مهندس احسان درخشان نیا
derakhshannia@hotmail.com

مروری بر انواع تکنیک‌های کروماتوگرافی؛
با تاکید بر کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

کروماتوگرافی لغتی یونانی به معنای رنگ‌نگاری است که ترکیبی از دو واژه‌ی Chroma به معنی رنگ و Graphein به معنی نوشتن است. روش کروماتوگرافی برای اولین بار توسط یک گیاه‌شناس روسی بنام میکائیل سویت–Tswett مورد استفاده قرار گرفت. سویت از این روش برای تایید انواع مختلف کلروفیل موجود در برگ استفاده کرد. در سال ۱۹۳۱، Winterstein،Kuhn و Lederer از این روش برای جداسازی کاروتنوئیدها– Carot-enoid استفاده کردند. Martin و Synge از سال ۱۹۴۱ به بررسی و توسعه روش کروماتوگرافی پرداختند و در سال ۱۹۵۲ موفق به دریافت جایزه نوبل شدند.

کروماتوگرافی در واقع روشی فیزیکی به منظور جداسازی مخلوط‌هاست که در آن مواد مورد نظر برای تفکیک در محیطی بی‌حرکت پخش می‌شود. این فاز بی‌حرکت، به فاز ساکن معروف است؛ در حالیکه فاز دیگر، یعنی فاز متحرک، در امتداد یک مسیر معین جاری می‌شود. روش کروماتوگرافی، جزء به جزء کردن یک مخلوط براساس قطبیت ملکول است. اجسام موجود در محلول به علت قطبیت متفاوت با سرعت‌های مختلف در فاز ساکن حرکت می‌کنند.

سرعت حرکت هر جزء در مخلوط به عوامل مختلفی بستگی دارد که مهمترین آنها قطبیت است. یک نمونه قطبی هم به حلال و هم به فاز ساکن جاذبه دارد و جسمی که کندتر حرکت می‌کند بیشترین جاذبه را نسبت به فاز ساکن دارد.

در تمام جداسازی‌های کروماتوگرافی، نمونه، در یک فاز متحرک که ممکن است گاز، مایع یا سیال ابر بحرانی– Supercritical Fluid باشد، حل می‌شود. سپس این فاز متحرک از درون یک فاز ساکن امتزاج‌ناپذیر که بر سطح یک جامد یا در محلی داخل ستون تثبیت شده است، با فشار عبور داده می‌شود. دو فاز طوری انتخاب می‌شوند که اجزای نمونه خود را با درجات مختلفی بین فاز ساکن و متحرک توزیع کنند. آن اجزائی که با فاز ساکن قویاً نگه داشته می‌شود به آهستگی با جریان فاز متحرک حرکت می‌کند. در مقابل، اجزائی که به طور ضعیف به وسیله فاز ساکن نگه داشته می‌شود، به سرعت حرکت می‌کنند. در نتیجه‌ی این اختلافات در تحرک، اجزای نمونه به نوارهای مجزا جدا می‌شود که می‌توان از آنها در تجزیه‌ی کیفی و یا کمی استفاده کرد. فاز ساکن، مایع و یا جامد و فاز متحرک، گاز و مایع است. عاملی که بین تمام روش‌های کروماتوگرافی مشترک است، اختلاف در آهنگ حرکت مؤلفه‌های مخلوط در فاز متحرک است که در اثر واکنش بین مؤلفه‌های با فاز ساکن که برای جداسازی اجزاء به‌کار می‌رود، اتفاق می‌افتد.

روش‌های کروماتوگرافی را می‌توان به دو روش دسته بندی کرد. روش اول بر اساس ابزار فیزیکی بنا شده است که به کمک آن فازهای متحرک و ساکن با یکدیگر تماس برقرار می‌کنند. در کروماتوگرافی ستونی، فاز ساکن در یک ستون باریک قرار دارد که از داخل آن فاز متحرک تحت تأثیر نیروی فشار عبور داده می‌شود. در کروماتوگرافی مسطح، فاز ساکن بر روی یک صفحه مسطح و یا در لابه لای یک صفحه کاغذ قرار داده می‌شود؛ در اینجا فاز متحرک از لا به لای فاز ساکن تحت اثر مویینه‌ای حرکت می‌کند.

یک دسته بندی اساسی‌تر روش‌های کروماتوگرافی بر

پایه انواع فازهای متحرک و ساکن و انواع تعادل‌های درگیر در انتقال مواد حل شده بین فازها بنا شده است. سه گروه عمومی کروماتوگرافی مایع-LC، کروماتوگرافی گازی-GC و کروماتوگرافی سیال ابر بحرانی-SFC. همان طور که از نام آنها پیداست، فاز متحرک در سه گروه به ترتیب عبارتند از: مایعات، گازها و سیالات ابر بحرانی. به بیان دیگر، اگر فاز متحرک گاز باشد، سیستم حاصل کروماتوگرافی گازی نامیده می‌شود و اگر فاز متحرک مایع باشد، نتیجه یک سیستم کروماتوگرافی مایع خواهد بود. اگر فاز متحرک سیال فوق بحرانی باشد، کروماتوگرافی سیال فوق بحرانی نامیده می‌شود که این سیال از نظر حلالیت شبیه مایعات است و از نظر نفوذپذیری شبیه گازهاست. کروماتوگرافی سیال فوق بحرانی یک نوع هیبرید از کروماتوگرافی گازی و مایع است که بعضی از بهترین جنبه های هردو را ترکیب می‌کند.

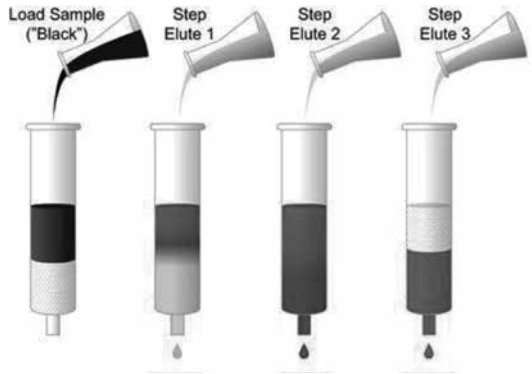
اگر به طور خلاصه بخواهیم اشاره کنیم، در واقع کروماتوگرافی متکی بر حرکت نسبی دو فاز است. یکی از فازها بدون حرکت است و فاز ساکن نامیده می‌شود و دیگری را فاز متحرک می‌نامند. مخلوط نمونه بین دوفاز در بستر کروماتوگرافی (ستون یا صفحه) توزیع می‌شود.

انواع کروماتوگرافی

در ادامه به بررسی انواع روش‌ها و تکنیک‌های کروماتوگرافی می‌پردازیم.

کروماتوگرافی ستونی

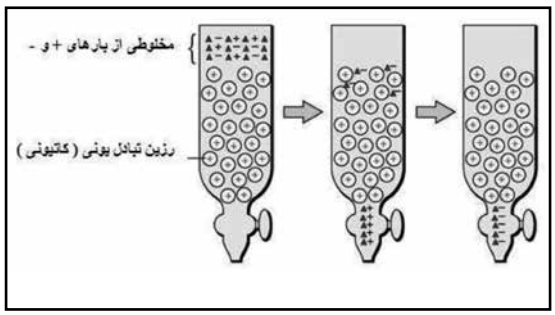
این نوع کروماتوگرافی برای جداسازی‌های فوق‌العاده حساس مانند جداسازی ویتامین‌ها، پروتئین‌ها و هورمون‌ها به کار می‌رود. در این روش فاز ساکن شامل یک ستون شیشه‌ای یا پلاستیکی است که با ماده‌ای نظیر آلومینیوم اکسید، کلسیم کربنات، منیزیم کربنات، زغال فعال شده، خاک رس، ژل‌ها و یا بسیاری از ترکیبات آلی دیگر پر شده است. اندازه ذرات فاز ساکن در گستره ۱۵۰ تا ۲۰۰ میکرومتر است. فاز متحرک شامل مخلوط نمونه همراه با یک حلال مناسب است که از بالای ستون اضافه می‌شود (شکل۱).



شکل۱. شمایی از نحوه‌ی جداسازی با استفاده از ستون کروماتوگرافی

کروماتوگرافی یونی

در این نوع کروماتوگرافی، ستون از رزین تبادل یون پر می‌شود. با به کار بردن رزین مناسب می‌توان یون‌های مثبت و یون‌های منفی را از یکدیگر جدا کرد (شکل۲). مقادیر زیادی از رزین‌های تبادل یونی برای جدا کردن کامل یون‌ها از محلول در آزمایشگاه و نیز در مقیاس صنعتی به کار می‌رود. از جمله کاربردهای جالب این روش عبارتند از جداسازی مواد لانتایندها، آکتینیدها و آسیدهای آمینه.



شکل۲. شمایی از جداسازی یون‌ها با استفاده از کروماتوگرافی یونی

به طورکلی یکی از متداول‌ترین روش‌های کروماتوگرافی در فرآیند جداسازی و تخلیص زیست ملکول‌ها به طور عام و پروتئین‌ها به طور خاص، روش کروماتوگرافی تعویض یونی است با اشاره به اینکه در این روش از خاصیت عام پروتئین‌ها یعنی توانایی ایجاد جاذبه‌ی یونی با یک ماده جاذب باردار با بار مخالف برای جداسازی پروتئین مورد نظر از سایر ناخالصی‌ها استفاده می‌شود.

در کروماتوگرافی یونی فاز ساکن همان رزین کروماتوگرافی است و خواص ویژه‌ی خود را برای جداسازی ذره مورد نظر در فاز متحرک دارد.

روش کروماتوگرافی تعویض یونی ساکن از دو قسمت تشکیل شده است: یکی شبکه‌ی جامد (عمدتاً پلیمری یا کوپلیمری) که به عنوان تثبیت کننده عمل می‌کند و دیگری گروه عاملی است که وظیفه اصلی جذب یون را برروی ذرات باردار موجود در محلول انجام داده و خود برروی شبکه جامد قبلا تثبیت شده است. ساختار شبکه جامد خواصی از قبیل پایداری فیزیکی و شیمیایی رزین و میزان نفوذ پذیری ذرات برای دستیابی به گروه‌های عاملی را در سطح واقعی رزین تعیین می‌کند. از طرفی دیگر در تکنولوژی ساخت این شبکه‌های جامد، اندازه یا بزرگی قطعه‌های پلیمری و تخلخل آنها کنترل و تعیین می‌شود که در فاکتورهایی نظیر هزینه عملیاتی، میزان دبی جریان و فشار مقاوم تاثیر اصلی و اساسی

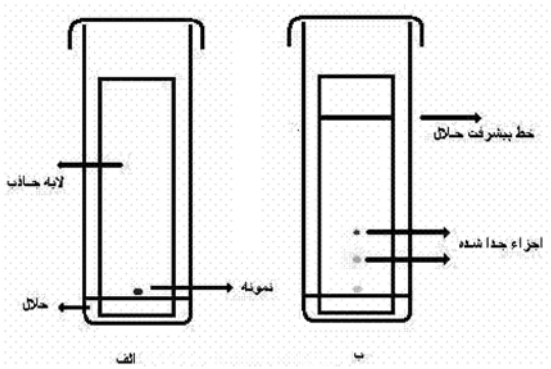
دارند. انواع مختلف رزین‌های تبادل یونی براساس نوع بار تثبیت شده گروه عاملی و شدت جذب تعیین می‌شود. مکانیزم تبادل یون بر این اساس استوار است که ذرات پروتئینی با توجه به نقطه ایزوالکتریک آنها و PH محلول می‌توانند دارای برآیند بار مثبت یا برآیند بار منفی باشند و بنابراین می‌توانند با یون‌های مثبت یا منفیِ قابل حرکت (یون‌های متحرک) که قبلاً در کنار یون‌های تثبیت شده دارای بار مخالف قرار گرفته‌اند، تبادل شوند (نقطه ایزوالکتریک یک ملوکول عبارت است از pH مشخصی که در آن هیچ گونه حرکت الکتریکی از ملوکول دیده نمی‌شود).

کروماتوگرافی کاغذی

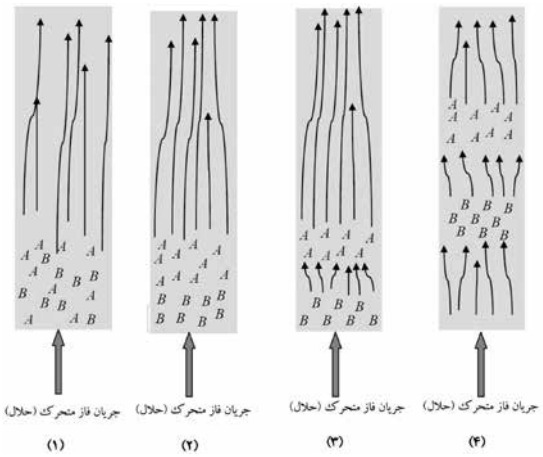
در این روش به جای ستون شیشه‌ای از نوارهای کاغذی در ظرف سر بسته استفاده می‌شود. قطره‌ای از مخلوط را روی کاغذ گذاشته و انتهای کاغذ را در حلال مناسب قرار می‌دهند، حلال بر اساس خاصیت موئینگی در کاغذ نفوذ کرده و باعث جداسازی اجزاء مخلوط می‌شود. در این روش فاز متحرک آب است و به وسیله جذب سطحی بر روی ملکول های سلولز قرار می‌گیرد. ملکول‌های سلولز نیز به نوبه خود با توجه به ساختار الیافی کاغذ در وضعیت ثابتی نگه داشته می‌شود. در ابتدا کروماتوگرافی کاغذی جهت جداسازی مخلوط‌های مواد آلی به کار می‌رفت اما امروزه برای جداسازی مخلوط‌های معدنی نیز استفاده می‌شود. با این روش کاتیون‌ها و آنیون‌ها را نیز می‌توان جداسازی کرد.

کروماتوگرافی لایه نازک(Thin Layer Chromatography)

کروماتوگرافی لایه نازک نوعی کروماتوگرافی جذبی جامد-مایع است و اصول آن مانند کروماتوگرافی ستونی است، ولی در این روش، جسم جاذب جامد را به صورت یک لایه نازک بر روی یک نوار شیشه‌ای یا پلاستیک پخش می‌کنند. یک قطره از محلول نمونه یا مجهول را در نزدیکی لبه‌ی صفحه قرار می‌دهند و صفحه را همراه مقدار کافی از حلال استخراج کننده در ظرفی قرار می‌دهند. مقدار حلال باید آنقدر باشد که فقط به سطح زیر لبه برسد (شکل۳-الف). حلال به طرف بالای صفحه حرکت می‌کند و اجزای مخلوط را با سرعت‌های متفاوت با خود حمل می‌کند. در نتیجه ممکن است تعدادی لکه در محل های متفاوت روی صفحه ظاهر شود. این لکه‌ها روی یک خط عمود بر سطح حلال ظرف قرار می‌گیرند (شکل۳ - ب). نحوه جداسازی و حرکت نمونه توسط حلال روی سطح در شکل ٤ آمده است.



شکل۳. طریقه قرار گرفتن صفحه TLCدرون تانک حلال



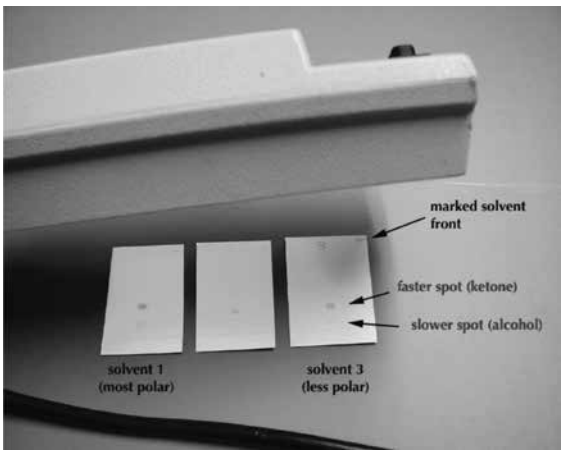
شکل٤. شمایی از جداسازی و حرکت نمونه توسط حلال بر روی صفحه TLC

روش کروماتوگرافی لایه نازک بسیار ساده است و سریع انجام می‌شود. این روش برای تفکیک اجزای یک مخلوط بسیار مفید است. یکی از مزایای مشخص TLC این است که احتیاج به مقدار کمی از نمونه دارد.

در روش TLC می‌توان از همان مواد جامد مورد استفاده در کروماتوگرافی ستونی استفاده کرد و در این میان سیلیکا و آلومینا بیشتر به کار می‌رود. معمولاً جسم جاذب را با مقدار کمی از ماده نگهدارنده مانند گچ شکسته بندی، کلسیم سولفات و یا نشاسته مخلوط می‌کنند تا جسم جاذب چسبندگی لازم را پیدا کند و به صفحه بچسبد.

برای تعیین محل لکه‌های اجسام بی‌رنگ بر نوار TLC روش‌های متعددی وجود دارد. به عنوان مثال می‌توان با تابش نور ماوراءبنفش به صفحه TLC، ترکیب‌هایی که خاصیت فلوئورسانس دارند را مشخص کرد (شکل۵). روش دیگر برای مشاهده لکه‌های بی‌رنگ این است که جسم جاذب را

با ماده فلوئورسانس‌دار بی اثر دیگر مخلوط کرد. هنگامی که نور ماورای بنفش به این صفحه می‌تابد، لکه موادی که نور ماورای بنفش را جذب می‌کنند ولی خاصیت فلوئورسانس ندارند در زمینه فلوئورسانس‌دار به صورت تیره ظاهر می‌شوند. در بعضی موارد نیز از معرف‌های آشکارساز دیگری استفاده می‌شود. این معرف‌ها را می‌توان بر روی کروماتوگرام پاشید و لکه ها را ظاهر کرد. به عنوان مثال ید را می‌توان به عنوان معرف آشکارساز مورد استفاده قرار داد. برای انجام این کار صفحه TLC را در داخل ظرفی که محیط آن از بخار ید اشباع شده است قرار می‌دهند. بسیاری از ترکیبات آلی ید را جذب می‌کنند و لکه‌ها روی کرماتوگرام به صورت رنگین معمولاً قهوه‌ای ظاهر می‌شوند.



شکل۵. دستگاه UV برای آشکار کردن لکه‌ها بر روی صفحه TLC

کروماتوگرافی گازی(Gas Chromatography)

کروماتوگرافی گازی یکی از قدرتمندترین و فراگیرترین روش‌های تجزیه دستگاهی است که اگر از امکانات و توانمندی‌های این دستگاه به خوبی استفاده شود، می‌توان اطلاعات متنوع و بسیار مفیدی را، هم در زمینه تجزیه کیفی (شناسایی) و هم در مورد تجزیه کمی (تعیین مقدار)، در ارتباط با تک‌تک اجزاء تشکیل دهنده یک مخلوط پیچیده به دست آورد. البته، این به آن معنی نیست که همه نمونه‌ها را می‌توان با این روش آنالیز کرد. تنها نمونه‌هایی به روش کروماتوگرافی گازی قابل آنالیز هستند که دارای ویژگی‌های معینی باشند. به عنوان مثال، تمامی اجزاء نمونه، باید در محدوده دمایی ۳۵۰ تا ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد فرار بوده و از فشار بخار قابل توجهی برخوردار باشند و یا با افزایش سریع دما، اجزاء نمونه بدون آنکه تخریب و یا تجزیه گردند، تبخیر شوند.

اساس جداسازی با کروماتوگرافی گازی، مانند سایر روش‌های کروماتوگرافی، بر پایه توزیع نمونه بین دو فاز استوار است. یکی از این فازها عبارت است از بستر ساکن ذراتی با سطح بسیار زیاد و فاز دیگر، گازی که از میان این بستر ساکن می‌گذرد. چنانچه فاز ساکن جامد باشد آن را کروماتوگرافی گاز–جامد می‌نامند. این روش بستگی به خواص جذب سطحی مواد موجود در ستون برای جداکردن نمونه‌ها، به ویژه گازها دارد. مواد جامد در ستون عبارتند از سیلیکا ژل، الک مولکولی– Molecular Sieve و زغال. اگر فاز ساکن مایع باشد آن را کروماتوگرافی گاز–مایع می‌نامند. کروماتوگرافی گاز – مایع کاربرد گسترده ای در تمام رشته های علوم دارد که به طور معمول به نام مختصر کروماتوگرافی گازی نامیده می‌شود. در کروماتوگرافی گاز – مایع، اجزای نمونه باید از هم جدا شوند که با استفاده از یک گاز بی اثر (گاز حامل) وارد ستون می‌شوند. اجسام موجود در نمونه میان گاز حامل و حلال غیرفرار (فاز ساکن) که روی یک جسم جامد بی اثری با اندازه معلوم و معین (جامد نگهدارنده) نگاه داشته شده است، تقسیم می‌شوند. این حلال به طور انتخابی، حرکت اجزای نمونه را براساس ضریب توزیع متفاوتی که دارند، کند می‌کند به طوری که هر یک، نوارهای مجزایی در گاز حامل به وجود می‌آورند. هر یک از این نوارهای اجزاء، همراه با جریان گاز حامل از ستون کروماتوگرافی بیرون می‌آیند و با آشکارساز به صورت تابعی از زمان ثبت می‌شوند. استفاده از GC به عنوان یک روش تجزیه‌ای توسط مارتین و سینج در سال ۱۹۴۱ پیشنهاد شد. جیمز و مارتین کروماتوگرافی گاز – مایع را در سال ۱۹۵۲ معرفی کردند.

دستگاه کروماتوگراف گازی دارای شش قسمت اصلی است:

- منبع تأمین کننده و ابزارهای تنظیم کننده جریان گاز حامل
- انژکتور
- آون یا گرمخانه
- ستون
- آشکارساز
- ابزارهای ثبت کروماتوگرام و محاسبه نتایج.

به طور خلاصه، فرآیند آنالیز و چگونگی انجام آزمایش با روش کروماتوگرافی گازی را می‌توان این چنین توصیف کرد:

محلولی از نمونه مورد نظر (مایع یا گاز) با استفاده از یک میکرو سرنگ (برای نمونه مایع) یا سرنگ گازی (برای نمونه گازی) به درون محفظه داغ انژکتور تزریق می‌شود. اجزای نمونه در تماس با دمای بالای انژکتور بلافاصله تبخیر شده و به همراه جریان گاز حامل به سوی ستون که داخل آونی با دمای قابل تنظیم قرار دارد، هدایت می‌شود. هر جزو نمونه به صورت مجزا با فاز ساکن داخل ستون برهم‌کنش برقرار می‌کند. به دلیل تفاوت در میزان برهم‌کنش هر جزء با ستون، سرعت حرکت اجزا در طول ستون با یکدیگر فرق دارد. میزان و نوع برهم‌کنش هر جزء با فاز ساکن و در نتیجه، سرعت حرکت آن، علاوه بر ماهیت ذاتی و ساختار شیمیایی گونه، به نوع فاز

ساکن، سرعت جریان گاز حامل و دمای آون نیز بستگی دارد. پس از خارج شدن هر جزء از ستون و رسیدن آن به آشکارساز، یک سیگنال الکتریکی تولید می‌شود که شدت آن با مقدار کمی آن جزء متناسب است. سیگنال الکتریکی تولید شده به دستگاه رسم کروماتوگرام و محاسبه نتایج ارسال شده و نتیجه نهایی در قالب یک کروماتوگرام به دست می‌آید. کروماتوگرام، نموداری است که در آن پاسخ‌های آشکارساز به اجزای نمونه بر حسب زمان خروج اجزاء از ستون رسم شده‌است. هر کروماتوگرام متشکل از چند پیک بوده که هر پیک متعلق به یک جزء نمونه است.

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

High Performance Liquid Chromatography technique

واژه‌ی کروماتوگرافی مایع دربرگیرنده‌ی تکنیک‌های جداسازی مختلفی همچون کروماتوگرافی مایع- جامد،مایع-مایع، تبادل یونی و به‌دام اندازی بر اساس ابعاد ذرات است که در تمامی آنها فاز متحرک مایع است. در نوع کلاسیک کروماتوگرافی مایع، یک ستون شیشه‌ای با قطر بالا محتوی فاز ساکن وجود دارد که فاز متحرک با توجه به نیروی جاذبه از بین آن عبور می‌کند. این فرآیند نسبتاً آهسته بوده و آزمایش‌های مکرر با آن خسته‌کننده است. از حدود سال ۱۹۶۹ میلادی، این روش با ساخت دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا-HPLC توسعه یافت.

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا روشی است توسعه یافته با مبنای کروماتوگرافی مایع، که قطر ذرات داخل ستون‌های آن بسیار کوچک شده و جداسازی را بهتر انجام می‌دهند و همچنین در درون این سیستم‌ها، پمپ‌هایی وجود دارند که سرعت تعادلی مناسب ایجاد می‌نمایند. به طور کلی، استفاده از انواع آشکارسازهای اسپکتروفتومتری، فلوئوریمتری، الکتروشیمیایی، ضریب شکست و غیره، و همچنین پیشرفت هایی که در ساخت ستون، پمپ و سایر تجیزات HPLC پدید آمد، کارایی، سرعت جداسازی و دامنه کاربردهای این روش را به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد.

در حال حاضر درمیان روش‌های مختلف جداسازی تجزیه‌ای، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا از بیشترین رشد برخوردار است. چنین رشد گسترده‌ای را می‌توان به توانایی این روش در جداسازی طیف وسیعی از مواد با نقطه جوش بالا و موادی که در اثر حرارت تجزیه می‌شود، اندازه‌گیری‌های کمّی و صحیح، حساسیت، توانایی در جداسازی سریع مخلوط‌های پیچیده و کاربرد گسترده آن در زمینه موادی که از نظر صنعتی اهمیت دارند، نسبت داد. از میان موادی که به وسیله این روش مورد تجزیه قرار گرفته‌اند می‌توان به اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلوئیک، هیدروکربن‌ها، کربوهیدرات‌ها، داروها، استروئیدها، آنتی‌بیوتیک‌ها و ... اشاره کرد.

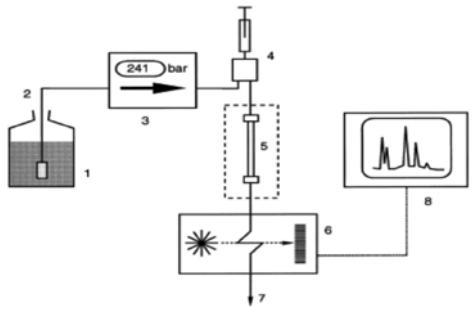
تجهیزات کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

به طور خلاصه و ساده می‌توان گفت:

جریانی از یک حلال به نام فاز متحرک، از درون یک ستونِ پر شده به نام فاز ساکن عبور می‌کند و نمونه آزمایش از قسمت تزریق وارد ستون شده و اجزاء نمونه بر اساس ماهیت شیمیایی با فاصله زمانی متفاوتی از ستون شویش می‌شود، سپس به وسیله آشکارساز شناسایی شده و نتایج به‌صورت پیک‌هایی به ثبت می‌رسد.

دستگاه HPLC، می‌تواند مجموعه‌ای از مدول‌ها یا اجزای سازنده جداگانه باشد، این در حالیست که می‌تواند به صورت یک دستگاه تک نیز طراحی شود. مفهوم مدول در مورد خرابی یک جزء سازنده‌ی تک، انعطاف پذیر است، به‌علاوه لزومی ندارد که قطعه‌های تک همه از یک سازنده‌ی دستگاه باشند. در صورتی که تمایل نداشته باشید خود تعمیزات جزئی را انجام دهید بهتر است یک دستگاه جمع و جور یکپارچه خریداری کنید. بهرحال این دستگاه فضایی کمتر از یک مجموعه مدولی را اشغال نخواهد کرد.

دستگاه HPLC شامل حداقل اجزای سازنده‌ای است که در شکل۶ نشان داده شده اند:



شکل۶. نمودار شمایی یک واحد HPLC. ۱=مخزن حلال، ۲= خط انتقال با چینی متخلخل، ۳=پمپ (با فشارسنج)، ٤= تزریق نمونه، ۵= ستون(با دماپا)، ۶=آشکارساز،۷=فاضلاب،۸=کسب داده‌ها

مخزن حلال، خط انتقال با چینی متخلخل، پمپ با فشار زیاد، وسیله تزریق نمونه، ستون، آشکارساز و ثبات داده‌ها معمولاً همراه با ارزیابی داده‌ها. گرچه ستون مهم ترین قسمت است، ولی معمولاً کوچکترین قطعه است. برای جداسازی‌های هم‌دما، ستون معمولاً در یک دماپا محبوس شده است. کاملاً متداول است بیش از یک حلال به‌کار بریم بنابراین به یک مخلوط‌کن و کنترل کننده نیاز است. در صورتی که کسب داده‌ها با یک کامپیوتر انجام شود، آن‌را می‌توان برای کنترل کل سیستم نیز به کار گرفت.

هر قسمتی از سیستم که در تماس با فاز متحرک است باید از موادی ساخته شود که به وسیله حلال‌های مورد استفاده آسیب نبیند. قسمت‌هایی که در تماس با حلال هستند معمولاً از فولاد

ضد زنگ یا پلی تترافلوئورواتیلن یا مواد دیگر مانند یاقوت کبود یا سرامیک ساخته شده‌اند. همچنین قسمت‌هایی نظیر خروجی پمپ تا انتهای ستون که معمولاً در معرض ایجاد فشار قوی قرار می‌گیرند باید آنقدر محکم باشند که تحمل فشار را داشته باشند. نکته مهمی دیگر در طراحی دستگاه‌های HPLC این است که بین تزریق جسم و آشکار کردن آن باید حجم مرده به کمترین حد خود برسد. منظور از حجم مرده فضاهای خالی یا اشغال نشده است. وجود حجم مرده زیاد سبب از دست دادن شدید کارایی سیستم می‌شود. واضح است که ستون نیز در جاهایی که توسط فاز ساکن پر نشده دارای مقدار کمی حجم مرده است.

◄ مخازن فاز متحرک و سیستم‌های مورد عمل قرار دادن حلال

یک دستگاه جدید HPLC به یک و یا تعداد بیشتری مخزن شیشه‌ای و یا فولاد زنگ نزن مجهز است که حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر و یا بیشتر از حلال است. مخازن اغلب به وسایلی برای حذف گازهای حل شده (معمولاً اکسیژن و نیتروژن) مجهزند. این گازها با تشکیل حباب‌ها سبب پهن شدن نوار پیک‌ها می‌شود و علاوه بر این، اغلب با عملکرد آشکارساز تداخل می‌کنند. گاززداها ممکن است به یک سیستم پمپ خلأ، یک سیستم تقطیر، وسایلی برای گرم کردن و هم زدن حلال و همچنین به سیستم‌هایی برای وارد کردن و پاشیدن حباب‌های یک گاز بی‌اثر برای خارج کردن گازهای حل شده از محلول، مجهز باشند. همچنین اغلب اوقات سیستم وسیله‌ای برای صاف کردن گرد و غبار ذرات از حلال دارد تا از آسیب دیدن پمپ یا وسیله‌ی تزریق یا گرفتگی ستون به وسیله‌ی این ذرات جلوگیری شود. لزومی ندارد که گاززداها و صافی‌ها، جزء لاینفک دستگاه HPLC باشند. مثلاً، یک راه مناسب، آماده سازی حلال‌ها قبل از هدایت آنها به مخزن، صاف کردن حلال از داخل یک صافی ریزمنفذ در خلأ است. این آماده سازی، گازها و همچنین مواد معلق را حذف می‌کند.

◄ سیستم‌های پمپ کننده

وظیفه اصلی پمپ در HPLC این است که فاز متحرک را با فشار بالا و با سرعت عبور کنترل شده، از ستون عبور دهد. یک نوع پمپ (پمپ با فشار ثابت)، این عمل را با وارد آوردن فشار ثابت به فاز متحرک انجام می‌دهد، و سرعت عبور از ستون با توجه به مقاومت ستون در برابر عبور جریان و مقاومت‌های دیگر موجود بین پمپ و آشکارساز تعیین می‌شود. نوع دیگر (پمپ با جریان ثابت)، این کار را با عبور جریان در حد خواسته شده انجام می‌دهد و در اینجا میزان فشار با توجه به مقاومت در برابر عبور تنظیم می‌گردد. ممکن است مقاومت در برابر عبور در یک سیستم، با زمان تغییر کند. این کار با ورم کردن یا نشت انباشته‌های ستون، تغییر درجه حرارت و یا تجمع ذرات خارجی موجود در نمونه، در پمپ و یا در واحد تزریق امکان‌پذیر است. اگر پمپی با فشار ثابت مورد استفاده قرار گیرد، به هنگام تغییر مقاومت در برابر عبور، سرعت عبور نیز تغییر خواهد کرد. اما در پمپ با جریان ثابت، تغییر مقاومت در برابر عبور، توسط تغییر فشار جبران می‌شود. تغییر در سرعت عبور سبب از دست دادن دقت و ایجاد خطوط پایه در دستگاه ثبات می‌شود.

علاوه براینکه پمپ باید قادر باشد تا فاز متحرک را در فشار بالا و با سرعت عبور یکنواخت از ستون عبور دهد، باید دارای خصوصیات زیر نیز باشد:

۱–قسمت‌های داخلی پمپ که در تماس با حلال‌ها هستند نباید به وسیله حلال‌های مورد استفاده آسیب دیده و فاسد شود.

۲–پمپ باید قادر باشد تا گستره‌ای از سرعت عبور را فراهم آورد و ایجاد تغییر در سرعت عبور باید آسان باشد.

۳–عبور حلال باید بدون ضربان باشد.

٤–حجم درونی پمپ کم باشد تا تغییر فاز متحرک از یک نوع به نوع دیگر به آسانی امکان‌پذیر شود.

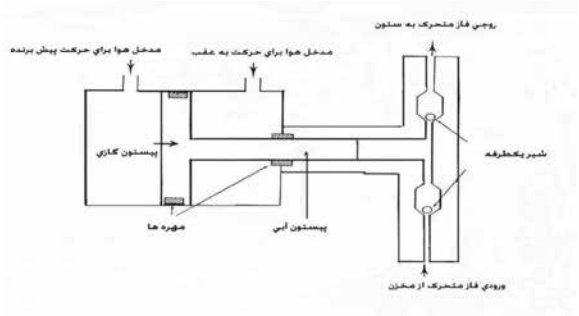
۵–پمپ باید به گونه‌ای باشد که تعمیر و جداکردن آن از سیستم به آسانی میسر باشد.

لازم به ذکر است که فشار بالا به خودی خود چیزی نیست که در HPLC به دنبال آن هستیم. واقعیت این است که فاز متحرک، یک مایع است که برای عبور آن از درون یک بستر پرشده متراکم به فشار بالایی نیاز است. ذرات کوچک مسیرهای نفوذ کوتاهی دارند و بنابراین تعداد زیادی از بشقابک‌های نظری در واحد طول در اختیار می‌گذارند. در تئوری بشقابک‌های فرضی یا نظری (Plates) فرض می‌شود که هر ستون از یک سری لایه‌های باریک، افقی و کاملا مجزا از هم، که به طور متوالی قرار گرفته‌اند، تشکیل شده است. به هر یک از این لایه‌ها، بشقابک گفته می‌شود. در هر کدام از این بشقابک‌ها، آنالیت یا ماده‌ی مورد تجزیه در تعادلی بین فاز متحرک و ساکن قرار دارد و در نهایت با انتقال بین بشقابک‌ها عمل جداسازی صورت می‌پذیرد. کارایی هر ستون به تعداد بشقابک‌های موجود درستون و یا به عبارت دیگر، به تعداد تعادل‌های ایجاد شده در ستون بستگی دارد. بنابراین برای بررسی کارایی ستون، تعداد بشقابک‌های فرضی (N) را از رابطه زیرمحاسبه می‌کنند. در این رابطه H نشان‌دهنده ارتفاع هر بشقابک و L طول ستون را به نمایش می‌گذارد.

$$N = L/H$$

- **پمپ‌های با فشار ثابت**

در اولین نوع پمپ‌های با فشار ثابت در HPLC (پمپ‌های حلقوی)، گاز متراکم درون سیلندر با فشار زیاد فاز متحرک موجود در مسیر اتصال (بین مخزن حلال و ورودی ستون)، را به درون ستون می‌راند. این نوع پمپ در انواع قدیمی HPLC استفاده می‌شد و هم‌اکنون تنها از جنبه تاریخی جالب است. پمپ‌های بادی از جمله پمپ‌های با فشار ثابت می‌باشند. اصول عملکرد پمپ‌های بادی تشدید کننده در شکل۷ زیر نشان داده شده است.

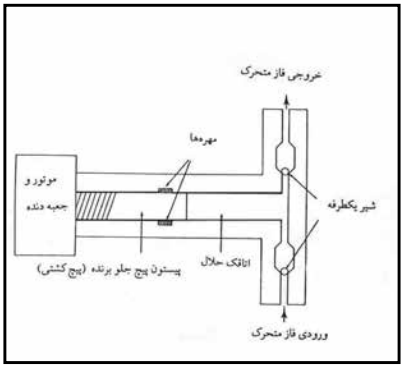


شکل۷. پمپ بادی تشدید کننده

- **پمپ‌های با جریان ثابت**

در HPLC دو نوع پمپ با جریان ثابت مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در پمپ سرنگی (شکل۸)، فاز متحرک توسط یک اتاقک از یک موتور جدا می‌شود. این موتور با سرعت متفاوت پیچی را گردانده که آن نیز سبب گردش پیستون می‌شود. جریان در اینجا بدون نبض- Pulse است و می‌تواند با تغییر سرعت موتور تغییر پیدا کند. اتاقک در حدود ۲۰۰ تا ۵۰۰ سانتیمتر مکعب حجم دارد و ظرفیت فاز متحرک محدود به ظرفیت اتاقک است. اگرچه میزان حجم اتاقک زیاد است و قبل از پرکردن مجدد آن، تعداد زیادی نوار جذبی کروماتوگرافی می‌توان بدست آورد، اما زمانی که تغییر حلال لازم است برای خارج کردن آن از اتاقک، میزان زیادی حلال از بین می‌رود.

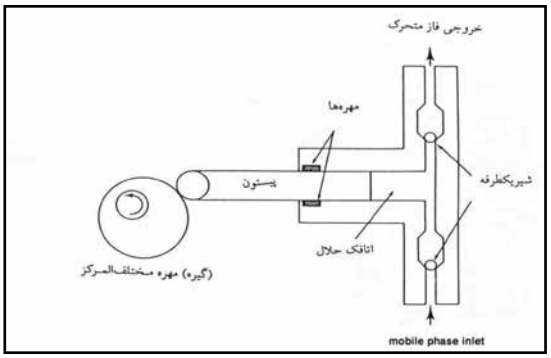


شکل۸. پمپ سرنگی

نوع دیگر پمپ که در دستگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، پمپ متناوب است که در شکل ۹ نشان داده شده است.

با استفاده از دنده یا گیره‌ی مختلف‌المرکز، پیستون به درون اتاقک حلال رفته و برمی‌گردد. در حرکت پیش‌برنده، شیر یک‌طرفه‌ی ورودی بسته شده و شیر یک‌طرفه خروجی باز است لذا فاز متحرک به درون ستون می‌رود. در حرکت به عقب، شیر یک‌طرفه خروجی بسته و شیر یک‌طرفه‌ی ورودی باز می‌شود تا اتاقک پر از حلال شود. پمپ‌های متناوب برخلاف پمپ‌های سرنگی دارای ظرفیت نامحدود است و حجم داخلی آن می‌تواند خیلی کوچک باشد. سرعت جریان می‌تواند با تغییر طول پیستون و یا سرعت موتور تغییرکند و دسترسی به شیرها و مهره‌ها در این پمپ‌ها ساده است.

در پمپ‌های متناوب یک‌دهانه‌ای (همانند شکل۹) در ازای یک نیم‌دایره پمپ، فاز متحرک به درون ستون پمپاژ می‌شود و در ازای نیم‌دایره دیگر، اتاقک حلال پر می‌شود. بنابراین سرعت جریان همواره ثابت نیست. اما با استفاده از پمپ‌های متناوب دودهانه، که دو دهانه با اختلاف فازِ برابر با ۱۸۰ درجه کار می‌کنند، زمانی‌که یک دهانه، حلال را به درون ستون می‌برد، دهانه دیگر در حال پر کردن اتاقک حلال خود است در نتیجه عملکرد دودهانه‌ای که ۱۸۰ درجه اختلاف فاز دارند سبب جریان بدون نبض می‌شود.



شکل۹. پمپ متناوب

- **پمپ‌های پیستونی**

این پمپ‌ها معمولاً از یک محفظه کوچک تشکیل شده‌اند که در آن حلال با حرکت رفت و برگشت یک پیستون توسط موتور پمپ می‌شود. دو شیر یک‌طرفه که به طور متناوب باز بسته می‌شوند، جریان حلال به داخل و به خارج از سیلندر را کنترل می‌کنند. حلال در تماس مستقیم با پیستون است یا اینکه ممکن است فشار از طریق یک دیافراگم انعطاف‌پذیر که خود نیز توسط یک پیستون رفت و برگشتی به طریق هیدرولیکی

پمپ می‌شود، به حلال منتقل شود. از مزیت‌های پمپ‌های پیستونی می توان به حجم داخلی کوچک، فشارهای خروجی زیاد (تا ۱۰۰۰۰ psi) و سرعت جریان‌های ثابت اشاره کرد.

به طور کلی نیازمندی‌های مهم برای یک سیستم پمپ کننده‌ی HPLC عبارتند از:

۱-تولید فشارهای تا ٦۰۰۰ psi

۲-خروجی بدون نبض یا ضربان-pulse

۳- سرعت جریان در گستره‌ی ۰,۱ تا ۱۰ (ml/min)

٤- اجزای سازنده‌ی مقاوم در مقابل خوردگی

سیستم تزریق نمونه

متداول‌ترین روش وارد کردن نمونه در کروماتوگرافی مایع که به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد، توسط حلقه‌های نمونه‌بردار-loop/valve injector است. این وسایل اغلب از قسمت‌های اصلی دستگاه‌های HPLC اند و قابلیت تعویض‌پذیری دارند که انتخاب اندازه‌های نمونه از ۵ تا ۵۰۰ میکرولیتر را فراهم می‌آورند. این وسیله به منظور نگهداری و سپس ورود مقدار مشخصی از نمونه به درون فاز متحرک طراحی شده است. نمونه معمولا توسط سرنگ و بصورت دستی و یا به صورت اتوماتیک از درون ویال‌ها به درون حلقه این وسیله وارد می‌شود. زمانی که لازم است تا تزریق صورت پذیرد، یک سوئیچ چرخشی حرکت می‌کند و جریان از درون حلقه حاوی نمونه عبور می‌کند.

ستون و پیش‌ستون

ستون‌ها قلب کروماتوگرافی هستند و موفقیت یا عدم موفقیت یک آنالیز بستگی به انتخاب ستون دارد. جنس ستون‌ها معمولا از فولاد ضد زنگ می‌باشد که با ماده پرکننده ستون پر شده است. این ماده پرکننده دو نوع است:

✔ مواد غیرآلی سرامیکی مانند سیلیکا و آلومینا که دارای استحکام بالایی است و در هر حلالی حل نمی‌شود.

✔ پلیمرهای آلی که دو نوع پلی استایرن دی‌وینیل بنزن و همچنین متاکریلیت‌ها می‌باشند که نسبت به مواد غیرآلی استحکام کمتری دارند و زودتر فشرده می‌شود ضمن اینکه حلال‌ها با نفوذ در ماتریس پلیمری آنها باعث حل شدن (خوردگی) ذرات می‌شود که نتیجتاً باعث پایین آمدن کارایی ستون با کاهش سرعت انتقال آنها می‌شود.

طول اکثر ستون‌های کروماتوگرافی مایع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر است. معمولاً ستون‌ها مستقیم‌اند و هر زمان که به طول‌های بیشتری احتیاج باشد، با متصل کردن دو یا چند ستون به یکدیگر، این کار انجام می‌شود. قطر داخلی ستون‌های مایع اغلب ٤ تا ۱۰ میلی‌متر است. متداول‌ترین اندازه ذرات پرکننده‌ها ۵ و ۱۰ میکرومتر است.

به طورکلی می‌توان گفت که نام ستون‌ها بنابر کارخانه سازنده، مختلف می‌باشد وگرنه همگی دارای خواص کاربردی تقریباً یکسانی هستند. در زیر چند گروه از ستون‌ها نام برده شده است:

- ستون‌هایی که زنجیره‌هایی با ۸ کربن دارند (C_8)
- ستون‌هایی که زنجیره‌هایی با ۱۸ کربن دارند (C_{18})
- ستون‌های سیلیکائی (SI)
- ستون‌های با گروه آمینی ($-NH_2$)
- ستون‌هایی با گروه سیانو (-CN)
- ستون‌هایی با گروه فنیلی (PHENYL)
- ستون‌هایی با گروه دی‌الی (-OH)

اغلب، یک ستون کوتاه محافظ (پیش‌ستون) قبل از ستون تجزیه‌ای به کار می‌رود. این کار عمر ستون تجزیه‌ای را افزایش می‌دهد.

دماپای ستون

برای بسیاری از کاربردها، کنترل دقیق دمای ستون لازم نیست و ستون را می‌توان در دمای محیط به کار برد. با وجود این، اغلب اوقات، با ثابت نگه داشتن دمای ستون تا چند دهم درجه سانتیگراد، کروماتوگرافی بهتری به دست می‌آید. اکثر دستگاه‌های تجاری جدید امروزه به گرم کننده‌های ستونی مجهزند که دمای ستون را تا چند دهم درجه از نزدیک دمای محیط تا ۱۰۰ الی ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد کنترل می‌کنند.

آشکارسازها

عامل وجودی آشکارساز در HPLC، آشکار کردن فاز متحرکی است که از ستون بیرون می‌آید. بنابراین، آشکارساز باید تغییر در ترکیب فاز متحرک را به طریقی نظارت و پایش و به یک علامت الکتریکی تبدیل کند. خروجی آشکارساز این علائم الکتریکی است که با خصوصیات فاز متحرک یا جزء نمونه متناسب است. سپس این علامت به ثبات یا صفحه نمایش انتقال می‌یابد که در آنجا بصورت انحرافی از خط مبنا نشان داده می‌شود. یک آشکارساز ایده‌ال باید مشخصات زیر را داشته باشد:

- حساسیت کافی
- پایداری خوب و تکرارپذیری
- زمان عکس‌العمل کوتاه که مستقل از سرعت جریان است
- قابلیت اعتماد بالا و سهولت کار
- حجم مرده-Dead Volume پایین
- حد تشخیص پایین (یعنی قادر باشد مقایر کوچک نمونه را نظارت کند)
- ارزان قیمت و دستکاری آن ساده باشد

به ندرت می‌توان آشکارسازی یافت که تمام موارد فوق را دارا باشد و می توان گفت که خصلت‌ها یا ویژگی‌های مختلف یک آشکارساز بر یکدیگر تاثیر می‌گذارند.

انواع آشکارسازها در HPLC به قرار زیرند:

- آشکارسازهای جاذب ماوراء بنفش–UV
- آشکارسازهای ضریب شکست
- آشکارسازهای فلوئورسانی
- آشکارسازهای الکتروشیمیایی
- آشکارسازهای پراکندگی نور
- آشکارسازهای رسانندگی
- آشکارسازهای زیرقرمز(IR)
- آشکارسازهای پرتوزایی

در این میان، آشکارسازهای جذب UV، عمومی‌ترین آشکارساز HPLC به شمار می‌روند. زیرا می‌توانند نسبتاً حساس باشند، گستره‌ی خطی وسیعی دارند و تا حد زیادی تحت تاثیر افت و خیزهای دما قرار نمی‌گیرند. اصول کارکرد این آشکارسازها براین مبنا است که فاز متحرک از ستون به درون محفظه‌ای کوچک جاری می‌شود، محفظه در مقابل اشعه فرابنفش/مرئی منتشر شده از دستگاه نورسنج یا طیف سنج قرار می‌گیرد. این آشکارسازها انتخابگر بوده و فقط می‌توانند اجزاء نمونه‌ای که نور فرابنفش یا مرئی را جذب می‌کنند، آشکار سازند؛ یعنی در صورتی که ملکول دارای حداقل یکی از موارد زیر باشد، جذب در طول موج بالای ۲۰۰ نانومتر صورت می‌گیرد.

- برم، ید یا گوگرد
- یک گروه کربونیل C=O یا گروه نیترو NO_2
- دو پیوند دوگانه مزدوج X=X–X=X
- یک حلقه آروماتیک
- یون‌های معدنی شامل: Br^-، I^-، NO_3^-، NO_2^-

به طور کلی آشکارسازهای جذب UV فقط در برخی مواد همچون آلکان‌ها، ترکیبات آروماتیک و ترکیبات دارای پیوند چندگانه که در داخل فاز متحرک جاذب نور ماوراء بنفش می‌باشند، انتخابی عمل می‌کنند.

آشکارسازهای ضریب شکست این مزیت مهم را دارند که نسبت به تمام مواد حل شده جواب می‌دهند. علاوه براین، این آشکارسازها اعتماد پذیرند و سرعت جریان بر آنها اثری ندارد. ضمن اینکه این آشکارسازها خیلی حساس به حرارت هستند.

امتیاز ذاتی آشکارسازهای فلوئورسانی حساسیت بالای آنهاست که نوعاً ده مرتبه یا بیشتر، بزرگ تر از آشکارسازهای جاذب ماوراء بنفش است. با این حال این آشکارسازها نسبت به دیگر آشکارسازها کم مورد استفاده قرار می‌گیرند چون موادی که خاصیت فلورسانس داشته باشند، زیاد نیستند.

پردازشگر سیگنال

پردازشگرها شامل یک سیستم کامپیوتری است که سیگنال‌های حاصل از آشکارساز را به شکلی که برای کاربر قابل استفاده باشد تبدیل می‌کنند که حاصل این تبدیل به صورت کروماتوگرام نمایش داده می‌شود که متشکل از یک یا چند پیک است که مساحت زیر پیک و ارتفاع پیک متناسب با غلظت آنالیت است . از این مسئله (مساحت زیر پیک و ارتفاع پیک) برای آنالیز کمی و از شکل و زمان پیک نیز برای آنالیز کیفی استفاده می‌شود.

منابع

- پایان نامه

1. پایان‌نامه دکتری تخصصی(PhD) در رشته شیمی–شیمی فیزیک دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده مهندسی شیمی با موضوع «بررسی اثر دافعه بین یون‌ها در دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی و جفت کردن آن با کروماتوگرافی لایه نازک و واجذبی دمایی»، وحیده ایل بیگی
2. بهزاد حسینی‌پور، «بهینه‌سازی شرایط به منظور جداسازی، تشخیص و اندازه‌گیری مشتق برم دار گاما بوتیرولاکتون در محیط سنتز بوسیله تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالای فاز معکوس (HPLC) با دتکتور فرابنفش (UV)» ، پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیمی تجزیه، دانشگاه بین المللی امام خمینی،
3. محمد کریمی، «شناسایی همزمان بنزودیازپین‌ها در بعضی نوشیدنی‌های غیرالکلی با روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی»، پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته سم‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس
4. زهره‌سادات حسینی‌فرد، «آنالیز سفوروکسیم سدیم در نمونه‌های دارویی با استفاده از جاذب‌های نوین و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا»، پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیمی تجزیه، دانشگاه آزاد واحد تهران مرکزی
5. محسن کرمی، «میکرواستخراج پخشی داروی کلوزاپین و اندازه‌گیری آن توسط HPLC در ماتریکس دارویی»، پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیمی کاربردی دانشگاه آزاد واحد تهران مرکزی

- مقاله

1. علیرضا ابراهیمی و همکاران، استفاده از روش کاپیلاری الکتروفورز جهت غربالگری اختلالات هموگلوبینی شایع در ایران، مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، خرداد ۱۳۹۵ ، دوره ۷٤ ، شماره ۳، صفحه‌های ۱٤۷ تا ۱۵۸
2. سهیلا سادات فتح‌اللهی، مهدا سلطان نژاد، معرفی دستگاه کروماتوگرافی گازی–طیف سنج جرمی، فصلنامه تخصصی دانش آزمایشگاهی ایران، شماره٤، زمستان ۹٤

- کتاب

- اصول فیزیکی دستگاه های آزمایشگاهی، تالیف دکتر داریوش شبهبازی گهرویی، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کاربردهای آن در زیست‌فناوری تالیف دکتر جواد حامدی، فاطمه ایمان‌پرست، مریم ایمانی و دکتر سیما صدرای، انتشارات دانشگاه تهران