

# HPLC؛ اصول و مبانی در تشخیص و اندازه گیری مواد شیمیایی و دارویی

دارای سرعت حرکت متفاوت بوده و حین کروماتوگرافی باندهای جداگانه تشکیل داده و با ادامه این روند مواد از هم جدا می شوند.

## کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) High pressure Liquid Chromatography

دستگاهی است که برای تجزیه کمی و کیفی مواد دارویی، شیمیایی، غذایی، صنایع سنگین (پلیمرها)، بیوشیمی (تجزیه پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک) و ..... به کار می رود. به طور ساده جریانی از یک حلال (بنام فاز متحرک) از درون یک ستون پر شده (بنام فاز ساکن) عبور می کند و نمونه مورد آزمایش از قسمت بالای دستگاه، تزریق شده و وارد ستون می شود.

اجزای نمونه بر اساس ماهیت شیمیایی، با فاصله زمانی متفاوتی از ستون عبور کرده سپس به وسیله دتکتور شناسایی می شود و نتایج به صورت پیک هایی به ثبت می رسد. به طور معمول، جداسازی ها و تجزیه هایی که با دیگر روش های کروماتوگرافی سخت یا غیر ممکن است، با این روش به سادگی انجام می شود.

### اجزای اصلی دستگاه

یک دستگاه HPLC شامل مخزن حلال (فاز متحرک)، قسمت گاز زدایی، پمپ فشار بالا، قسمت تزریق، ستون حاوی فاز ساکن با کارایی بالا و آشکارساز (دتکتور) است.

### فاز حامل یا متحرک:

فاز متحرک در HPLC می تواند آب، حلال های آلی یا بافرها به صورت تنها یا مخلوط با یکدیگر باشد. تمام قسمت های سامانه که در تماس با فاز متحرکند، باید از

برای اولین بار یک گیاه شناس روسی به نام Mikhail tswett در آغاز قرن بیستم روش کروماتوگرافی را ابداع و از آن برای تفکیک رنگدانه ها استفاده کرد. او با گذراندن محلول تهیه شده از خلال یک ستون شیشه ای پر شده از کربنات کلسیم و رنگدانه های گیاهان به صورت باند های جداگانه رنگی و البته قابل مشاهده جدا سازی کرد و به همین دلیل روش کروماتوگرافی متشکل از دو کلمه Chroma به معنی رنگ و Graphy به معنی نوشتن نشان دهنده همین فرآیند بوده است.

### طبقه بندی روش های تجزیه

#### ۱- روش های کلاسیک:

روش های وزنی و حجمی را که بر مبنای اندازه گیری های وزن و حجم است را روش های کلاسیک می گویند.

#### ۲- روش های دستگاهی:

روش هایی که بر مبنای اندازه گیری یک خاصیت فیزیکی (مانند جذب و نشر تابش، پراکندگی، شکست و پراش، پتانسیل) به وسیله دستگاه است و آن کمیت فیزیکی به غلظت آنالیت ربط داده می شود را روش های دستگاهی می گویند.

### تعریف کروماتوگرافی

کروماتوگرافی فرآیندی است که طی آن مواد مورد آنالیز تحت پروسه ای در یک سیستم دو یا چند فازی از هم جدا می شوند. این مواد بر اساس اختلاف در ویژگی هایی مانند:

- ✓ جذب سطحی
- ✓ توزیع
- ✓ حلالیت
- ✓ فشار بخار
- ✓ اندازه مولکولی
- ✓ دانسیته باریونی



- جنس مواد مقاوم به حلال های مورد استفاده باشند.
- هنگام تهیه فاز متحرک رعایت نکات زیر ضروری است:
- ۱- ویژگی های فاز متحرک توسط فارماکوپه تعریف می شود.
  - ۲- کلیه اجزای فاز متحرک باید دارای خلوص متناسب یا گرید HPLC باشد.
  - ۳- آب مورد استفاده باید دارای شرایط آب خالص باشد.
  - ۴- فاز حامل به اندازه مصرف همان روز تهیه کنید و از ظروف کاملاً تمیز استفاده کنید.
  - ۵- فاز متحرک را قبل از مصرف گاز زدایی نمایید.

### پمپ ها

پمپ مورد استفاده در پمپ ویژه ای است که قابلیت رسیدن به فشارهای خیلی بالا به منظور پمپاژ کردن فاز متحرک به درون فاز ساکن (ستون)، با یک سرعت جریان معمول که بین ۱ تا ۲ میلی لیتر در دقیقه است را داراست. هم چنین جریان باید عاری از هرگونه نوسان باشد به طوریکه سرعت جریان کاملاً ثابت باقی بماند.

شیر های تنظیم فقط اجازه جریان یک طرفه را به مایع می دهند. نتیجه یک جریان بدون نوسان است و به دو شکل قابل اجراست:

- ۱- برنامه شویش ایزوکراتیک: تنها از یک فاز متحرک برای عمل جداسازی استفاده می شود.
- ۲- برنامه شویش گرادینت: ترکیب فاز متحرک به تدریج در حین عملیات تغییر می یابد.

### انواع ستون ها

در کروماتوگرافی مایع، چهار روش داریم که براساس نوع ستون به کار رفته طبقه بندی می شود.

انواع روش های کروماتوگرافی مایع عبارتند از:

- ۱- پخششی (Partition)
  - ۲- جذب سطحی (Adsorption)
  - ۳- تعویض یونی (Ion-Exchange)
  - ۴- طرد اندازه (size-exclusion)
- کروماتوگرافی مایع پخششی که معمول ترین آنهاست که بیشتر به عنوان فاز نرمال-فاز معکوس طبقه بندی می شود.

### ستون های فاز- نرمال Normal Phase :

در این روش فاز متحرک غیر قطبی و فاز ساکن قطبی است.

فاز پیوندی در این نوع ستون ها دارای عواملی از قبیل، سیانو (CN-)، یک گروه آمینی ( $NH_2$ )، یا یک گروه دی ال (-CHOH-CH<sub>2</sub>OH) است و ستون ها بر اساس گروه های عاملی نام گذاری می شود.

فاز های متحرک مورد استفاده برای ستون های فاز نرمال عبارتند از: هگزان، سیکلو هگزان، تتراکلرید کربن، کلروفرم، بنزن و تولوین.

### ستون های فاز معکوس (Reverse Phase) :

در روش فاز معکوس از یک فاز متحرک قطبی و فاز ساکن غیر قطبی استفاده می شود نام ستون اغلب با تعداد کربن مشخص می شود به عنوان مثال C<sub>18</sub> و C<sub>8</sub>

فاز های متحرک مورد استفاده شامل: آب، متانول، استونیتریل و محلول های بافر است.

### ستون های جذب سطحی (Adsorption) :

در این نوع ستون ها از ذرات سیلیکای خیلی قطبی استفاده می شود و از فاز نرمال به عنوان فاز متحرک استفاده می شود.

### ستون های تعویض یونی و طرد- اندازه (Ion-exchange and size-exclusion) :

فاز ساکن ذرات رزینی جامدی است که در سطوح آنها مکان های پیوندی یونی مثبت یا منفی وجود دارد که یون ها با فاز متحرک تعویض می شود.

### دکتورها

دکتور HPLC برای شناسایی محلولی است که از ستون شسته می شود. این سیگنال های الکترونیکی متناسب با غلظت اجزای نمونه را صادر می کند.

انواع دتکتور های مورد استفاده در HPLC به قرار زیر است:

۱- دتکتور جذب UV

۲- دتکتور Fluorescent

۳- دتکتور Refractive Index

۴- دتکتور Electrochemical (Conductivity)

۵- دتکتور Diode Array

✓ در صورتی که جداسازی خوبی صورت نگیرد اقدامات زیر انجام می شود:

۱- تغییر سرعت جریان فاز متحرک

۲- تغییر فاز متحرک

۳- تغییر ترکیب درصد فاز متحرک

۴- تغییر نوع حلال های فاز متحرک

۵- تغییر طول، اندازه ذره ای، نحوه پر شدن ستون

۶- تعویض نوع ستون

۷- تعویض دتکتور

تعیین ناخالصی ها در مواد اولیه و محصولات دارویی از دو دیدگاه مورد توجه قرار می گیرد؛

۱- جنبه شیمی: در مبحث ناخالصی ها شامل طبقه بندی، شناسایی (تعیین ساختمان)، گزارش دهی، لیست کردن ناخالصی ها در مشخصات و توضیح روش ناخالصی ها می شود.

۲- جنبه بی خطری: در مبحث ناخالصی ها توجه به راه کار و روش بررسی احراز کیفیت و بی خطری ناخالصی یا ناخالصی های موجود در ماده دارویی جدید در غلظت های کم اطلاق می شود.

### روش کار دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC)

۱. در ابتدا باید یک روش کار معتبر در دسترس باشد. برای ترکیبات دارویی و زیر مجموعه های آن ها، روش کارهایی تحت عنوان فارماکوپه وجود دارد و یا در مورد ترکیبات مربوط به صنایع غذایی، خوراکی و غیره نیز منابع معتبری در دسترس است. گاهی هم روش معتبر آنالیز یک ماده با خرید محموله یا نمونه، از شرکت تولید کننده آن ماده درخواست می شود. به هر حال مرحله اول کار داشتن یک روش و دستور کار معتبر و مناسب است.

### ۲. شرایط کروماتوگرافی

در این بخش باید با توجه به روش کار، دستگاه و آشکار ساز (دتکتور) و ستون تعیین شده را آماده کنید و تنظیمات را مطابق روش انجام دهید.

طول موج تعیین شده در روش ۲۷۰ نانومتر تنظیم کنید. مطابق روش ستون دستگاه باید ستونی با طول و قطر ۱۵CM- در ۴,۵CM- باشد و قطر ذرات آن باید ۵μ- باشد، یک کد در روش ذکر شده است که این کد در فارماکوپه USP تعریف شده است و مشخصات ستون با

### حل مشکلات HPLC

۱- اختلالات فشار

۲- نشستی

۳- مشکلات مربوط به تزریق

۴- مشکلات مربوط به کروماتوگرام

۵- مشکلات سیستماتیک

بسیاری از مشکلات را می توان با تعمیر و نگهداری به موقع جلوگیری کرد.

✓ چرا پیک ها دنباله دار می شوند؟

۱- آلودگی ستون

۲- وجود یون های فلزی

۳- تغییر PH فاز متحرک

۴- عمر ستون

۵- فاز متحرک نامناسب

✓ چرا زمان بازداری افزایش می یابد؟

۱- وجود هوا در سر پمپ

۲- کثیفی در شیر ورودی یا خروجی

۳- نشستی

۴- کاهش دمای ستون

۵- تغییر در فاز متحرک ( تغییر در ماهیت یا سرعت

جریان فاز متحرک)

۶- تغییر در فاز ساکن

✓ اگر لامپ آشکار ساز فرسوده باشد؟

۱- ارتفاع پیک ها تغییری نمی کند.

۲- خط پایه دارای Noise می شود.

۳- نسبت پیک به نویز کاهش میابد لذا حد تشخیص کاهش میابد.



می توان پس از تزریق استانداردها، رزولوشن و نمونه ها، با استفاده از نرم افزار دستگاه تعیین کرد. در صورتی که هر کدام از موارد خواسته شده مطابقت نداشته باشد باید بررسی و اصلاح شود.

۳. مقدار  $L_{\mu 20}$  از محلول استاندارد و محلول نمونه به دستگاه کروماتوگرافی تزریق کنید. معمولا سه بار استاندارد تزریق می شود و میانگین سطح زیر پیک ها برای محاسبه استفاده می شود، در مورد نمونه ها هم معمولا از میانگین استفاده می شود.

کد  $L_1$ ، نوع پرکننده و قطر ذرات آن ذکر شده است و هنگام تهیه و خرید ستون از این مشخصات استفاده می شود. هر ستون با توجه به قطر آن، طول آن، قطر ذرات پرکننده آن، نوع و جنس مواد پرکننده آن متفاوت است و کاربردی متفاوت دارد معمولا در روش های معتبر نوع ستون و شرایط ستون تعیین می شود. این ستون همان فاز ثابت است که نقش مهمی در جداسازی ماده دارد.

مقدار فلو یا سرعت عبور فاز متحرک در روش، ۲ میلی لیتر در دقیقه تعیین شده است. به قسمت تنظیمات پمپ و فلو بر روی خود دستگاه و یا نرم افزار آن رفته و مقدار فلو را تنظیم کنید. در ادامه روش شرایطی جهت بالا بردن صحت و دقت آزمایش تعیین شده است.

مقادیر خواسته شده  $\text{Resolution}$ ،  $\text{tailing factor}$ ،  $\text{Standard deviation}$ ،  $\text{Theoretical plates}$  را

## ماهنامه تشخیص آزمایشگاهی را در فضای مجازی دنبال کنید:

📍 @Tashkhis\_Magazine

📷 Tashkhis\_Magazine

🌐 www.tashkhis.com

📌 tashkhis magazine