محمد علی محمدی: کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی- دانشگاه علوم پزشکی اراک
مراد رستمی: کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی- دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

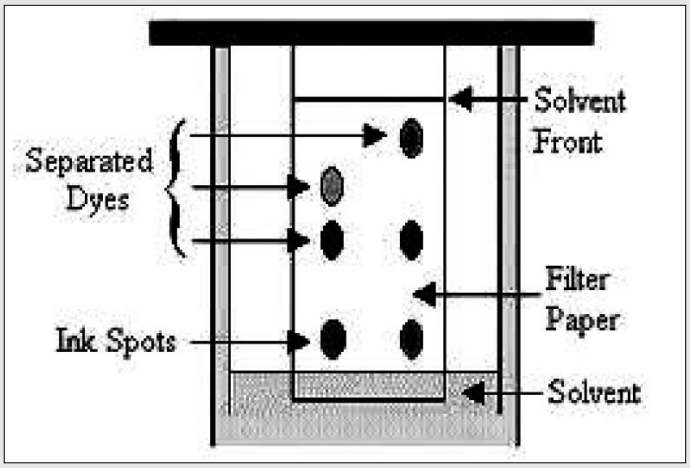
کروماتوگرافی؛ انواع و کاربرد

یکی از مهم ترین و پرکاربرد ترین روش های جداسازی و تشخیص مواد مختلف از یکدیگر در آزمایشگاه، کروماتوگرافی است. در مواقعی که جداسازی به روش های دیگر ناممکن است به راحتی می توان از این روش استفاده کرد؛ زیرا اختلاف های جزئی موجود در رفتار اجسام باعث تسهیل جداسازی در جریان عبور آن ها از یک سیستم کروماتوگرافی می شود. کروماتوگرافی کلمه ای یونانی و به معنای رنگ نگاری است که از ترکیب دو واژه کروما (به معنی رنگ) و گروفین (به معنی نوشتن) به دست آمده است.

در سال ۱۹۰۳ برای نخستین بار توسط یک گیاه شناس روس به نام میخائیل سوئت از این روش برای جداسازی مواد رنگی استفاده شد. امروزه این روش برای جداسازی مواد بی رنگ نیز مانند گازها استفاده می شود. مارتین و سینج در سال ۱۹۵۲ به پاس اکتشافاتشان در زمینه کروماتوگرافی جایزه نوبل دریافت کردند.

اصول کروماتوگرافی

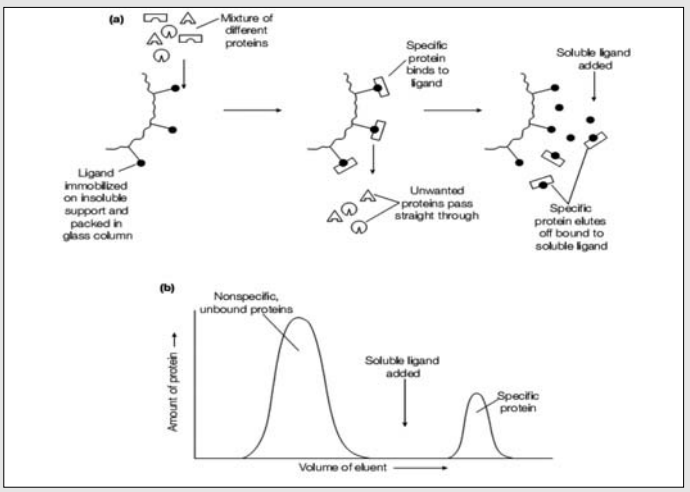
کروماتوگرافی به روشی اطلاق می شود که طی آن مخلوطی از مواد مختلف را که لازم است از یکدیگر جدا شوند از یک دستگاه و یا وسیله ای که دارای یک ماده جامد معدنی یا آلی با ذرات ریز و یا درشت است، عبور داده و در نتیجه برخی از مواد به نسبت زیادتر و محکم تر به وسیله این مواد معدنی یا



آلی نگهداری شده و برخی دیگر به سهولت از روی آن عبور می کنند. مکانیسم این عمل در حقیقت یک نوع جداسازی یا تقسیم مواد بین دو فاز است. در مواقعی که فقط نیروی کشش سطحی مواد مختلف را روی ذرات آلی یا معدنی جذب کننده نگه می دارد، نوع کروماتوگرافی را کروماتوگرافی جذبی (Adsorption Chromatography) می نامند؛ در حالی که اگر واکنش شیمیایی رخ داد و اتصال شیمیایی قطبی قابل برگشت بین ماده مورد نظر و ماده جاذب در کار باشد، کروماتوگرافی مبادله یونی (Ion Exchange Chromatography) نامیده می شود. چنانچه میل ترکیبی اختصاصی بین جسم مورد نظر و ماده جاذب در کار باشد، کروماتوگرافی بر اساس میل ترکیبی (Affinity) و چنانچه جداسازی ملکول ها بر اساس اختلاف در اندازه ملکولی و اختلاف حلالیت در دو فاز باشد، کروماتوگرافی را تقسیمی (Partition) می نامند.

اصول کلی انواع کروماتوگرافی ها یکسان بوده و در آن ها معمولا دو فاز وجود دارد که شامل فازهای ثابت و متحرک هستند. در کروماتوگرافی یکی از فازها بدون حرکت است و فاز ساکن نامیده می شود و دیگری را فاز متحرک می نامند. اجزای یک مخلوط به وسیله جریانی از یک فاز متحرک از داخل فاز ساکن عبور داده می شود. جداسازی ها بر اساس اختلاف در سرعت مهاجرت اجزای مختلف نمونه استوارند. روش های کروماتوگرافی را می توان ابتدا بر حسب ماهیت فاز متحرک و سپس بر حسب ماهیت فاز ساکن طبقه بندی کرد. فاز متحرک ممکن است گاز یا مایع و فاز ساکن ممکن است جامد یا مایع باشد. بدین ترتیب فرآیند کروماتوگرافی به چهار بخش اصلی

تقسیم می‌شود. اگر فاز ساکن جامد باشد کروماتوگرافی را کروماتوگرافی جذب سطحی و اگر فاز ساکن، مایع باشد



تصویر ۱) کروماتوگرافی میل ترکیبی. شکل a طرح کروماتوگرافی میل ترکیبی. شکل b طرح خروج مواد، نشان دهنده خروج پروتئین‌های غیراختصاصی است که به لیگاند ثابت متصل نشده‌اند، در حالی که پروتئین‌های اختصاصی به لیگاند ثابت متصل شده و تنها پس از افزودن لیگاند محلول از ستون خارج می‌شوند.

کروماتوگرافی را تقسیمی می‌نامند. هر یک از چهار نوع اصلی کروماتوگرافی انواع مختلف دارد:

کروماتوگرافی مایع - جامد

- کروماتوگرافی جذب سطحی
- کروماتوگرافی لایه نازک
- کروماتوگرافی تبادل یونی
- کروماتوگرافی ژلی

کروماتوگرافی گاز - جامد

کروماتوگرافی مایع - مایع

- کروماتوگرافی تقسیمی
- کروماتوگرافی کاغذی

کروماتوگرافی گاز - مایع

- کروماتوگرافی ستون مویین

تقسیم بندی انواع کروماتوگرافی ها بر اساس شکل ظاهری

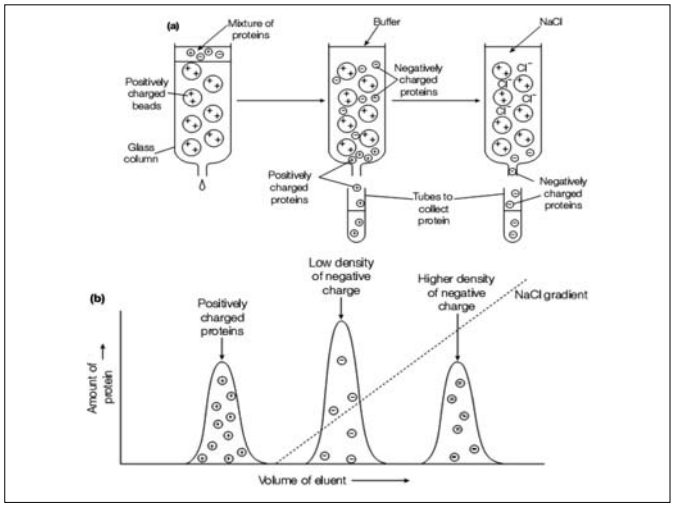
کروماتوگرافی کاغذی (Paper Chromatography)

جداسازی مواد در این روش بر اساس اختلاف در حلالیت هر جسم در فاز ثابت (آب موجود در کاغذ) و فاز متحرک (حلال غیر قطبی) است. درجه ای که جسم بین دو حلال پخش می شود را ضریب تقسیم جسم (Partiton coefficient) نامیده که عبارت از نسبت غلظت جسم در فاز متحرک به غلظت جسم در فاز ثابت است. به طور معمول، استخراج ترکیبات قطبی و غیرقطبی به ترتیب در حلال های قطبی و غیرقطبی صورت می گیرد.

جنس کاغذ در این نوع از کروماتوگرافی از آلفا-سلولز با خلوص بالا بوده و عوامل OH موجود در آن موجب جذب لایه نازکی از آب در سطح خود می شوند. در کروماتوگرافی کاغذی، آب متصل به سلولز، فاز ثابت را تشکیل داده و علاوه بر آن، عمل جذب توسط خود کاغذ نیز نقش مهمی در این نوع کروماتوگرافی بازی می کند.

در این نوع کروماتوگرافی، حرکت حلال می تواند صعودی (Ascending) باشد که به علت خاصیت موئینگی رخ می دهد و یا حرکت حلال می تواند نزولی (Descending) باشد که در آن حرکت حلال بر اثر نیروی جاذبه رخ می دهد. این نوع کروماتوگرافی برای جداسازی اسیدهای آمینه، کربوهیدرات ها، بازهای پورین، مواد رنگی نباتی، ویتامین ها، آنتی بیوتیک ها و... به کار می رود.

در کروماتوگرافی کاغذی، یک قطره کوچک از محلول حاوی نمونه در لبه ۲/۵ سانتیمتری کاغذ قرار داده و پس از خشک شدن نمونه، کاغذ را در حلال غیرقطبی (فاز متحرک) قرار داده به گونه ای که نمونه در پایین قرار گیرد. در این هنگام، حلال غیرقطبی از کاغذ بالا رفته و نمونه را با خود حرکت می دهد. نمونه ها بر حسب حلالیت در آب (حلال قطبی = فاز ثابت) و حلال غیرقطبی (فاز متحرک) از یکدیگر جدا می شوند. قبل از رسیدن حلال به لبه انتهایی دیگر کاغذ، کروماتوگرافی را با درآوردن کاغذ از ظرف حاوی حلال غیرقطبی، متوقف کرده و با استفاده از مداد، مسیر انتهایی حلال را مشخص می کنیم. پس از خشک شدن کاغذ در جریان هوای آزاد و یا با استفاده از



تصویر ۲)
کروماتوگرافی تعویض یونی.
شکل a طرح کروماتوگرافی تعویض یونی.
شکل b طرح خروج مواد، نشان دهنده خروج پروتئین های با بار خالص مثبت است که به دانه های با بار مثبت از ستون کروماتوگرافی متصل نشده اند و به صورت مستقیم از ستون خارج می شوند، در حالی که دو پروتئین با بارهای خالص منفی متفاوت که به دانه های با بار مثبت از ستون کروماتوگرافی متصل شده اند و در نتیجه افزودن کلرید سدیم (NaCl) با غلظت فزاینده به تدریج از ستون کروماتوگرافی خارج می شوند. پروتئین دارای دانسیته کمتر از نظر بار منفی، نسبت به پروتئین دارای دارای دانسیته بالاتر از نظر بار منفی، زودتر از ستون کروماتوگرافی خارج می شود.

دستگاه فور، برای آشکارشدن نمونه ها می توان از یک ماده رنگی استفاده نمود. این ماده رنگی در مورد پروتئین ها نین هیدرین است.

نسبت مسافت طی شده توسط جسم از مبدا به مسافتی که حلال طی نموده است را Rf (rowing flow= Rate of flow) می نامند. Rf هر جسم به عواملی از قبیل شرایط آزمایش، نوع حلال، حرارت، مدت زمان آزمایش و ... بستگی دارد.

Rf = فاصله مبدا تا لکه ظاهر شده /فاصله مبدا تا خط پیشروی حلال

برای ترکیباتی که دارای Rf یکسان هستند، از کروماتوگرافی دو بعدی (Two dimention) استفاده می شود. به این ترتیب که یک بار کروماتوگرافی را انجام داده، سپس کاغذ را به میزان ۹۰ درجه چرخانده و مجددا در حلال دیگری قرار داده و کروماتوگرافی را تکرار می نماییم. به این ترتیب، لکه هایی که بر روی هم قرار گرفته بودند از یکدیگر جدا می شوند.

کروماتوگرافی ستونی
(Column Chromatography)

در این روش، فاز ساکن شامل یک ستون شیشه ای یا پلاستیکی است که با ماده ای جامد که به صورت پودر و یا ژل است و ابتدا آن ها را به فرم سوسپانسیون در می آوریم، ستون را پر می نماییم. پس از ته نشین شدن مواد در ستون، مخلوط مورد آزمایش را از بالای ستون در سطح ماده جامد (فاز جامد) قرار داده و یک بافر مناسب (فاز متحرک) را از ستون عبور داده و به این ترتیب با عبور بافر و حرکت آن به سمت پایین، اجزای مخلوط از ماده جامد ستون جدا می شوند. سرعت حرکت بافر را طوری تنظیم می کنیم که محلول به صورت قطراتی از انتهای باریک ستون خارج شده و در زمان های معینی در داخل لوله های جداگانه جمع آوری شود. محتویات هر لوله را می توان برای مطالعات کمی و کیفی مورد استفاده قرار داد. جمع آوری محلول خارج شده از ستون معمولا توسط دستگاه نمونه بردار خودکار (Fractioncollector) انجام می شود.

کروماتوگرافی لایه نازک
(Thin layer Chromatography)

در این تکنیک که غالبا در جداسازی مخلوط های مواد زیست شناختی مختلف به کار می رود، بعضی از تکنیک و اصول به کار رفته در کروماتوگرافی ستونی و کاغذی با هم تلفیق شده است. در این روش، فاز ثابت، لایه نازکی از جاذبی سطحی (عموما ژل سیلیکا یا آلومینا) است که بر روی صفحه ای نازک (از جنس شیشه، پلاستیک و یا آلومینیوم) کشیده شده است. فاز متحرک در مسیر حرکت خود از میان فاز ثابت حرکت نموده و نمونه را با خود حمل می کنید. اجزای نمونه بر اساس میزان جذب در فاز ثابت و میزان انحلال پذیری در فاز متحرک از یکدیگر جدا می شوند. پس از پایان کار و خشک شدن حلال می توان با استفاده از رنگ آمیزی و یا نور ماوراء بنفش (UV)، لکه های رنگی را مشاهده کرد.

کروماتوگرافی گازی
(Gas Chromatography)

این نوع کروماتوگرافی برای تجزیه مایعات فرار و مخلوط هایی از گازها و بخارات است. گازهایی که باید تفکیک شوند همراه با یک گاز بی اثر نظیر نیتروژن، آرگون و یا هلیم در فاز متحرک حمل می شود. ترکیبات بر حسب حلالیت بیشتر در فاز گازی جدا خواهند شد.

تقسیم بندی انواع کروماتوگرافی بر اساس اصول جداسازی

کروماتوگرافی جذبی (Adsorption Chromatography)

در این نوع کروماتوگرافی، فاز ثابت (پایه) از مواد جامدی مانند کاغذ، آلومین، فسفات تری کلسیک، سیلیس، سیلیکات منیزیوم و یا زغال تشکیل شده که می تواند مواد مختلف را به خود جذب کند. نیروی جذب بین مواد مختلف و فاز ثابت تابع قانون شناخته شده ای نیست و انتخاب نوع ماده جامد (فاز ثابت) و بافر، بیشتر از طریق تجربی صورت می گیرد.

در این کروماتوگرافی، جسم مورد نظر جذب فاز ثابت شده و با عبور حلال (فاز متحرک)، جسم مورد نظر از فاز ثابت جدا می شود. کروماتوگرافی جذبی به ویژه برای ترکیباتی که دارای حلالیت پایین در آب بوده اما در حلال های آلی کاملا حل می شوند، مناسب است. از جمله این مواد به استرول ها، ترپن ها، کاروتنوئیدها، لیپیدها و ... می توان اشاره کرد. کروماتوگرافی جذبی به صورت ستونی و یا لایه نازک، قابل انجام است.

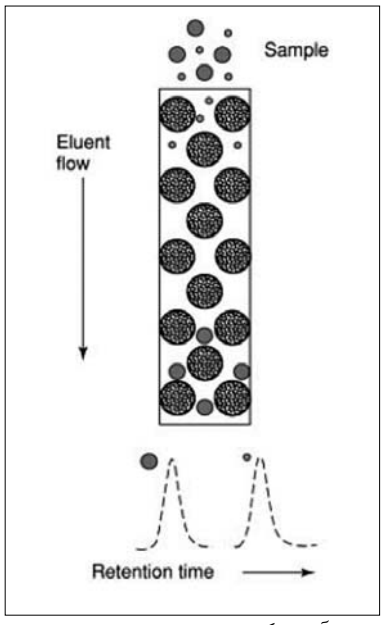
کروماتوگرافی میل ترکیبی (Affinity Chromatography)

این نوع کروماتوگرافی برای جداسازی ترکیباتی که از نظر بیولوژیکی دارای میل ترکیبی اختصاصی هستند (مانند آنتی ژن و آنتی بادی و یا آنزیم و سوبسترا) به کار می رود. در این حالت، بر روی پایه (ژل) ترکیبی وجود دارد که دارای میل ترکیبی اختصاصی با جسم مورد نظر است. مثلا چنانچه جسم مورد نظر آنزیم باشد، بر روی ملکول های پایه، سوبسترا قرار دارد و یا چنانچه جسم مورد نظر آنتی ژن باشد، بر روی ژل، ملکول های آنتی بادی نصب شده است. اگر مخلوط مواد مختلف را از بالای ستون وارد کنیم، جسم مورد نظر به طور اختصاصی به فاز ثابت متصل شده و سایر ترکیبات چون به ژل متصل نمی شوند، از ستون خارج می شوند. در مرحله بعد با افزودن بافر مناسب، جسم مورد نظر متصل شده با فاز ثابت را از فاز ثابت جدا می کنیم.

کروماتوگرافی تعویض یونی (Ion Exchange Chromatography)

مبنای جداسازی مواد مختلف در این نوع کروماتوگرافی، مبادله یونی ترکیبات مختلف موجود در یک مخلوط بر حسب تفاوت در بزرگی و کوچکی بار الکتریکی از یکدیگر است. این نوع کروماتوگرافی برای جداکردن ترکیبات محلول در آب مانند یون های معدنی، اسیدهای آمینه، پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و ... بوده که هم به صورت ستون و هم به صورت لایه نازک قابل انجام است. فاز ثابت از رزین هایی که شامل پلیمرهایی از فنل با وزن ملکولی بالا هستند و بر روی آن ها گروه های قابل یونیزه شدن کاتیونی و یا آنیونی به وسیله پیوندهای کووالان متصل شده اند، تشکیل شده است. این اجسام در مرحله اول یونیزه شده اند و یون های مربوطه بر حسب نوع رزین، جانشین یک کاتیون مثل Na+، K+ و ... و یا یک آنیون مانند Cl- یا OH- می شوند. حالت اول را تحت عنوان تعویض کننده های کاتیونی (Cation exchange) و حالت دوم را نیز تعویض کننده های آنیونی (anion exchange) می نامند.

از رزین های دارای گروه های باردار مثبت به آمینو اتیل (AE) و دی اتیل آمینو اتیل (DEAE) و از رزین های دارای گروه های باردار منفی به کربوکسی متیل (CM) و سولفو متیل (SM) می توان اشاره کرد.



تصویر ۳) طرح ساده شده کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (تقسیمی) که نشان دهنده خروج سریع تر ملکول های درشت تر در مقایسه با ملکول های کوچک تر است.

کروماتوگرافی تقسیمی
Partition Chromatography

از این نوع به کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (Gel filtration) می پردازیم که در آن ذرات مختلف تنها بر اساس

تفاوت در اندازه ملکولی از یکدیگر جدا می شوند. ژل فیلتراسیون، روش ساده‌ای برای جداسازی ماکروملکول ها بوده و ملکول های موجود در یک محلول را بر اساس تفاوت در اندازه مولکول هایشان از یکدیگر جدا می کند. ژل، ماده‌ای است که حاوی روزنه هایی با ابعاد مشخص (قطر ۵۰۰- ۱۰ میکرومتر) است. فاز ثابت (ژل)، پلیمرهای قندی به نام دکستران هستند که توسط ماده‌ای به نام اپی کلر هیدران با اتصال عرضی به هم متصل شده‌اند و اسم تجارتی آن ها سفادکس است. وقتی که ملکول هایی با ابعاد مختلف به بالای ستون حاوی ژل اضافه می شوند، ملکول های درشت، به داخل روزنه ها وارد نشده و بنابراین توسط محلول شستشو دهنده (elution) سریع تر از ستون عبور می کنند. در حالی که ملکول های ریز، به داخل روزنه ها وارد شده و دیرتر از ستون خارج می شوند. خروج ذرات پروتئینی از فاز جامد بستگی کامل به وزن ملکولی و ساختمان آن دارد. از آنجا که انواع پروتئین ها در داخل یک ستون حاوی ژل، دارای حرکت ممتدی در زمان مساوی ولی با سرعت های متفاوت هستند، لذا برای آنکه نقاط اوج مختلف با فواصل مناسبی از هم قرار گیرند باید حجم نمونه کم و یکنواخت باشد.

مزیت روش های کروماتوگرافی

● با روش های کروماتوگرافی می توان جداسازی هایی را که با روش های دیگر خیلی مشکل هستند انجام داد. زیرا اختلافات جزئی موجود در رفتار جزئی اجسام در جریان عبور آن ها از یک سیستم کروماتوگرافی چندین برابر می شود. هر قدر این اختلاف بیشتر شود قدرت جداسازی مواد بیشتر و برای انجام جداسازی مواد نیاز کمتری به وجود اختلافات دیگر خواهد بود.

● مزیت کروماتوگرافی نسبت به ستون تقطیر این است که نسبتا آسان می توان به آن دست یافت، با وجود اینکه ممکن است چندین روز طول بکشد تا یک ستون تقطیر به حداکثر بازده خود برسد ولی یک جداسازی مواد کروماتوگرافی می تواند در عرض چند دقیقه یا چند ساعت انجام گیرد.

● یکی از مزایای برجسته روش های کروماتوگرافی این است که آن ها آرام هستند. به این معنی که احتمال تجزیه مواد جداشونده به وسیله این روش ها در مقایسه با سایر روش ها کمتر است.

● مزیت دیگر روش های کروماتوگرافی در این است که تنها مقدار بسیار کمی از مخلوط برای تجزیه لازم است به این دلیل روش های تجزیه‌ای مربوط به جداسازی مواد کروماتوگرافی می توانند در مقیاس میکرو و نیمه میکرو انجام گیرند.

● روش های کروماتوگرافی ساده، سریع و وسایل مورد لزوم آن ها ارزان هستند. مخلوط های پیچیده را می توان نسبتا به آسانی به وسیله این روش ها به دست آورد.

انتخاب روش کروماتوگرافی مناسب

انتخاب بهترین روش کروماتوگرافی و انتخاب نوع روش کروماتوگرافی به جز در موارد واضح (مانند کروماتوگرافی گازی در جداسازی مواد گازها) عموما تجربی است. زیرا هنوز هیچ راهی جهت پیش بینی بهترین روش برای جداسازی مواد اجسام مگر در چند مورد ساده وجود ندارد. در ابتدا روش های ساده تر مانند کروماتوگرافی کاغذی و لایه نازک امتحان می شوند. زیرا این روش ها در صورتی که مستقیما قادر به جداسازی مواد نباشند، نوع سیستم کروماتوگرافی را که جداسازی مواد به وسیله آن باید صورت بگیرد، مشخص می کنند آنگاه در صورت لزوم از روش های پیچیده تر استفاده می شود. در جداسازی های مشکل، وقتی که روش های ساده فاقد کارایی لازم هستند روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) می تواند جوابگو باشد.

منابع

[1]WHO. Maintenence manual for lavoratory equipment. 2008. 2nd Edition.

۲-علی محمدی م. و رستمی م. بیوشیمی عملی (با تکیه بر نکات بالینی). ۱۳۹۱