NAISL
Quarterly, 2017
Volume 1, Number 2
Pages 45 – 50
Print ISSN: 2588-6401
Online ISSN: 2588-641X

Basic principles of chromatography analysis

Reihaneh Sabbaghzadeh*

Abstract

High performance liquid chromatography technique for chemical analysis for the separation, identification and quantification of the components of a mixture. In this technique, which is located by creating high-pressure pumps, liquid solvent to the mixture of solid adsorbent material passes through the column. Chromatography is widely used in biological research and various research and development has overcome tremendous. In different ways chromatographic are mobile phase and a stationary phase. It also allows you to use a very much smaller particle size for the column packing material which passes a much greater surface area for interactions between the stationary phase and the molecules flowing past it. This allows a much better separation of the components of the mixture.

Key Words

Mobile phase,
Stationary phase,
High performance liquid chromatography technique

(*) Hakim Sabzevari University, Faculty of Science, Department of Biology, Sabzevar, Iran.
E-mail: reihanehsabb@gmail.com, Phone Number: 09151702161

فصلنامه علمی
سال اول، شماره ۲
صفحات ۴۵ – ۵۰، ۱۳۹۶
شاپای چاپی: ۲۵۸۸-۶۴۰۱
شاپای الکترونیکی: ۲۵۸۸-۶۴۱X

اصول عمومی روش تجزیه‌ای کروماتوگرافی HPLC

ریحانه صباغزاده*

چکیده

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تکنیکی جهت آنالیز شیمیایی برای جداسازی، تشخیص و تعیین مقدار اجزای یک مخلوط می‌باشد. در این تکنیک، پمپ‌هایی قراردارد که با ایجاد فشار قوی، حلال مایع را از مخلوط نمونه از طریق ستون بسیار ریزحاوی مواد جاذب جامد عبور می‌دهد. هر جزء نمونه با تفاوت جزئی از بقیه، با ماده جاذب واکنش می‌دهد که باعث اختلاف سرعت‌های جریان برای اجزای متفاوت شده و باعث جدا کردن اجزا در ستون می‌شود. کروماتوگرافی کاربردی وسیع در پژوهش‌های مختلف علوم پایه دارد و گوناگونی و تکامل شگرفی در غلبه تحقیقات یافته است. در روش‌های مختلف کروماتوگرافی یک فاز متحرک (Mobile phase) و یک فاز ثابت (Stationary phase) وجود دارد. فاز ثابت می‌تواند جامد یا مایع و فاز متحرک مایع یا گاز باشد.

ریحانه صباغزاده

واژگان کلیدی

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا،
فاز متحرک،
فاز ثابت،
ماده جاذب،

(*) عضو هیأت علمی گروه زیست‌شناسی و مسئول آزمایشگاه مرکزی دانشگاه حکیم سبزواری
ایمیل: reihanehsabb@gmail.com، شماره تلفن: ۰۹۱۵۱۷۰۲۱۶۱

۱ مقدمه

سلول‌های زنده شامل صدها هزار ترکیب شیمیایی مختلف هستند. از اجزای ماکروسکوپی بزرگ‌تر مثل پروتئین و اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها تا اجزای ریزتر مثل آمینو اسیدها، نوکلئوتیدها و اسیدهای چرب. از آنجا که اکثر این ترکیبات به میزان بسیار کم در بدن حضور دارند مانند فاکتورهای پروتئینی و ویتامین‌ها، ابزاری دقیق که بتواند غلظت‌های بسیار کم این مواد را ردیابی کند، حائز اهمیت فراوان می‌باشد [۱].

کروماتوگرافی کاربردی وسیع در پژوهش‌های زیستی دارد و گوناگونی و تکامل شگرفی در غلبه تحقیقات یافته است. در روش‌های مختلف کروماتوگرافی یک فاز متحرک (Mobile phase) و یک فاز ثابت (Stationary phase) وجود دارد. فاز ثابت می‌تواند جامد یا مایع و فاز متحرک مایع یا گاز باشد [۲].

انواع مختلف کروماتوگرافی بر اساس نوع فاز ثابت و متحرک و نیز ماهیت برهم‌کنش ذرات با فاز ثابت شکل گرفته‌اند. در حالت کلی، برهم‌کنش فاز ثابت کروماتوگرافی با ذراتی که باید از همدیگر جدا شوند، نیروی تأخیری در برابر حرکت آن‌ها ایجاد می‌کند. قدرت این نیروی تأخیر بسته به خواص ذره متفاوت است و به این طریق ذرات از همدیگر جدا می‌شوند. روش‌های جداسازی، بر پایه مشخصات فیزیکی ترکیبات بنا نهاده شده است [۴].

۲ مشخصات کلی در کروماتوگرافی نوع HPLC [۱]

ستون‌هایی با قطر کم و تقریباً بلند از ماده زمینه‌ای (ماتریکسی) پر می‌شود، که تحمل فشار زیاد را داشته و در فشارهای بالا فشرده نمی‌شوند. شکل ۱ نمای ساده‌ای را نشان می‌دهد [۱۴].

فاز متحرک در HPLC می‌تواند آب، حلال‌ها، آلی یا بافرها به صورت تن‌ها یا مخلوط با یکدیگر باشند. تمام قسمت‌های دستگاه که در تماس با فاز متحرک هستند باید از جنس مواد مقاوم به حلال‌های مورد استفاده باشند. برای مثال برای فاز ثابت می‌توان به موارد زیر اشاره کرد [۶].

حلال‌های اصلی: هیدروکربن‌های آلیفاتیک، هیدروکربن‌های آروماتیک

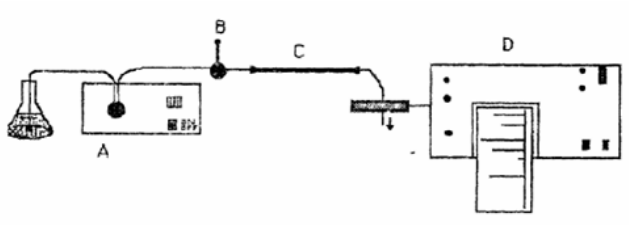
سایر حلال‌ها: الکل‌ها، اترها و...

همه بخش‌هایی که در سمت فشار بالا قرار دارند (از خروجی پمپ تا انت‌های ستون) باید تحمل فشار بالا را داشته باشند [۱۳].

برهم‌کنش اجسام حل شده با هر فاز، تعیین کننده‌ی توزیع نسبی حل شدن بین دو فاز است و قدرت نسبی این برهم‌کنش‌ها، با نوع و قدرت نیروهای بین مولکولی نمونه وفاز متحرک یا ساکن تعیین می‌شود [۱۵].

اگر قطبیت‌های دو فاز ساکن و متحرک یکسان باشد، آن گاه احتمال دارد برهم‌کنش جسم حل شده با این دو یکسان باشد که در نتیجه، جداسازی ضعیف می‌شود. بنابراین مثلاً برای فازهای ساکن هیدروکربن (غیرقطبی) به فاز متحرک قطبی نیاز است و برعکس. جدا شدن ترکیب مورد نظر بین دو فاز مایع آمیزش‌ناپذیر، اساس کروماتوگرافی مایع-مایع می‌باشد. قطبیت ترکیب مورد نظر و حلال، عوامل مهمی در تعیین حلالیت ترکیب است و ترکیبات قطبی در حلال‌های قطبی سریع‌تر از حلال‌های غیرقطبی حل می‌شوند. اخیراً محیط‌های مایعی (به عنوان فاز ثابت) تعریف شده که با یک محیط جامد به عنوان محافظ پیوند می‌یابد [۹].

واژه‌های فاز نرمال و معکوس، برای توصیف جداسازی‌های جذبی و فاز پیوندی به کار می‌روند. فاز نرمال به این معنی است که قطبیت فاز ساکن بیشتر از فاز متحرک و فاز معکوس به معنی قطبیت کمتر از فاز ساکن نسبت به فاز متحرک است [۹].



شکل ۱: نمای ساده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا. بخش‌های مختلف به ترتیب حروف مشخص شده‌اند: پمپ، محل تزریق، ستون و آشکارساز [۱۴]

[۱] High Performance Liquid Chromatography

جدول ۱: تقسیم‌بندی تکنیک‌های جداسازی کروماتوگرافی [۳]

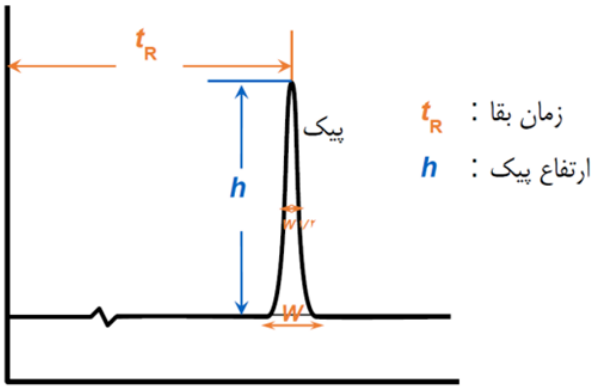
ویژگی مولکولی	خصوصیت فیزیکی	روش جداسازی
قطبیت	فراری، تبخیر حلالیت قابلیت جذب	کروماتوگرافی گاز-مایع کروماتوگرافی مایع-مایع (HPLC) کروماتوگرافی مایع-جامد

از فواید HPLC کم بودن زمان کروماتوگرافی، قدرت تفکیک و حساسیت بالا است. حساسیت روش HPLC به قدری است که مقادیر غلظت پیکومولار نیز به این روش قابل شناسایی و بررسی است. برای افزایش کارایی، تغییراتی در ستون آن صورت گرفته است. ستون بسیار ریز و دارای ضخامت کم معمولاً حدود ۴ mm می باشد. برای ایجاد چنین شرایطی پمپی نیاز است که بتواند فاز متحرک را با جریانی ثابت مناسب، به حرکت درآورد، چنانچه به طور تقریبی در هر دقیقه ۱۰ میکرولیتر پمپ شود. هم‌چنین به دلیل استفاده از پمپ با فشار زیاد، جداره‌های دستگاه باید از استیل سخت ساخته شود. جهت تزریق نمونه نیز از سرنگی در حد میکرولیتر نمونه استفاده می‌گردد. رنج طول موج‌ها کارشده حدود ۳۵۰ – ۱۹۰ نانومتر که عمدتا فاز متحرک فاقد جذب در این نقاط است [۱۱].

این نوع کروماتوگرافی برای موارد زیر قابل استفاده است [۱۶].

- مواد زیستی: کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک، آمینو اسیدها، پروتئین‌ها، پپتیدها، استروئیدها، آمین‌ها
- محصولات پزشکی: داروها، آنتی بیوتیک‌ها
- محصولات غذایی: ویتامین‌ها، مکمل‌های غذایی، اسیدهای آلی
- نمونه‌های محیطی: یون‌های غیرآلی، مواد آلی خطرزا
- محصولات سنتزی آلی: پلیمرهای سنتزی، سورفاکتانت‌ها

یک کروماتوگرام (chromatogram) نمودار حاصل از آزمایش کروماتوگرافی است و به نموداری اطلاق می‌شود که غلظت محلول خروجی از ستون را بر حسب زمان یا حجم محلول شستشوی به کار رفته، نشان می‌دهد [۱۶].



شکل ۲: نمای یک کروماتوگرام. محور افقی معرف زمان و محور عمودی درصد غلظت ترکیب را مشخص می‌کند [۱۶].

۳ روابط قابل استفاده در تجزیه و تحلیل‌های کروماتوگرام

حجم محلولی که برای شستشوی کامل نمونه از ابتدای ورود تا انتهای خروج از ستون جمع می‌گردد به نام حجم بقا نامیده می‌شود و با V_R (Retention Volum) نشان می‌دهند. جهت سهولت برای اندازه‌گیری معمولاً از زمان بقا t_R (Retention Time) استفاده می‌شود.

رابطه زمان بقا و حجم بقا

$$V_R = F_c t_R$$

F_c سرعت جریان می‌باشد. مقدارعددی حجم بقا به نوع ستون وابسته است. معمولاً ازکمیت نرمال شده دیگری به نام عامل بقا (K) استفاده می‌شود.

$$K = \frac{t_R - t_\circ}{t_\circ}$$

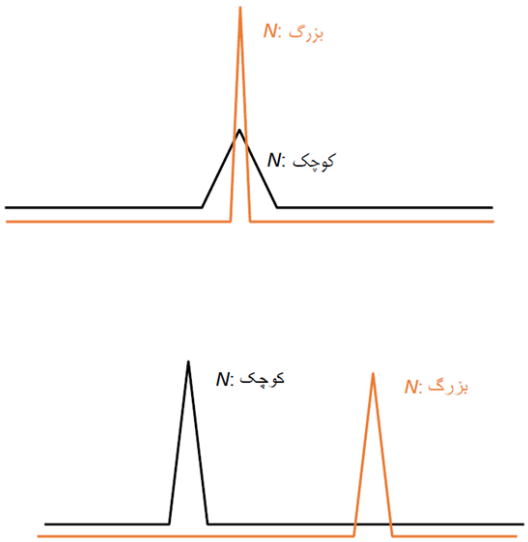
$t_\circ$ نشان‌دهنده زمان شروع و K و نشان‌دهنده عامل بقاست.

چیزی که در کروماتوگرام سبب تشخیص دو مولکول مجزای از هم می‌شود، حضور دو پیک جدای از هم با پهنای مشخص است. برای

توضیح پهنای پیک‌های کروماتوگرام از مفهوم سطوح فرضی (N) استفاده می‌شود.

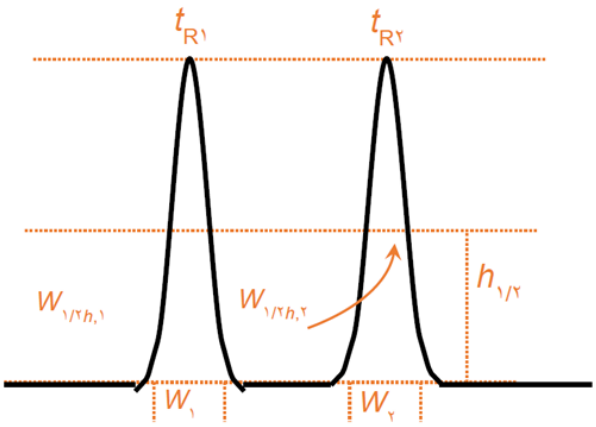
$$N = ۱۶\left(\frac{t_R}{W}\right)^۲$$
$$= ۵/۵۴\left(\frac{t_R}{W_{۱/۲}}\right)^۲$$

شکل ۳ نمونه‌ای از تفسیر کروماتوگرام را نشان می‌دهد. اگر زمان‌های تأخیر یکسان باشد، پهنای پیک کمتر، مربوط به مقدار بزرگ‌تر برای میزان سطوح فرضی است و اگر پهنای پیک یکسان باشد، زمان تأخیر بزرگ‌تر، مربوط به پیکی است که N بزرگ‌تر دارد [۹، ۱۰].



شکل ۳: نمونه‌ای از تفسیر کروماتوگرام [۵]

کروماتوگرام حاصل از یک مجهول چندگانه، حاوی تعداد زیادی پیک‌های مجزای از هم است. درجه تفکیک یک جفت پیک (R_s) به صورت زیر تعریف می‌شود.



$$R_S = \frac{t_{R_۲} - t_{R_۱}}{\frac{۱}{۲}(W_۱ + W_۲)}$$
$$= ۱/۱۸ \times \frac{t_{R_۲} - t_{R_۱}}{W_{۱/۲h,۱} + W_{۱/۲h,۲}}$$

۴ پرکننده‌های ستون HPLC

متداول‌ترین پرکننده‌های ستون های HPLC، ذرات ریزسلیلیکا هستند که از نوع متخلخل با قطرهای ۵،۳ یا ۱۰ میکرومتر و شکل‌های کروی و بی‌قاعده هستند [۹].

در استفاده از سلیلیکا محدودیت‌هایی وجود دارد (به ویژه در PHهای بالا و پایین) که برای غلبه بر این محدودیت‌ها، مواد پرکننده‌ی دیگری توسعه یافته‌اند که بر پایه‌ی فلورور کربن، کربن، آلومینا یا رزین‌های پلیمری می‌باشند [۹].

مثال‌هایی از فاز ثابت [۱۸]

-Si-OH ژل سیلیکا

$-Si-CH_2CH_2CH_2CN$ نوع سیانو

$-Si-CH_2CH_2CH_2NH_2$ نوع آمینو

$-Si-CH_2CH_2CH_2OCH(OH)-CH_2OH$ نوع دی ال

۵ نتیجه‌گیری

یکی از ساده‌تری مدل‌ها در تعیین غلظت مجهول با این روش، External Standard است. برای انجام این مدل، محلول‌های استاندارد با غلظت‌های مشخص و مجهول از ترکیب مورد نظر تهیه می‌شود. میزان ثابت نمونه تزریق می‌شود، سپس طول یا سطح پیک در مقابل غلظت برای هر ترکیب تعیین می‌شود. نمودار باید خطی باشد و از مبنا آغاز شود. غلظت انواع ناشناخته با فرمول زیر قابل محاسبه است [۱۰].

غلظت ناشناخته = (سطح ناشناخته/سطح شناخته)×غلظت شناخته

طول عمر مفید ستون‌های HPLC به دلیل ظهور فضاهای خالی یا شکاف در پرکننده ستون (به ویژه در سر ستون) یا با تجمع ذرات ریز

موجود در فاز متحرک (مانند ذرات نشسته بر پمپ یا شیر تزریق) در سر ستون، کوتاه تر می‌شود. بنابراین برای افزایش طول عمر ستون باید از این عوامل جلوگیری کرد. تغییر فشار ستون از کم به زیاد و بالعکس باید به آهستگی انجام شود و از تغییرات ناگهانی دما نیز باید خودداری گردد. بنابراین ستون باید در جایی نگهداری شود که از ضربه یا تکان شدید در امان باشد. هنگامی که از آن استفاده نمی‌شود، باید در حلال خنثی و غیر فرار نگهداری شود. به طور معمول قطبیت حلال نگهدارنده باید مشابه قطبیت حلال مورد استفاده با ستون باشد. برای مثال، ستون‌های فاز ساکن مورد استفاده در کروماتوگرافی فاز معکوس را در متانول یا مخلوط متانول/آب نگه می‌دارند. این حلال‌ها نسبت به آب مقطر ترجیح داده می‌شوند زیرا متانول از رشد باکتری جلوگیری می‌کند. در انتهای ستون، باید به طور کامل بسته باشد. همیشه باید حلال نگهدارنده ستون را یادداشت کرد، در غیر این صورت ممکن است در هنگام استفاده بعدی از ستون دچار مشکلات انتزاج حلال‌ها شد [۷].

برای مثال، اگر ستون در متانول نگهداری شود و دفعه‌ی بعد قرار باشد با بافر مایعی کار شود، ابتدا باید ستون با آب شسته شود. در غیر این صورت ممکن است نمک‌های بافر در مواجه با متانول رسوب کنند. محلول‌های بافری به آهستگی موجب خوردگی ستون‌های فولادی و پیچ‌های سفت کننده می‌شوند. پس از استفاده از دستگاه باید آن‌ها را شست و شو داد [۱۳].

مراجع

[1] Bain BJ. Hemoglobinopathy diagnosis. Oxford, England: Blackwell,Science Ltd., 2001:260pp.

[2] Br J Haematol ,Working Party of the General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haemotology. Guideline: the laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. 1998;101:783–92.

[3] Clarke G, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemia: review and update. Clin Chem 2000;46:1284–90.

[4] Knox JH, Done JN, Fell AF et al. High-Performance Liquid Chromatography. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1978.

[5] Lafferty JD, McFarlane AG, Chui DHK. Evaluation of a dual hemoglobin A2/A1c quantification kit on the Bio-Rad Variant II automated hemoglobin analyzer. Arch Pathol Lab Med 2002;126:1494–9.

[6] Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. London: Pharmaceutical Press; 2004.

[7] Ou C-N, Rogerud CL. Rapid analysis of hemoglobin variants by cation-exchange HPLC. Clin Chem 1993;39:820–4.

[8] Ou C-N, Rognerud CL. Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC. Clin Chim Acta 2001;313:187–94.

[9] Phyllis Brown, Kathryn DeAntonois, Prentice Hall "High Performance Liquid Chromatography", 1997, pp. 147-164.

[10] Pungor E. A Practical Guide to Instrumental Analysis. Boca Raton: CRC, Press; 1995.

[11] Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography, Tom Kupiec, PhD, International Journal of Pharmaceutical Compounding, Vol. 8 No. 3 May/June 2004.

[12] Riou J, Godart C, Didier H, Mathis M, Bimet C, Bardakdjian-Michau J, et al. Cation-exchange HPLC evaluated for presumptive identification of hemoglobin variants. Clin Chem 1997;43:34–9.

[13] Skoog, D.; Holler, F.; Crouch, S. Principles of Instrumental Analysis 2007.

[14] Skoog, Holler, Nieman, Saunders College Publishing "Principles of Instrumental Analysis", 5th Edition., 1998, pp. 673-697, 725-766.

[15] Simpson CF. Practical High-Performance Liquid Chromatography. London: Heyden and Son; 1976.

[16] Swadesh, J.K. HPLC: Practical and Industrial Applications 2001.

[17] Waters HM, Howarth JE, Hyde K, Goldstone S, Kadkhodaei Elyaderani M, Cinkotai KI, et al. Evaluation of the Bio-Rad Variant, thalassemia short program. MDA Evaluation Report MDA/96/ London: Medical Devices Agency, 1996.

[18] Wild BJ, Stephens AD. The use of automated HPLC to detect and quantitate haemoglobins. Clin Lab Haematol 1997;19:171–6.