

سیستم UPLC و کاربردهای آن در آزمایشگاه آنالیز دستگاهی



با نگاهی اجمالی به جدول مقایسه عملکرد تکنیک های HPLC و UPLC در می یابیم که مزایای بسیاری در استفاده از سیستم UPLC در مقایسه با HPLC وجود دارد که از آن جمله اقتصادی تر بودن آن از لحاظ مصرف کمتر حلال به میزان ۹۵٪ و در نتیجه کاهش آلدگی های زیست محیطی به لحاظ تولید کمتر حلال آلدگ است.

راندمان و کارائی بالاتریه جهت سرعت عمل بیشتر (۵ برابر) و کاهش چشمگیر زمان بازدارندگی (Retention Time) به میزان ۱/۵ برابر از جمله مواردی است که در مجموع موجب افزایش عملکرد بهتر UPLC نسبت به HPLC های متداول می شود و در نهایت می تواند هزینه های بیشتر عملیاتی شامل: خریداری، راهبری، تعمیر و نگهداری بالاتر این سیستم ها

امروزه با پیشرفت علم و تکنولوژی روش های جدیدی برای بهبود و توسعه جداسازی و آنالیز مواد ابداع شده است که یکی از این تکنیک ها، کروماتوگرافی مایع با فشار (عملکرد) فوق العاده بالا است که به اختصار UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) نامیده می شود.

سیستم UPLC به تدریج و پس از گذشت حدود ۱۰ سال از اولین معرفی آن (PATENT) توسط کمپانی Waters آمریکا با نام تجاری ACQUITY UPLC به تدریج جایگاه خود را در بازار پیدا کرده و در حال جایگزینی سریع با سیستم های متداول HPLC است.

اساس تئوریک و علمی UPLC تقریبا مشابه با روش پایه HPLC است فقط دانشمندان و متخصصین آنالیز دستگاهی در طول زمان به این نتیجه رسیدند که با افزایش فشار سیستم های کروماتوگرافی مایع HPLC به میزان ۲ برابر و کاهش قطر ذرات ستون Particle Size به کمتر از ۲ مایکرون در واقع موجب افزایش سرعت عمل و کارائی (Performance) دستگاه UPLC به لحاظ تئوریک و علمی به میزان قابل توجهی می شود که در برخی منابع این کارائی به اندازه ۳ دستگاه HPLC برآورد می شود.

در ادامه به اختصار مطابق با جدول ذیل به برخی از تفاوت های اصلی سیستم UPLC و HPLC اشاره می شود:

Item	Chromatography Parameters	HPLC	UPLC
1	Max Pressure	6000psi (410bar)	12000-15000psi (\approx 1000bar)
2	Eluent Consumption	High	Very Low (\leq 1/5)
3	Sample Injection Volume	Average 10 μ l	\leq 5 μ L Low volume dispersion
4	Flow Rate	1	1/3
5	Retention Time	5-40 min	\leq 1/5 min
6	Column Particle Size	3-10 μ m	\leq 2 μ m
7	Column Length	100-300mm	\leq 30mm
8	Column I.d (internal diameter)	3.9 or 4.6 mm	1.7 or 2.1 mm
9	Temperature	35	Ambient to 60
10	Base Line	Some noise	Smooth
11	Efficiency	Average	High(\times 3)
12	Resolution	Average	High
13	Selectivity	Average	High
14	sensitivity	Average	Excellent
15	Reproducibility	Very good	Very good

تفکیک پذیری (Resolution) به هیچ عنوان قربانی سرعت عمل نشده است بلکه به میزان قابل توجهی نیز ببود یافته است که تحقق این امر (راندمان و سرعت بالاتر توأم با دقت بیشتر از آرزو های مهم صنایع داروسازی و مراکز تحقیقاتی است.

احتیاج به مقادیر بسیار کمتر نمونه جهت تزریق در سیستم UPLC (≤ $5\mu\text{L}$) برای آنالیز و شناسایی مقادیر بسیار کم در نمونه های با ارزش بیولوژیک و سنتیک از جمله تومورمارکرها، بیومارکرها، هورمون ها و داروهای نوترکیب حائز اهمیت است و از اталاف آنها جلوگیری می نماید. علاوه بر آن هماهنگی بیشتر با دتکتورهای اسپکترومتری جرمی با قدرت تفکیک بالا HDMS/MS سری TQ-SQ از موارد دیگر مزایای کاربردی UPLC است که از نظر تثویریک به علت افزایش ظرفیت Peak ها (Resolution) در UPLC و در نتیجه تشدید کارآیی فرایند Source Ionization و کاهش پدیده Ion Suppression حساسیت مجموعه را به صورت چشمگیری ببود می بخشند.

در ادامه باید به برخی از مشکلات سیستم های UPLC در مقایسه با HPLC به لحاظ تکنیکال و ساختاری از جمله قیمت تمام شده بالاتر خرید دستگاه UPLC و ملحقات جانبی آن شامل ستون های هیبریدی، دتکتورهای مخصوص فشار بالا و در برخی موارد دیگر از جمله زمان بر بودن Method Development در تبدیل HPLC از Methodology به UPLC نیز اشاره کرد. علاوه بر آن هزینه های بالاتر تعمیر و نگهداری دستگاه های UPLC به لحاظ پیچیدگی های سخت افزاری و فنی و اصطلاحاً بالاتر به علت فشار فوق العاده بالاتر در این سیستم ها در نهایت موجب کاهش عمر متوسط Half Life آنها در مقایسه با سیستم های HPLC رایج می شود و نیاز به تعویض اتصالات، Check Valve، Transducer های مخصوص کار در فشار بالا را در میان مدت اجتناب ناپذیر می کند.

در مخصوص ستون های مخصوص UPLC باید گفت که این ستون ها در واقع Patent کمپانی Waters آمریکا بوده و با نام تجاری Bridged Ethylene Hybrid(BEH) نیز شناخته می شود و در حقیقت نسل دوم ستون های هیبریدی X-Terra است که از اتصال پایه سیلیکاژل به پایه پلیمری توسط پل های متیلی(CH_3) ساخته شده اند که عملاً به صورت ترکیبی از کارایی بالاتری برخوردار بوده و در شرایط سخت آنالیز(دماهای بالا، فشار بالا، محیط ها به شدت اسیدی یا قلائی) ویژگی های آنالیتیکال Quantitative & Qualitative خود را به خوبی حفظ می کند.

ذکر این نکته ضروری است که به دلیل قطر ذرات ریزتر ($\text{Particle size} \geq 2\mu\text{m}$) و ابعاد (طول و قطر) کوچکتر، ستون های هیبریدی (BEH) بعضی دارای مشکلاتی است از جمله این که لیگاند کردن گروه های عاملی (واکنش دهنده) مثل $\text{CN}, \text{C}_8, \text{C}_{18}, \text{NH}_2$ روی ماده پایه ستون (پلیمر-سیلیکاژل) کار دشواری است که به دلیل سطح مقطع و

Time را به دلیل سرویس دهی سریع تر (Efficiency) به مراکز صنعتی - تحقیقاتی در میان مدت و بلند مدت مستهلك نماید.

شایان ذکر است که علی رغم افزایش راندمان و کارائی سیستم UPLC (زمان پاسخ دهی بسیار کوتاه تر در فشار بالاتر) ویژگی های کمی و کیفی آنالیز که از خواص اصلی کروماتوگرافی مایع به شمار می روند شامل انتخاب پذیری (Selectivity)، حساسیت (Sensitivity)



و دقت ترکیبی (COMPOSITIONAL PRECISION & ACCURACY

بالائی است که ترکیب حلال های مختلف در فشار ترکیبی بالا را با دقت و انعطاف پذیری بیشتری امکان پذیر می کند.

دستکنترور های مختلف در سیستم های UPLC هم دچار دگرگونی های اساسی نسبت به HPLC های رایج شده اند از جمله این که حجم (ظرفیت) Flow cell دستکنترور های آن به میزان زیادی در حد (500 nl) کم شده اند ولی علی رغم کاهش سطح مقطع تماس (Cross-Section) \geq 10 mm با منبع نوری که خود موجب کاهش ضریب SIGNAL/NOISE در نتیجه کاهش حساسیت دستکنترور می شود، با به کارگیری تکنولوژی فیبر نوری (OPTIC FIBER GUIDING) و هدایت دقیق نور از منبع نوری بدون پراکنش و به طور مستقیم به محفظه ای Flow Cell این نیصیه برطرف شده است. لذا کماکان دستکنترور های UPLC از دقت و حساسیت (LOD) Detection فوق العاده بالائی برخوردار است.

در پایان یادآوری می شود که سیستم UPLC به علت در اختیار قرار دادن مقادیر بیشتری اطلاعات به ازاء تزریق مقدار کمتری ($5\mu\text{L}$) از نمونه های کمیاب مانند نمونه های بیولوژیکی نقش بسیار تعیین کننده ای در شناسایی سریع تر و دقیق تر ناهنجاری های متabolیکی دارند و در صنعت داروسازی بخش تحقیقات دارو (Drug Discovery) و متabolیت ها (METABOLOMICS) مورد توجه است که در نهایت موجب کاهش تحمیل هزینه های سنگین دارو و درمان به جامعه می شود.

تماس کوچکتر (low Surface Area) ذرات اجتناب ناپذیر بوده که خود موجب کاهش زمان احتباس می شود ولی در عوض همین کاهش قطر ذرات (Sub particle ≥ 2) موجب افزایش ۲ پارامتر مهم کمی و کیفی کروماتوگرافی یعنی تفکیک پذیری (Resolution)، افزایش ارتفاع (Height) Peak و کاهش عرض آن ها (Width) و نتیجتاً افزایش حساسیت (Sensitivity) به میزان قابل توجهی در ستون های هیریدی نسبت به ستون های معمولی (Conventional) می شود.

جهت انتخاب ستون های جدید UPLC توسط کمپانی های سازنده کیت هایی تحت عنوان Method Transfer Kit در بازار در اختیار مشتری (End User) قرار می گیرد که با استفاده از این نرم افزار می توان تمامی آنالیز را از HPLC Methodology به خود شامل انتخاب ستون Condition، Flow Rate، Temperature، Wave Length غیره است را مناسب با روش UPLC انتخاب نمود و در واقع فرایند Method Development را با سهولت و دقت بیشتری انجام داد.

سیستم اتوسهمپلر (Sample Management) در دستگاه های UPLC به علت حجم نمونه های بسیار کمتر (Low Dispersion) شامل استفاده از تکنولوژی های جدیدی از جمله سیستم کمکی تزریق نمونه با فشار بالا و تعداد بیشتری pressure transducer است که موجب انتقال فشار به صورت بدون پالس (Pulse Free) می گردد که در نهایت موجب افزایش دقت اندازه گیری Detection در دستکنترور می شود.

پمپ دستگاه VPLC (Solvent Management) نیز عموماً شامل یک پمپ ۴ حلاله (Quaternary Gradient) یا ۲ حلاله (Binary Gradient) با فشار خیلی بالا (1000 Bar) است که دارای صحت

