



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی

جهرم

معاونت غذا و دارو - آزمایشگاه کنترل مواد غذایی، آشامیدنی، آرایشی و بهداشتی

راهنمای آشنایی با دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)

تهیه کننده : بهروز مصلی نژاد - کارشناسی ارشد شیمی تجزیه

اردیبهشت ۱۴۰۴

فهرست مطالب

۱. کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و انواع آن.....	۲
۱.۱ جذب/وا جذب سطحی.....	۲
۱.۲ تبادل.....	۳
۱.۳ تبادل یون.....	۴
۱.۴ اندازه طردی.....	۵
۱.۵ کروماتوگرافی تمایلی.....	۵
۲. کروماتوگرافی مایع برای جداسازی چه ترکیباتی مناسب است؟.....	۶
۳. دستگاهوری کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا.....	۶
۳.۱ حلال‌ها.....	۷
۳.۱.۱ ویژگی‌های حلال‌های کروماتوگرافی مایع.....	۷
۳.۱.۲ انواع حلال‌های کروماتوگرافی مایع.....	۷
۳.۱.۳ انواع شویح حلال‌ها در کروماتوگرافی مایع.....	۸
۳.۲ سیستم انتقال حلال.....	۸
۳.۲.۱ ظروف نگهدارنده حلال.....	۸
۳.۲.۲ سیستم گاززدایی از حلال‌ها.....	۹
۳.۲.۳ پمپ.....	۱۰
۳.۳ سیستم تزریق نمونه.....	۱۰
۳.۳.۱ تزریق دستی.....	۱۰
۳.۳.۲ تزریق اتوماتیک (خودکار).....	۱۲
۳.۴ ستون.....	Error! Bookmark not defined.
۳.۵ دتکتور (آشکارساز).....	Error! Bookmark not defined.
۳.۵.۱ دتکتور ماوراء بنفش-مرئی.....	۱۳
۳.۵.۲ دتکتور فلورسانس.....	۱۴
۳.۵.۳ دتکتور ضریب شکست.....	۱۵
۳.۵.۴ دتکتور هدایت (الکتروشیمیایی).....	۱۶

۱- کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و انواع آن

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا^۱ یکی از مهم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین انواع روش‌های جداسازی مواد به شمار می‌آید. همان‌طور که از اسم آن پیداست، این تکنیک با هدف جدا کردن ترکیبات استفاده می‌شود. همانند دیگر روش‌های کروماتوگرافی، اساس کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، برهمکنش میان فاز متحرک^۲ (حامل نمونه) و فاز ساکن^۳ است. در این تکنیک، فاز متحرک به صورت مایع است. اما، فاز ساکن می‌تواند به صورت جامد یا مایع باشد. به همین خاطر، نوع کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا می‌تواند براساس ماهیت فاز ساکن تغییر کند.

جدول ۱. انواع کروماتوگرافی مایع براساس ماهیت فاز ساکن

نوع کروماتوگرافی مایع	ماهیت فاز متحرک	ماهیت فاز ساکن	نوع برهمکنش نمونه با فاز ساکن
مایع-جامد (جذبی)	مایع	جامد	جذب/واجذب ^۴ سطحی
مایع-مایع (تبادلی)	مایع	مایع	تبادل ^۵ میان فاز مایع و مایع
تبادل یون ^۶	مایع	رزین تبادل یون	تبادل یون
اندازه طردی ^۷	مایع	پلیمری یا سیلیکایی	جداسازی براساس سایز مولکول‌ها
تمایلی ^۸	مایع	لیگندهای تثبیت شده روی فاز ساکن	واکنش بین لیگاند و رسپتور

همان‌طور که در جدول ۱ به آن اشاره شده است، براساس نوع کروماتوگرافی مایع، نوع برهمکنش نمونه (درون فاز متحرک) با فاز ساکن می‌تواند تغییر کند که شامل:

۱-۱ جذب/واجذب سطحی

این نوع برهمکنش فقط در انواعی از روش‌های جداسازی رخ می‌دهد که فاز ساکن آن‌ها جامد است نظیر کروماتوگرافی مایع-جامد. اساس آن، جذب یا اتصال سطحی نمونه (درون فاز متحرک) به فاز ساکن جامد، انجام واکنش و سپس واجذب آن است.

تفاوت جذب سطحی (Adsorption) با جذب (Absorption) در این است که در اولی هیچ‌گونه انتقال یا توزیع نمونه بین دو فاز صورت نمی‌گیرد، در حالی که در دومی توزیع نمونه بین دو فاز اتفاق می‌افتد.

¹ High performance liquid chromatography (HPLC)

² Mobile phase

³ Stationary phase

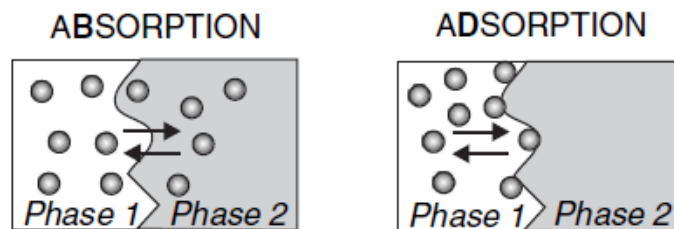
⁴ Adsorption/desorption

⁵ Partitioning

⁶ Ion exchange

⁷ Size exclusion

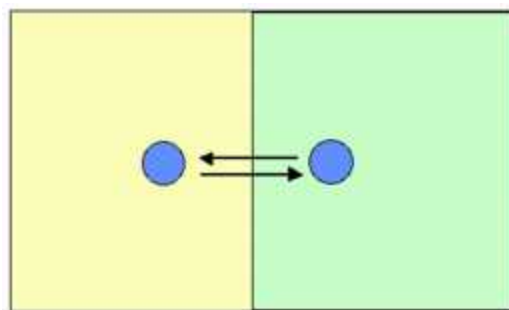
⁸ Affinity



شکل ۱. فرآیندهای جذب و جذب سطحی و تفاوت میان آنها.

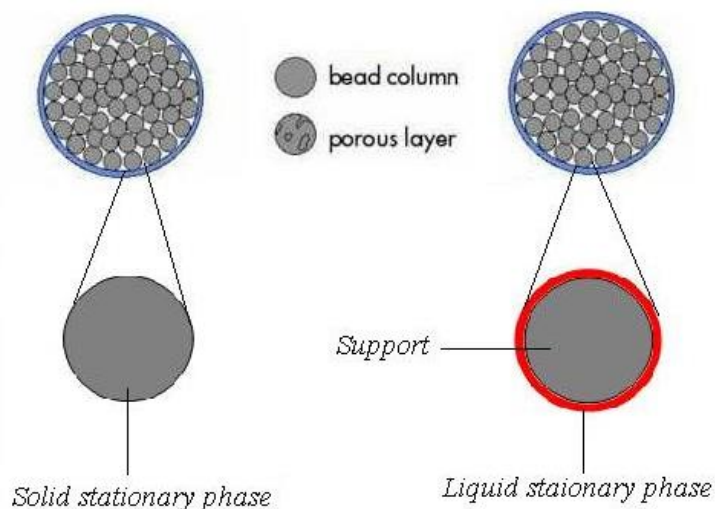
۲-۱ تبادلی

تبادل نوعی واکنش تبادل است که در آن نمونه بین دو فاز (فاز متحرک و ساکن) توزیع یا تقسیم می‌شود.



شکل ۲. فرآیند تبادل که در آن نمونه بین دو فاز توزیع یا تقسیم می‌شود.

در این فرآیند، فاز ساکن به صورت مایع است که به صورت یک پوشش یا یک لایه اطراف دانه‌های جامد یا ساپورت ظاهر می‌شود. به لایه مایع، فاز پیوند زده شده^۱ گفته می‌شود.

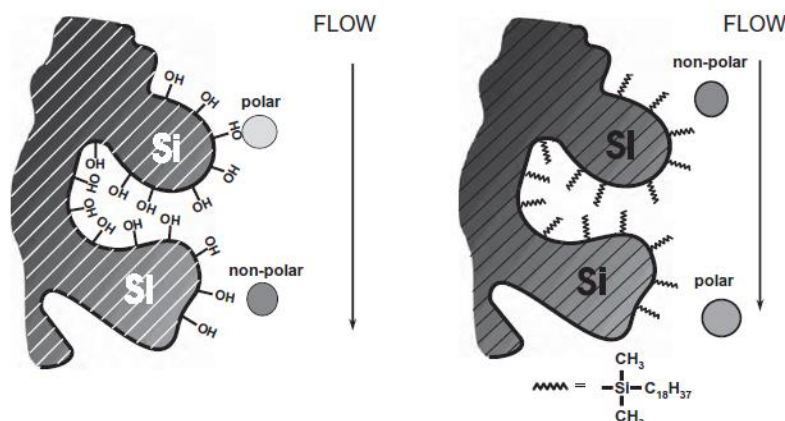


شکل ۳. شمایی از (سمت چپ) فاز ساکن جامد، و (سمت راست) فاز ساکن مایع پیوند زده شده.

^۱ Bounded-phase

کروماتوگرافی تبدالی در دو حالت انجام می‌گیرد:

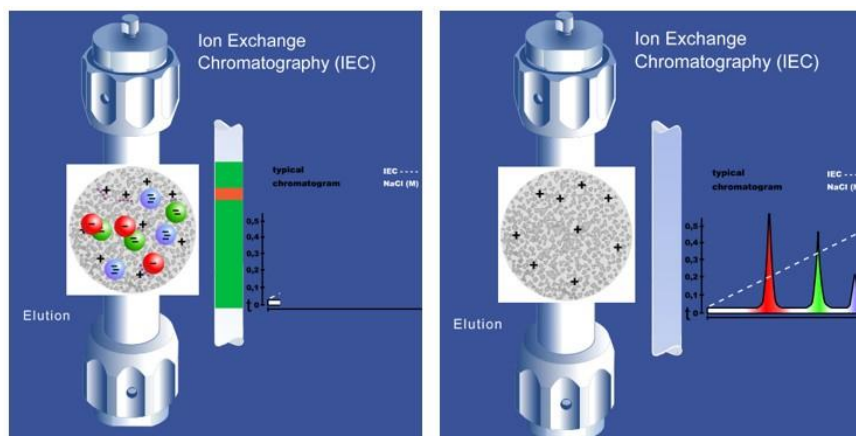
- ۱- فاز نرمال^۱: حالتی است که در آن فاز مایع پیوند زده شده قطبی (نظیر سیلیکا) است.
- ۲- فاز معکوس^۲: در این حالت فاز مایع پیوند زده شده غیرقطبی (نظیر C18) می‌باشد.



شکل ۴. نمایی از (سمت چپ) کروماتوگرافی فاز نرمال (فاز پیوند زده شده سیلیکا می‌باشد)، و (سمت راست) کروماتوگرافی فاز معکوس (فاز پیوند زده شده C18 است).

۳-۱ تبادل یون

در کروماتوگرافی تبادل یون، فاز ساکن یک رزین است. اساس این کروماتوگرافی، تبادل یون میان فاز متحرک و فاز ساکن (رزین) است.



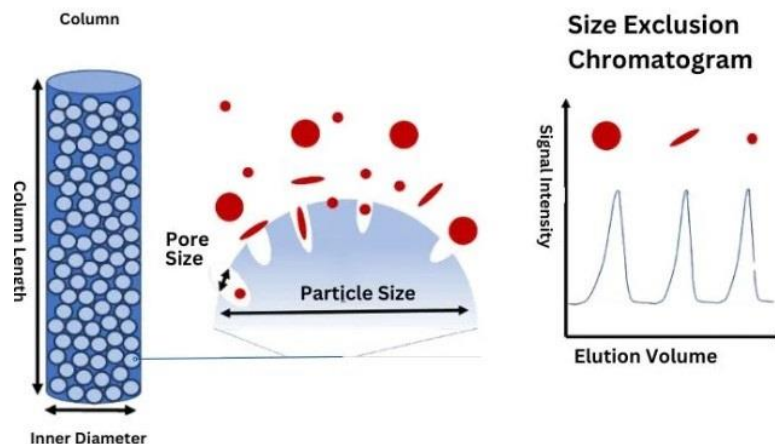
شکل ۵. کروماتوگرافی تبادل یون.

¹ Normal phase

² Reversed phase

۴-۱ اندازه طردی

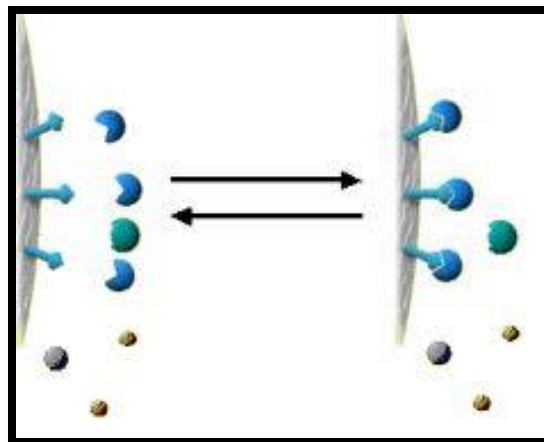
نوع دیگری از کروماتوگرافی مایع که در آن نمونه بر اساس سایز مولکول‌ها از هم جدا می‌شوند. از کروماتوگرافی اندازه طردی برای جداسازی پلیمرها و نیز مواد بیولوژیکی (نظیر پروتئین‌ها) استفاده می‌شود.



شکل ۶. شمایی از کروماتوگرافی اندازه طردی.

۵-۱ کروماتوگرافی تمایلی

اساس کروماتوگرافی تمایلی، برهمکنش میان لیگاند (آنتی‌ژن، آنزیم، و هورمون) و رسپتور مورد نظر خود (به ترتیب آنتی بادی، ممانعت کننده، و حامل) است. لیگاندها روی ذرات ساپورت جامد تثبیت می‌شوند تا اجزای یک مخلوط را از هم جدا سازند.



شکل ۷. اصول کروماتوگرافی تمایلی. فلش های آبی رنگ لیگاندهایی هستند که با رسپتور هم‌نوع خود جفت می‌شوند.

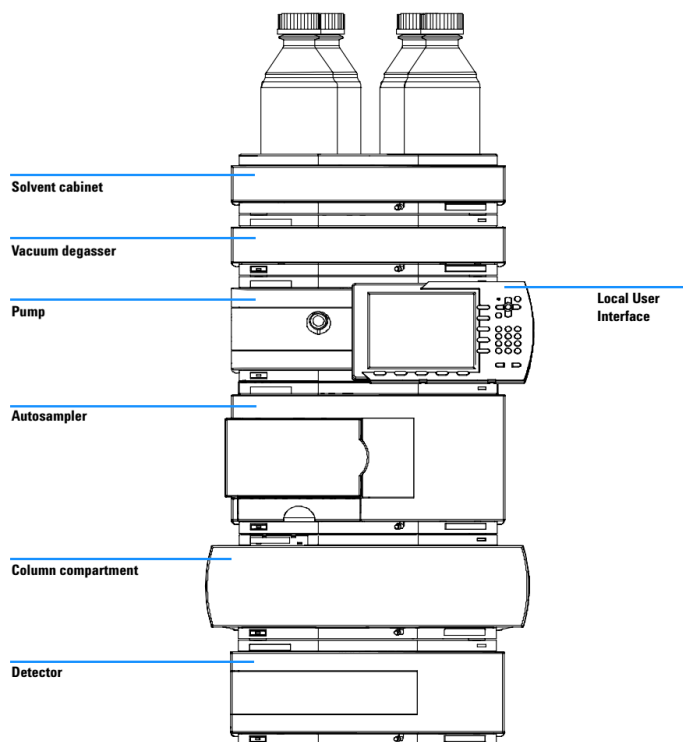
۲- کروماتوگرافی مایع برای جداسازی چه ترکیباتی مناسب است؟

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا برای جداسازی طیف وسیعی از مواد قابل استفاده است که شامل:

- داروها (آنتی بیوتیک‌ها، مسکن‌ها، استروئیدها)
- مواد بیولوژیکی (آمینواسیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و لیپیدها)
- مواد غذایی (شیرین کننده‌های مصنوعی، آنتی اکسیدان‌ها، افزودنی‌ها، آفلاتوکسین‌ها)
- مواد شیمیایی صنعتی (آروماتیک‌ها، پيشرانه‌ها، رنگ‌ها، سورفاکتانت‌ها)
- آلاینده‌ها (سموم، علف کش‌ها، فنل‌ها)
- مراکز پزشکی قانونی (دارو، سم، الکل خون، مواد مخدر)
- جداسازی مولکول‌های بزرگ با اجرام مولکولی زیاد (آنزیم‌ها، هورمون‌ها، مولکول‌های زیستی)

۳- دستگاه‌وری کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

دستگاه HPLC متشکل از حلال‌ها (فاز متحرک)، سیستم انتقال حلال، سیستم تزریق نمونه، ستون و دتکتور است.



شکل ۸. دستگاه‌وری دستگاه HPLC.

۱-۳- حلال‌ها

همان‌طور که گازها به‌عنوان فاز متحرک در کروماتوگرافی گازی مورد استفاده قرار می‌گیرند، حلال‌ها همین نقش را در کروماتوگرافی مایع ایفا می‌کنند. حلال‌هایی که در HPLC استفاده می‌شوند بایستی از یک سری ویژگی‌ها برخوردار باشند، که در ادامه به آن‌ها اشاره می‌شود.

۱-۱-۳- ویژگی‌های حلال‌های کروماتوگرافی مایع

حلال‌های کروماتوگرافی مایع باید خصوصیات زیر را داشته باشند:

- انحلال‌پذیری آن‌ها بالا باشد.
- سازگاری خوبی با اجزای دستگاه HPLC داشته باشند و باعث ایجاد خوردگی برای آن‌ها نشوند. همچنین، حلال‌ها باید در ناحیه فرابنفش شفاف بوده و فاقد هرگونه جذب در این ناحیه باشند.
- از خلوص بسیار بالایی برخوردار باشند. برای این منظور، حلال‌ها بایستی فاقد هرگونه گاز، ذرات معلق، آلاینده‌های آلی، یون‌ها، باکتری و جلبک (برای آب و محلول‌های آبی) باشند.
- ویسکوزیته پایینی داشته باشند.
- توانایی مخلوط شدن با دیگر حلال‌ها را داشته باشند.
- قیمت مقرون به صرفه‌ای داشته باشند.

۲-۱-۳- انواع حلال‌های کروماتوگرافی مایع

حلال‌های مختلفی به‌عنوان فاز متحرک در کروماتوگرافی مایع مورد استفاده قرار می‌گیرند (جدول ۲) که در میان آن‌ها، آب، متانول، استونیتریل و تتراهیدروفوران جزء پرکاربردترین حلال‌ها هستند.

جدول ۲. حلال‌های مورد استفاده در کروماتوگرافی مایع و خواص فیزیکی آن‌ها.

Solvent	Solvent strength (E°)	bp (°C)	Viscosity (cP) at 20°C	UV cut-off (nm)	Refractive index
n-Hexane	0.01	69	0.31	190	1.37
Toluene	0.29	78	0.59	285	1.49
Methylene chloride	0.42	40	0.44	233	1.42
Tetrahydro-furan	0.45	66	0.55	212	1.41
Acetonitrile	0.55-0.65	82	0.37	190	1.34
2-Propanol	0.82	82	2.30	205	1.38
Methanol	0.95	65	0.54	205	1.33
Water	Large	100	1.00	<190	1.33

E° (solvent elution strength as defined by Hildebrand on alumina).

علاوه بر حلال‌های آبی و آلی فوق، یک بافر نیز در کنار آن‌ها استفاده می‌شود، که علت آن، تثبیت pH فاز متحرک است. گاهی اوقات، نمونه حاوی گروه‌های عاملی اسیدی یا بازی می‌باشد که یونیزاسیون آن‌ها باعث تغییرات pH می‌شود. استفاده از محلول بافر می‌تواند از این تغییرات جلوگیری کند.

۱-۳-۳- انواع شویش در کروماتوگرافی مایع

شویش، به فرآیند جدا کردن نمونه جذب شده به فاز ساکن با کمک حلال گفته می‌شود. در تکنیک کروماتوگرافی مایع، شویش به دو صورت انجام می‌گیرد:

- شویش ایزوکراتیک^۱

در شویش ایزوکراتیک، نسبت حلال‌های مورد استفاده به عنوان فاز متحرک در تمام طول فرآیند جداسازی ثابت است. برای نمونه، نسبت ۶۰٪ به ۴۰٪ استونیتریل به آب تا اتمام جداسازی بدون تغییر باقی می‌ماند.

- شویش گرادینانی^۲

شویش گرادینانی برعکس ایزوکراتیک است و نسبت حلال‌ها می‌تواند تغییر کند. شویش گرادینانی در کروماتوگرافی مایع همانند برنامه‌ریزی دمایی در کروماتوگرافی گازی است. مثالی از این روش می‌توان به مثال فوق اشاره کرد. نسبت دو حلال می‌تواند به ۸۰٪ به ۲۰٪ و یا نسبت‌های دیگر تغییر کند. شویش گرادینانی به ایزوکراتیک ترجیح داده می‌شود زیرا باعث بهتر شدن فرآیند جداسازی می‌شود.

۲-۳- سیستم انتقال حلال

سیستم انتقال حلال شامل سه بخش ظروف نگهدارنده حلال، سیستم گاززدایی و پمپ‌ها می‌باشد.

۱-۲-۳- ظروف نگهدارنده حلال

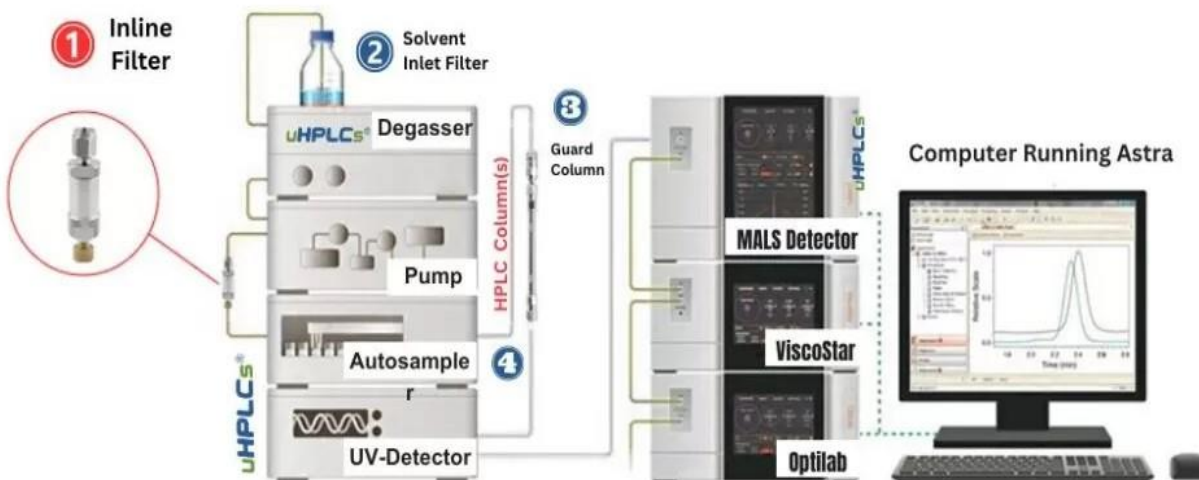
حلال‌ها به طور معمول در ظروف شیشه‌ای نگهداری می‌شوند. به طور معمول، برای حذف ناخالصی‌ها از حلال‌ها و افزایش خلوص آن‌ها راهکارهای مختلفی اتخاذ می‌شود، که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- فیلتر کردن حلال قبل از بسته‌بندی آن
- استفاده از فیلتر درون ظروف نگهداری حلال‌ها
- فیلتر کردن حلال پیش از استفاده با کمک ارلن‌های خلأ

^۱ Isocratic

^۲ Gradient

- استفاده از فیلتر به طور مستقیم در مسیر سیستم انتقال حلال^۱
- استفاده از ستون گارد^۲ پیش از ستون اصلی



شکل ۹. انواع فیلترهای مورد استفاده در مسیر حلال و نمونه پیش از رسیدن به ستون اصلی.

۲-۲-۳- سیستم گاززدایی از حلال‌ها

گاززدایی از حلال‌ها با هدف حذف هرگونه گاز محلول در حلال‌ها (فاز متحرک) صورت می‌گیرد. وجود گاز درون حلال بر عملکرد دستگاه و جداسازی تأثیر منفی می‌گذارد. گاززدایی به دو روش کلی صورت می‌گیرد:

• گاززدایی قبل از قرارگیری حلال درون ظروف نگهدارنده

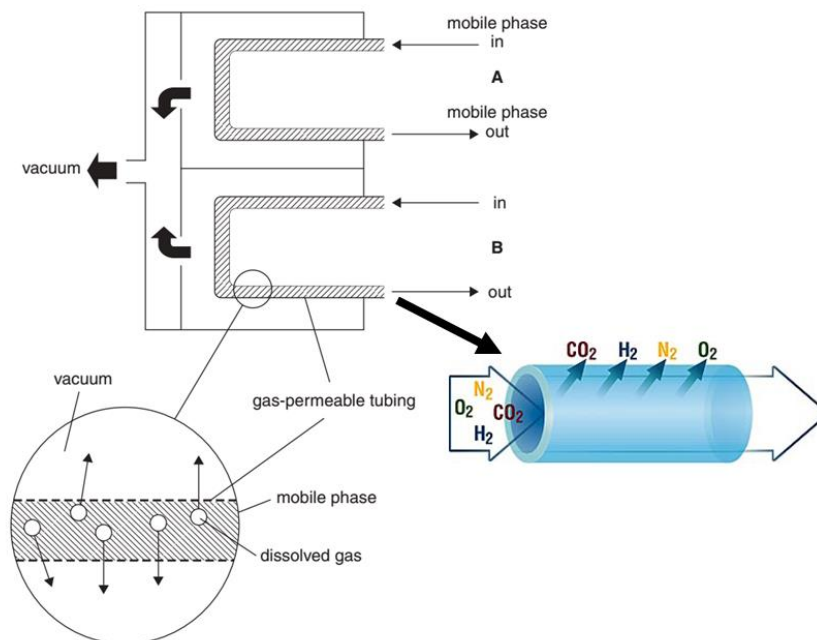
در این حالت، حلال قبل از قرارگیری درون ظروف نگهدارنده (بخش ۱-۲-۳) گاززدایی می‌شود. تکنیک‌های مختلفی برای این منظور استفاده می‌شود که شامل: (۱) حرارت‌دهی حلال، (۲) استیرر یا التراسونیک کردن، (۳) استفاده از ارلن خلاء و (۴) پرژ کردن گاز هلیوم درون حلال می‌باشند.

• گاززدایی حین فرآیند جداسازی

گاززدایی حین فرآیند جداسازی با کمک لوله‌هایی از جنس غشای نفوذپذیر به گاز صورت می‌گیرد. در این تکنیک، گازهای محلول در حلال از لوله خارج شده و با کمک یک سیستم خلاء تخلیه می‌شوند. سیستم گاززدایی قبل از ورود فاز متحرک به پمپ‌ها درون دستگاه قرار می‌گیرد.

¹ In-line filter

² Guard column



شکل ۱۰. سیستم گاززدایی تحت خلأ که قبل از پمپ قرار می‌گیرد.

۳-۲-۳- پمپ

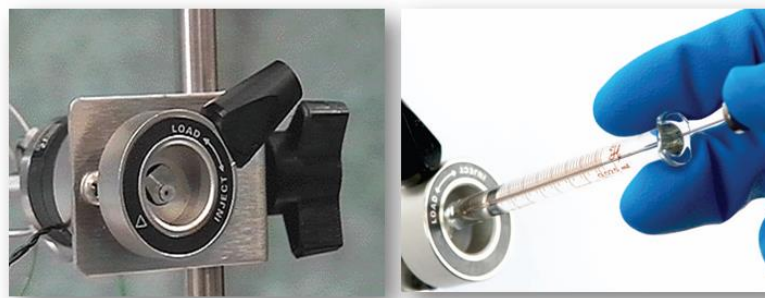
پمپ یکی دیگر از اجزای تشکیل دهنده سیستم انتقال حلال محسوب می‌شود. نقش آن، حفظ جریان ثابتی از حلال‌ها (فاز متحرک) درون دستگاه است.

۳-۳- سیستم تزریق نمونه

تزریق نمونه به دستگاه از دو طریق صورت می‌گیرد:

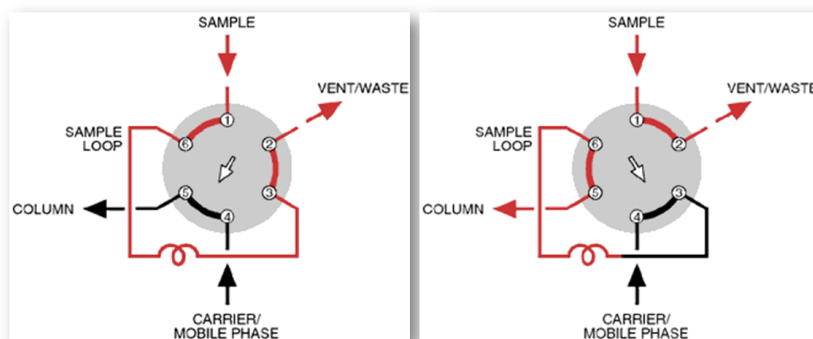
۳-۳-۱- تزریق دستی

روش دستی روشی قدیمی می‌باشد که در آن از سرنگ‌های میکرولیتری استفاده می‌شود. این روش در کروماتوگرافی گازی نیز وجود دارد.



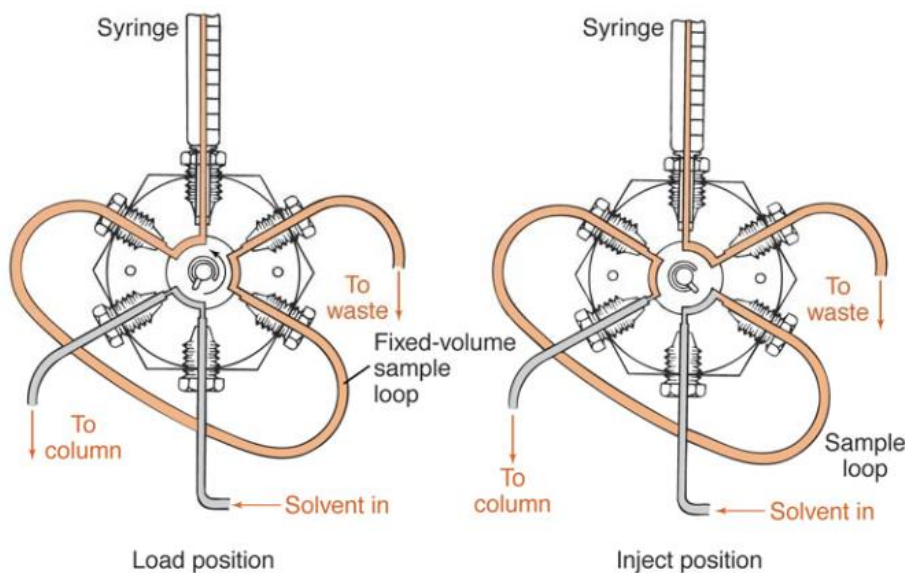
شکل ۱۱. نمایی از محل تزریق و نیز تزریق دستی نمونه با استفاده از سرنگ میکرولیتری.

تزریق دستی با کمک شیر صورت می‌گیرد که درون آن‌ها قطعه‌ای به نام لوپ^۱ یا به تعبیری، نگهدارنده نمونه تعبیه شده است.



شکل ۱۲. نمایی از لوپ حاوی ۶ پورت (ورودی) که در حالت (چپ) بارگذاری^۲ و (راست) تزریق^۳ قرار دارد.

همانطور که از شکل ۱۲ پیداست، هر لوپ حاوی ۶ پورت یا ورودی نمونه است. در حالت بارگذاری، در ابتدا لوپ با استفاده از یک سرنگ میکرولیتری از نمونه پر می‌شود. سپس با چرخاندن شیر از حالت «بارگذاری» به حالت «تزریق»، محتویات لوپ نمونه توسط فاز متحرک به داخل ستون منتقل می‌شود.



شکل ۱۳. چگونگی قرارگیری نمونه و حلال (فاز متحرک) در حالت بارگذاری و تزریق.

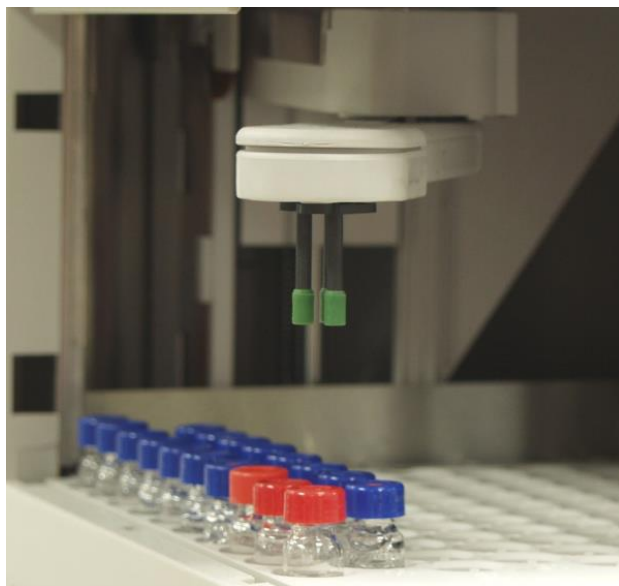
^۱ loop

^۲ Loading

^۳ Injection

۲-۳-۳- تزریق اتوماتیک (خودکار)

نسل جدید دستگاه‌های HPLC از تزریق اتوماتیک بهره‌مند هستند. این نوع تزریق با کمک Autosampler صورت می‌گیرد.



شکل ۱۴. نمایی از Autosampler در تزریق اتوماتیک.

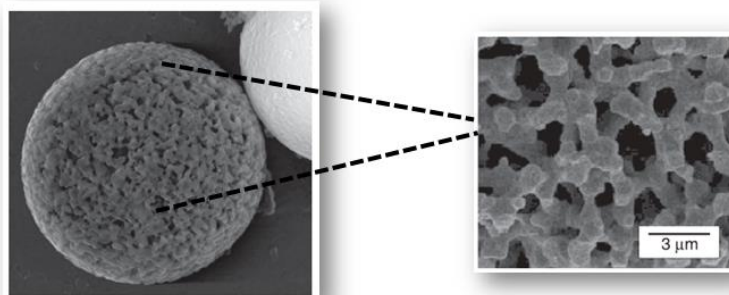
۴-۳- ستون

ستون به عنوان قلب دستگاه HPLC شناخته می‌شود جایی که جداسازی در آن اتفاق می‌افتد.



شکل ۱۵. نمای بیرونی و درونی ستون دستگاه HPLC.

همانطور که از شکل ۱۵ پیداست، درون ستون با ذراتی پر می‌شود که نقش فاز ساکن را ایفا می‌کنند. ذرات پر کننده ستون به طور معمول از جنس سیلیکا هستند. تخلخل^۱ آن‌ها باعث می‌شود برهمکنش میان نمونه و فاز ساکن افزایش یابد که این موضوع به هر چه بهتر شدن جداسازی کمک می‌کند.



شکل ۱۶. ذرات پر کننده ستون HPLC از جنس سیلیکا و تخلخل آن‌ها.

عوامل مختلفی می‌توانند بر کیفیت جداسازی تأثیر گذارند که از نمونه‌های آن‌ها می‌توان به طول ستون، اندازه ذرات پر کننده و میزان تخلخل آن‌ها و نیز نوع فاز ساکن یا فاز پیوند زده شده^۲ که می‌تواند برحسب نوع کروماتوگرافی مایع (جدول ۱) تغییر کند، اشاره کرد.

۵-۳- دتکتور یا آشکارساز

جزئی در دستگاه کروماتوگرافی مایع که شاخصه‌ای از یک آنالیت نظیر غلظت را به سیگنال الکتریکی تبدیل می‌کند. انواع مختلفی از دتکتور مورد استفاده قرار می‌گیرد، که شامل:

۱-۵-۳- دتکتور ماوراء بنفش-مرئی

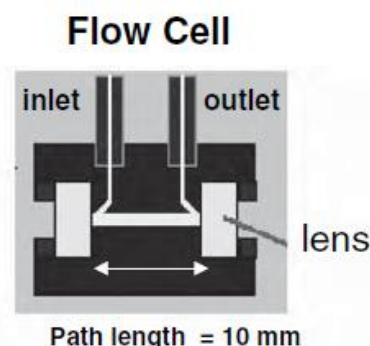
به‌عنوان معمول‌ترین دتکتور در کروماتوگرافی مایع شناخته می‌شود که غلظت نمونه را اندازه‌گیری می‌کند. اساس عملکرد آن، جذب نور فرابنفش یا مرئی توسط جزئی از مخلوط شسته شده از ستون کروماتوگرافی می‌باشد. مقدار نمونه را می‌توان با محاسبه تغییر شدت نور تابانیده شده بین فاز متحرک (عدم وجود نمونه) و فاز حاوی نمونه تعیین کرد.

ساختار این دتکتور همانند دستگاه‌های UV-Visible می‌باشد که حاوی منابع نوری (لامپ دوتریوم برای ناحیه فرابنفش یا لامپ تنگستن برای ناحیه مرئی)، مونوکروماتور یا تکفام ساز و یک سل نوری کوچک می‌باشد. سل در

¹ Porosity

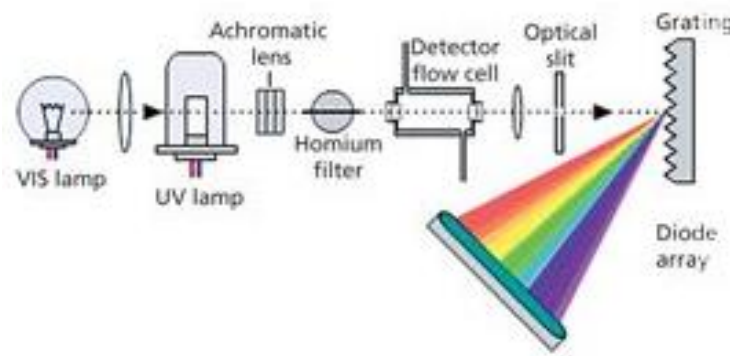
² Bounded phase

دتکتور ماوراء بنفش-مرئی یک سل جریانی^۱ است که طول مسیر آن ۲ تا ۱۰ میلی‌متر و حجم آن، ۲ تا ۱۰ میکرولیتر می‌باشد. لنزهای کوارتزی به‌عنوان پنجره‌های سل عمل می‌کنند.



شکل ۱۷. سل جریانی مورد استفاده در دتکتور UV-Visible.

دتکتور UV-Visible در سه مدل عرضه می‌شود که شامل دتکتور با طول موج ثابت، دتکتور با طول موج متغیر و آرایه دیودی (آرایه فوتودیودی) می‌باشند. عملکرد دتکتور آرایه فوتودیودی همانند دتکتور فرابنفش-مرئی می‌باشد. تفاوت این دو در این است که اولی قادر است جذب را از ناحیه فرابنفش تا مرئی اما دومی فقط می‌تواند جذب را در یکی از نواحی فوق اندازه‌گیری کند.

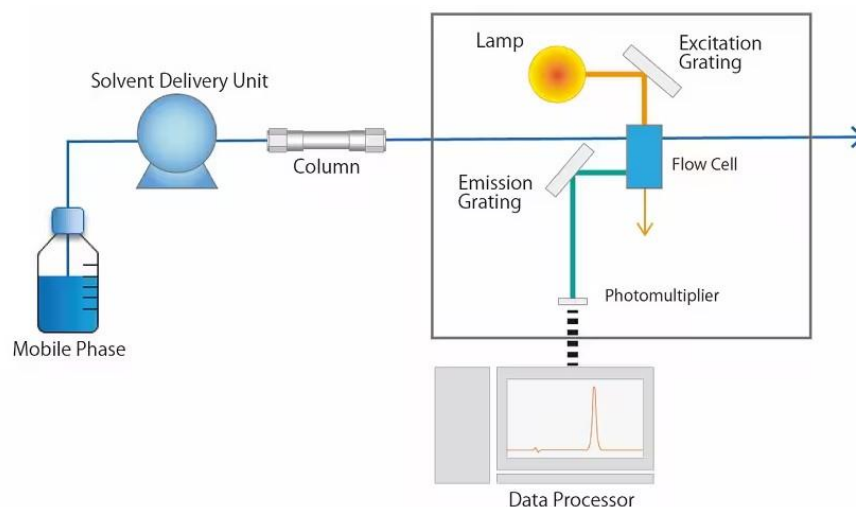


شکل ۱۸. دتکتور آرایه فوتودیودی که از هر دو لامپ تنگستن (مرئی) و دوتریوم (فرابنفش) برخوردار است.

۲-۵-۳- دتکتور فلوئورسانس

دتکتور فلوئورسانس از حساسیت بسیار بالایی برخوردار هستند که این مزیت اصلی این دتکتور نسبت به دیگر دتکتورها می‌باشد. اساس عملکرد آن، اندازه‌گیری تابش‌های نشر شده از اتم‌های برانگیخته در آنالیت است.

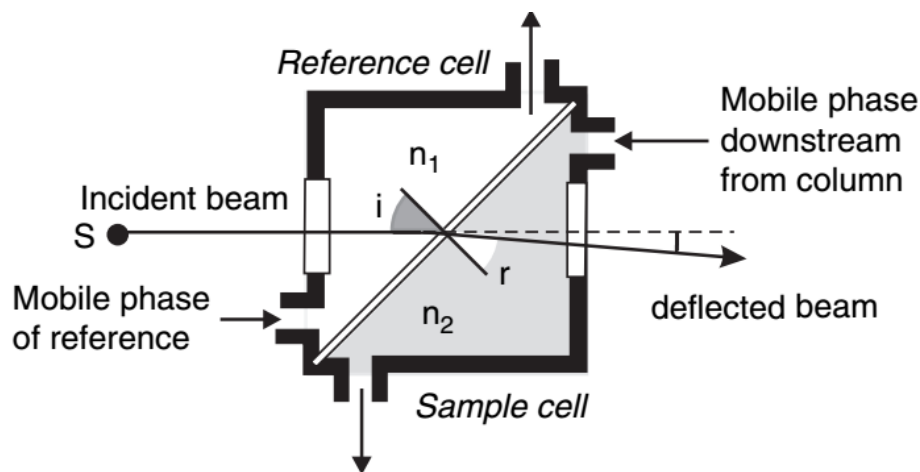
^۱ Flow cell



شکل ۱۹. نمایی از دتکتور فلوئورسانس.

۳-۵-۳- دتکتور ضریب شکست^۱

این دتکتور، تغییر ضریب شکست میان سلول حاوی فاز متحرک و نمونه و سلول حاوی فاز متحرک (بدون نمونه) را اندازه‌گیری می‌کند. یکی از معایب اصلی آن، حساسیت بسیار پایین (۲ تا ۳ مرتبه کمتر از دتکتور UV) است. از جمله ترکیباتی که می‌توان آن‌ها را با دتکتور ضریب شکست اندازه‌گیری کرد می‌توان به الکل‌ها، شکرها، اسیدهای چرب، تری‌گلیسیرید و پلیمرها اشاره کرد.

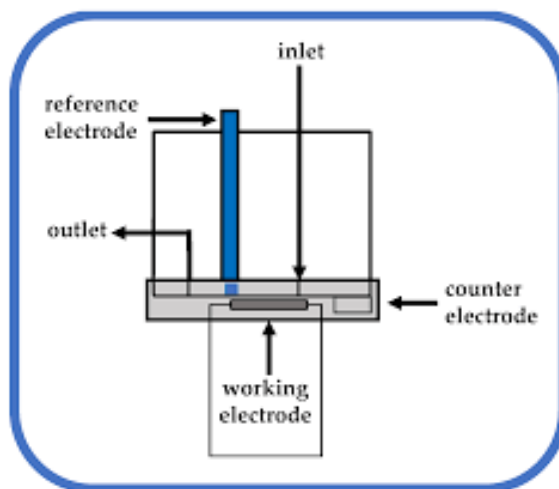


شکل ۲۰. ساختار دتکتور ضریب شکست.

^۱ Refractive index

۴-۵-۳- دتکتور هدایت (الکتروشیمیایی)

همانطور که از نام آن پیداست، اساس عملکردی این آشکارساز، اندازه‌گیری هدایت است. در دو نوع آمپرومتریک یا کولومتریکی موجود است و جنس الکترودهای مورد استفاده در آن، کربن، نقره، طلا یا پلاتین است که در حالت اکسایشی یا احیاء عمل می‌کنند.



شکل ۲۰. اساس عملکردی دتکتور الکتروشیمیایی.

منابع

Hamilton, R.J. and Sewell, P.A., 1982. Introduction to high performance liquid chromatography. Dordrecht: Springer Netherlands.

Linsay, S., 1987. High performance liquid chromatography, analytical chemistry by open learning. John Willey, New York.