NAISL
Volume 2, Number 3, 2018
Pages:73-79
Print ISSN: 2588-6401
Online ISSN: 2588-641X
Website: shaajournal.msrt.ir

High-Performance Liquid Chromatography: Dos and Don'ts

Javad Feizy[1*],Fahimeh Mahmoodi[2]

Abstract

High performance liquid chromatography or high pressure liquid chromatography (HPLC) is one of methods for physical, chemical separation analysis. In the several years after the rediscovery of chromatography, this technique was further expanded and the individual variant was developed. It uses liquid as mobile phase and solid or liquid as stationary phase. The pressurized liquid is typically a mixture of solvents such as water, acetonitrile or methanol. There occurs the difference of interaction of each analyte between stationery phase and mobile phase of column as stationary phase. The difference is used to separate mixture. Its extensive use of high performance liquid chromatograp in food, pharmaceuticals and cosmetics industry and its high separation power makes it widely used. LC can be applied to measure such non-volatile or thermally unstable compounds that are difficult to measure by gas chromatography. Although HPLC method development has been improved by advances in column technology and instrumentation, problems still arise. The complexity of working with this instrument has always been a matter of concern in laboratories, which should be considered seriously due to the high price and high technology of this instrument.

Key Words:

High-performance liquid chromatography, Separation, Detector, Mobile phase, Stationary phase

(*) Corrosponding author
1.Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.
E-mail: j.feizy@rifst.ac.ir
Tel: 05135425371
2. . Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.
E-mail: fahime_mahmodi88@yahoo.com
Tel: 05135425317

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا: بایدها و نبایدها

جواد فیضی[1*]، فهیمه محمودی[2]

نشریه رویکردهای نوین در آزمایشگاه‌های علمی ایران
سال دوم، شماره ۳, ۱۳۹۷
صفحات ۷۹-۷۳
شاپای چاپی: ۶۴۰۱-۲۵۸۸
شاپای الکترونیکی: ۶۴۱X-۲۵۸۸
وب‌سایت: shaajournal.msrt.ir

چکیده

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا یا کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) یکی از تکنیک‌های تجزیه‌ای پرکاربرد جهت جداسازی‌های فیزیکی و شیمیایی است. در چند سال اخیر، این تکنیک بطور ویژه و بیش‌تر گسترش یافته است. در این تکنیک جداسازی، از فاز متحرک مایع و فاز ساکن جامد یا مایع استفاده شده است. فاز متحرک معمولا مخلوطی از حلال‌هایی مانند آب، استونیتریل و یا متانول است و تحت فشار بالا از ستون عبور داده می‌شود. برهم‌کنش‌های مختلفی بین هر آنالیت با فاز ساکن و متحرک اتفاق افتاده و همین برهم‌کنش‌های مختلف باعث عمل جداسازی می‌گردد. کاربرد وسیع این دستگاه در آنالیز مواد غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی و قدرت جداسازی بالای آن باعث استفاده گسترده از دستگاه HPLC شده است. ترکیبات غیرفرار و ترکیبات ناپایدار حرارتی که به راحتی توسط کروماتوگرافی گازی قابل اندازه‌گیری نیستند توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری می‌شوند. اگر چه توسعه روش‌های کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با پیشرفت فناوری‌های ستون و دستگاه‌وری جدید بهبود یافته است، مشکلات هم‌چنان وجود دارد. کاربری سخت و پیچیدگی‌های کار با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا همواره از مسائل مورد توجه در آزمایشگاه‌ها بوده که بخاطر قیمت و تکنولوژی بالای این دستگاه باید بطور جدی مورد توجه قرار گیرد.

جواد فیضی

فهیمه محمودی

واژگان کلیدی:

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا،
جداسازی،
آشکارساز،
فاز متحرک،
فاز ساکن

(*) مسئول مکاتبات.
۱. رئیس آزمایشگاه مرکزی و استادیار گروه ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.
ایمیل: j.feizy@rifst.ac.ir
تلفن: ۰۵۱۳۵۴۲۵۳۷۱
۲. کارشناس ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، آزمایشگاه مرکزی موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.
ایمیل: fahime_mahmodi88@yahoo.com
تلفن: ۰۵۱۳۵۴۲۵۳۱۷

۱ مقدمه

کروماتوگرافی مایع باکارایی بالا[1] یکی از روش‌های بسیار متداول در جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری اجزای یک مخلوط می‌باشد و در میان روش‌های جداسازی بیش‌ترین رشد و کارایی را داشته است. از دلایل رشد این روش می‌توان به قدرت تفکیک و حساسیت بالا، قابلیت اندازه‌گیری ترکیبات غیرفرار و حساس به دما و اندازه‌گیری کمی آنالیت‌ها اشاره کرد. در روش‌های مختلف کروماتوگرافی یک فاز ساکن و یک فاز متحرک وجود دارد که اجزای مختلف نمونه در فاز متحرک حل شده و از فاز ساکن عبور می‌کنند. با توجه به میزان برهم‌کنش اجزا نمونه با فاز ساکن اجزاء در زمان‌های متفاوتی از ستون خارج می‌شوند که باعث جداسازی اجزای نمونه می‌شود. در روش HPLC، حلال تحت فشارهای بالا تا ٤٠٠ اتمسفر که توسط پمپ‌ها تامین می‌شود، نمونه را در طول ستون حرکت می‌دهد، اجزای نمونه با فاز ساکن موجود در ستون واکنش داده و بر اساس سرعت جریان‌های مختلف ایجاد شده، جداسازی اجزا صورت می‌گیرد. به طور کلی قطبیت حل شونده به فاز متحرک بسیار نزدیک است و با فاز ساکن اختلاف دارد[۷].

برای انجام یک جداسازی مطلوب و کارآمد با استفاده از این تکنیک، پارامترهای بسیار زیادی مانند نوع ستون، ترکیب فاز متحرک، سرعت جریان فاز متحرک، دما و روش مناسب آماده‌سازی و... نقش دارند که بی‌توجهی به هریک از آن‌ها در طول آنالیز می‌تواند نتایج گمراه‌کننده‌ای به همراه داشته باشد. هم‌چنین در طی آنالیز عدم رعایت برخی نکات ساده می‌تواند هرکدام از مراحل مختلف آزمون را دچار مشکل نموده و طول عمر هر یک از بخش‌های دستگاه HPLC را کاهش دهد. در این مقاله بایدها و نبایدهایی در کار با دستگاه HPLC بصورت یک راهنمای گام به گام ارائه شده تا از بروز مشکلات معمول جلوگیری و آنالیز در مسیر درست و در زمان کمتری انجام پذیرد.

۲. آماده‌سازی نمونه

آماده‌سازی نمونه یک گام مهم از آنالیز تمامی نمونه‌ها با استفاده از HPLC است. نمونه‌ها می‌توانند از یک مایع شفاف تا یک بافت پیچیده و آلوده متفاوت باشند. مانند خوراک دام، مایعات بیولوژیکی، نمونه‌های غذایی و... که قبل از شروع آنالیز باید آماده‌سازی شوند. امروزه آماده‌سازی نمونه در آزمایشگاه‌ها به صورت ترکیبی از روش‌های جدید و کلاسیک انجام می‌شود. از آن‌جا که بخش‌هایی از آنالیز توسط دستگاه‌های مدرن انجام می‌شود که راه‌های مختلفی برای اطمینان از صحت کارکرد آن‌ها وجود دارد، نتیجه می‌گیریم که آماده‌سازی نمونه که توسط کارشناس صورت می‌گیرد منبع اصلی خطاهای آزمایشگاهی می‌باشد. خطاهای موجود در آماده‌سازی نمونه بسیار ظریف و غیرقابل تشخیص هستند. در نتیجه انتخاب دستورالعمل‌های مطمئن و مناسب امری ضروری است.

آماده‌سازی نمونه می‌تواند به سادگی حل کردن آنالیت‌ها در یک حلال مناسب باشد یا آنقدر پیچیده باشد که نیاز به چندین مرحله‌ی استخراج، تغلیظ، فیلتراسیون، انتقال حلال یا استفاده از بهبود دهنده‌های شیمیایی و... داشته باشد[۵]. انتخاب روش مناسب آماده‌سازی می‌تواند تاثیر بسیار زیادی بر نتایج داشته باشد. عوامل مزاحم موجود در نمونه به شکل پیک‌های اضافه در کروماتوگرام نهایی ظاهر می‌شوند. هم‌چنین بهبود شکل پیک آنالیت، افزایش طول عمر ستون و کاهش زمان آنالیز نیز از جمله نتایج آماده‌سازی مناسب نمونه می‌باشد. آماده‌سازی نمونه به نوع نمونه، روش‌های آنالیز، زمان مورد نیاز برای آماده‌سازی نمونه، زمان مورد نیاز برای توسعه روش مورد نظر و در نهایت هزینه هر نمونه بستگی دارد. آماده‌سازی نمونه می‌تواند به صورت دستی و یا به صورت خودکار باشد که در صورت خودکار بودن بازده کار بالا خواهد رفت. در تکنیک‌های مدرن سعی شده تا آماده‌سازی نمونه در مقیاس‌های کوچک‌تر انجام شود در نتیجه در مصرف حلال صرفه‌جویی شده و به محیط زیست آسیب کم‌تری وارد می‌شود. یکی از مراحل مهم در آماده‌سازی نمونه، استخراج آنالیت مورد نظر از نمونه می‌باشد که از مهم‌ترین این روش‌ها می‌توان به استخراج مایع-مایع[2] و استخراج فاز جامد[3] اشاره کرد.

استخراج مایع-مایع یکی از روش‌های متداول و قدیمی است که به دلیل سادگی و کاربردی بودن آن هنوز هم در بسیاری از آزمایشگاه‌ها رایج بوده و اساس بسیاری از روش‌های استخراج مدرن است. این روش مبتنی بر اختلاف حلالیت یك جزء در دو حلال امتزاج ناپذیر می‌باشد. اولین مرحله که نقش کلیدی در این روش دارد انتخاب حلال مناسب است. به طور معمول در این تکنیک از یک مخلوط شامل دو حلال آلی حل نشدنی مایع در مایع استفاده می‌شود، که به علت اختلاف قطبیت فازهای ایجاد شده، امکان استخراج آنالیت و جدایی فاز را می‌دهد. از معایب این روش می‌توان به مصرف حجم بالای حلال و زمان طولانی استخراج اشاره کرد که باعث جایگزینی تکنیک‌های مدرن آماده‌سازی با آن شده است.

روش دیگر استخراج، استخراج فاز جامد می‌باشد. در این روش از یک کارتریج دارای ماده جاذب به عنوان فاز ساکن استفاده می‌شود که آنالیت‌های مورد نظر از طریق عبور نمونه آماده‌سازی شده از ستون، در فاز ساکن به دام می‌افتند و سپس با استفاده از یک حلال مناسب و قوی می‌توان با شستشوی فاز ساکن آنالیت‌ها را جدا کرد. هم‌چنین به کمک این روش می‌توان آنالیت‌های مورد نظر را تغلیظ نمود.

[1] High performance Liquid Chromatography (HPLC)
[2] Liquid–liquid extraction(LLE)
[3] Solid phase extraction(SPE)

اگر چه در هر دو روش استخراج مایع-مایع و استخراج فاز جامد انتقال آنالیت‌ها از یک حلال ضعیف به یک حلال قوی صورت می‌گیرد، اما شباهت روش استخراج فاز جامد به HPLC، باعث برتری این روش نسبت به استخراج مایع-مایع شده است. چرا که دارای ویژگی استخراج انتخابی و سهولت در انجام خودکار آن است. هم‌چنین از دیگر مزیت‌های این روش استفاده از مقادیر کم حلال است که خطر قرارگرفتن در معرض حلال‌های خطرناک را کاهش می‌دهد. درصورتی که کارتریج‌های استخراج فاز جامد آلودگی کمی داشته باشند قابلیت استفاده مجدد را دارند. این روش برخلاف استخراج مایع-مایع محدود به استفاده از حلال‌های امتزاج ناپذیر با آب نمی‌شود. در نتیجه از حلال‌های بیش‌تری می‌توان جهت توسعه این روش استفاده کرد. بهینه‌سازی استخراج فاز جامد یک فرایند چند مرحله‌ای است که از طریق انتخاب صحیح ماده‌ی جاذب، بهبود شرایط کلی و بهبود بارگیری نمونه و مراحل شستشو به دست می‌آید (۸، ٤).

پس از مرحله استخراج، برای تزریق نمونه به دستگاه نیاز به انجام عمل فیلتراسیون هست که با هدف حذف ذرات درشت و مزاحم انجام می‌شود. در انتخاب فیلتر مورد نظر باید به نوع غشا، قطر فیلتر و تخلخل آن توجه شود. هم‌چنین باید از سازگاری حلال با غشا و مواد تشکیل دهنده‌ی آن و امکان اتصال آنالیت به غشا آگاه بود. قطر مطلوب فیلتر بستگی به حجم نمونه دارد به طوری که برای نمونه‌های با حجم‌های بیش‌تر از یک میلی‌لیتر، از فیلتر با قطر ٤ میلی‌متر، برای حجم‌های ۱۰-۱ میلی‌لیتر، از فیلتر با قطر ۱۳ میلی‌متر و برای حجم‌های ۱۵۰-۱۰ میلی‌لیتر، از فیلتر با قطر ۳۳-۲۵ میلی‌متر استفاده می‌شود. تخلخل فیلتر سرنگی با توجه به تخلخل فریت[٤] ورودی ستون یا قطر ذرات داخل ستون در نظر گرفته می‌شود تا از انسداد ورودی ستون توسط ذرات درشت و یا ورود آن‌ها به داخل دستگاه جلوگیری شود. برای ستون‌هایی با قطر ذرات کم‌تر از ۲ میکرومتر از فیلتر ۰/۲۰ میکرومتری و برای قطر ذرات بیش‌تر از ۲ میکرومتر، فیلترهای ۰/۲۰ و ۰/٤٥ میکرومتری مناسب هستند[۸].

۳. انتخاب ستون

رویکردهای متعددی برای انتخاب یک ستون دستگاه HPLC، وجود دارد. استفاده از تحقیقات انجام شده و یا مطالعه متون علمی می‌تواند در انتخاب ستون مناسب برای ترکیبات موردنظر کمک کننده باشد.

اگر هیچ روشی در متون علمی موجود نبود، استفاده از یک ستون که در آزمایشگاه در حال استفاده می‌باشد، ممکن است قابل قبول باشد؛ البته براین اساس که مولکول‌های مورد نظر شما احتمالا مشابه مولکول‌های دیگری باشند که پیش‌تر در آزمایشگاه مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. گاهی استفاده از ستون موجود در آزمایشگاه ممکن است به بعضی تغییرات در شرایط آنالیز از جمله تنظیم ترکیبات موجود در فاز متحرک (نوع حلال آلی، درصد حلال آلی و pH) و یا تنظیم گرادیان (درصد استفاده از حلال‌ها در زمان‌های مختلف) نیاز داشته باشد. بهبود روش‌ها از همان ابتدا نیاز به آگاهی از خواص فیزیکوشیمیایی مولکول و چگونگی برهم‌کنش آنالیت‌ها در فاز ساکن دارد. علاوه بر این ممکن است روش جایگزینی به جای استفاده از روش سنتی در انتخاب ستون و تغییر چند باره‌ی شرایط شستشو وجود داشته باشد[۸]. در انتخاب ستون مناسب، نوع فاز ساکن، قطر داخلی، طول و ضخامت لایه فاز ساکن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که با تکیه بر دستورالعمل‌های مناسب و معتبر می‌توان ستون مورد نظر خود را انتخاب کرده و مورد استفاده قرار داد. اما بحث اساسی در مورد ستون، چگونگی نگهداری و حفاظت از آن است. محافظت از ستون در برابر خرابی نه تنها صرفه‌جویی در هزینه خرید یک ستون جدید، بلکه صرفه‌جویی در زمان صرف شده برای تهیه، نصب، به تعادل رساندن و ارزیابی ستون جایگزین نیز می‌باشد. ستون‌های آلوده در حین کار موجب ایجاد مشکلاتی مانند عدم تکرارپذیری نتایج و یا فشار برگشتی بالا در ستون می‌شوند. در بین تمام عوامل، گرفتگی ستون باعث تقریبا نیمی از خرابی‌های ستون است. آلودگی ستون‌ها به اجزایی از بافت نمونه که مدنظر کاربر دستگاه نمی‌باشد به شکل پیک‌های مغشوش، تغییرات شدید خط پایه و یا پیک‌های منفی ظاهر می‌شوند. اگر اجزا تمایل بیش‌تری به فاز ساکن داشته باشند و فاز متحرک به اندازه کافی قوی نباشد که بتواند آن‌ها را شسته و از ستون خارج کند، این اجزا در ابتدای ستون جمع شده و در نهایت باعث بالا رفتن فشار و یا افت کارایی آن خواهند شد. گاهی میزان این اجزای جذب شده به حدی است که می‌تواند به عنوان فاز ساکن جدید عمل کرده، موجب واکنش ثانویه این اجزا و تغییر زمان بازداری و یا دنباله‌دار شدن پیک‌ها شوند. آلودگی‌های موجود علاوه بر نمونه می‌تواند ناشی از فاز متحرک، گرد و غبار موجود در ظرف نگهداری فاز متحرک، محل تزریق فرسوده و ... باشد. لذا باید ظروف نگهداری حلال را تمیز و پوشیده نگه داشت و قبل از استفاده از فاز متحرک آن را از صافی مناسب عبور داد. بهتر است قبل از بروز مشکل در سیستم، قطعات پمپ، نمونه‌بردار خودکار[٥]

[٤] Frit
[٥] Autosampler

و یا محل تزریق تعویض شود. یکی از روش‌هایی که می‌تواند از ورود آلودگی به ستون جلوگیری کند و باعث افزایش طول عمر ستون شود استفاده از پیش ستون‌ها[۶] است که معمولا کوچک شده همان ستون مورد استفاده هستند. تعویض به موقع و مناسب پیش‌ستون برای جلوگیری از انباشته‌شدن ذرات ریز در آن و سپس نفوذ به ستون اصلی و تاثیر منفی آن الزامی است. عامل دیگری که در تخریب ستون نقش دارد pH می‌باشد. pHهای کم‌تر از ۲/۵ باعث از بین رفتن فاز پیوندی به دلیل هیدرولیز اسیدی و pHهای بیشتر از ۷/۵ موجب حل شدن سیلیکا در ستون‌های فاز معکوس می‌شود. آگاهی از دامنه pH مناسب ستون که توسط شرکت‌های سازنده پیشنهاد می‌شود، امری ضروری است. نگهداری ستون حاوی آب به مدت زیاد و استفاده ار فاز متحرک حاوی بافر که مدت زیادی از تهیه آن می‌گذرد، باعث رشد باکتری‌ها در ستون می‌شود. برای اجتناب از رشد باکتری‌ها بهتر است فاز متحرک حاوی بافر را به روز آماده کرد و آن را در یخچال نگهداری نمود. هیچگاه نباید آب به عنوان آخرین حلال برای نگهداری ستون مورد استفاده قرار بگیرد و بهتر است از متانول به تنهایی یا مخلوط متانول و آب برای نگهداری ستون استفاده کرد. درب دو طرف ستون برای جلوگیری از تبخیر حلال نگهدارنده نیز باید محکم بسته باشد. تغییرات جریان فاز متحرک و تغییرات دمایی باید به آهستگی صورت گیرد، تغییرات ناگهانی باعث کاهش طول عمر ستون خواهد شد. به طور کلی کار در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد، استفاده از بافرهای حاوی حلال آلی، استفاده از درصد بالای حلال آلی در فاز متحرک، استفاده از پیش‌ستون، استفاده از متانول به عنوان حلال آلی و همچنین توجه به دامنه pH ستون، از عوامل موثر در افزایش طول عمر ستون می‌باشد[۲].

۴. فاز متحرک

فاز متحرک نقش بسیار مهمی در انتقال نمونه از طریق ستون به آشکارساز و جداسازی اجزای مورد نظر دارد. اغلب فاز متحرک ترکیبی از آب و حلال‌های آلی، بافرهای آبی با حلال‌های قطبی می‌باشد و به ندرت پیش می‌آید برای فاز متحرک تنها از یک نوع حلال استفاده شود[۱۱]. در HPLC دو حالت برای استفاده از فاز متحرک وجود دارد. حالت اول ایزوکراتیک[۷] است که در آن ترکیب فاز متحرک قبل از شروع اندازه‌گیری مشخص شده و در طول انجام آنالیز ثابت باقی می‌ماند. در حالت دوم که گرادیانتی[۸] است نسبت حلال‌ها در طول آنالیز تغییر می‌کند و این تغییر از طریق نرم‌افزار در طول آنالیز اعمال می‌شود. اگرچه پمپ‌ها کارایی بالایی دارند، اما اگر در طول آنالیز نسبت ثابتی از فاز متحرک A و B مورد نیاز است بهتر است به جای استفاده از دو پمپ، قبل از قرار دادن فازهای متحرک در مخازن حلال، آن‌ها را با همان نسبت مشخص مخلوط کرده و از یک مسیر برای انتقال آن‌ها استفاده شود[۹]. هدف از استفاده از مخلوط حلال‌های مختلف، ایجاد قطبیت مناسبی جهت جذب نمونه مورد نظر و کنترل برهم‌کنش نمونه با فاز ساکن و دستیابی به بهترین وضوح در خصوص پیک‌های جدا شده می‌باشد[۱۱]. انتخاب فاز متحرک به عوامل مختلفی مانند نوع فاز ساکن، حلالیت نمونه، نوع آشکارساز، طول موج مورد نظر و دمای آنالیز و... بستگی دارد. در روش کروماتوگرافی فاز نرمال قطبیت فاز ساکن بیش‌تر از فاز متحرک است. در نتیجه فاز متحرک از حلال‌های غیر قطبی مانند هگزان، ایزوپروپیل و ... انتخاب می‌شود. در روش کروماتوگرافی فاز معکوس، قطبیت فاز ساکن کم‌تر از فاز متحرک می‌باشد به همین دلیل از حلال‌های آلی قطبی‌تر مانند متانول و استونیتریل به عنوان فاز متحرک استفاده می‌شود. حلال‌ها و موادی که در تهیه فاز متحرک استفاده می‌شوند باید دارای درجه خلوص HPLC باشند. استفاده از حلال‌هایی با درجه خلوص پایین می‌تواند موجب کاهش یا افزایش واکنش آشکارساز، تغییر انتخاب‌پذیری و قدرت فاز متحرک شود. آب مورد استفاده نیز باید دارای خلوص کروماتوگرافی باشد. میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها و جلبک‌ها به سرعت در آب زیاد می‌شوند. بنابراین حتی هنگام استفاده از آب تصفیه شده بهتر است که در پایان هر هفته آب باقی‌مانده را کنار گذاشته و از آب جدید استفاده کرد. یکی از راه‌های حذف میکروارگانیسم‌های ایجاد شده در HPLC شستشوی دستگاه با متانول می‌باشد. هم‌چنین افزودن ۰/۰۲٪ سدیم آزید و یا استونیتریل می‌تواند رشد میکروارگانیسم‌ها را در آب متوقف کند. آب تصفیه شده باید در ظروف شیشه‌ای بسیار تمیز نگهداری شوند چرا که پلاستی‌سایزرهای[۹] موجود در آب‌های نگهداری شده در ظروف پلاستیکی می‌توانند موجب آلودگی ستون شده و هم‌چنین در سیستم‌های فازمعکوس اشکال ایجاد می‌کنند. ناخالصی‌های موجود در فاز متحرک باعث آسیب رساندن به پمپ‌ها و کاهش کارایی ستون می‌شود و با مسدود کردن بخش‌های مختلف دستگاه فشار برگشتی را افزایش می‌دهد. به همین دلیل فیلتراسیون حلال‌های HPLC جزو فرآیندهای معمول آنالیز نمونه‌ها در آزمایشگاه‌ها می‌باشد. فیلترهای نایلونی با قطر ۱/۲-۰/۲۲ میلی‌متر با اکثر حلال‌های معمول در HPLC سازگاری دارد و می‌تواند از ورود این

[۶] Guard Column
[۷] Isocratic
[۸] Gradient
[۹] Plasticizer

ذرات به دستگاه جلوگیری کند. از دیگر فاکتورهای مهم در انتخاب حلال، هزینه، سمیت، ویسکوزیته، نقطه جوش، فشار بخار، نقطه اشتعال، قدرت نفوذ آن با توجه به ترکیبات نمونه و توانایی ایجاد خوردگی و... می‌باشد. پس از انتخاب حلال‌ها باید توجه داشت که نمونه موردنظر به طور کامل در فاز متحرک محلول باشد و یا از حلالی برای حل کردن نمونه استفاده کرد که با فاز متحرک سازگاری داشته باشد. فاز متحرک هنگام عبور از آشکارساز نباید هیچ‌گونه سیگنالی تولید کند. انتخاب حلال‌های مورد استفاده در فاز متحرک باید به گونه‌ای باشد که تا حد امکان از لحاظ اقتصادی توجیه داشته و قابل اجرا باشد[۳]. نکته دیگر در تهیه فاز متحرک pH آن است. در سیستم‌های فاز معکوس کنترل pH نقش بسیار مهمی در انتخاب‌پذیری، زمان بازداری و تکرارپذیری آنالیزها دارد. به طور معمول pH بین ٤-٢ بیش‌ترین پایداری را در برابر تغییرات ایجاد می‌کند و از طرفی این دامنه pH برای راه‌اندازی روش، در مورد اکثر نمونه‌های بازی و اسیدی ضعیف سازگاری دارد[٦]. حساسیت به تغییرات pH درمورد همه مواد صدق نمی‌کند. زمان بازداری مواد خنثی با تغییرات pH فاز متحرک کمتر تغییر می‌کند. زمان بازداری مواد بازی در محدوده pH، بین ١٠-٥ و مواد اسیدی در محدوده pH، ٥-٢ شدیدا تغییر می‌کند. برای جلوگیری از مشکلات ناشی از تغییر pH بهتر است از روشی استفاده شود که حساسیت کم‌تری به تغییرات pH داشته باشد مثلا برای جداسازی ترکیبات بازی pH فاز متحرک زیر۳ تنظیم شود. تهیه فاز متحرک همیشه به یک روش معین انجام شود و pH فاز متحرک با روش همیشگی تنظیم شود. مثلا اگر pH همیشه قبل از افزودن فاز آلی اندازه گیری می‌شود فاز متحرک‌های بعدی نیز به همین روش تهیه شود[۱]. pH فاز متحرک پس از افزودن حلال‌های آلی اندازه‌گیری شود. چرا که pH متر برای اندازه‌گیری pH در حلال‌های آبی کالیبره شده است. برای تهیه بافر بعنوان فاز متحرک لازم است ابتدا اجزای بافر به طور کامل در آب حل شده سپس فاز آلی به آن اضافه شود چرا که اجزای بافر در فاز آلی حل نمی‌شود و ایجاد رسوب می‌کند. اطمینان حاصل شود که از اسید یا باز مناسب برای تنظیم epH استفاده می‌شود. به عنوان مثال بافرهای سدیم فسفات فقط با اسید فسفریک یا سدیم هیدروکساید تنظیم می‌شوند. قبل از اینکه مسیر با حلال آلی پر شود باید مطمئن شد که درون آن‌ها بافر جریان نداشته است، چرا که در این‌صورت نیز شرایط مناسبی برای ایجاد رسوب در مسیر لوله‌ها و سر پمپ فراهم می‌شود. اگر کاربر از عدم وجود بافر اطمینان نداشته باشد لازم است مسیر با مخلوط آب (٨٠): متانول(٢٠) شستشو داده شود تا بافر موجود با آب شسته شده و از ایجاد رسوب جلوگیری شود[۹]. گاززدایی از حلال‌ها برای جلوگیری از مشکلات ناشی از حضور حباب‌ها در ستون، پمپ و آشکارساز امری بسیار ضروری است. از جمله اثرات حضور حباب در دستگاه ایجاد خط پایه ناپایدار است. روش‌های گاززدایی شامل گاززدایی در خلاء، جوشاندن، استفاده از امواج فراصوت، عبور یک گاز بی‌اثر و... می‌باشد. امواج فراصوت روش موثری در گاززدایی از فاز متحرک است، اما به دلیل ایجاد گرما باعث از دست رفتن بخشی از فاز آلی می‌شود. در مقابل روش گاززدایی در خلا روش بسیار مناسب‌تری است، چرا که در یک مرحله بدون ایجاد گرما، فیلتراسیون و گاززدایی را می‌توان هم‌زمان انجام داد. روش گاززدایی با خلا در مورد همه حلال‌ها قابل استفاده نمی‌باشد، چرا که ترکیب فاز متحرک را در مورد حلال‌های فرار تغییر می‌دهد. پس از قرار دادن فاز متحرک در محل خود با برقراری جریان مناسب می‌توان از عدم وجود نشتی در سیستم اطمینان حاصل کرد. برای خروج هوا از مسیر و تخلیه آن از فاز متحرک قبلی یا حلال‌های شستشو می‌توان از فاز متحرک جدید استفاده نمود. لازم است پس از قرار دادن ستون در مسیر، مجددا با اعمال جریان مشخص شده به مدت ٥ دقیقه مسیر از لحاظ وجود نشتی بررسی شود. وقتی ستونی برای اولین‌بار و یا بعد از مدت طولانی استفاده می‌شود نیاز به شستشوی حلال نگهدارنده موجود در آن با حلال مناسب دارد. در این مرحله توصیه می‌شود که ستون به آشکارساز متصل نباشد و بهتر است به مدت ٥ دقیقه جریان حلال دفع شود تا از تخلیه ذرات خارجی و هوای موجود اطمینان حاصل شود[۹].

٥. آشکارساز

آشکارساز با توجه به خصوصیات آنالیت مورد نظر مانند توانایی جذب در ناحیه ماورای بنفش و فلورسانس، هدایت، اکسیداسیون-احیا و ... انتخاب می‌شود. ویژگی‌هایی که برای انتخاب یک آشکارساز اهمیت دارد شامل حساسیت بالا، حداقل نویز در خط پایه، گستره خطی وسیع، مستقل بودن از تغییرات پارامترهایی مانند فشار، سرعت جریان، دما، مستقل بودن از تغییرات فاز متحرک، حجم مرده کم، غیر مخرب بودن بر روی نمونه و پایداری در طی مراحل آنالیز می‌باشد [۱۰]. طول موج انتخابی باید برای آنالیت موردنظر مناسب باشد. به عنوان مثال دامنه طول موج برای ترکیبات آروماتیک با گروه های قطبی ٢٦٠-٢٤٠ نانومتر است. پس از انتخاب آشکارساز و تعیین طول موج مناسب برای ایجاد تعادل در سیستم به مدت ده دقیقه جریان را در مسیر برقرار و فشار برگشتی را

بررسی کرده تا به حالت پایدار و ثابت درآید. هدف نهاییِ هر آنالیز به وسیله‌ی کروماتوگرافی، دستیابی به بهینه‌ترین وضوح در کم‌ترین زمان ممکن است.

در این مرحله طبق روش انجام آزمون و شرایط مورد نیاز شامل فاز متحرک، تنظیمات آشکارساز و... دستگاه را تنظیم کرده و خط پایه بررسی می‌شود. خط پایه آشکارساز می‌تواند ما را از مشکلات ستون، حلال‌ها و یا پمپ آگاه سازد. اگر ستون آلودگی داشته باشد، حلال‌ها مناسب نباشند و یا در هد سر پمپ هوا وجود داشته باشد خط پایه پایدار خوبی بدست نخواهد آمد[۹].

٦. نتیجه‌گیری

به طور کلی برای راه‌اندازی و توسعه روش‌های آنالیز دستگاهی نیازمند مطالعه دقیق دستورالعمل‌های مربوط به هر بخش قبل از شروع کار می‌باشد. ازآنجا که هزینه‌های خرید، تعمیر، و نصب و راه‌اندازی دستگاه‌های HPLC بسیار زیاد است لذا توجه به راه‌های جلوگیری از ایجاد مشکل بسیار ضروری است که باید مورد توجه کارشناسان و مدیران فنی آزمایشگاه‌های کنترل کیفی و مراکز دانشگاهی و پژوهشی قرار گیرد.

۷. مراجع

۱) خبرنامه کروماتوگرافی، شرکت شیمیایی بهان، شماره ۱، زمستان ۱۳۸۳

۲) خبرنامه کروماتوگرافی، شرکت شیمیایی بهان، شماره۲ ، پائیز ۱۳۸٤

[3] Bernadette M. McMahon, Carolyn M. Makovi. (1999). PESTICIDE ANALYTICAL MANUAL, 1.

[4] Biziuk M, Żwir-Ferenc A. M. (2006). SolidPhase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. (Polish J. of Environ), 15(5), 677-690.

[5] Gregory C, Slack A, and Nicholas H. (2007). HPLC Sample Preparation. (ELSEVIER), 8, 238-268.

[6] Technical Overview, Control pH During Method Development for Better Chromatography, Agilent Application.

[7] Thammana M. (2016). A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). (Pharmaceutical Analysis),5(2).

[8] Watson D.W. (2016). What HPLC Operators Need to Know, Part I: Sample Preparation and Column Selection. (LCGC North America), 34(8), 574.

[9] Watson D.W. (2016). What HPLC Operators Need to Know, Part II: Instrument and Detector Settings. (LCGC North America), 34(9), 750.

[10] Work, T.E, Work, E.(2008). Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,17(7), 73-89.

[10] www.lab-training.com (http://lab-training.com/2014/06/20/desirable-properties-hplc-mobile-phase/)