HPLC

۱- شرح دستگاه

کرواتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) از جمله تکنیک های جداسازی مرسوم در بسیاری از علوم است. پارامترهایی از قبیل انتخاب نوع ستون و انتخاب فاز متحرک که به قطبیت آنالیت بستگی دارد و یا انتخاب آشکارساز مناسب که به ساختار و ویژگی های شیمیایی نمونه بستگی دارد. دستگاه HPLC ساخت شرکت Knauer آلمان با دو نوع آشکارساز طیف‌سنج UV–Vis و فلورسانس امکان آنالیز انواع فرآورده¬های داروئی را فراهم ساخته است. بدون شک مهمترین و پرکاربردترین روش جداسازی، روش "کروماتوگرافی" است. کروماتوگرافی (Chromatography)، بوسیله یک گیاه شناس روسی به نام تسوت، در اوایل قرن بیستم (۱۹۰۳) کشف شد. او از این تکنیک برای جداسازی رنگدانه های مختلف گیاهی مانند کلروفیل‌ها و گزانتوفیل‌ها استفاده کرد.

۲- اساس کار

درتمامی روشهای کروماتوگرافی، جداسازی بر پایه تفاوت مقداری آنالیت (ماده مورد جداسازی) در دو فاز ساکن (Stationary Phase) و متحرک (Mobile Phase) انجام می شود . این تفاوت مقدار، در نهایت منجر به تشکیل تعادلی می گردد که آن را با پارامتری به نام ثابت توزیع (K) بیان می کنند.

نتایج تحقیقات نشان می دهند که پدیده های فیزیکی و شیمیایی متفاوتی بر روی سرعت جداسازی و همچنین پهنای باند دیده شده برای هر آنالیت تاثیر دارند. از بین تئوری های موجود که به توجیه و محاسبه این عوامل می پردازند، تئوری بشقابک های فرضی (Plates)کاربرد بیشتری دارد.

در این تئوری فرض می شود که هرستون از یک سری لایه های باریک، افقی وکاملا مجزا از هم، که به طور متوالی قرار گرفته اند، تشکیل شده است. به هر یک از این لایه ها، بشقابک گفته می شود. کارایی هر ستون به تعداد بشقابک های موجود درستون و یا به عبارت دیگر به تعداد تعادل های ایجاد شده در ستون بستگی دارد.

از میان تکنیک های جداسازی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatography –HPLC)، بیشترین رشد و کارایی را داشته است و سالیانه میلیونها دلار صرف خرید و فروش دستگاههای HPLC در دنیا می شود. علت این رشد را می توان به حساسیت بالا، تعیین مقدار کمی با صحت بالا، قابلیت آنالیز نمونه های غیرفرار و حساس به دما نسبت داد.

۱-۲ قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

مخازن حلال: که در آنها فاز متحرک و یا حلالهای شستشو دهنده ستون ریخته شده است.

موتور یا پمپ : به منظور انتقال حلال و همچنین نمونه در فضای نسبتا طویل ستون نیاز به ایجاد فشاری در سیستم است که برای ایجاد آن حداقل از یک پمپ یا موتور استفاده می شود. حلال (فاز متحرک) توسط پمپ با سرعت و جریان ثابتی بر روی فاز ساکن حرکت داده می شود.

designed By Amin Mohammadzadeh
email: amindesigner1@gmail.com

تزریق کننده(Injector): تزریق نمونه، بسته به نوع دستگاه، به دو شکل دستی و یا خودکار انجام می¬گیرد. در روش خودکار، نمونه در ظروف مخصوصی ریخته شده و در محل تعبیه شده در دستگاه قرار می گیرد و نمونه توسط یک سرنگ به سیستم منتقل می شود. در روش دستی، از سرنگ هایی با ظرفیت های مختلف برای تزریق نمونه استفاده می شود.

ستون: پس از تزریق، نمونه ابتدا وارد قسمتی به‌نام‌پیش‌ستون(pre–column)یاستون‌محافظ(Guard column) می شود. نقش این ستون محافظت از ستون اصلی است. طول این ستون معمولا در حد سانتی متر است و جنس آن از فولاد ضد زنگ است. ماده پرکننده (Packing) ستون محافظ از جنسی مشابه ماده پرکننده ستون اصلی است.

ستون می تواند قطبی و یا غیرقطبی باشد. از مرسوم ترین ستون های غیرقطبی میتوان به C۱۸، (اکتادسیل سیلان ODS) اشاره کرد. جنس ستونها از فولاد ضد زنگ (Stainless Steel) است. پس از ورود نمونه به ستون، بر اساس تفاوت قطبیت، اجزاء مختلف نمونه در زمان های متفاوتی بانام‌زمان‌بازداری(RetentionTime)ازیکدیگر جدا شده و برای تشخیص نوع ماده به سمت آشکار ساز(Detector) هدایت می شوند.

آشکارساز (Detector): آشکارساز بر اساس نوع آنالیت انتخاب می شود. به طور کل یک آشکارساز خوب باید دارای ویژگی های زیر باشد.

- حساسیت
- غیر تخریبی بودن
- پاسخ خطی به غلظت در دامنه وسیع
- الف- از پر کاربردترین انواع آشکارساز، طیف سنج UV–Vis است که برای اجسامی که در این ناحیه جذب داشته باشند مورد استفاده قرار می گیرد.

ب- آشکارساز ضریب شکست، اساس کار این آشکارساز بر مبنای تغییراتی است که در ضریب شکست سیستم حلال به تنهایی و سیستم حلال همراه با نمونه، ایجاد می شود.پاسخ این آشکارساز به حرارت وابسته بوده و به همین دلیل معمولا به ندرت ازآن استفاده می-شود.

ج - آشکارساز فلورسانس، حساس تر از آشکارساز UV/Vis است ولی ترکیبات کمی موجودند که خاصیت فلورسانس داشته باشند درنتیجه کاربرد این آشکارساز نیز محدود است.

د- آشکارساز الکتروشیمیایی، که عملکرد آن بر پایه واکنش های اکسید و احیا می باشد.

ه- آشکارساز طیف سنج جرمی (MS): این مورد امروزه به دلیل مزایای زیادی که دارد به طور وسیعی مورد استفاده قرار می گیرد. از این جمله می‌توان به حد تشخیص بسیار پایین، حساسیت و انتخابگری بالا و امکان بررسی نمونه در حضور مزاحم‌های شیمیایی اشاره کرد.

۳- دامنه کاربرد

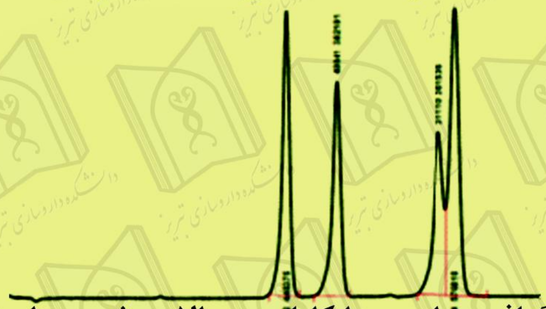
۳-۱) آنالیز کیفی

برای تشخیص و شناسایی نوع ترکیبات انجام می شود. از آنجایی که زمان بازداری (Retention Time) برای هر ماده در یک سیستم و شرایط خاص آزمایشگاهی ثابت و مشخص می باشد، می توان از آن جهت تعیین نوع آنالیت استفاده کرد.

. به این منظور کروماتوگرام آنالیت را با کروماتوگرام به دست آمده از استاندارد آن آنالیت مقایسه می کنند. در صورت یکسان بودن زمان بازداری می توان با قطعیت نوع ماده را تعیین کرد. ذکر این نکته لازم است که مقایسه این دو کروماتوگرامِ تنها در شرایط آزمایشگاهی و دستگاهی کاملاً یکسان معتبر است.

۳-۲) آنالیز کمی

به منظور تعیین کمی مقدار آنالیت، سطح زیر پیک و یا ارتفاع پیک ترکیب مجهول را با نمونه استاندارد مقایسه می کنند. در مواردی که پیک ها باریک و متقارن باشند، اندازه گیری ارتفاع پیک از صحت و سرعت بیشتری برخوردار است. هر چند که امروزه به راحتی می توان ارتفاع و سطح زیر پیک را به کمک دستگاه های الکترونیک با دقت و صحت بالایی محاسبه کرد.



کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، روشی مناسب جهت جداسازی، اندازه گیری، و تعیین نوع مواد است. این تکنیک با تلفیق با روشهای دیگر و آشکارسازهای پیشرفته ای مانند طیف سنج جرمی کاربردهای زیادی در علوم مختلف دارد. انتخاب فاز متحرک و ثابت، انتخاب آشکارساز و تعیین سرعت جریان فاز متحرک از جمله موارد اساسی در تنظیمات یک روش مناسب HPLC است.

designed By: Amin Mohammadzadeh
email: amindesigner1@gmail.com