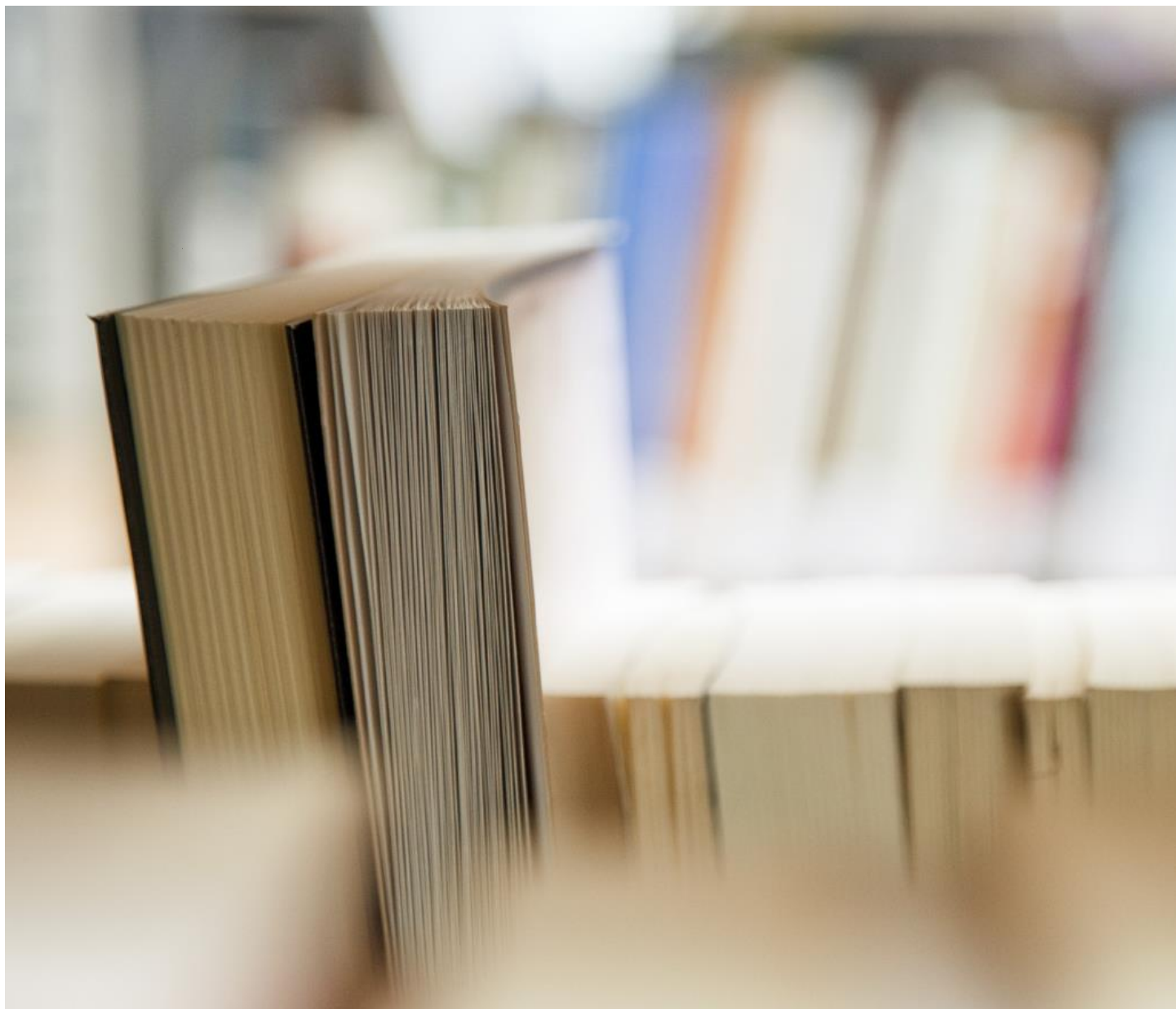




کروماتو گرافی گازی

گرد آوری شده توسط محمد نقلانی

مطلب این مبحث

- ۱- مقدمه از کروماتوگرافی گازی : ۲
- ۲- دستگاه وری کروماتوگرافی گازی : ۲
- ۱-۲ ستون : ۲
- ۲-۲ دستگاه گرم کننده : ۳
- ۳-۲ فاز گازی : ۳
- ۴-۲ Detector (شناسا گر) : ۳
- ۱-۴-۲ آشکارسازهای یونی - شعله ای (FID) : ۳
- ۲-۴-۲ آشکارسازهای قدرت هدایت گرما (TCD) : ۴
- ۵-۲ پورتهای تزریق نمونه : ۴
- ۳- روش کار کروماتوگرافی گازی : ۵
- ۴- ترکیبات فاز ثابت در کروماتوگرافی گازی ۶
- ۱-۴ ترکیبات غیر قطبی : ۶
- ۲-۴ ترکیبات نیمه قطبی : ۶
- ۵- گازهای حامل مورد استفاده در کروماتوگرافی گازی (به ترتیب ارزش و کیفیت) ۶
- ۶- مثالی از کاربرد کروماتوگرافی گاز در علم گیاهان دارویی و کشاورزی ۶
- ۷- برخی از Error های دستگاه و منبع ایجاد Error : ۶
- ۸- Apparatus ۷
- ۹- کار با نرم افزار دستگاه : ۹
- ۱۰- کالیبراسیون : ۱۱
- ۱۱- منابع : ۱۱

۱- مقدمه از کروماتوگرافی گازی :

کروماتوگرافی گازی یک روش فیزیکی جداسازی عصاره است. با تبدیل کردن عصاره مورد نظر به بخار یا گاز و عبور آن از یک فاز ساکن اجزاء سازنده اش را از یکدیگر جدا می کنند. حاصل این جداسازی تعیین نوع و مقدار اجزاء سازنده در مخلوط است. یا به عبارت دیگر اطلاعات کمی و کیفی مواد موجود در عصاره را مشخص می کند.

این نوع کروماتوگرافی برای شناسایی اسانس ها و ترکیبات فرار و ترکیباتی که نقطه جوش پایین دارند استفاده می شود.

نکته : شرط جداسازی یک مخلوط بوسیله روش کروماتوگرافی گازی آن است که نمونه مورد آزمایش در حین حرارت و تبدیل شدن، به گاز تجزیه نشود.

۲- دستگاه وری کروماتوگرافی گازی :

۲-۱ ستون :

لوله باریک (قطر تا ۱mm) و طویل (تا ۱۶m هم می رسد) که از جنس فلز بوده و به صورت مارپیچ درون Oven (گرم کننده) قرار دارد. ستون از فاز ثابت پر می شود. هرچه طول لوله بیشتر باشد خالص سازی بهتر انجام می شود.

به طور کلی دو نوع ستون وجود دارد

❖ ستون آکنده (packed column)

❖ ستون موئینه (capillary column)

ستونهای آکنده : حاوی یک ماده جامد بی اثر و خرد شده می باشد که سطح آن با مایع فاز ساکن پوشانده شده است.

ستونهای آکنده اغلب به طول ۱/۵ تا ۱۰ متر و به قطر داخلی ۲ تا ۴ میلیمتر ساخته می شوند.

ستونهای موئینه : این ستونها معمولاً با قطر داخلی چند دهم میلیمتر می باشند. این ستونها در دو نوع ساخته می شوند

تیوپهای باز با سطح آغشته و تیوپهای باز با سطح جداری آغشته.

ستونهای باز با سطح آغشته شامل یک لوله موئینه می باشد که سطح آن با سیال ساکن پوشیده شده است. در ستونهای باز با سطح جداری، سطح لوله موئینه با مواد جاذب، مانند خاک دواتمی پوشیده می شود که فاز سیال جذب آن می شود. ستونهای موئینه بازده بالاتری نسبت به ستونها آکنده دارند. برای بدست آوردن نتایج دقیق دمای ستون باید در محدوده یک دهم درجه

کنترل شود. دمای بهینه ستون به دمای جوش نمونه بستگی دارد. با یک حساب سرانگشتی می توان گفت دمایی کمی بالاتر از میانگین دمای نقطه جوش نمونه، زمان جدایش ۲ تا ۳۰ دقیقه را نتیجه می دهد. دمای پایین کیفیت نتیجه خوبی می دهد اما زمان جدایش را افزایش می دهد. اگر نمونه شامل اجزاء با نقطه جوشهای خیلی متغیر باشد بهتر است از برنامه ریزی دمایی استفاده کنیم. در حین جداسازی دمای ستون افزایش می یابد. شکل زیر سه نوع فاز ساکن را نشان می دهد که براساس قطبیت دسته بندی شده اند.

۲-۲ دستگاه گرم کننده :

جهت گرم کردن ستون از ۳۵۰-۵۰ درجه سانتی گراد

۲-۳ فاز گازی :

از یک گاز بی اثر مانند آرگون یا ازت می باشد که نمونه را پس از حل کردن در اتر یا هگزان از ابتدای ستون وارد فاز گازی می کنند.

۲-۴ Detector (شناساگر) :

برای تشخیص ترکیبات خارج شده از ستون استفاده می شود و انواع مختلف دارد که یک از آنها Mass spectrometry (طیف سنج جرمی) می باشد که مستقیماً وزن مولکولی و ساختمان اجسام موجود در عصاره را تشخیص می دهد. از دتکتورهای دیگر می توان به دتکتور یونیزاسیون شعله ای و دتکتور جلب کننده الکترون اشاره کرد

۲-۴-۱ آشکارسازهای یونی - شعله ای (FID):

در آشکارسازهای FID خروجی ستون با هیدروژن و هوا مخلوط می شود و مشتعل می شود. ترکیبات آلی سوخته می شوند و تولید یون می کنند و الکترونهای الکتریسته را در شعله منتقل می کنند. یک پتانسیل الکتریکی زیاد بر روی نوک آتشرنه ایجاد می شود و یک الکتروود جمع کننده بالای شعله قرار می گیرد. جریان حاصله از اشتغال هر یک از ترکیبات آلی اندازه گیری می شود. FID به جریان (جرم) حساس است. به غلظت حساسیت ندارد و این مزیت را دارد که تغییرات در جریان فاز سیال اثری در جواب آشکارساز ندارد. FID برای ترکیبات آلی مفید است. بسیار حساس می باشد و پارازیت کمی دارد ولی متأسفانه نمونه را از بین می برد

۲-۴-۲ آشکارسازهای قدرت هدایت گرما (TCD) :

یک رشته فلزی هادی جریان در درون یک جریان گاز (گاز حامل) قرار می گیرد . جریان برق در رشته مقاومت به گرما تبدیل می شود و دما تا جایی بالا می رود که اتلاف توان گرمایی در رشته برابر با توان الکتریکی ورودی شود. رشته مقاومت ممکن است با تابش به سطح سردتر گرما از دست بدهد و همچنین باعث انتقال گرما به مولکولهایی می شود که با آن برخورد می کند. اضافه کردن یک ترکیب (نمونه مورد آزمایش) به گاز حامل باعث تغییر در قدرت هدایت گرمای جریان گاز و در نتیجه تغییر دمای رشته مقاومت می شود که این باعث تغییر مقاومت الکتریکی رشته می شود. اساس کار این آشکارگر اندازه گیری تغییر قدرت هدایت رشته به علت وارد کردن نمونه می باشد . در آشکارسازهای (TCD) از چهار رشته مقاومت استفاده می شود که به صورت پل و تسون سوار می شوند و از آنها یک جریان ثابت عبور می دهند . دو تا از این رشته ها در قسمت خروجی ستون ، جایی که اجزاء جدا شده نمونه جریان دارند قرار می گیرند و دو تای دیگر قبل از تزریق کننده یا در یک ستون مربع جداگانه قرار می گیرند هر تغییری در مقاومت باعث بهم خوردن تعادل در پل و تغییر ولتاژ می شود که این ولتاژ به صورت مستقیم اندازه گیری می شود . قدرت مولکولهای سرد کننده در حمل و انتقال گرما به هدایت گرمایی آنها بستگی دارد . هیدروژن و هلیوم قدرت هدایت گرمایی بالاتری دارند در نتیجه در خنک کردن رشته مقاومت کارآمدتر از دیگر گازها می باشند . ساسیت آشکارساز TCD مستقیماً وابسته به شدت جریان عبوری از آن می باشد و تقریباً با توان دو جریان پل افزایش می یابد . علاوه بر آن اگر اختلاف دمای بلوک و رشته های مقاومت افزایش یابد ، حساسیت افزایش می یابد . اما باید بخاطر سپرد که افزایش جریان پل از عمر رشته های مقاومت می کاهد .

۲-۵ پورتهای تزریق نمونه :

به منظور بالا بردن بازده ستون ، نمونه نباید زیاد بزرگ باشد و باید به طور جزئی و خیلی سریع تزریق شود. تزریق آرام یک نمونه بزرگ باعث افزایش پهنای باند و کاهش کیفیت داده ها می شود. روش رایج برای تزریق ، استفاده از میکروسرنگ و تزریق نمونه از غشاء لاستیکی از بالای ستون می باشد . در مورد دستگاه کروماتوگرافی گازی از تزریق کننده Split یا Splitless استفاده می شود . تزریق کننده می توانند در یکی از دو حالت Split یا Splitless مورد استفاده قرار بگیرد تزریق کننده شامل یک محفظه گرم شده می باشد که در آن یک جداره شیشه ای وجود دارد که از آن نمونه به غشاء لاستیکی تزریق می شود . گاز حامل وارد محفظه می شود و می تواند از سه مسیر خارج شود (هنگامی که تزریق کننده در حالت Split باشد) . نمونه تبخیر می شود و یک مخلوطی از گاز حامل ، حلال تبخیر شده و محلول تبخیر شده بوجود می آید . یک قسمت از این مخلوط از درون ستون عبور می کند ، اما قسمت عمده آن از

خروجی Split خارج می شود. خروجی قسمت تخلیه (septum purge outlet) از وارد شدن اجزاء به ستون جلوگیری می کند. معمولاً در نمونه های گازی به جای سرنگ از طریق شیر ورودی نمونه را وارد ستون می کنیم.

۳- روش کار کروماتوگرافی گازی:

عصاره را همراه یک گاز بی اثر از درون ستون حاوی ماده جاذب عبور می دهند. گاز حامل باید یک گاز بی اثر باشد تا با فاز ساکن، حلال و یا نمونه واکنش ندهد، به همین دلیل معمولاً از نیتروژن یا هلیوم استفاده می شود. در دمای ثابت، فشار و سرعت جریان گاز به طرف ستون را با تنظیم کننده فشار و جریان سنج، ثابت نگه می دارند.

در کروماتوگرافی گازی، فاز متحرک یک گاز است. فاز ساکن یک ماده جاذب جامد یا مایع پوشش داده شده و یا دارای پیوند با یک جامد بر روی دیواره ستون است. اگر فاز ساکن جامد باشد، روش را کروماتوگرافی گاز-جامد (GSC) و اگر فاز ساکن مایع باشد، روش را کروماتوگرافی گاز-مایع (GLC) می نامند. هر چند هر دو روش در تجزیه به کار می روند ولی GLC بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد. جدا شدن اجزای یک نمونه فرار در GLC بر اساس تقسیم آنها بین دو فاز مایع و گاز است. نمونه در فاز متحرک حل شده و فاز ساکن یک مایع دیرجوش است که به صورت لایه نازکی ($0.25 - 5 \mu\text{m}$) بر روی ذرات یک جامد گسترده شده است. نمونه مورد مطالعه را با اتر یا هگزان حل کرده و به دستگاه تزریق می کنند بعد نمونه از محفظه تزریق وارد جریان گاز بی اثر شده و همراه گاز وارد ستون شده جریان می یابد و اجزای آن بر حسب ضریب توزیع خود بین دو فاز گاز-مایع (GLC) و یا گاز-جامد (GSC) تقسیم می شوند. در نتیجه اجزای موجود در نمونه بر حسب تمایلی که ستون برای نگهداری آنها دارد از یکدیگر جدا شده و به وسیله عبور گاز حامل، اجزاء عصاره جدا می شوند و وارد دتکتور شده و ثبت کننده آنها را به صورت پیک های نشان می دهد. با مطابقت دادن هریک از پیک ها با پیک استاندارد ترکیبات بدست آمده را شناسایی می کنند.

در این نوع کروماتوگرافی ماهیت فاز ثابت و درجه حرارت عملیات بسیار مهم و تعیین کننده است

جنس فاز ثابت در ستون بسیار مهم است زیرا بر اساس جنس فاز ثابت می توان ترکیبات گوناگون را جدا کرد. قابل ذکر است که تفاوت بین ستون های مختلف به خاطر جنس فاز ثابت آنهاست. یا به عبارت دیگر جذب یا عدم جذب ترکیبات در ستون به جنس فاز ثابت بستگی دارد. مثلاً اگر جنس فاز ثابت غیر قطبی باشد وقتی نمونه تزریق می شود ترکیبات قطبی زودتر خارج می شوند و ترکیبات غیرقطبی به ستون می چسبند و دیرتر بر حسب مقدار پلاریته خود از ستون خارج می شوند. ترکیبات براساس پلاریته های مختلف جذب ستون می شوند و در زمانهای مختلف از آن خارج می شوند.

۴- ترکیبات فاز ثابت در کروماتوگرافی گازی

۴-۱ ترکیبات غیر قطبی :

۱- روغن های سیلیکون (۲۰۰-۲۲۵۰C) - پارافین (۱۰۰۰C) (می توان ستون را حرارت داد)

۳- اسکوالن (۷۵۰C)

۴-۲ ترکیبات نیمه قطبی:

الکل ها با نقطه جوش بالا و استرهای آنها (۱۰۰-۲۲۵۰C)

ترکیبات شدیداً قطبی :

پروپیلین گلیکول ها و استرهای مربوطه (۲۲۵۰C)

۵- گازهای حامل مورد استفاده در کروماتوگرافی گازی (به ترتیب ارزش و کیفیت)

✓ هیدروژن

✓ هلیوم

✓ نیتروژن

✓ آرگون

۶- مثالی از کاربرد کروماتوگرافی گاز در علم گیاهان دارویی و کشاورزی

برای بررسی روغن های فرار (اسانس ها)، اسیدهای گیاهی، برخی آلكالوئیدها (تریاک، تنباکو، شوکران و مشتقات تروپان)، برخی رزین ها، ترکیبات استروئیدی و اندازه گیری باقی مانده حشره کش ها بر روی غلات.

۷- برخی از Error های دستگاه و منبع ایجاد Error :

Pwr : مشکل در منبع برق

Fan : سرعت فن کوره نادرست است

Trp : مشکل محفظه

Ove : گیرنده کوره مشکل دارد

Ij1 : مشکل در گیرنده تزریق کننده ۱

Ij2 : مشکل در گیرنده تزریق کننده ۲

Dt1 : مشکل در گیرنده آشکارساز ۱

Dt2 : مشکل در گیرنده آشکارساز ۲

۸- Apparatus

کوره : یک کوره ی الکتریکی است که دمایی در حدود 1100°C به وجود می آورد که این دما می تواند نمونه را به طور کامل پیرولیز کرده و با توجه به حضور اکسیژن به CO_2 تبدیل نماید

لوله ی احتراق : از کوارتز و به طوری ساخته شده است که اجازه ی تزریق مستقیم را به وسیله ی سرنگ به داخل ناحیه ی گرم اکسید کننده می دهد. با توجه به نوع نمونه ای که داریم Combustion tube می تواند دارای اشکال مختلف باشد. دهانه ی لوله ی احتراق باید آنقدر بزرگ باشد تا نمونه بتواند از Sample boat عبور کند Combustion tube . دارای دو لوله ی جانبی در ابتدای لوله می باشد که یکی از آن ها برای عبور اکسیژن و دیگری برای عبور مخلوط گاز اکسیژن و گاز حامل است.

کنترل جریان : دستگاه می بایست مجهز به یک سیستم کنترل کننده ی جریان باشد که بتواند یک جریان ثابت از گاز حامل و اکسیژن، وارد لوله ی احتراق شود

تله آبگیر : قبل از اینکه گاز وارد Detector شود باید H_2O آن گرفته شود این کار به وسیله Drier tube انجام می شود که مانند exchanger عمل می کند. یک لوله ی موئینه باریک داخل آن وجود دارد که به صورت shell and tube می باشد و به صورت نیمه تراوا عمل می کند و به صورت انتخابی آب را جذب کرده و به shell انتقال می دهد. آب از ناحیه ی shell عبور کرده و آبی که در این ناحیه قرار دارد، توسط گاز درون Detector به بیرون دستگاه Vent می شود

UV Florescence Detector : که می تواند نور انتشار یافته از فلورسانس را برای ما Detect کند.

Micro liter syringe : برای نمونه های liquid 5-20ml مورد استفاده قرار می گیرد. طول Needle آن باید $50\text{mm} \pm 5$ باشد. طول نیدل بسیار قابل اهمیت می باشد، اگر طول نیدل خیلی زیاد باشد زمانی که در منطقه گرم قرار می گیرد، Needle بسته می شود. (این عمل یا باعث ذوب شدن نیدل یا سبب رسوب نمک های موجود در محلول می شود).

Sample inlet system : با توجه به نوع نمونه سیستم ورودی دارای اشکال مختلف می باشد

Gas-LPG Sample inlet system

Syringe sample inlet system

Salid sample inlet system

Refrigerated Circulator :

یک وسیله ی قابل تنظیم می باشد که می تواند با به کارگیری یک مایع خنک کننده با سرعت مشخصی دما را تا 4°C کاهش دهد. این وسیله معمولاً "زمانی مورد استفاده قرار می گیرد که نمونه ی جامد داشته باشیم. دقت balance باید به صورت $0.01 \pm$ باشد.

Reagent:

اکسیژن خشک

خلوص 99.75%؛ فشار 3bar؛ 400-650ml/min؛ حداکثر آب 5ppm

آرگن خشک

خلوص 99.99%؛ فشار 3bar؛ 50-200ml/min؛ حداکثر آب 5ppm

تولون، زایلن، ایزو اکتان که به عنوان حلال استفاده می شوند نیز باید کاملاً "Pure" و عاری از ترکیبات سولفور باشد. دی بنزو تیوفن (Di benzo thiophen) به عنوان استاندارد استفاده می شود

Hazards:

در این Method از دمای خیلی بالا استفاده می شود، لذا هنگام استفاده از مواد آتشگیر باید دقت خیلی بالایی داشته باشیم

Preparation off apparatus

بررسی تمامی قسمت های عبور گاز برای نداشتن leakage، در صورت داشتن مقادیر بسیار کم نشتی نیز امکان Detect سیگنال برای دستگاه وجود نخواهد داشت.

Temperature $1100 \pm 25^{\circ}\text{C}$

Furnace oxygen 400-500

Inlet O₂ 10-30ml/min

Inlet carrier 130-160ml/min

۹- کار با نرم افزار دستگاه:

برای شروع کار با دستگاه کافی است بر روی آیکون آن که بر روی صفحه ی میز کار کامپیوتر قرار دارد، کلیک نماییم که شکل زیر نمایان می شود :

Demo mode : با انتخاب این حالت نرم افزار مستقل از سخت افزار عمل کرده و یک چراغ نشانگر سبز رنگ این حالت را در تمام صفحات نشان می دهد؛ در این حالت نرم افزار به طور کامل شرح داده می شود .

Normal operation : اگر این حالت انتخاب شود نرم افزار به طور عادی شروع به کار می کند و ارتباط بین نرم افزار و سخت افزار برقرار شده و می توان آنالیز را انجام داد .

پس از کلیک روی آیکون Antek حالت زیر را خواهیم داشت :

۱. متد فعال را نشان می دهد .

۲. به استفاده کننده اجازه می دهد تا وارد صفحه شود .

۳. مشخصات مربوط به استفاده کننده نمایش داده می شود .

۴. استفاده کننده از صفحه ی اصلی خارج می شود .

۵. براحتی به help نرم افزار دسترسی پیدا می نماییم .

۶. از برنامه خارج می شویم.

این نرم افزار دارای سیستم های حفاظتی قوی می باشد که به سطوح مختلفی طبقه بندی می شود ، که به صورت زیر می باشد :

سطح Antek : که مربوط به کارخانه ی سازنده است و دسترسی کامل به تمام قسمت های نرم افزار را دارا می باشد .

سطح ۱ : به بیشتر جنبه های نرم افزار به جزء تنظیم اولیه ی دستگاه دسترسی دارد و مربوط به Head chemist می باشد.

سطح ۲ : به اکثر قسمت های نرم افزار به جزء تنظیم اولیه دستگاه و تغییر کاربرها دسترسی دارد.

سطح ۳: در این سطح کاربر فقط می تواند نمونه را آنالیز کرده و قسمت کالیبراسیون را نیز مشاهده نماید و نمی تواند کالیبراسیون را تغییر دهد .

برای ورود به صفحه ی اصلی دکمه ی log on را فشار داده که از ما pass word می خواهد و pass word سیستم (HC) می باشد ، pass word را وارد کرده و دکمه ی ok را فشار می دهیم .

اگر سطح دسترسی شما به نرم افزار ، سطح Antek ، سطح ۱ یا سطح ۲ باشد ؛ صفحه ی زیر نمایش داده می شود:

که برای سطح ۳ ؛ دکمه های کالیبراسیون و Method نشان داده نمی شود .

Method : با فشار دادن این دکمه به متد فعال دسترسی پیدا کرده و می توان قسمت های مختلف آن را کنترل و یا تغییر داد . Calibration: به قسمت کالیبراسیون دسترسی پیدا کرده که تمامی داده های کالیبراسیون ، منحنی کالیبراسیون و جدول کالیبراسیون تنظیم و ذخیره می شوند .

Sample: می توان آنالیز بر روی نمونه را انجام داد و در ضمن به تمامی داده های روزانه دسترسی پیدا کرد .

Method notes : اطلاعات و مشخصات مربوط به متد در اینجا نوشته می شود .

۱۰- کالیبراسیون :

برای کالیبراسیون دستگاه می بایست دکمه ی کالیبراسیون را فشار داد ،دراین حالت برای حالت های مختلف نمونه (جامد ،مایع ،گازو LPG) می بایست متد های مختلفی داشته باشیم که در هر کدام از این متدها با استانداردهای مشخصی کالیبره می شوند. بر روی دکمه ی Run کلیک کرده و سپس گزینه ی استاندارد را انتخاب می کنیم و پس از وارد کردن مقدار استاندارد دکمه ی Next را فشار می دهیم و دستگاه آماده ی تزریق می شود .

سپس از طریق سیستم ورودی نمونه ،نمونه را وارد دستگاه کرده و دکمه ی inject را فشار می دهیم که می توان سیگنال مربوط به نمونه را روی صفحه ی کامپیوتر مشاهده کرد.

به همین ترتیب برای استانداردهای دیگر نیز عمل می نماییم ،تمامی داده های مربوط به کالیبراسیون در قسمت جدول کالیبراسیون ذخیره می شود که می توان از طریق زیر آنها را مشاهده کرد . View > calibration table

۱۱- منابع :

۱. وبسایت: <http://www.forum.98ia.com>
۲. دانشنامه رشد
۳. سایت ویکی پدیا
۴. مباحث تدریس شده توسط استاد عزیز جناب آقای دکتر افشین رجبی خرمی
۵. کتاب کروماتوگرافی