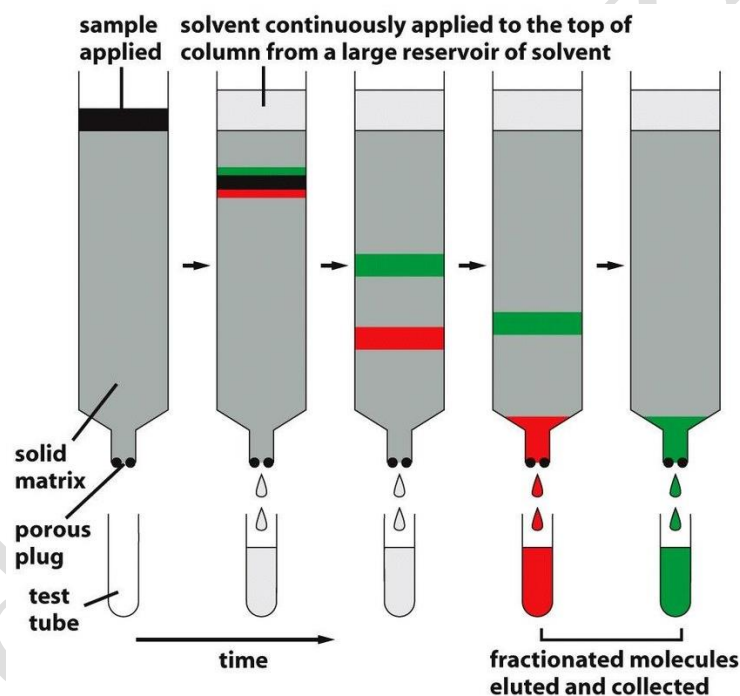


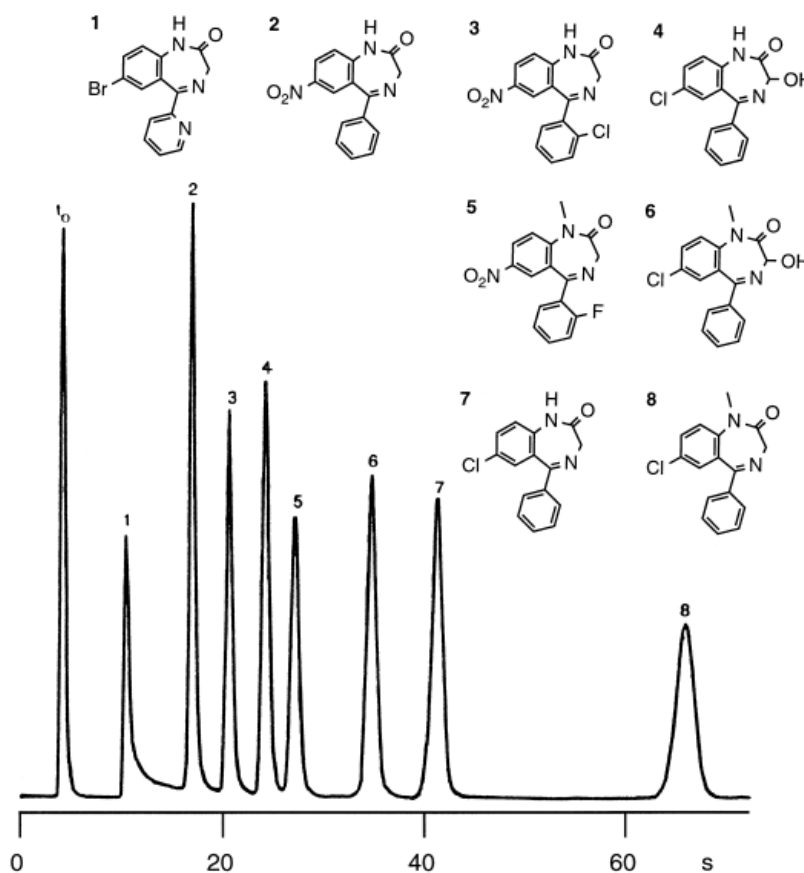
کروماتوگرافی

کروماتوگرافی در سال ۱۹۰۳ به وسیله میخائیل تسوت ابداع و نامگذاری شد. او توانست رنگدانه های گیاهی را که جذب متفاوتی نسبت به ستون حاوی کربنات کلسیم داشتند، بصورت باندهای رنگی از یکدیگر تفکیک نماید. در این تکنیک، اجزاء یک نمونه مخلوط بر اساس توزیع متفاوت شان بین فازهای ثابت و متحرک از یکدیگر جدا می شوند. در این فرایند، فاز متحرک از میان یک بستر، لایه یا ستون که حاوی فاز ثابت است، عبور می نماید. موادی که تمایل بالا برای فاز ثابت دارند، برای مدت طولانی تری در فاز ثابت باقی می مانند و مواد با تمایل پایین، عمدتاً در فاز متحرک قرار می گیرند و سریع تر حرکت می کنند. در انتها، موادی که با اتصال قوی به فاز ثابت چسبیده اند، از طریق تغییر ماهیت فیزیکی یا شیمیایی فاز متحرک از فاز ثابت جدا می شوند.



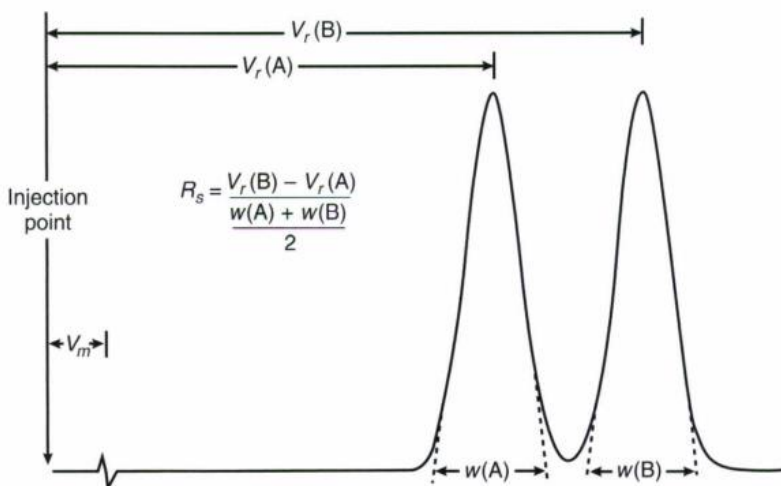
کروماتوگرافی یک روش جداسازی قدرتمند است

کروماتوگرام زیر جداسازی مخلوطی از ۸ داروی بنزودیازپین با ساختار بسیار مشابه را در مدت ۷۰ ثانیه توسط HPLC نشان می دهد. کروماتوگرام دارای اطلاعات کیفی و کمی است. هر ماده ای در مخلوط دارای زمان شستشوی (Elution time) اختصاصی است و مساحت و ارتفاع هر پیک با مقدار آن ماده متناسب است.



کروماتوگرام

نموداری است که پاسخ دتکتور را بعنوان تابعی از زمان شستشو یا حجم شستشو نشان می دهد.

حجم بقا (retention volume) یا V_r

حجم محلول شستشو (فاز متحرک) که از ابتدای تزریق نمونه تا خروج جز مورد نظر از ستون در ظرف زیر ستون جمع می شود.

بجای حجم بقا اغلب از زمان بقا (t_r) استفاده می شود که اندازه گیری آن ساده تر است.

$$V_r = \text{Flow} \cdot t_r$$

تفکیک (R_s)

معیاری از جداسازی موفقیت آمیز است که دو پیک دارای زمان های شستشوی (elution times) متفاوتی بوده و پهنای باند به

اندازه ای باریک باشد که هم پوشانی پیک ها را به حداقل برساند.

$$R_s = \frac{V_r(B) - V_r(A)}{\left[\frac{w(A) + w(B)}{2} \right]} \quad (2)$$

where

$V_r(A)$ = retention volume for solute A

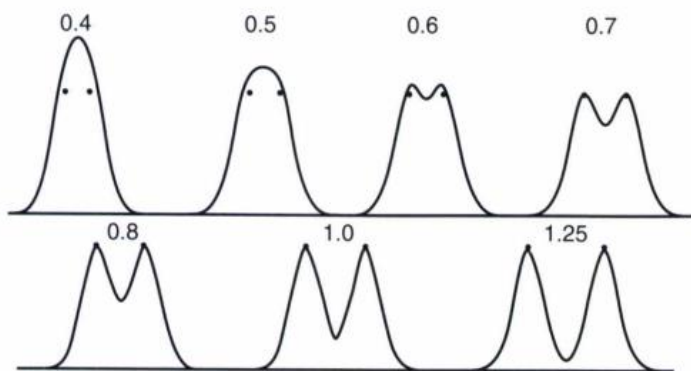
$V_r(B)$ = retention volume for solute B

$w(A)$ = bandwidth (units of volume) measured at base for solute A

$w(B)$ = bandwidths (units of volume) measured at base for solute B

Resolution also is expressed in terms of time, with $V_r(A)$ and $V_r(B)$ being replaced with retention times $t_r(A)$ and $t_r(B)$, and $w(A)$ and $w(B)$ being expressed in units of time.

❖ اگر ارزش R_s کمتر از ۰/۸ باشد نشان می دهد که جداسازی بطور ناقص انجام گرفته است، در R_s بالاتر از ۱/۲۵ جداسازی پیک ها از یکدیگر رخ می دهد.



عوامل موثر در قدرت تفکیک

$$R_s = \left(\frac{k'}{k' + 1} \right) \times \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)$$

بهبود R_s از طریق تغییر در فاکتور بقا ستون (k')، کارایی ستون (N) و قابلیت گزینش ستون (α) بدست می آید.

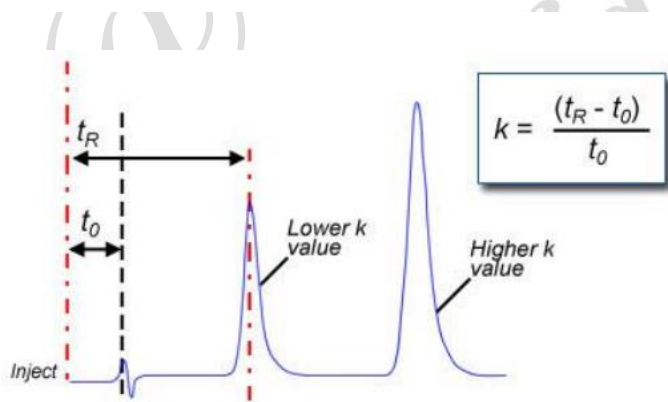
Retention Factor یا Capacity Factor (k')

معیاری از زمانی که آنالیت در فاز ثابت قرار دارد به زمانی که در فاز متحرک قرار می گیرد.

$$k' = \frac{V_r - V_0}{V_0} = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

t_0 یا V_0 (زمان یا حجم مرده): زمان یا حجم لازم برای طی کردن ستون توسط فاز متحرک.

t_r یا V_r (زمان یا حجم بقا): فاصله زمانی بین تزریق نمونه و ثبت سیگنال توسط *detector*



- ❖ k' مستقیماً به قدرت برهمکنش آنالیت ها با فازهای ثابت و متحرک وابسته است.
- ❖ k' تابعی از خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنالیت، فاز ثابت، فاز متحرک و دمای ستون می باشد.
- ❖ هر چه زمان ماندن آنالیت در ستون بیشتر باشد، k' بزرگتر خواهد بود.
- ❖ در یک سیستم Isocratic (ترکیب فاز متحرک ثابت باشد)، در k' کمتر از ۲، آنالیت خیلی سریع از ستون خارج می شود و قدرت تفکیک ضعیف می باشد. همچنین k' بسیار بزرگ موجب پهن شدن پیک ها می شود. در عمل k' در محدوده ۲ الی ۹ مناسب است.
- ❖ k' در مقایسه نتایج حاصل از سیستم های مختلف مفید است زیرا مستقل از طول ستون و سرعت جریان فاز متحرک می باشد.
- ❖ راحت ترین کار برای تغییر فاکتور بقا آنالیت ها، دست کاری ترکیب فاز متحرک نظیر قطبیت، pH یا قدرت یونی است. بعنوان مثال در کروماتوگرافی با فاز معکوس (فاز ثابت حاوی گروه های آبگریز است)، با کاهش جزء آلی فاز متحرک زمان ماندگاری آنالیت در ستون طولانی می شود. در تصویر پایین با کاهش درصد استونیتریل و افزایش جزء قطبی فاز متحرک یعنی آب فاکتور بقا بهبود می یابد. همچنین آنالیت هایی که باردار هستند، در ستون با فاز معکوس ماندگاری کوتاهی دارند ولی با تغییر pH فاز متحرک می توان آنالیت را در شکل غیر یونی قرار داد و بقا را افزایش داد.

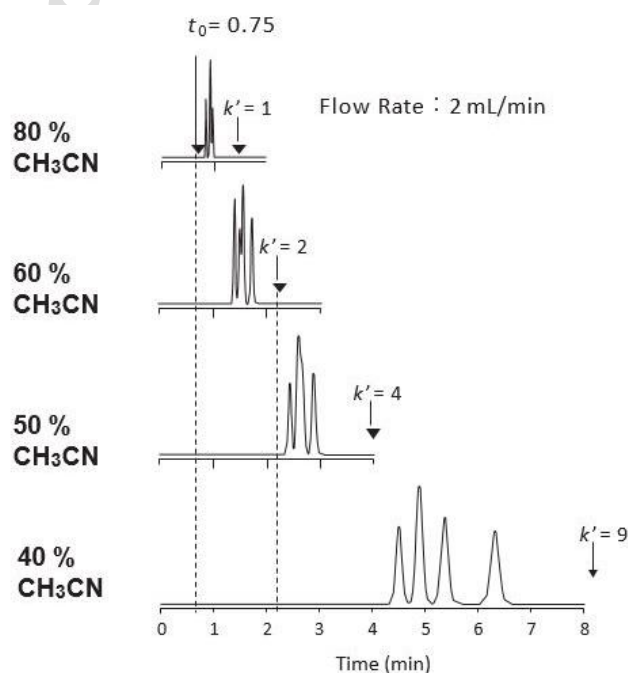


Figure 3-1. Shifts of elution times by changing the elution strength of the mobile phase.

(N) Efficiency

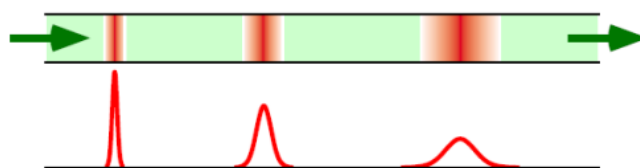
به طور ایده‌آل، وقتی یک آنالیت از فاز ثابت عبور می‌کند، بهتر است حرکت آن به صورت یک باند بسیار باریک باشد ولی در عمل این طور نمی‌شود و باند پهن می‌گردد.

دلایل پهن شدن باند:

۱- عمدتاً نتیجه جریان غیریکنواخت فاز متحرک به هنگام عبور از فاز ثابت

۲- یک دست نبودن ابعاد ذرات

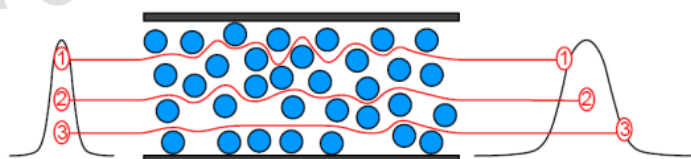
۳- انتشار



دو پدیده که در پهن شدن باند سهم اصلی را دارند:

Eddy diffusion

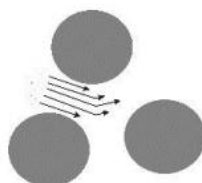
نتیجه حالتی است که مولکول‌های آنالیت مسیر فاز ثابت را به طور متفاوت طی می‌کنند. مسیر برخی ممکن است خطی و برخی دیگر دورانی باشد. به علاوه مسیرها ممکن است باریک‌تر یا پهن‌تر باشند. مولکول‌ها در مسیرهای پهن حرکت سریع‌تری خواهند داشت.



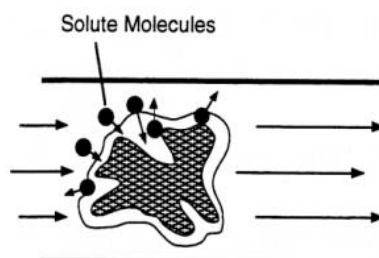
مولکول‌های آنالیت به طور راندوم در این مسیرها پخش می‌شوند، آنهایی که وارد مسیرهای مستقیم و گشاد می‌شوند، سریع‌تر از آنهایی که مسیرهای دورانی و باریک‌تر را انتخاب می‌کنند، از انتهای ستون خارج می‌شوند. به این ترتیب باند پهن می‌شود.

Mass Transfer

Mobile Phase mass transfer: فاز متحرک که نزدیک به یکی از دو *bead* قرار دارد حرکت آهسته‌تری نسبت به فاز متحرک در مرکز جریان دارد.



Stagnant mobile phase Mass transfer: مولکول‌های آنالیت موقتا در مخزن راکد فاز متحرک موجود در منافذ *Bead* به دام می‌افتند. این مولکول‌ها مجدداً از طریق حرکات انتشاری وارد فاز متحرک می‌شوند.



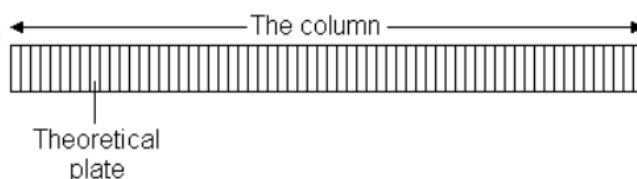
✓ فرآیندهای **Mass Transfer** شدیداً به ویژگی‌هایی نظیر اندازه ذرات، اندازه منافذ ذرات و شکل ذرات بستگی دارد.

صفحه فرضی (Theoretical Plate)

In theory a theoretical plate is equivalent to the length of a column necessary to allow one equilibration of the solute to occur between the stationary and the mobile phases.

$$H = L / N$$

H: ارتفاع یک صفحه فرضی، **L:** طول ستون، **N:** تعداد صفحات فرضی



برای افزایش **Efficiency** یک ستون، باید تعداد صفحات فرضی را افزایش داد. در عمل این کار با افزایش طول ستون حاصل می‌شود. به طور کلی، کاهش در سرعت جریان فاز متحرک، میانگین اندازه ذرات فاز ثابت، پراکندگی اندازه ذرات و حجم نمونه موجب افزایش **Efficiency** خواهد شد. همچنین افزایش طول ستون، دما و ویسکوزیته نمونه **Efficiency** را بهبود می‌دهد.

(α) Selectivity Factor

معیاری از جداسازی نسبی میان باندهای دو آنالیت است.

$$\alpha = \frac{K'(A)}{K'(B)} = \frac{[tr(B) - t_0]}{[tr(A) - t_0]}$$

$tr(A)$: زمان شستشوی ماده A

$tr(B)$: زمان شستشوی ماده B

برحسب قرارداد، آنالیت با K' بزرگتر در صورت کسر قرار می‌گیرد. بنابراین مقدار α همواره یک یا بزرگتر است. وقتی دو آنالیت دارای مقادیر K' برابر هستند، $\alpha=1$ است. بنابراین آنالیت‌ها از یکدیگر جدا نمی‌شوند.

$\alpha=1$ عدم جداسازی دو آنالیت

$\alpha=1/0.1$ جداسازی از لحاظ فنی امکان‌پذیر است ولی مشکل می‌باشد

$\alpha=1/0.5$ جداسازی منطقاً آسان است.

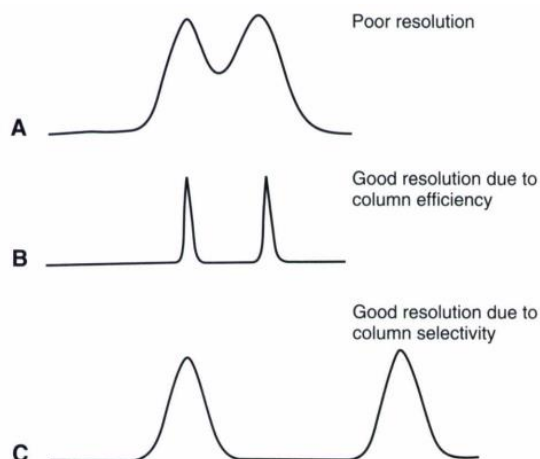
$\alpha=1/10$ جداسازی راحت‌تر خواهد بود.

❖ ترکیب فاز متحرک نظیر pH، قدرت یونی و قطبیت حلال، دمای ستون در HPLC و GC، ماهیت فیزیکوشیمیایی فاز ثابت و خصوصیات شیمیایی فاز متحرک از عوامل موثر در Selectivity هستند.

در تعیین **Good Selectivity Resolution** مهم‌تر از **High Efficiency** است. زیرا رابطه R_s با **Selectivity** خطی می‌باشد،

در حالیکه با چهار برابر مجذور **Efficiency** مرتبط است. این بدان معنی است که افزایش ۴ برابر در **Efficiency** برای ۲ برابر

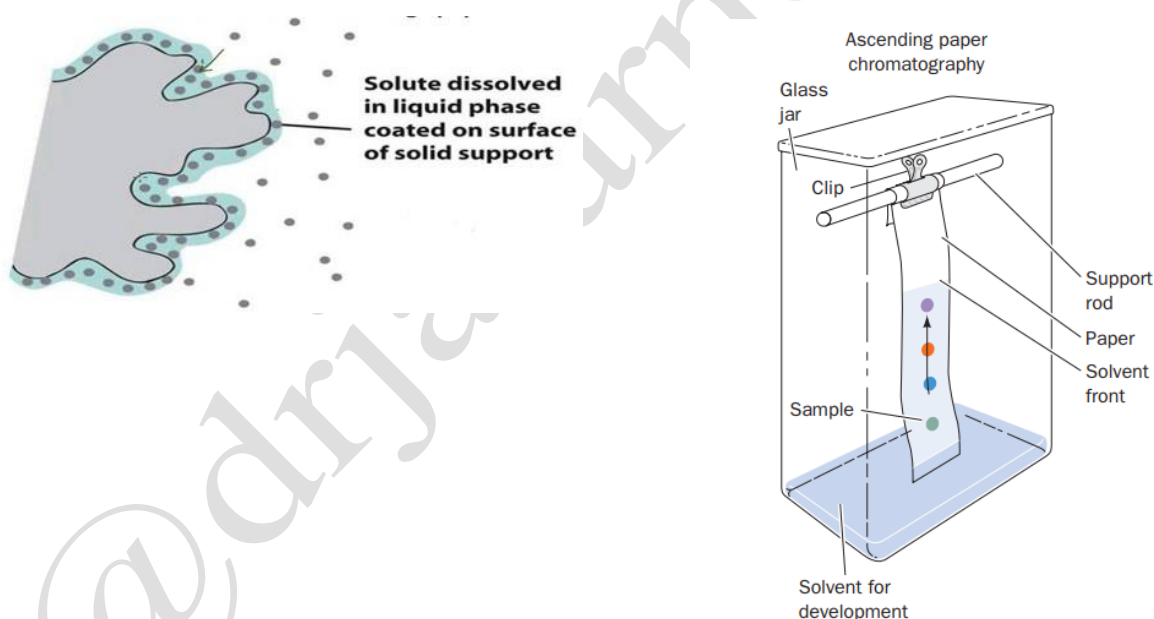
کردن **Resolution** لازم است.



انواع کروماتوگرافی

کروماتوگرافی تقسیمی (Partition)

توزیع متفاوت آنالیت ها بین دو مایع غیر قابل اختلاط، اساس جداسازی در کروماتوگرافی تقسیمی است. یکی از این دو مایع، بعنوان فاز ثابت عمل می کند. برای تهیه این فاز، لایه نازکی از مایع بر روی سطح جامد جذب می شود. جداسازی بر اساس اختلاف در حلالیت نسبی آنالیت ها بین فازهای ثابت و متحرک صورت می گیرد. آن را **کروماتوگرافی مایع- مایع** نیز می نامند نظیر **کروماتوگرافی کاغذی** که نوعی کروماتوگرافی صفحه ای است و برای جداسازی قندها، اسیدآمینها، نوکلئوتیدها، آلکالوئیدها، پپتیدها و لیپیدها استفاده می شود. حلال هایی که برای جداسازی استفاده می شوند شامل مخلوطی از آب، الکل ها، اسیدها و بازها هستند نظیر ترکیب آب- بوتانول- اسید استیک در نسبت ۱:۵:۴. در کروماتوگرافی تقسیمی با فاز **نرمال** اجزاء قطبی تر حلال مثل آب با کاغذ برهم کنش داده و فاز ثابت ژله ای را تشکیل می دهد و اجزائی که قطبیت کمتری دارند فاز متحرک را بوجود می آورند که بر اساس خاصیت موئینه روی کاغذ حرکت می کنند.

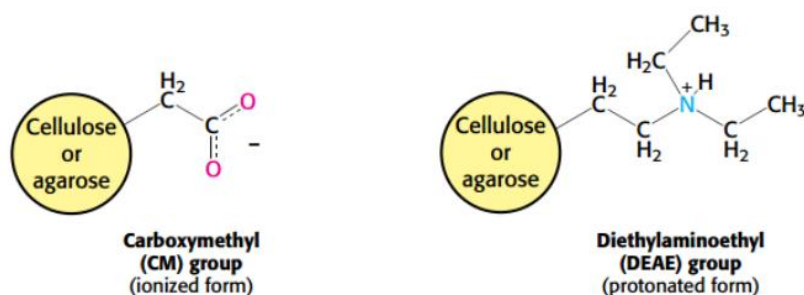


محاسبه تحرک نسبی یا R_f اجزاء نمونه در کروماتوگرافی صفحه ای

$$R_f = \frac{\text{distance spot migrated (mm)}}{\text{Distance solvent front migrated (mm)}}$$

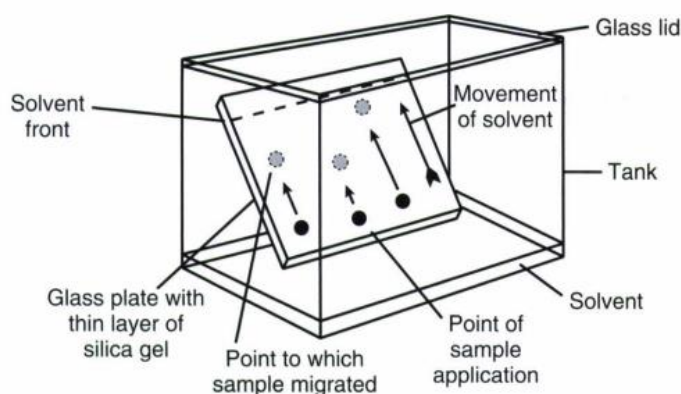
کروماتوگرافی جذبی (Adsorption)

اساس جداسازی، برهم کنش اجزاء مخلوط با نقاط فعال تثبیت شده بر روی جسم جامد است. آن را **کروماتوگرافی مایع - جامد** نیز می نامند. ماهیت نقاط فعال بر حسب نوع کروماتوگرافی متفاوت است بعنوان مثال در کروماتوگرافی تعویض یون، نقاط فعال گروه های باردار هستند.



کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

TLC نوعی کروماتوگرافی صفحه ای جذبی است که در آن لایه نازکی از ماده جاذب نظیر ژل سیلیکا (معمولاً به ضخامت ۰/۲ میلی متر) بطور یکنواخت بر روی پلیت شیشه ای یا پلاستیکی یا فویل آلومینیومی کشیده می شود. پلیت های آماده که با انواع مواد جاذب نظیر سیلیکا، میکروسلولوز، آلومینا یا دکستران پوشیده شده اند، بطور تجاری موجود هستند. نمونه بصورت یک نقطه کوچک در نزدیک لبه پلیت گذاشته می شود و سپس پلیت در تانک حاوی فاز متحرک قرار می گیرد. فاز متحرک بر اساس خاصیت موئینه روی پلیت حرکت می کند. زمانی که فاز متحرک به اندازه کافی حرکت کرده، پلیت را خارج کرده و خشک می کنیم. سپس با روش های مختلف مثل استفاده از ترکیبات تولید کننده رنگ، محل ترکیبات روی پلیت مشخص می شوند.



✓ استفاده از ذرات با قطر کوچک در فاز ثابت موجب ظهور **High-Performance TLC** شده است. جداسازی های

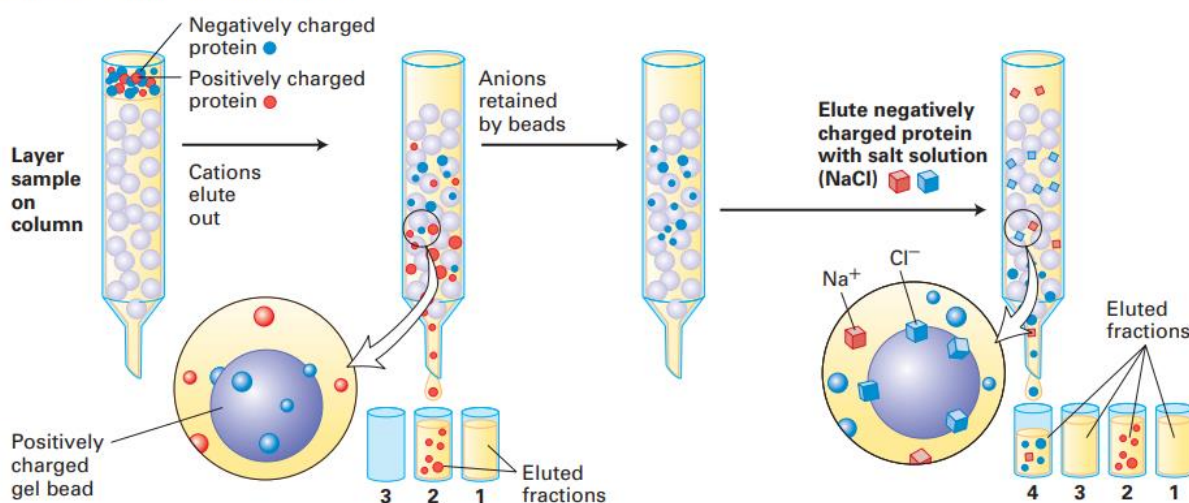
HPTLC کارآمدتر و تکرارپذیرتر می باشد.

✓ آزمایش غربالگری سوء مصرف مواد مخدر (Drug Abuse) در نمونه ادرار توسط تکنیک TLC و ایمنونواسی انجام می گیرد. روش ها حساسیت کافی دارد ولی ویژگی آنها پایین است و در معرض نتایج مثبت کاذب می باشند. لذا از گاز کروماتوگرافی یا LC-MS/MS بعنوان روش های رفرنس جهت تایید نتایج استفاده می شود.

کروماتوگرافی تعویض یون

برای جداسازی مولکول های باردار نظیر اسید آمینه ها، پپتیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک کاربرد دارد. همچنین در آزمایشگاه برای تهیه آب دیونیزه و حذف یون های معدنی از آب استفاده می شود. اساس این روش، تعویض یون ها بین یک سطح ثابت باردار و فاز متحرک است. سطح یک رزین یا ژل بعنوان فاز متحرک عمل می کند که گروه های آنیونی یا کاتیونی به آن تثبیت شده اند. اجزاء نمونه که باردار مثبت یا منفی هستند، به هنگام عبور از ستون براساس اختلاف در بار یونی شان یا بزرگی و اندازه بارهای یونی شان از یکدیگر تفکیک می شوند.

(b) Ion-exchange chromatography



رزین های تعویض کاتیون، حاوی گروه های باردار منفی هستند که برای تفکیک پروتئین های خنثی یا قلیایی کاربرد دارند نظیر گروه های اسیدی قوی مثل سولفونات یا گروه های اسیدی ضعیف مثل کربوکسیلات، کربوکسی متیل (CM)، فسفات، سولفواتیل (SE)، سولفومتیل (SM) و سولفوپروپیل. در حالیکه رزین های تعویض آنیون حاوی گروه های باردار مثبت هستند که برای

تفکیک پروتئین های خنثی یا اسیدی کاربرد دارند نظیر گروه های بازی قوی مثل آمین های نوع چهارم تری اتیل آمین اتیل یا گروه های بازی ضعیف مثل آمینواتیل (AE) ، دی اتیل آمینواتیل (DEAE) .

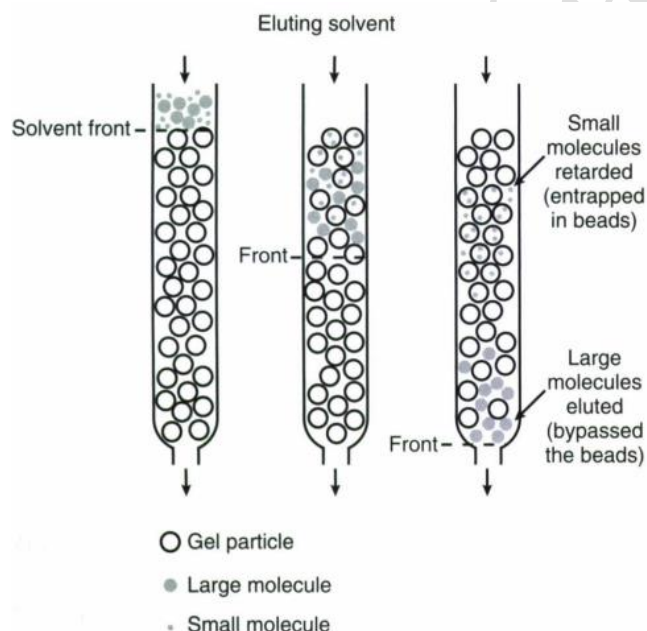
Table 6-2 Some Biochemically Useful Ion Exchangers

Name ^a	Type	Ionizable Group	Remarks
DEAE-cellulose	Weakly basic	Diethylaminoethyl —CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Used to separate acidic and neutral proteins
CM-cellulose	Weakly acidic	Carboxymethyl —CH ₂ COOH	Used to separate basic and neutral proteins
P-cellulose	Strongly and weakly acidic	Phosphate —OPO ₃ H ₂	Dibasic; binds basic proteins strongly
Bio-Rex 70	Weakly acidic, polystyrene-based	Carboxylic acid —COOH	Used to separate basic proteins and amines
DEAE-Sephadex	Weakly basic cross-linked dextran gel	Diethylaminoethyl —CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Combined chromatography and gel filtration of acidic and neutral proteins
SP-Sephadex	Strongly acidic cross-linked agarose gel	Methyl sulfonate —CH ₂ SO ₃ H	Combined chromatography and gel filtration of basic proteins

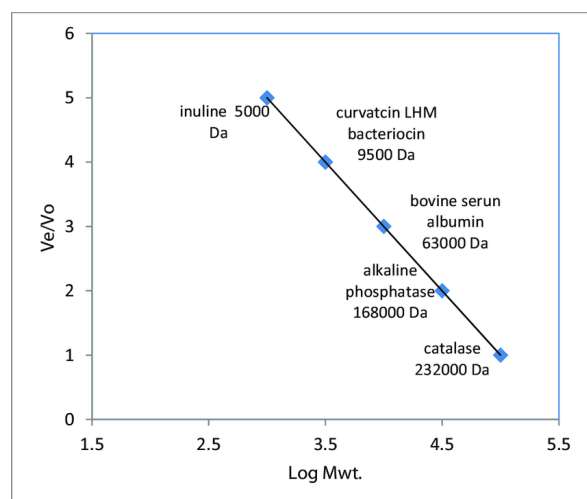
^aSephadex and Sepharose are products of GE Healthcare; Bio-Rex resins are products of BioRad Laboratories.

کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون

در این تکنیک اساس جداسازی اندازه و وزن مولکولی است. مولکول های درشت تر سریع تر از ستون خارج می شوند.



از این تکنیک برای تعیین وزن مولکولی پروتئین ها استفاده می شود. هر چه پروتئین کوچکتر باشد، فاز متحرک بیشتری جهت خارج کردن آن از ستون لازم است و حجم شستشو (V_e) بیشتر می شود و بالعکس.



برخی از ژل های رایج مورد استفاده در ژل فیلتراسیون

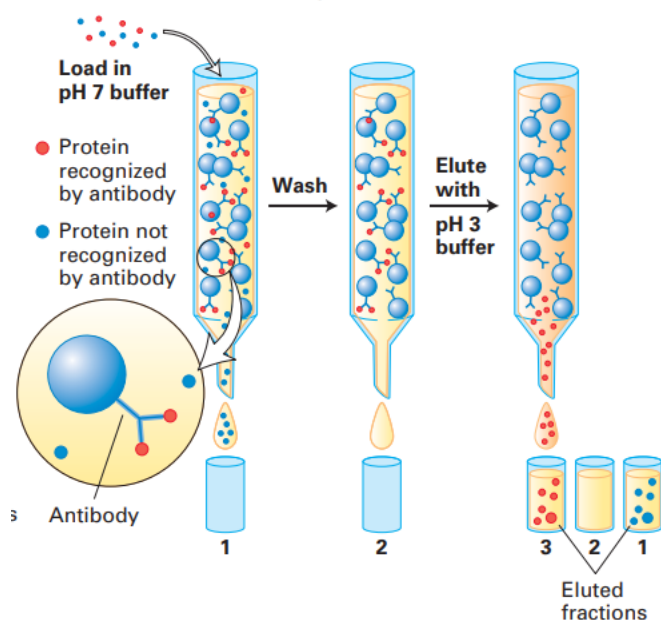
Name ^a	Type	Fractionation Range (kD)
Sephadex G-10	Dextran	0.05–0.7
Sephadex G-25	Dextran	1–5
Sephadex G-50	Dextran	1–30
Sephadex G-100	Dextran	4–150
Sephadex G-200	Dextran	5–600
Sephacryl S-100	Dextran, cross-linked	1–100
Sephacryl S-200	Dextran, cross-linked	5–250
Sephacryl S-300	Dextran, cross-linked	4–150
Sephacryl S-400	Dextran, cross-linked	20–8000
Bio-Gel P-2	Polyacrylamide	0.1–1.8
Bio-Gel P-6	Polyacrylamide	1–6
Bio-Gel P-10	Polyacrylamide	1.5–20
Bio-Gel P-30	Polyacrylamide	2.5–40
Bio-Gel P-100	Polyacrylamide	5–100
Sepharose 6B	Agarose	10–4,000
Sepharose 4B	Agarose	60–20,000
Sepharose 2B	Agarose	70–40,000

^aSephadex, Sephacryl, and Sepharose are products of GE Healthcare; Bio-Gel gels are products of BioRad Laboratories.

- ❖ از ژل های سفادکس G-10 و G-25 برای نمک زادی از محلول های پروتئینی و تعویض بافر استفاده می شود.
- ❖ ذرات ژل حاوی منافذ با سایز مشخصی هستند که بعنوان **fractionation range** شناخته می شود. بعنوان مثال، پروتئین های بزرگتر از ۳۰ کیلودالتون وارد منافذ سفادکس G-25 نمی شوند. عبارتی اگر آلبومین با وزن ۶۸ و آنزیم لیزوزیم با وزن ۱۴ کیلودالتون را وارد ستون نمائیم، آلبومین سریع تر از ستون خارج می شود.

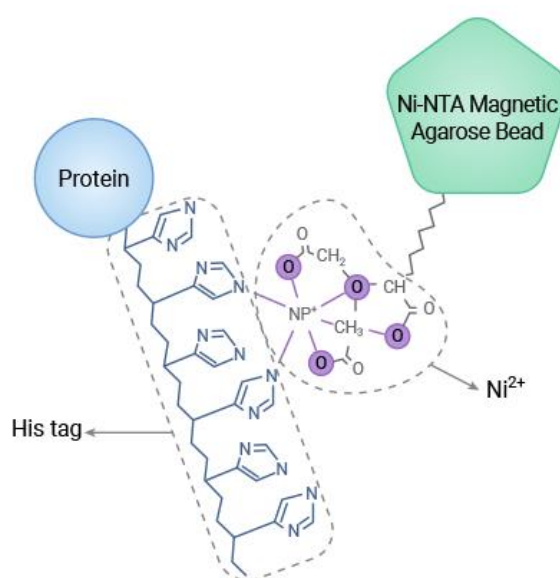
کروماتوگرافی تمایلی

(c) Antibody-affinity chromatography



در این روش از واکنش اختصاصی بیومولکول ها با یکدیگر برای جداسازی استفاده می شود. تنظیم pH و قدرت یونی برای اتصال مطلوب آنالیت به لیگاند لازم است. اگر برهم کنش بین آنالیت و لیگاند اختصاصی باشد، آنالیت طی یک مرحله با افزودن یک سوبسترا یا یک مهارکننده یا از طریق تغییر pH یا تغییر قدرت یونی یا افزودن یک عامل دناتوره کننده مثل اوره از لیگاند جدا می شود.

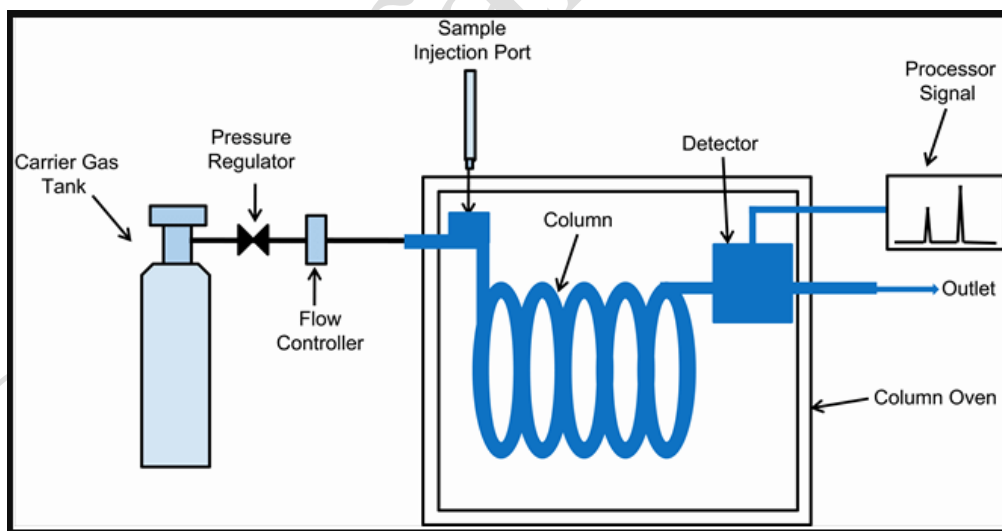
برای جداسازی پروتئین های نوترکیب از این تکنیک استفاده می شود. برای سهولت تخلیص پروتئین نوترکیب به آن یک Tag نظیر یک توالی ۶ تایی از هیستیدین (tag-His) متصل می شود تا توسط ژل های متصل به نیکل از سایر پروتئین ها در عصاره سلولی تفکیک شوند. بعد از تخلیص می توان توسط پروتئاز Tag را از پروتئین نوترکیب جدا نمود.



گاز کروماتوگرافی (GC)

گاز کروماتوگرافی روشی برای جداسازی، شناسایی و اندازه گیری اجزاء فرار است. در این روش اجزاء مخلوط را به شکل گاز در آورده و از ستون های حاوی مواد جامد یا مایع بعنوان فاز ثابت عبور داده و آنها را تفکیک می کنند. فاز متحرک یک گاز خنثی نظیر نیتروژن، هلیوم، هیدروژن یا آرگون است که آن را گاز حامل (Carrier gas) می نامند. انتخاب گاز حامل به نوع ستون و دتکتور وابسته است. بعنوان مثال در ستون های موئینه، هلیوم و هیدروژن گازهای حامل منتخب هستند. برای ستون های پک شده، نیتروژن گاز حاملی است که غالباً همراه با دتکتورهای FID، ECD و TCD استفاده می شود. گاز هلیوم با دتکتورهای FID و TCD و مخلوط متان-آرگون-نیتروژن با دتکتور ECD استفاده می شوند.

جدا شدن مواد در ستون، نظیر فرایند استخراج است. نمونه که در فاز گازی محلول است از بالا وارد ستون می شود و اجزا آن بر حسب ضریب توزیع خود بین دو فاز مایع و گاز تقسیم می شوند. در نتیجه اجزا موجود در نمونه، بر حسب تمایلی که ستون برای نگهداری آنها دارد از یکدیگر جدا شده و به وسیله عبور گاز حامل، اجزا جدا می شوند و به ترتیبی که متناسب با عکس تمایل نگهداری ستون برای آنها است، از انتهای ستون خارج شده، وارد آشکارساز می گردند. در آشکارساز اجزاء جدا شده موجود در گاز حامل مورد شناسایی و اندازه گیری قرار می گیرند.



انواع دتکتورها در گاز کروماتوگرافی

Type of Detector	Principle of Operation	Selectivity	Limit of Detection	Comments
Thermal conductance (TCD)	Measures thermal conductivity change in carrier gas on elution of compounds	Universal	<400 pg propane/mL He	
Flame ionization (FID)	$\text{CHNO} + \text{heat} \rightarrow \text{CHNO}^+ + \text{e}^-$; electrons collected for detection	Hydrocarbon	10 to 100 pg CHO	
Thermionic selective (TSD; NPD)	Alkali bead selectively ionizes N- or P-containing compounds	N, P	0.4 to 10 pg N 0.1 to 1.0 pg P	
Electron capture (ECD)	$\text{e}^- + \text{R} + \text{N}_2 \rightarrow \text{Re}^- + \text{N}_2 + \text{e}^-$; excess electrons collected; concentration inversely related	Electronegative groups	0.05 to 1.0 pg Cl ⁻ containing compounds	
Mass spectrometer (MS)	$\text{e}^- + \text{ABC} \rightarrow \text{A}^+ + \text{BC}$; monitor mass-to-charge ratio by either scanning or single-ion monitoring (SIM)	Universal (tunable)	1 ng scan 10 pg SIM	Provides structural confirmation; ion ratios constant in SIM
Photoionization (PID)	$\text{CHNO} + \text{photon} \rightarrow \text{CHNO}^+ + \text{e}^-$; detect electron	Hydrocarbon	1 to 10 pg CHO	May be improvement on FID
Electrolytic conductivity (Hall)	Postcolumn reaction detector for selective detection of halogen-, S-, or N-containing compounds	Halogen-, S-, and N-containing compounds	0.1 to 1.0 pg Cl 2.0 pg S 4.0 pg N	
Flame photometric (FPD)	P- and S-containing hydrocarbons emit light when burned in FID-type flame; emitted light detected	P- and S-containing compounds	0.9 pg CHP 20 pg CHS	
Fourier transform infrared (FTIR)	Infrared wavelength light absorbed by the compound of interest	Universal (tunable)	1 ng strong infrared absorber	Scanned for structural information or absorbance-measured for quantitation

NPD, Nitrogen-phosphorus detector.

فازهای ثابت مورد استفاده در گاز کروماتوگرافی برای جداسازی بالینی

Composition	Polarity	Similar Phases	Applications
100% dimethyl-polysiloxane	Nonpolar	OV-1, SE-30	Drugs, amino acid derivatives
5% diphenyl—95% dimethyl-polysiloxane	Nonpolar	OV-101, SP-2100	Drugs
50% diphenyl—50% dimethyl-polysiloxane	Intermediate	OV-17	Drugs, steroids, glycols
50% cyanopropylmethyl—50% phenylmethyl-polysiloxane	Intermediate	OV-225	Fatty acid methyl esters, carbohydrate derivatives
Polyethylene glycol	Polar	Carbowax 20 M	Acids, alcohols, glycols, ketones

کروماتوگرافی مایع با توان بالا (High Performance Liquid Chromatography)

در HPLC از ستون‌های نسبتاً بلند و باریک فولادی که با رزین‌های غیر قابل فشرده شدن از جنس سیلیکون، یک اندازه و با قطر ۱ الی ۱۰ میکرومتر پر شده‌اند، استفاده می‌شود. استفاده از رزین‌ها با این مشخصات قدرت جداسازی HPLC را نسبت به کروماتوگرافی‌های سنتی بسیار افزایش می‌دهد. به دلیل استفاده از ذرات بسیار ریز بعنوان فاز ثابت و فشردگی زیاد داخل ستون، لازم است تا فاز متحرک تحت فشار 15,000 psi از ستون عبور نماید که می‌تواند زمان آنالیز را کاهش می‌دهد. در HPLC امکان استفاده از فاز نرمال و معکوس وجود دارد. اگر فاز ثابت حاوی گروه‌های فعال قطبی نظیر Silica و Alumina و فاز متحرک حلال غیرقطبی باشد، سیستم را **فاز نرمال** و در صورتی که فاز ثابت حاوی گروه‌های فعال غیرقطبی نظیر ODS silica gel و فاز متحرک حلال قطبی باشد، در این صورت سیستم را **فاز معکوس** می‌نامند.

اجزاء اصلی HPLC

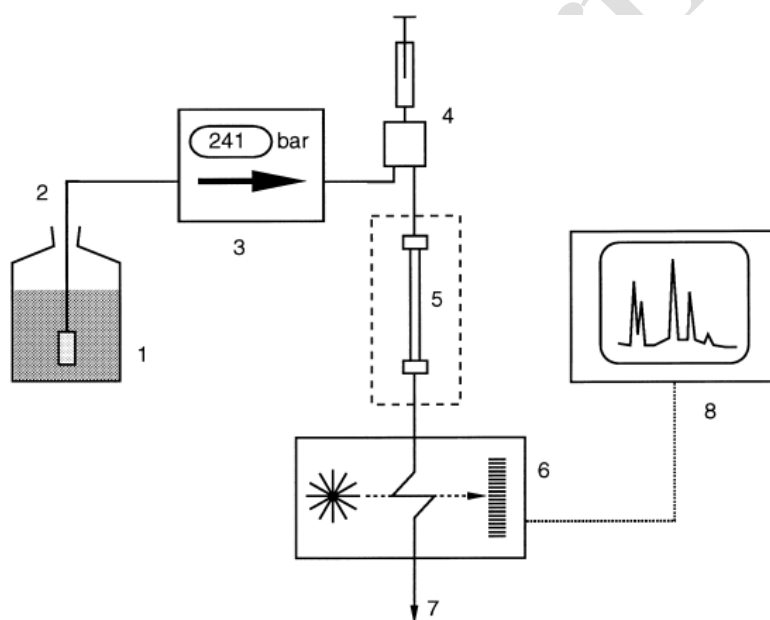


Fig. 1.3 Schematic diagram of an HPLC unit. 1 = solvent reservoir; 2 = transfer line with frit; 3 = pump (with manometer); 4 = sample injection; 5 = column (with thermostat); 6 = detector; 7 = waste; 8 = data acquisition.

HPLC انواع ستون های

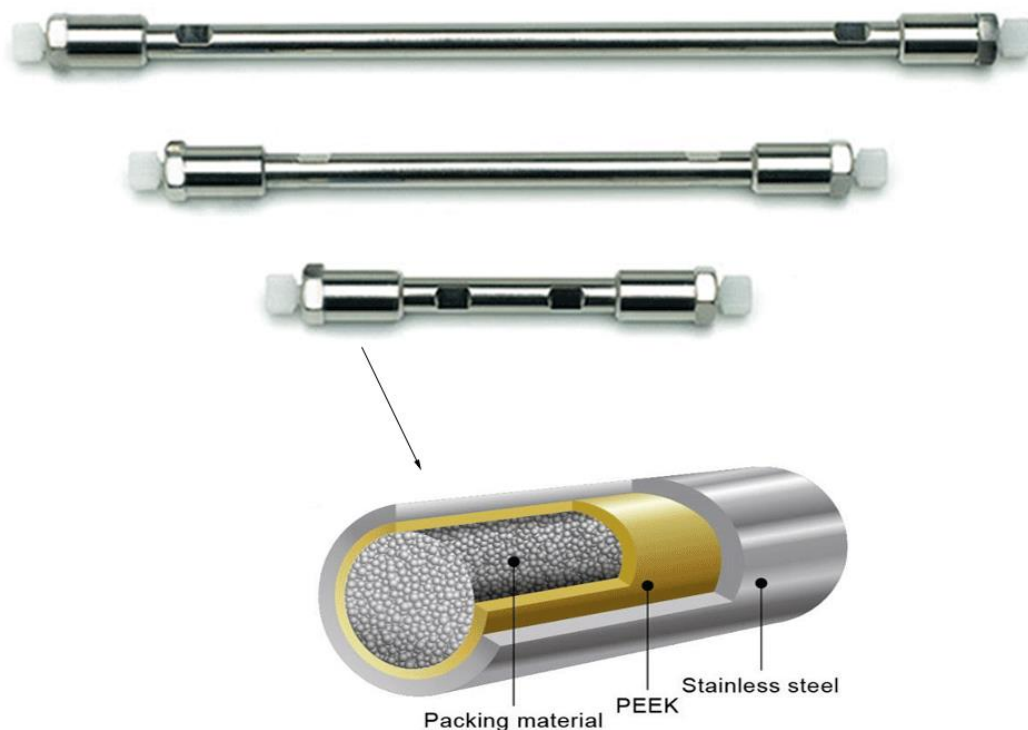
سرعت جریان (flow rate) فاز متحرک از ستون به قطر ستون بستگی دارد.

TABLE 6-3 Types of Columns Used in HPLC

Column Terminology	Column ID (mm)	Optimum Flow Volume
Standard	4.6	1.25 mL/min
	4.0	1.0 mL/min
Narrow bore	3.0	0.6 mL/min
	2.0	200 μ L/min
Microbore/capillary	1.0	50 μ L/min
	0.5	12 μ L/min
	0.3	4 μ L/min

HPLC, High-performance liquid chromatography; ID, internal diameter.

نمونه هایی از ستون های فولادی و ضد زنگ HPLC

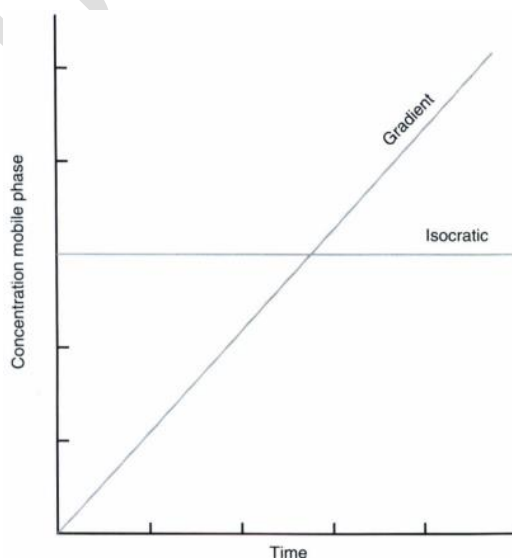


انواع دتکتورهای مورد استفاده در HPLC

Type of Detector	Principle of Operation	Range of Application	Detection Limit	Comments
UV photometer (fixed wavelength)	Measures absorbance of UV light	Selective	<1 ng	Analyte must absorb UV light or be derivatized
UV photometer (variable wavelength)	Measures absorbance of UV light	Selective	<1 ng	Detector can be "tuned" to a specific wavelength
Diode array	Measures absorbance of light	Selective	<1 ng	Detector provides complete spectra
Fluorometer	Measures fluorescence	Very selective	pg to ng	Analyte must fluoresce or be derivatized
Refractometer	Measures change in refractive index	Universal	1 μ g	
Electrochemical	Electrochemically measures oxidized/reduced analyte	Selective	pg to ng	Detector is useful for catecholamines

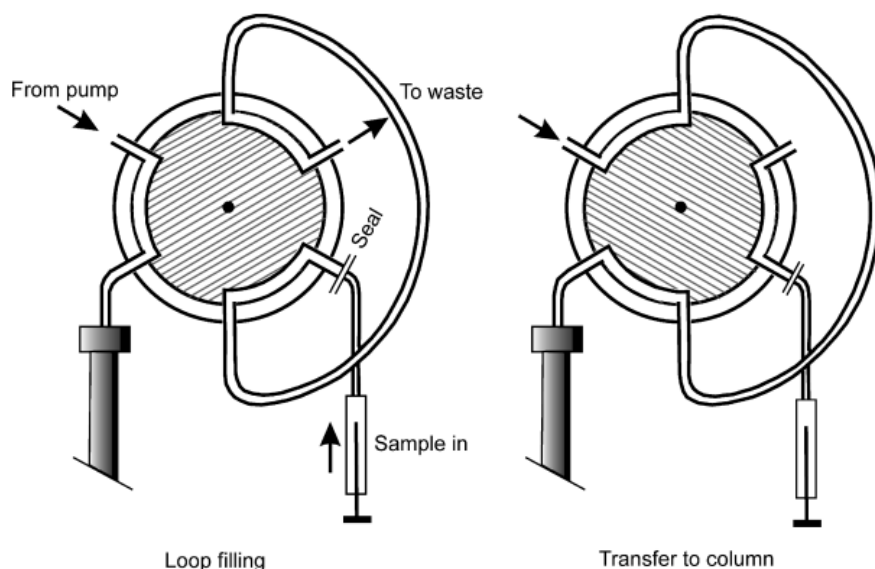
UV, Ultraviolet.

پمپ HPLC در دو حالت **Isocratic** و **Gradient** عمل می کند. در حالت ایزوکراتیک، ترکیب فاز متحرک در سرتاسر کروماتوگرافی ثابت باقی می ماند. این حالت معمولاً برای جداسازی های ساده تر و جداسازی ترکیبات با ساختار یا زمان بقاء مشابه استفاده می شود. فاز متحرک ایزوکراتیک یک حلال تنها نظیر متانول یا یک مخلوط آماده شده از چندین حلال نظیر متانول، استونیتریل و آب می باشد که از یک مخزن حلال وارد ستون می شود. یا اینکه فاز متحرک چند حلاله می تواند از دو یا چند مخزن حلال با نسبت مشخص ترکیب شده و وارد ستون شود. اکثر جداسازی های HPLC تحت شرایط ایزوکراتیک صورت می گیرد. شستشوی گرادیانی برای جداسازی های پیچیده استفاده می شود. در این حالت، ترکیب فاز متحرک در طول آزمایش در الگوی پلکانی یا پیوسته تغییر می کند.



Sample loop injector

در fill position نمونه تحت فشار اتمسفر به داخل لوپ فولادی وارد می شود. در inject mode لوپ نمونه می چرخد و نمونه در مسیر جریان فاز متحرک قرار می گیرد و وارد ستون می شود.



HPLC با فاز معکوس

در این نوع کروماتوگرافی، فاز ثابت شامل گرانول های منفذدار از ژل سیلیکا در ابعاد و شکل های مختلف (عمدتا کروی شکل) هستند که لیگندهای هیدروکربنی نظیر C3، C4، C8 و C18 به آنها متصل شده اند. هر چه لیگاند بلندتر باشد، اجزاء نمونه برای مدت طولانی تر داخل ستون باقی می مانند. در جداسازی داروها، اسیدآمین ها و ویتامین های محلول در چربی از ستون های C18 استفاده می شود که تحت نام تجاری RP-18 یا ODS شناخته می شوند. از حلال های قطبی تر نظیر آب، متانول یا استونیتریل بعنوان فاز متحرک استفاده می شود. هر چه درصد حلال آلی فاز متحرک بیشتر شود، اجزاء غیرقطبی تر نمونه سریع تر از ستون خارج می شوند.

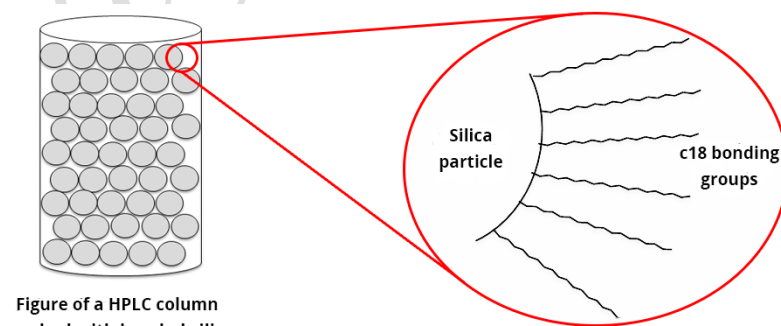
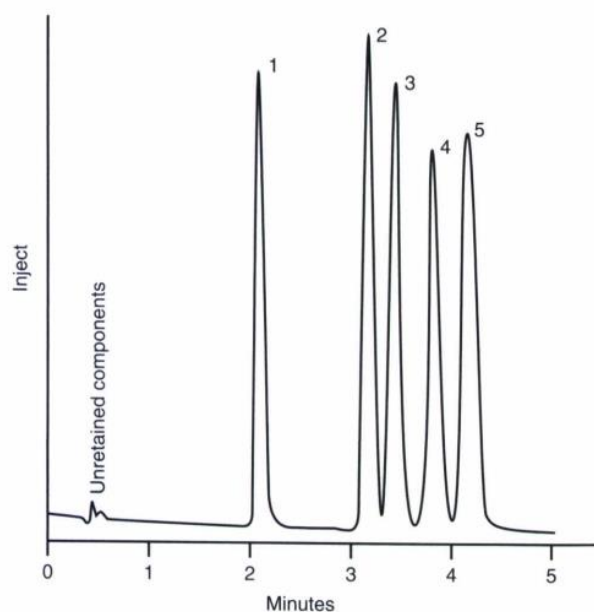


Figure of a HPLC column packed with bonded silica

جداسازی داروهای ضد افسردگی سه حلقه ای توسط reverse-phase HPLC



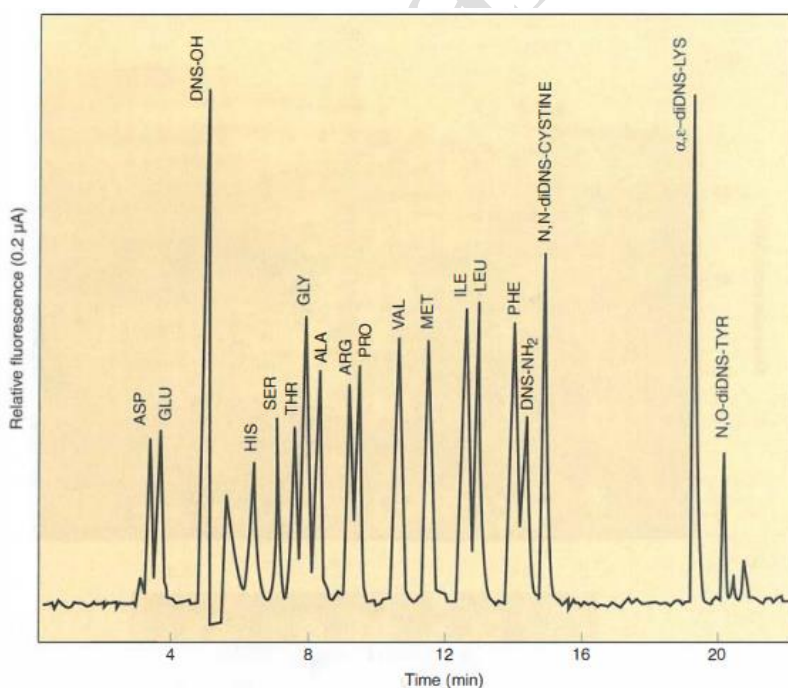
Column: C18, 3 μ , 0.46 $\times$ 10 cm
Eluent: Isocratic, 0.025 M phosphate
Buffer: pH 3.0 in 25% acetonitrile
Flow rate: 2 mL/min
Detection: 215 nm, 0.1 AUFS

Compounds: 1. Doxepin
2. Desipramine
3. Imipramine
4. Nortriptyline
5. Amitriptyline

Chromatogram from an HPLC reversed-phase separation of tricyclic antidepressants with the use of a UV photometer detector set at 215 nm. Signal is displayed at 0.1 AUFS. HPLC, high-performance liquid chromatography; UV, ultraviolet; AUFS, absorbance units full scale.

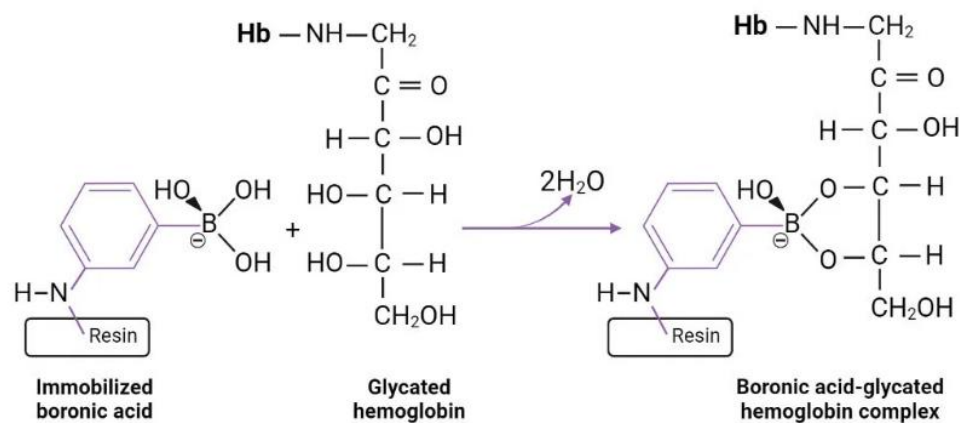
استفاده از reverse-phase HPLC در جداسازی اسیدآمینها

اسیدآمینها با دانسیل کلراید مشتق سازی می شوند تا ماهیت فلورسانس (نشر نور) پیدا کنند. از دتکتور فلوریمتر برای شناسایی اسیدآمینها بهنگام خروج از ستون استفاده می شود.



Boronate affinity chromatography

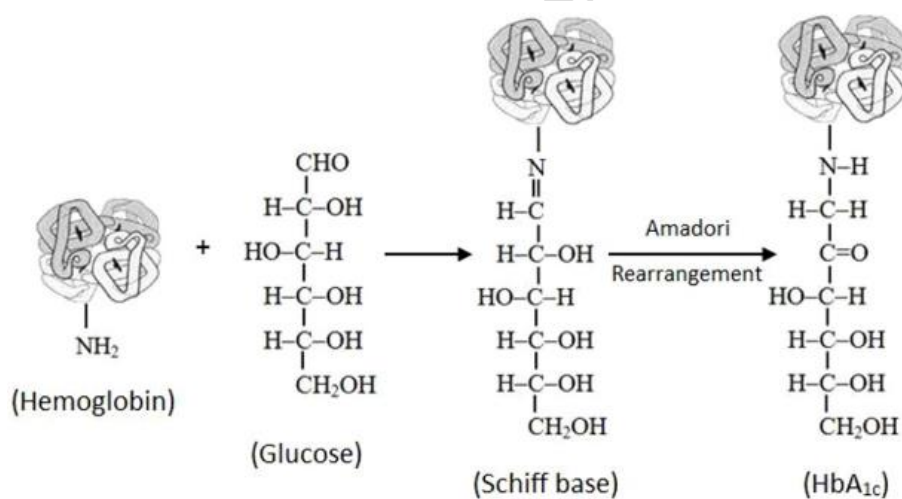
از این روش برای تعیین مقدار هموگلوبین A1C در آزمایشگاه های بالینی استفاده می شود.



✓ ابتدا هموگلوبین های غیر گلیکوزیله از ستون خارج می شوند زیرا تمایلی برای رزین برونیک اسید ندارد.

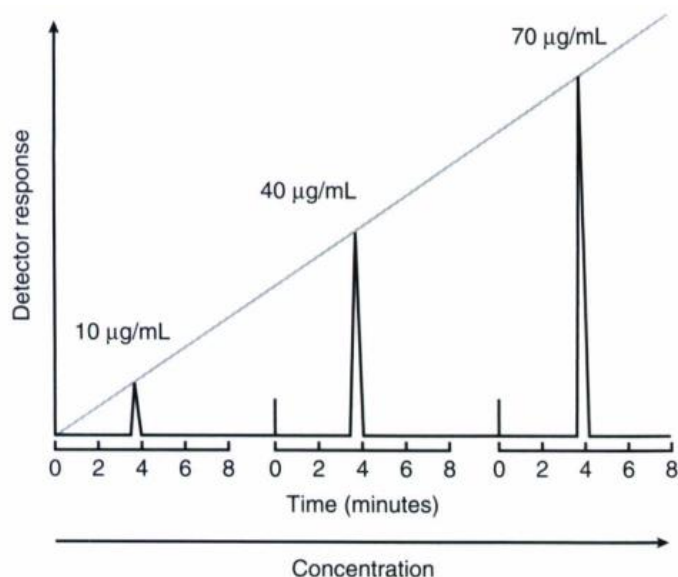
✓ برای شستشوی HbA1C و خارج کردن آن از ستون از سوربیتول استفاده می شود.

واکنش قند دار شدن هموگلوبین (glycated hemoglobin)



تعیین غلظت آنالیت ها در HPLC

با استفاده از کالیبراتورهای خارجی (نمونه های رفرانس که دارای غلظت مشخصی از آنالیت هستند)، یک منحنی کالیبراسیون از ارتفاع یا مساحت پیک در مقابل غلظت کالیبراتورها تهیه می شود و از آن برای تعیین غلظت آنالیت در نمونه استفاده می شود.



در کالیبراسیون داخلی (یا استاندارد داخلی) محلول های رفرانس با غلظت مشخص آنالیت تهیه می شوند و مقدار ثابتی از یک ماده متفاوت بعنوان استاندارد داخلی به تمام محلول های رفرانس و نمونه ها اضافه می شود. نموداری از نسبت ارتفاع یا مساحت پیک آنالیت به ارتفاع یا مساحت پیک استاندارد داخلی در مقابل غلظت آنالیت ترسیم می شود. از این نمودار برای تعیین غلظت آنالیت در نمونه ها استفاده می شود.

