

اصول و مبانی در تشخیص و اندازه گیری HPLC

مواد شیمیایی و دارویی

مقدمه:

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 بصورت 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 روشهای تجزیه:

1- روشهای کلاسیک:

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

2- روش های دستگاهی:

روشهایی که بر مبنای اندازه گیری یک خاصیت فیزیکی (مانند جذب و نشر تابش، پراکندگی، شکست و پراش، پتانسیل) به وسیله دستگاه می باشد 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

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

کراماتوگرافی مایع با فشار بالا High pressure Liquid Chromatography

HPLC دستگاهی است که برای تجزیه کمی و کیفی مواد دارویی، شیمیایی، غذایی، صنایع سنگین (پلیمرها)، بیوشیمی (تجزیه پروتئینها و اسیدهای نوکلئیک) و بکار می رود. بطور 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.

اجزا نمونه بر اساس ماهیت شیمیایی، با فاصله زمانی متفاوتی از ستون عبور کرده سپس بوسیله دتکتور شناسایی می شوند و نتایج به صورت پیک هایی به ثبت می رسند.

به طور معمول، جداسازی ها و تجزیه هایی که با دیگر روشهای کروماتوگرافی سخت یا غیر ممکن است، با این روش به سادگی انجام می شود.

اجزای اصلی دستگاه HPLC:

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

فاز حامل یا متحرک:

فاز متحرک در HPLC می تواند آب، حلال های آلی یا بافر ها به صورت تنها یا مخلوط با یکدیگر باشد. تمام قسمت های سامانه که در تماس با فاز متحرک هستند، باید از جنس مواد مقاوم به حلال های مورد استفاده باشند.

هنگام تهیه فاز متحرک رعایت نکات زیر ضروری است:

1- ویژگی های فاز متحرک توسط فارماکوپه تعریف میشود.

2- کلیه اجزای فاز متحرک باید دارای خلوص متناسب یا گرید HPLC باشد.

3- آب مورد استفاده باید دارای شرایط آب خالص باشد.

4- فاز حامل به اندازه مصرف همان روز تهیه کنید و از ظروف کاملا تمیز استفاده کنید.

5- 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 1 تا 2 میلی لیتر در دقیقه می باشد را داراست. هم چنین جریان باید عاری از هر گونه نوسان باشد به طوریکه سرعت جریان کاملاً ثابت باقی بماند.

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

1- برنامه شویش ایزوکراتیک : تنها از یک فاز متحرک برای عمل جداسازی استفاده می شود.

2- 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 بکار رفته طبقه بندی می شوند.

انواع روشهای کروماتوگرافی مایع عبارتند از:

- | | |
|---------------|-------------------|
| 1- پخشی | (Partition) |
| 2- جذب سطحی | (Adsorption) |
| 3- تعویض یونی | (Ion- Exchange) |
| 4 طرد اندازه | (size- exclusion) |

کروماتوگرافی مایع پخشی که معمولترین آنهاست 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 می باشد.

فاز پیوندی در این نوع ستونها دارای عواملی از قبیل، سیانو(CN-)، یک گروه آمینی (NH₂)، یا یک گروه دی ال (CHOH – CH₂OH) می باشند و ستون ها بر اساس گروه های عاملی نام گذاری می شوند.

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 C₈ و C₁₈.

فاز های متحرک مورد استفاده شامل:

آب، متانول، استونیتریل و محلولهای بافر می باشند.

ستون های جذب سطحی (Adsorption) :

در این نوع ستونها از ذرات سیلیکای خیلی قطبی استفاده می شود و از فاز نرمال بعنوان فاز متحرک استفاده می شود.

ستونهای تعویض یونی و طرد – اندازه (Ion- Exchange&size- exclusion) :

فاز ساکن ذرات رزینی جامدی هستند که در سطوح آنها مکانهای پیوندی یونی مثبت یا منفی وجود دارد که یونها با فاز متحرک تعویض می شوند

دکتورها:

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

انواع دکتور های مورد استفاده در HPLC به قرار زیر می باشد:

1- دکتور جذب UV

2- دکتور Fluorescence

3- دکتور Refractive Index

4- دکتور Electrochemical (Conductivity)

5- دکتور Diode Array

حل مشکلات HPLC :

1- اختلالات فشار

2- نشستی

3- مشکلات مربوط به تزریق

4- مشکلات مربوط به کروماتوگرام

5- مشکلات سیستماتیک

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

چرا پیک ها دنباله دار می شوند؟

- 1- آلودگی ستون
 - 2- وجود یون های فلزی
 - 3- تغییر pH فاز متحرک
 - 4- عمر ستون
 - 5- فاز متحرک نامناسب
- چرا زمان بازداری افزایش میابد؟
- 1- وجود هوا در سر پمپ
 - 2- کثیفی در شیر ورودی یا خروجی
 - 3- نشتی
 - 4- کاهش دمای ستون
 - 5- تغییر در فاز متحرک (تغییر در ماهیت یا سرعت جریان فاز متحرک)
 - 6- تغییر در فاز ساکن

اگر لامپ آشکار ساز فرسوده باشد؟

- 1- ارتفاع پیک ها تغییری نمی کند.
- 2- خط پایه دارای Noise می شود.
- 3- نسبت پیک به نویز کاهش میابد لذا حد تشخیص کاهش میابد.

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

- 1- تغییر سرعت جریان فاز متحرک
- 2- تغییر pH فاز متحرک
- 3- تغییر ترکیب درصد فاز متحرک
- 4- تغییر نوع حلال های فاز متحرک
- 5- تغییر طول، اندازه ذره ای، نحوه پر شدن ستون
- 6- تعویض نوع ستون
- 7- تعویض دتکتور

تعیین ناخالصی ها در مواد اولیه و محصولات دارویی:

از دو دیدگاه مورد توجه قرار میگیرد:

- 1- 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.
- 2- 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.

تهیه کننده : فرحناز حدیدساز

کارشناس ارشد شیمی

مسوول آزمایشگاه شیمی

در صورت داشتن هرگونه پرسش در باره این مقاله با شرکت ایران ناژو

با شماره 02165432812-14 تماس بگیرید.