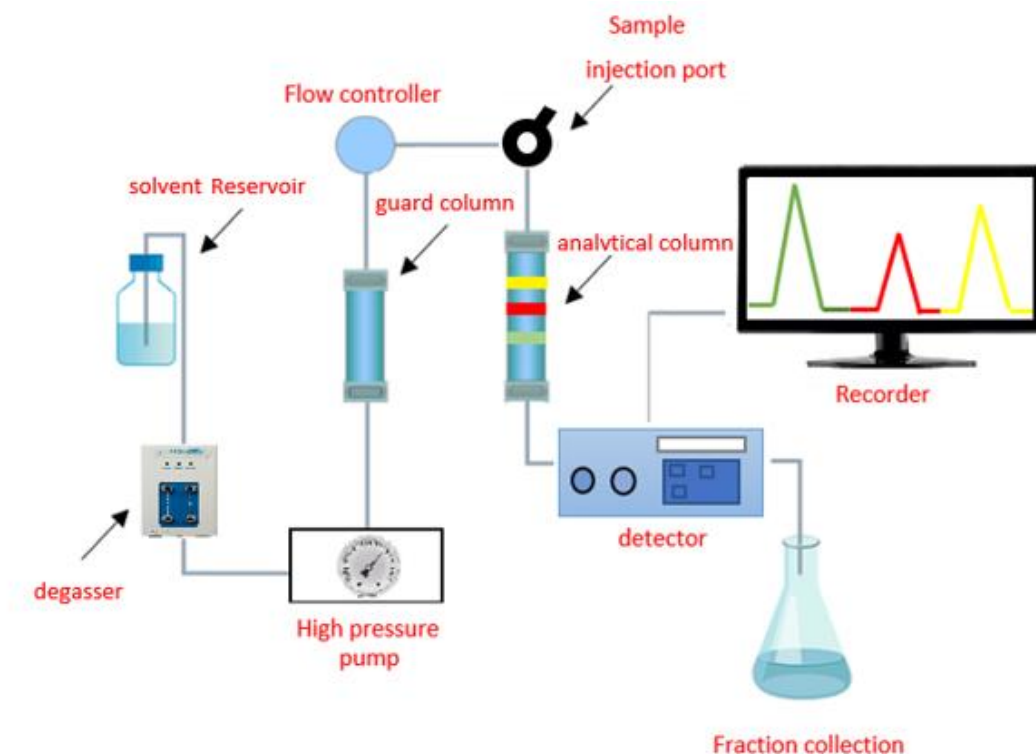


کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatograph) یا HPLC توانایی جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در یک مخلوط را با استفاده از فاز متحرک مایع (حلال) و فاز ساکن جامد (ستون) دارا می‌باشد. اساس جداسازی در روش های کروماتوگرافی تمایل نسبی هر جز به فاز ساکن به هنگام عبور فاز متحرک بر روی فاز ساکن است. به این صورت که گونه ای که تمایل بیشتری به فاز ساکن دارد با سرعت کمتری در طول ستون حرکت می کند و گونه ای که تمایل بیشتری به فاز متحرک دارد با سرعت بیشتری از ستون عبور می کند.

از آنجایی که مولکول های هم ترکیب، به صورت گروهی حرکت می کنند، ترکیبات به صورت باندهایی جداگانه و مشخص در ستون از یکدیگر متمایز هستند.



باتوجه به نوع فاز ساکن، روش‌های HPLC به انواع زیر تقسیم می‌شود:

- کروماتوگرافی فاز نرمال (فاز ساکن قطبی) (Normal phase HPLC)
- کروماتوگرافی فاز معکوس (فاز ساکن غیرقطبی) (Reverse phase HPLC)
- کروماتوگرافی تبادل یونی (Ion-exchange chromatography)
- کروماتوگرافی کایرال (Chiral chromatography)
- کروماتوگرافی اندازه-طرودی (Size-exclusion chromatography)
- کروماتوگرافی افینیتیه (Affinity chromatography)

اجزاء دستگاه

دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا شامل اجزاء زیر می‌باشد:



۱. مخزن حلال (Solvent Reservoir)

۲. دستگاه گاززدا

۳. پمپ (pump)

۴. تزریق کننده (injector)

۵. ستون (column)

۶. آشکارساز (Detector)

مخزن حلال

جریان حلال از طریق سیستم HPLC از مخزن حلال که حاوی حلال های مناسب برای حمل نمونه است آغاز می-شود حلال ها باید از طریق فیلتر حلال ورودی فیلتر شوند تا هر ذره ای که ممکن است به اجزای حساس سیستم آسیب برساند حذف شود.

دستگاه گاززدا

گاز زدایی فاز متحرک در HPLC موضوعی است که امروزه به ندرت در مورد آن صحبت می شود. با این حال، در گذشته اینگونه نبود در واقع مشکلات مربوط به خروج گاز از فاز متحرک از رایج ترین مشکلاتی بود که در استفاده معمول با آن مواجه می شدند. هنگامی که حلال ها با جو در تماس هستند، هوا(نیتروژن واکسیژن) به تدریج در حلال حل می شود. اگر خروج گاز در سیستم اتفاق بیوفتد بیشترین مناطقی که تحت تاثیر قرار میگیرد پمپ و دتکتور می باشد در نهایت، هوای داخل پمپ باعث می شود پمپ انتقال فاز متحرک به ستون را متوقف کند همچنین اگر فقط یک حباب وجود داشته باشد، سرعت جریان نامنظم خواهد شد و باعث ایجاد مشکل در زمان ماند(retention time) می شود یک راه ساده برای انجام این کار استفاده از دستگاه گاززدا خلاء برای گاز زدایی حلال ها است. این کار را می توان به راحتی با قرار دادن حلال در فلاسک خلاء و کشیدن خلاء جزئی با یک اسپراتور یا پمپ مکانیکی با ظرفیت مشابه انجام داد. در هر صورت، چند دقیقه گاز زدایی در خلاء حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد از گاز محلول را حذف می کند.



پمپ

به دلیل کم بودن قطر ذرات در ستون، افت فشار به وجود می آید و نیاز به ایجاد فشاری در سیستم است بنابراین باید از پمپ که موجب می شود نمونه با فشار وارد سیستم شود، استفاده نمود سپس حلال (فاز متحرک) توسط پمپ با سرعت و جریان ثابتی بر روی فاز ساکن حرکت داده می شود. فشار سیستم به اندازه ذرات موجود در ستون، گرانیوی (Viscosity) و سرعت جریان فاز متحرک بستگی دارد. سه نوع پمپ متداول عبارت اند از پمپ های سرنگی، پمپ های فشار ثابت و پمپ های پیستونی رفت و برگشتی.



تزریق کننده

تزریق کننده (Injector) در واقع برای تزریق نمونه مورد آنالیز به درون حلال (فاز متحرک) عبوری در دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا می باشد. تزریق کننده بین پمپ و ستون قرار دارد. مقدار ثابت نمونه در داخل لوله ای با حجم مشخص بنام لوپ قرار می گیرد تا در مرحله تزریق به درون حلال تزریق شده و به سمت ستون کروماتوگرافی حرکت نماید. تزریق کننده اتوماتیک و یا Autosampler نیز نوع رباتیک این سیستم می باشد که می تواند تعداد بسیار زیادی از نمونه را طبق برنامه به داخل حلال تزریق نماید.



ستون

ستون در کروماتوگرافی مایع یکی از بخش های مهم در عمل جداسازی می باشد زیرا جدا کردن یک مخلوط در این قسمت صورت می گیرد. ستون ها انواع مختلفی دارند و براساس خواص فیزیکی مولکول های هدف (آنالیت ها)، روش، مدت زمان جداسازی و شرایط دیگر انتخاب می شوند. ویژگی های مولکولی که بر انتخاب ستون HPLC تأثیر می گذارند عبارتند از آبگریزی/آب دوستی، نیروهای بین مولکولی (به ویژه دوقطبی-دوقطبی)، نیروهای درون مولکولی (یونی) و اندازه. قطر داخلی و حجم یک ستون هم مقدار نمونه ای را که می توان روی یک ستون بارگذاری کرد و هم حساسیت جداسازی را تعیین می کند. قبل از ستون اصلی، قسمتی به نام پیش ستون (Pre-column) قرار گرفته است که از ستون اصلی محافظت می کند و نمونه ابتدا از این قسمت می گذرد. نوع ماده ای که ستون محافظ و ستون اصلی را پر می کند باید مشابه یکدیگر باشند. جنس هر دو ستون از فولاد ضد زنگ می باشد.

پیش ستون HPLC



ستون اصلی HPLC



آشکارساز

بعد از عمل جداسازی در ستون، فاز متحرک باندها یا آنالیت های جدا شده را به سمت آشکارساز (دکتور) هدایت می-کند اغلب آشکارسازهای HPLC براساس تبدیل ویژگی های فیزیکوشیمیایی آنالیت به سیگنال کار می-کنند. شدت سیگنال باید با مقدار جرم یا غلظت نمونه شناسایی شده در زمان بازداری معین مرتبط باشد و امکان تعیین کمی و شناسایی آنالیت های جدا شده را به روشی وابسته به زمان فراهم کند. انتخاب یک آشکارساز متناسب با آنالیت های هدف و شرایط جداسازی بسیار مهم است و اگر شما از یک آشکارساز نامتناسب با آنالیت های هدف استفاده کنید به اطلاعات مفیدی در رابطه با نمونه دست نخواهید یافت. آشکارسازهای متنوعی برای دستگاه HPLC استفاده می-شود که به چند مورد رایج از آنها در زیر اشاره شده است.

حد تشخیص	الزامات آنالیت	دکتور
نانوگرم	جذب پرتو نوری در ناحیه 190-800nm	(uv-vis) (ultraviolet/visible light detector)
فمتوگرم	دارای فلوروفور یا برچسب گذاری شده با حامل فلوئورسنت	(FLD) (Fluorescencedetection Detector)
پیکوگرم	آنالیت های فرار و نیمه فرار قابل یونیزاسیون	(MS) (mass spectrometry)
پیکوگرم	آنالیت های غیر فرار و نیمه فرار	(CAD) (charged aerosol Detector)
نانوگرم	آنالیت های غیر فرار و نیمه فرار	(ELSD) (Evaporative Light Scattering Detector)
میکروگرم	بدون محدودیت آنالیت	(RID) (Refractive Index Detector)

منابع

1. Dahimiwal, S. M., Thorat, D. B., Jain, N. P., Jadhav, V. B., & Patil, P. B. (2013). A review on high performance liquid chromatography. *Int J Pharm Res*, 5(3), 1-6.
2. Malviya, R., Bansal, V., Pal, O. P., & Sharma, P. K. (2010). High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of global pharma technology*, 2(5), 22-26.
3. Sunil, A., Anju, G., & Rajat, V. (2018). HPLC detectors, their types and use: a review. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 6(5), 143-146.
4. Bachhav, M. Bhamare, R. Bachhav, (2023). Review of High Performance Liquid Chromatography and Its Applications
5. Mary T. Gilbert)1987(. High Performance Liquid Chromatography. ScienceDirect
6. Serban Moldoveanu, Victor David, (2022). Essentials in Modern HPLC Separations (Second Edition). ScienceDirect