کارگاه آموزشی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

برگزار کننده : معاونت غذا وداروی دانشگاه علوم پزشکی تهران

محل برگزاری : دانشگاه تهران-دانشکده داروسازی

تاریخ برگزاری : ۱۴ الی ۱۵ شهریور ۹۰

کروماتوگرافی

کروماتوگرافی پرکاربردترین شیوهٔ جداسازی تجزیه ای است که در تمام شاخه های علوم به کار میرود .کروماتوگرافی گروه گوناگون و مهمی ازروش های جداسازی را شامل می شود و امکان می دهد تا اجزای سازندهٔ نزدیک به همِ مخلوط های کمپلکس را جدا، منزوی و شناسایی کند.بسیاری از این جداسازی ها با روش های دیگر ناممکن است.
کروماتوگرافی متکی بر حرکت نسبی دو فاز است ولی در کروماتوگرافی یکی از فازها بدون حرکت است و فاز ساکن نامیده می شود و دیگری را فاز متحرک می نامند .اجزای یک مخلوط به وسیله جریانی از یک فاز متحرک از داخل فاز ساکن عبور داده می شود .جداسازی ها بر اساس اختلاف در سرعت مهاجرت اجزای مختلف نمونه استوارند.

روش های کروماتوگرافی

روش های کروماتوگرافی را می توان ابتدا بر حسب ماهیت فاز متحرک و سپس بر حسب ماهیت فاز ساکن طبقه بندی کرد. فاز متحرک ممکن است گاز یا مایع و فاز ساکن ممکن است جامد یا مایع باشد. بدین ترتیب فرایند کروماتوگرافی به چهار بخش اصلی تقسیم می شود.اگر فاز ساکن جامد باشد کروماتوگرافی را کروماتوگرافی جذب سطحی و اگر فاز ساکن،مایع باشد کروماتوگرافی را تقسیمی می نامند.

انواع کروماتوگرافی

کروماتوگرافی ژلی، کروماتوگرافی تبادل یونی، کروماتوگرافی لایهٔ نازک، کروماتوگرافی جذب سطحی، کروماتوگرافی مایع جامد، کروماتوگرافی گاز مایع ، کروماتوگرافی کاغذی، کروماتوگرافی تقسیمی، کروماتوگرافی مایع مایع، کروماتوگرافی گاز جامد، کروماتوگرافی ستون موئین

کاربردهای HPLC

کاربرد گسترده آن برای موادی است که در صنعت،زمینه های مختلف علوم و جامعه اهمیت درجه اول را دارند،مثال هایی از این موارد عبارتند از: اسیدهای آمینه ، پروتئین ها ، اسیدهای نوکلئیک ، هیدراتهای کربن ، داروها ، ترپنوئیدها، حشره کش ها ، آنتی بیوتیکها ،استروئیدها ، گونه های آلی و گروهی از مواد گوناگون معدنی.

سیستم های کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

در روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، پیوسته تمامی مراحل مختلف کروماتوگرافی با استفاده از یک سیستم اعمال فشار هیدرولیک از طریق پمپ انجام می گیرد .جهت انجام یک چنین فرایندی می توان از یک سیستم معمولی متشکل از پمپ، آشکار ساز و ثبات ذیل آورده شده است ,بعلاوهٔ یک سیستم ایجاد گرادیان استفاده کرد .بهرحال اساس کار سیستم های فوق یکی بوده و در واقع جهت ایجاد یک سیستم کروماتوگرافی مایع بر روی ستونهای کروماتوگرافی مختلف (جهت انجام روشهای متفاوت) بکار می روند .تفاوت کار در این سیستم ها تفاوت در میزان فشار اعمال شده در مراحل مختلف، تفاوت در مرحلهٔ انجام کروماتوگرافی از سلسله مراحل فرایند تخلیص از نظر استراتژی تخلیص و تفاوت در مقیاس کار (از نظر آنالیتیکال، کار صنعتی و یا نیمه صنعتی)است.

قسمتهای مختلف دستگاه کروماتوگرافی مایع

۱- فاز متحرک(حلال)

۲- محل قرار گرفتن شیشه های فاز متحرک (Reservoir Box)

۳- خارج کننده گاز حل شده در حلال(Degasser)

۴- گرادیانت میکسر(Gradient Mixer)

۵- پمپ(Pump)

۶- لوله های ارتباط دهنده (tubing)

۷- نمونه گذار اتوماتیک یا تزریق کننده دستی

۸- آون ستون(Column Oven)

۹- ستون (Column)

۱۰- آشکار ساز (Dtector)

۱۱- انتگراتور یا کامپیوتر

فاز متحرک ، حلال:

خصوصیات فاز متحرک(HPLC)

•خلوص بالا

•نقطه جوش حدود ۲۰ تا ۵۰ بالاتر از دمای ستون

•گرانروی پایین

•واکنش پذیری کم

•قابلیت تطابق با آشکارساز

•سمیت و اشتعال پذیری کم

فاز متحرک حاوی مخلوطی از حلال های قطبی نظیر الکل و غیر قطبی نظیر هیدروکربنها است .با کنترل ترکیب و قطبیت فاز متحرک درروش گرادیان حلال می توان زمان و حجم باز داری مواد را در ستون HPLC کنترل نمود.فاز متحرک در HPLC باید چنان انتخاب شود که در آشکار ساز مزاحمت ایجاد نکند . معمولا مخلوط های متانول , اتانول یا پروپانول با هپتان و کلروفرم با هپتان را به عنوان فازمتحرک درHPLC مورد استفاده قرار می دهند .درHPLC فاز معکوس عموما از مخلوط متانول یا استونیتریل با آب به عنوان فاز متحرک استفاده می شود. اگر فاز ثابت قطبی و فاز متحرک غیرقطبی باشد سیستم را فاز نرمال و در صورتی که ستون غیرقطبی و حلال قطبی باشد .سیستم را فاز معکوس می گویند.

اگر بخواهیم برای فاز متحرک حلالهایی را با هم مخلوط کنیم باید قبل از وارد کردن به دستگاه مقداری از آن را با هم مخلوط کرد و برهمکنش آنها را با هم مشاهده کرد چون ممکن است در اثر اختلاط رسوب یا امولسیون دهند که در دستگاه ایجاد مشکل کند.اگر بخواهیم حلال دیگری بعنوان فاز متحرک وارد ستون کنیم باید دقت کرد که با حلال قبلی که درون ستون بوده قابل اختلاط باشد تا ایجاد مشکل نکند.مثلا بعد از حلال بافر نباید از حلال آلی استفاده کرد چون حلال بافر ایجاد رسوب می کند که ابتدا باید شستشو شود و بعد حلال آلی را وارد کرد.

حلال های HPLC grad (مثل متانول و استونیتریل) اگر از منبع مطمئن تهیه شده باشدنیازی به صاف کردن ندارد اما اگر دوست داشته باشید می توانید صاف کنید.برای صاف کردن حلال متانول باید از صافی از جنس نایلون یا PFT استفاده کرد نه از صافی سلولزی.

خصوصیات آبی که بعنوان فاز متحرک از آن استفاده می شود : آب دو بار تقطیر در صورتی که حاوی ذرات ریز نباشد برای HPLC مناسب است و لازم نیستد دیونیزه باشد. هدایت الکتریکی آب هم باید ۰/۲ میکروزیمنس باشد. توصیه می شود اگر ذراتی در آب است از آن استفاده نشود ،چون ممکن است این ذرات میکروارگانیسم باشد که با فیلتر شدن جدا شود ولی موادی از خود ترشح کرده باشند که در آب محلول بوده و با فیلتر شدن جدا نشود و در ستون ایجاد مشکل کند.

آب HPLC grad را می توان در ظروف شیشه ای ۲/۵ لیتری با مارک Merck تهیه کرد البته بعد از باز شدن درب بطری تا دو هفته قابل استفاده است.

محل قرار گرفتن حلال Reservoir Box

جهت عدم اشتباه از انتخاب ظروف حلال مورد استفاده دردستگاه بهتر است کلیه ظروف برچسب مشخص نمودن محتوی را داشته باشندو در مکان مشخص که همان Reservoir Box میباشد نگهداری گردند.

دستگاه خارج کننده گاز حل شده در حلالDegasser

جهت خارج کردن گازهای حل شده در مایع علاوه بر روش فوق از اولتراسونیک نمودن ماده نیز باید سود جست بخصوص برای دتکتورهای FLD چنانچه فاز متحرک گاز زدایی نگردیده باشد باعث بالا رفتن خط پایه می گردد

گرا دیانت میکسرGradient Mixer

روش گرادیانت gradient: اجزاء فاز متحرک در مخازن مختلف ریخته می شود.دستگاه قابلیت این را دارد که خود نسبتهای مختلف حلال را از مخازن برداشت کند و با تغییر پارامترهای تاثیر گذار فاز متحرک جداسازی بهتری صورت گیرد.

قبل از انجام کار با HPLC باید تست صحت گرادیان را انجام داد.برای این کار دستگاه به ستون نیاز ندارد و دستگاه را از دو طرف به یونیون (یک رابط) وصل می کنیم بنابراین فشاری به پمپ ایجاد نمی شود و دتکتور را روی ۲۵۰ نانومتر تنظیم می کنیم.

پمپ Pump

به دلیل استفاده از ستونها نسبتا طویل و اندازه ذرات کم ، قابلیت نفوذ کم شده و برای این که حلال جریان داشته باشد باید فشار بالایی اعمال گردد برای ایجاد فشار از پمپ استفاده می کنیم . .پمپ فشاری حدود ۴۵۰۰ psi می تواند ایجاد کند و باید بتواند فشارثابتی ایجاد نماید.حلال توسط پمپ با فلوی ثابتی بر روی فاز ثابت حرکت داده می شود.

لوله های ارتباط دهنده Tubing

لوله هایی که قسمت های مختلف دستگاه را به هم وصل می کند.جنس این لوله ها می تواند استیل و یا پلیمر باشد.
در کروماتوگرافی معمولی هم از رابط پلیمری استفاده می شود چون اتصالات آن راحتر بوده و ارزانتر است و هم انعطاف پذیری بهتری دارد.در اتصالات استیل ممکن است گپی ایجاد شود که باعث ایجاد حجم مرده در ستون می شود.
جایی که حلال اسیدی و فشار کم است و یا یون داشته باشیم باید از رابط پلیمری استفاده کرد.
باریکترین لوله ها مربوط به ته ستون تا آشکارساز است.برای اینکه نمونه پشت سر هم بیفتد و پیک های آنها روی هم قرار نگیرد.
در خروجی آشکار ساز فلورسانس باید یک متر لوله ۰/۵ استفاده شود چون درون آن حباب ایجاد می شود.

نمونه گذار اتوماتیک یا تزریق دستی کننده

وظیفه سوارکردن حجم مشخصی از نمونه بر روی فاز متحرک جهت وارد کردن به ستون را دارد.

آون ستون Column Oven

وظیفه تثبیت شرایط دمایی جهت انجام آزمون تحت شرایط یکسان برای کلیه نمونه ها و همچنین ایجاد شرایط دمایی گفته شده در روش را دارد.

ستونColumn

در ستون کروماتوگرافی جسم بین فازهای مایع و جامد توزیع میشود .فاز ساکن اجزای مایعی را که از آن میگذرد به طور انتخابی در سطح خود جذب میکند و آنها را جدا میکند .اثرهایی که باعث جذب سطحی میشوند همان اثرهایی هستند که موجب جذب در مولکولها میشوند.این اثرها عبارتند از: جاذبه الکترواستاتیکی، ایجاد کمپلکس، پیوند هیدروژنی، نیروی واندروالس و غیره.
ستون نقش اصلی را در جداسازی ایفا می کند و بسیاری از مشکلات در جداسازی مربوط به ستون است.

خصوصیات ستون ازلحاظ فیزیکی: زمانی که یک ستون را خریداری می کنیم مشخصات آن مهم است که عبارتنداز:
۱-سازنده ستون ۲- packing اصلی ستون ۳-لیگاندی که بر روی ستون سوار می شود ۴-قطر ستون ۵-طول ستون ۶- سایز ذرات ستون
هر چه سایز ذرات ستون ریزتر باشد سطح تماس بیشتر است و جداسازی بهتر صورت می گیرد و پیک ها شارپ تر است اما فشار بر پمپ بیشتر است.
هر چه ذرات درشت تر باشد سطح تماس کمتر و پیک ها پهن تر است و چنین ستون هایی برای جداسازی ذرات بزرگتر مثل پروتئین ها کاربرد دارد.

انواع ستون ها از نظرفیزیکی: ۱- Microbove : قطر داخلی کم –برای حجم های خیلی کم
۲- std.analytical: ستون استاندارد که بیشترین کاربرد را دارد
۳- preparative: ازاین سوم معمولا بعد از ستون دوم استفاده می شود

خصوصیات ستون از لحاظ شیمیایی:ستون هایی که معمولا استفاده می شوند از جنس سیلیکات هستند.چون ستون های سیلیکاتی در مقابل حلال های آلی بطور وسیعی مقاوم هستند ،خیلی ارزان بوده و معمولا با مواد شیمیایی دیگر بر همکنشی ندارند.محدودیت هایی که اینگونه ستون ها دارند محدود بودن رنج pH (۲/۵ تا ۷) است یعنی در PH های بازی مشکل دارند.

ستون های رزینی محدودیت pH ندارند اما در مقابل اعمال فشار و حلال های آلی محدودیت دارند، مثلا حلال هایی مثل کلروفرم نباید برای آنها استفاده شود.

جدیدا ستون های جدیدی از سیلیکات موجود است که تا PH=۱۱ قابل استفاده است ولی ترجیحا بهتر است در PH های بالاستفاده نشود.

برای شستشوی ستون اگر ستون حاوی بافر است بهتر است ستون با آب تنها شسته نشود توصیه می شود که حداقل ۰/۲ درصد متانول یا استونیتریل به آن اضافه شود. در مورد ستون هایی که فاز متحرک بافر و یک حلال آلی است برای شستشوی آن بهتر است از همان حلال آلی و آب استفاده کرد.

بهترین حلال برای نگهداری ستون آب بدون متانول می باشد البته باید به برشور ستون هم توجه کرد.

آشکار سازDetector

دتکتور وجود واندازه ماده ای که ازستون خارج می شود را اندازه گیری می کند.درواقع فراوانی وچگالی اثرعبوریک ماده شیمیایی رابه جریان یا ولتاژالکتریکی متناسب با فراوانی غلظت تبدیل می کند.بسته به نوع ماده ای که می خواهند آنالیز کنند ،نوع دتکتور و نحوه عمل آن متفاوت است وحدآشکارسازی آنها متفاوت می باشد.

نکات مهم

- زمانیکه نمونه را داخل لوپر تزریق می کنیم نباید بلافاصله سرنگ را برداشت زیرا ممکن است ایجاد خلا کند بعد از inject شدن (اتصال) باید سرنگ را برداشت.
- برای تزریق نمونه به دستگاه بهتر است نمونه در همان فاز متحرک حل شود تا در طیف ایجاد noise نکند.
- بعد از تزریق نمونه به دستگاه باید دسته injector را چرخاند تا فشار پمپ آنرا به آشکارساز هدایت کند.
- خطا در injector : ممکن است در لوله های مربوط به injector خراش ایجاد شود که باعث نشتی می شود.خراش ایجاد شده بیشتر بر اثر املاح نمکی حاصل از بافر ها است یعنی بعد از استفاده از بافر دردستگاه ،شستشو بخوبی انجام نشده و کریستال های نمک در دستگاه مانده و ایجاد خراش در injector که جنس آن از پلیمر است می کند.
- در دستگاه HPLC قبل از ستون باید از یک grad استفاده کرد چون ذرات اضافی در grad گیر کرده و به ستون نمی رسد و باعث می شود طول عمر ستون بیشتر شود.
- برای چک کردن تکرارپذیری دستگاه ۵ تزریق را از یک نمونه با حجم های متفاوت ۱۰،۲۰،۳۰،۴۰،۵۰ یعنی رویهم ۲۵ تزریق را انجام می دهیم.
- در یک نوع از دستگاه HPLC حلال ها قبل از اینکه وارد پمپ شوند با هم مخلوط می شوند اما در نوعی دیگر حلال ها بعد از عبور از پمپ مخلوط می شوند که نوع دوم بهتر است