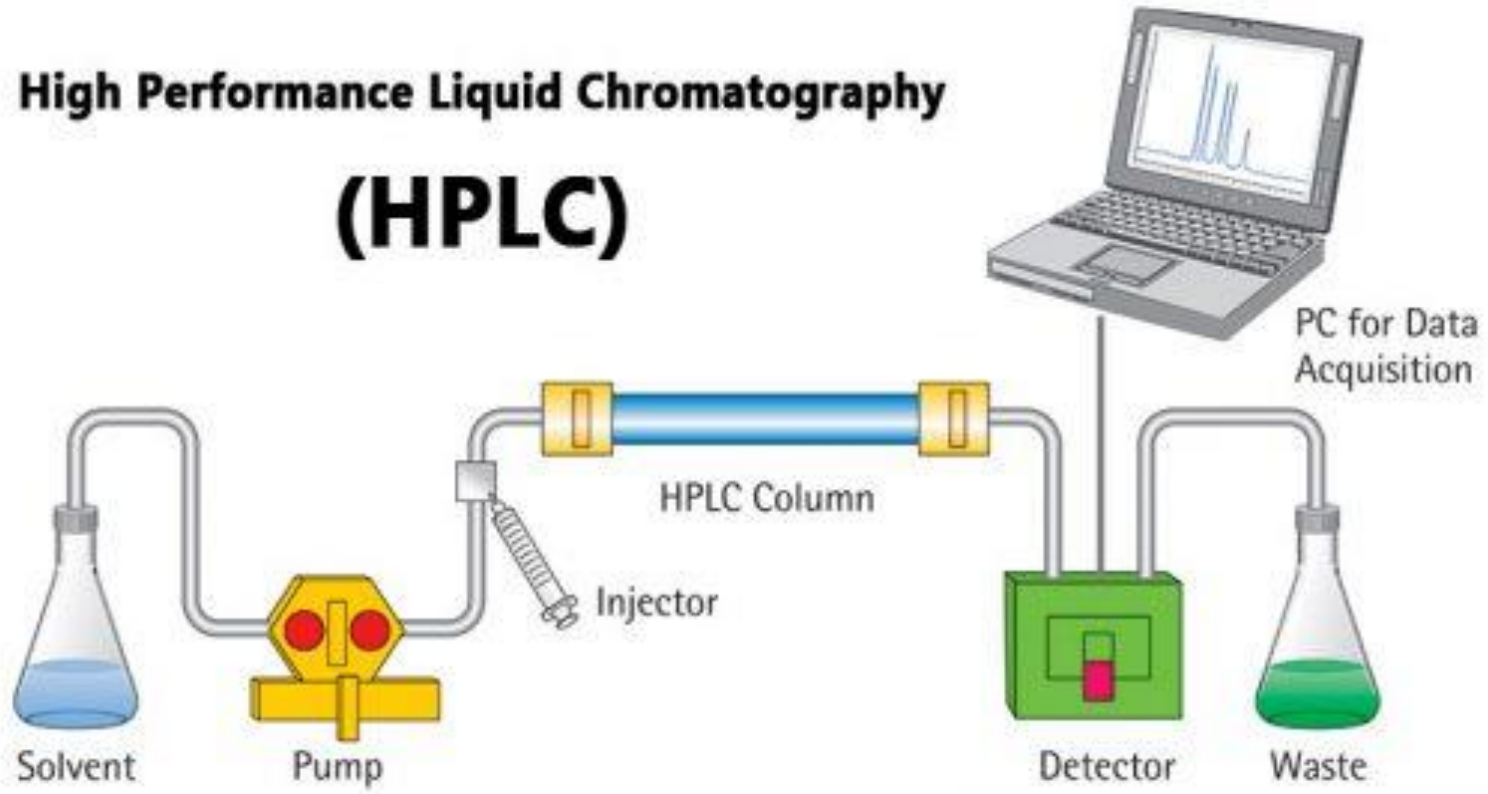

بسم الله الرحمن الرحيم

HPLC
(High Performance Liquid Chromatography)










GAS AUTOSAMPLER
Sulfur Analyzer

کروماتوگرافی HPLC یا «کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا» (High Performance Liquid Chromatography) روشی در شیمی تجزیه برای جدا کردن اجزای یک مخلوط، شناسایی و اندازه‌گیری هر جزء است. این روش در اوایل قرن بیستم کشف شد و برای اولین بار بمنظور جدا کردن ترکیبات رنگی مورد استفاده قرار گرفت. واژه کروماتوگرافی به معنای «رنگ‌نگاری» (Color Writing) است.

مخترع این روش، گیاه‌شناس روسی «میخاییل تسوت» (Mikhail Tsvet) بود که برای مطالعه رنگ برگ‌ها از آن بهره گرفت. در سال 1906، تسوت دو مقاله در توصیف جنبه‌های مختلف «کروماتوگرافی جذب مایع» (Liquid Adsorption Chromatography) به چاپ رساند. او همچنین بیان کرد که فارغ از نوع نام این روش، می‌توان از کروماتوگرافی برای جداسازی سایر مواد نیز بهره گرفت.



کروماتوگرافی مایع با عملکرد (کارایی) بالا از جمله روش‌های کروماتوگرافی برای جداسازی مواد به شمار می‌آید. این جدایش بر اساس برهم‌کنش نمونه با فازهای ساکن و متحرک انجام می‌گیرد. از آن‌جایی که ترکیب‌های مختلفی را می‌توان برای فازهای ساکن و متحرک به هنگام جدا کردن یک مخلوط بکار برد، روش‌های مختلف کروماتوگرافی نیز وجود دارند که بر مبنای حالت فیزیکی این فازها بنا شده‌اند.

شمای کلی از کروماتوگرافی مایع

اجزای یک مخلوط، بر اساس تمایل هر جزء به فایل مایع، در ستون، جداسازی می‌شوند. بنابراین، اگر اجزا، قطبیت متفاوتی داشته باشند و فاز ساکنی با قطبیت شدید از میان ستون عبور کند، یکی از اجزا نسبت به بقیه، با سرعت بیشتری از داخل ستون عبور خواهد کرد. از آن‌جایی که مولکول‌های یک ترکیب، به صورت گروهی حرکت می‌کنند، ترکیبات به صورت باندهایی جداگانه و مشخص در ستون از یکدیگر متمایز هستند.

اگر اجزای جدا شونده، رنگی باشند، در زمان کروماتوگرافی، باندهای رنگی متناظر با هر گروه قابل تشخیص خواهند بود. در غیر اینصورت، همچون «کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا» (High Performance Liquid Chromatography)، حضور باندهای متناظر هر گروه را به کمک سایر روش‌ها مانند استفاده از انواع طیف سنجی همچون طیف‌سنجی ماورابنفش-مرئی شناسایی می‌کنند.

نحوه جدایش اجزا در کروماتوگرافی مایع

در یک مخلوط دو جزئی با عبور فاز ساکن از میان ستون، هر دو جزء به صورت باندهایی مجزا از یکدیگر جدا می‌شوند. زمانی که هر جزء از ستون، شویش شود، هر کدام را می‌توان بسته به نوع روش مورد نظر، جداسازی و بررسی کرد. بر اساس نوع قطبیت فازهای ساکن و متحرک، قطبیت‌های نسبی هر دو جزء قابل تعیین است.

آماده‌سازی ستون کروماتوگرافی مایع

در این بخش، توضیحات کوتاهی در خصوص آماده‌سازی ستون در یک کروماتوگرافی مایع داده می‌شود و در ادامه متن، به طور دقیق‌تر، کروماتوگرافی HPLC مورد بررسی قرار می‌گیرد. فاز ساکن در «کروماتوگرافی ستونی» (Column Chromatography)، به طور معمول، یک جاذب جامد است. این جامد می‌تواند اجزای مایع و گازی را در سطح خارجی خود حفظ کند. ستونی که به طور معمول در کروماتوگرافی ستونی از آن بهره می‌گیرند همانند پیپت پاستور است که در کروماتوگرافی ستونی با مقیاس پایین مورد استفاده قرار می‌گیرد. بخش نازک خروجی را با پشم شیشه یا صفحه‌ای متخلخل پر می کنند تا مواد پرشده داخل ستون را حفظ کند. در ادامه، جامد جاذب (به طور معمول سیلیکا) را به صورت فشرده به داخل لوله شیشه‌ای می‌فرستند تا ستون را تکمیل کند. پر کردن ستون با فاز ساکن باید با دقت کافی انجام شود تا توزیع یکنواختی از مواد در داخل ستون صورت بگیرد.

این توزیع یکنواخت برای جلوگیری از ایجاد حباب یا کانالی‌شدن در ستون انجام می‌شود. در انتهای آماده‌سازی ستون، حلال مورد استفاده در فاز متحرک را از میان ستون خشک عبور می‌دهند. چنین ستونی را «تَرشده» (Wetted) می‌نامند. زمانی که ستون، به خوبی آماده شد، نمونه را در بالای ستون قرار می‌دهند.

اساس کروماتوگرافی HPLC

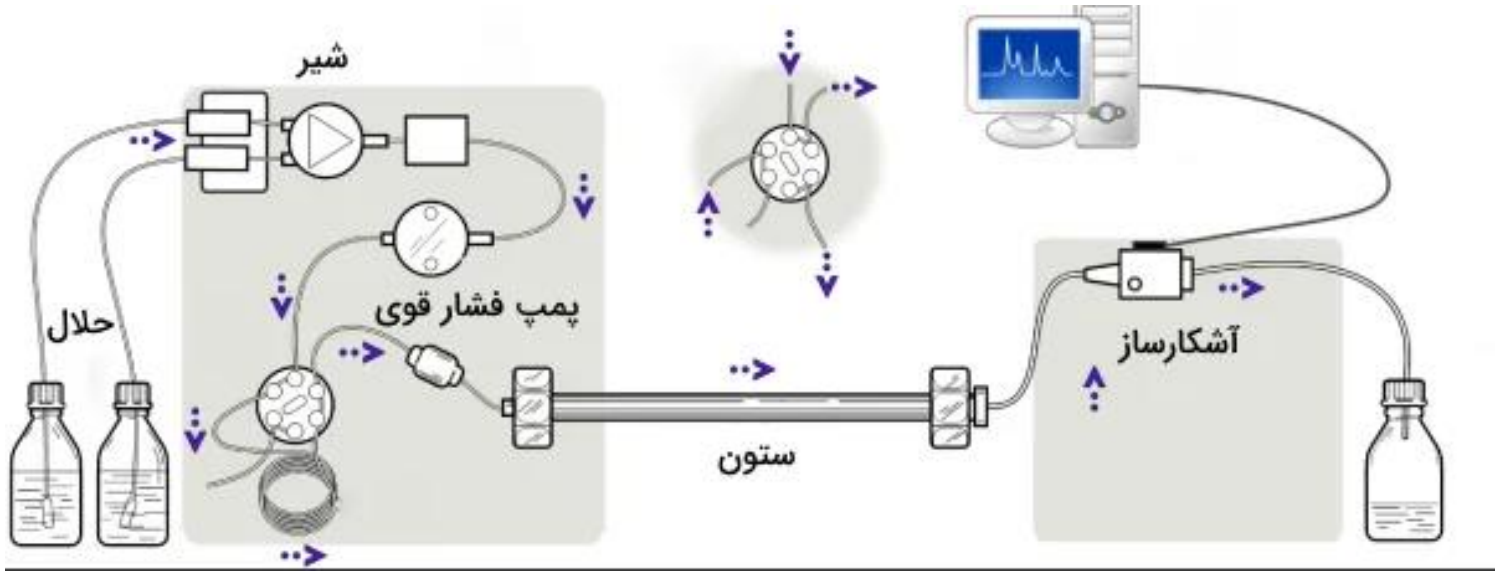
اجزای مولکولی در کروماتوگرافی HPLC، دو دسته مهم را به نام آنالیت و ماتریکس تشکیل می‌دهند. آنالیت، اجزای مولکولی مورد نظر و ماتریکس، سایر اجزای نمونه هستند. بمنظور انجام کروماتوگرافی HPLC نمونه را به یک فاز متحرک وارد می‌کنند تا از میان فاز ساکن عبور کند. فاز متحرک را با شاخصه‌های مختلفی همچون ترکیب اجزا، انحلال‌پذیری، خواص فرابنفش، ویسکوزیته و امتزاج‌پذیری با سایر حلال‌ها توصیف می‌کنند.

فاز ساکن می‌تواند توده‌ای از مایع متراکم، لایه‌ای مایع بر سطحی جامد یا یک لایه «بین سطحی» (InterFacial) بین مایع و جامد باشد. در کروماتوگرافی HPLC فاز ساکن به طور معمول به صورت یک ستون پرشده با اجزای کوچک متخلخل است که فاز متحرک مایع، به کمک یک پمپ از میان آن عبور می‌کند. در حقیقت، توسعه کروماتوگرافی HPLC با توسعه ستون‌های جدید همراه بود که این امر نیازمند اجزای جدید، فازهای ساکن جدید و دستورالعمل‌های بهبودیافته برای پرکردن ستون است. تصویری از یک دستگاه کروماتوگرافی HPLC در زیر نشان داده شده است.



شرح دستگاه کروماتوگرافی HPLC

اجزای اصلی یک دستگاه کروماتوگرافی HPLC در زیر نشان داده شده است. نقش پمپ در این دستگاه، حرکت دادن فاز متحرک با یک نرخ جریانی مشخص بر حسب میلی‌لیتر بر دقیقه است. وظیفه «انژکتور» (Injector)، تزریق نمونه مایع به جریان فاز متحرک است. ستون دستگاه، مهم‌ترین بخش دستگاه کروماتوگرافی با عملکرد بالا را تشکیل می‌دهد. فاز ساکن در ستون نیز اجزای نمونه مورد نظر را از یکدیگر جدا می‌کند. از آشکارساز بمنظور شناسایی مولکول‌های شویش شده از ستون بهره می‌گیرند. همچنین، از یک کامپیوتر برای تحلیل و ارزیابی داده‌ها استفاده می‌کنند. در حقیقت، از کامپیوتر نه تنها برای کنترل پارامترهای دستگاه بلکه برای ارزیابی «زمان بازداری» (Retention Time)، اجزای نمونه و آنالیز مقداری بهره می‌گیرند.



ستون کروماتوگرافی

بر اساس خواص فاز ساکن در ستون، از مکانیسم‌های جدایش مختلفی در کروماتوگرافی استفاده می‌شود که از آن جمله می‌توان به «کروماتوگرافی فاز نرمال» (Normal Phase Chromatography)، «کروماتوگرافی فاز معکوس» (Reverse Phase Chromatography)، «کروماتوگرافی تبادل یونی» (Ion Exchange Chromatography)، «کروماتوگرافی اندازه طردی» (Size Exclusion Chromatography) و «کروماتوگرافی میل ترکیبی» (Affinity Chromatography) اشاره کرد.

کروماتوگرافی فاز نرمال

در این روش، ستون را با ذرات قطبی معدنی پر و از یک فاز متحرک ناقطبی برای عبور از میان فاز قطبی استفاده می‌کنند. از کروماتوگرافی فاز نرمال به طور عمده برای خالص‌سازی نمونه‌های خام، جداسازی نمونه‌های به شدت قطبی یا جداسازی تحلیلی با کروماتوگرافی لایه نازک بهره می‌گیرند. یکی از مشکلات استفاده از این روش این است که آب، حلالی قوی برای کروماتوگرافی فاز نرمال به شمار می‌آید و وجود آب در فاز متحرک به طور محسوسی بر بازداری نمونه تاثیر گذار است. در جدول زیر، نوع فازهای متحرک و ساکن در کروماتوگرافی فاز نرمال و معکوس آورده شده است.

	فاز ساکن	فاز متحرک
فاز نرمال	قطبی	ناقطبی
فاز معکوس	ناقطبی	قطبی

کروماتوگرافی فاز معکوس

در کروماتوگرافی فاز معکوس، فاز ساکن، دارای خاصیت «آب‌گریز» (Hydrophobic) است درحالیکه فاز متحرک خاصیتی قطبی دارد. همانطور که در جدول بالا نیز نشان داده شده، نوع قطبیت فازها، عکس کروماتوگرافی فاز نرمال است. نوع برهم‌کنش‌ها در کروماتوگرافی HPLC با فاز معکوس (RP-HPLC) را به صورت نیروهای آب‌گریز در نظر می‌گیرند. این نیروها نتیجه انرژی حاصل از تغییر در ساختارهای دوقطبی حلال است. جدایش مواد به طور عمده ناشی از تقسیم شدن آنالیت بین فاز ساکن و متحرک ذکر می‌شود.

مولکول‌های حل‌شونده در تعادل بین فاز ساکن آب‌گریز و فاز متحرک با قطبیت جزئی هستند. هر قدر مولکول آب‌گریز (ناقطبی) باشد، زمان بازداری طولانی‌تری خواهد داشت درحالیکه ترکیبات معدنی یونیزه شده، یون‌های معدنی و مولکول‌های فلزی قطبی، زمان بازداری کمی دارند.

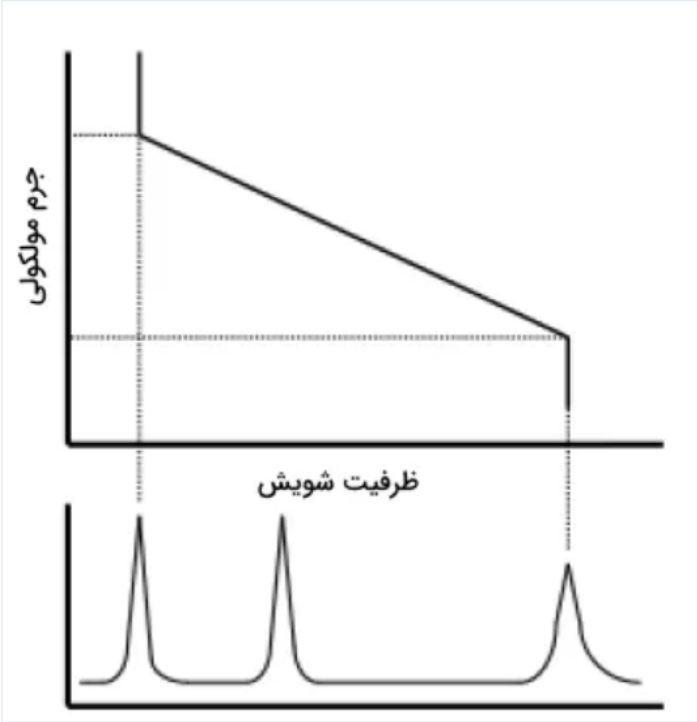
کروماتوگرافی تبادل یونی

مکانیسم تبادل یونی، بر اساس برهم‌کنش الکترواستاتیک بین یون‌های آبدار از نمونه و گروه‌های عاملی با بار مخالف فاز ساکن بنا شده است. دو مکانیسم برای جداسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در یک مکانیسم، به هنگام شویش، از فاز متحرک با یون‌هایی استفاده می شود که با یون‌های آنالیت جایگزین شوند و این یون‌ها را به خارج از ستون هدایت می‌کنند.

کروماتوگرافی اندازه طردی

«کروماتوگرافی اندازه طردی» (Size Exclusion Chromatography)، روشی برای جداسازی مولکول‌ها بر اساس اندازه است. از این روش به طور معمول برای جداسازی درشت‌مولکول‌ها از مولکول‌های کوچکتر استفاده می‌شود. بعد از تزریق آنالیت به ستون، مولکول‌هایی که از اندازه حفرات فاز ساکن کوچکتر باشند، به داخل ذرات متخلخل وارد می‌شوند در بین کانال‌های تودرتوی فاز ساکن جریان پیدا می‌کنند اما مولکول‌های بزرگ‌تر، مسیر طولانی‌تری را برای خروج باید طی کنند و در نتیجه، دیرتر از ستون خارج می‌شوند.

با توجه به این‌که حجم مولکولی با جرم مولکولی مرتبط است، انتظار می‌رود که زمان بازداری، به نحوی با جرم مولکولی مواد پلیمری مرتبط باشد. ارتباط بین زمان بازداری و جرم مولکولی در تصویر زیر نشان داده شده است:




SONOCLEAN
LABO-MODERNE


Mobile Phase
Degasser
Detector
Column
Pump
Autosampler
Column oven

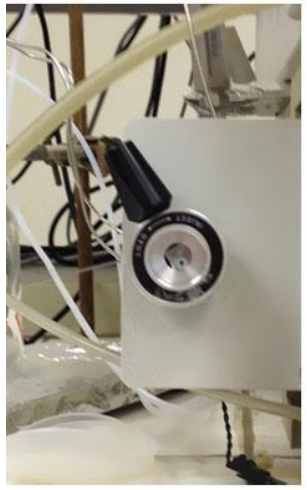

LAB GLASS
1000ml
APPROX VOLUME
1000
800
600
400


FILTER PAPERS
114
Wet Strengthened Circles
Cat No 1114 125
Whatman™

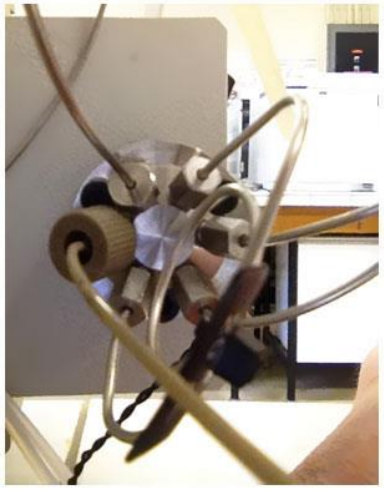




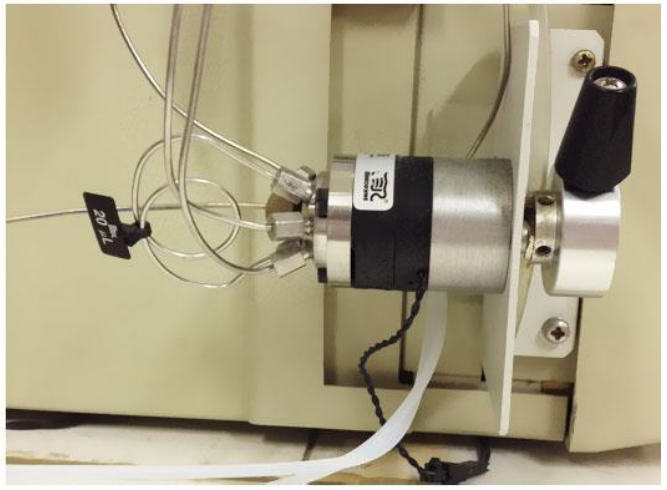
Manual injection valve



Frontal view



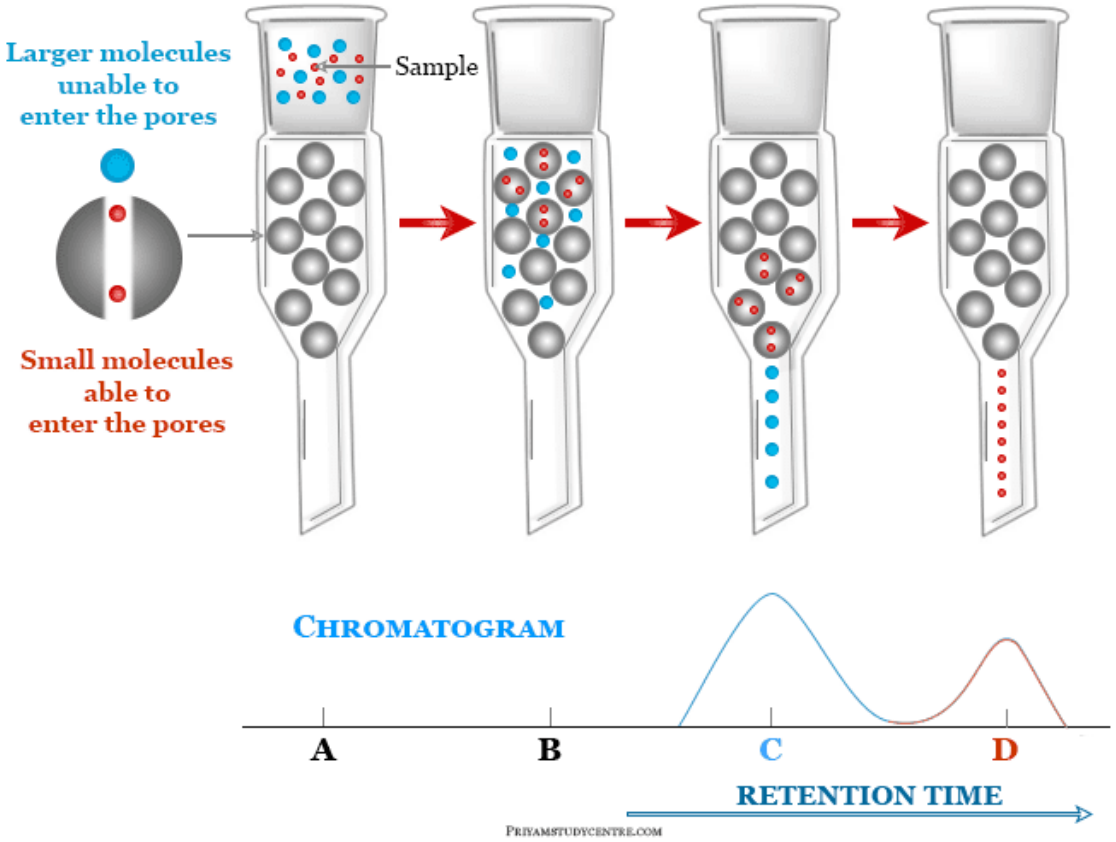
View from behind



Side view

Photos credits: Isabelle Billault

Size Exclusion Chromatography (SEC)



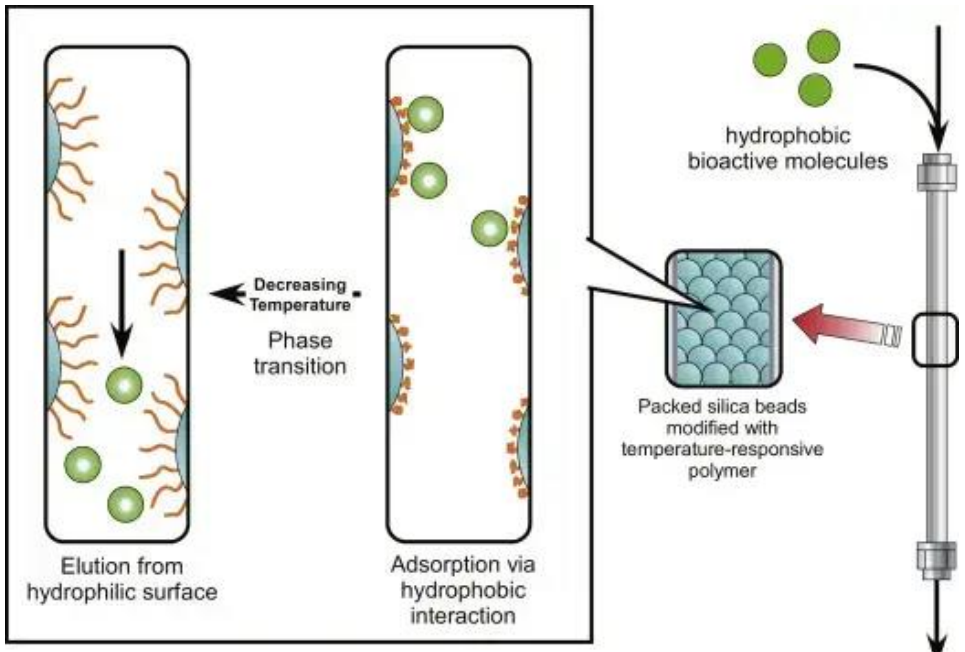
Supelco.

805762

TSKgel® G3000PW HPLC Column

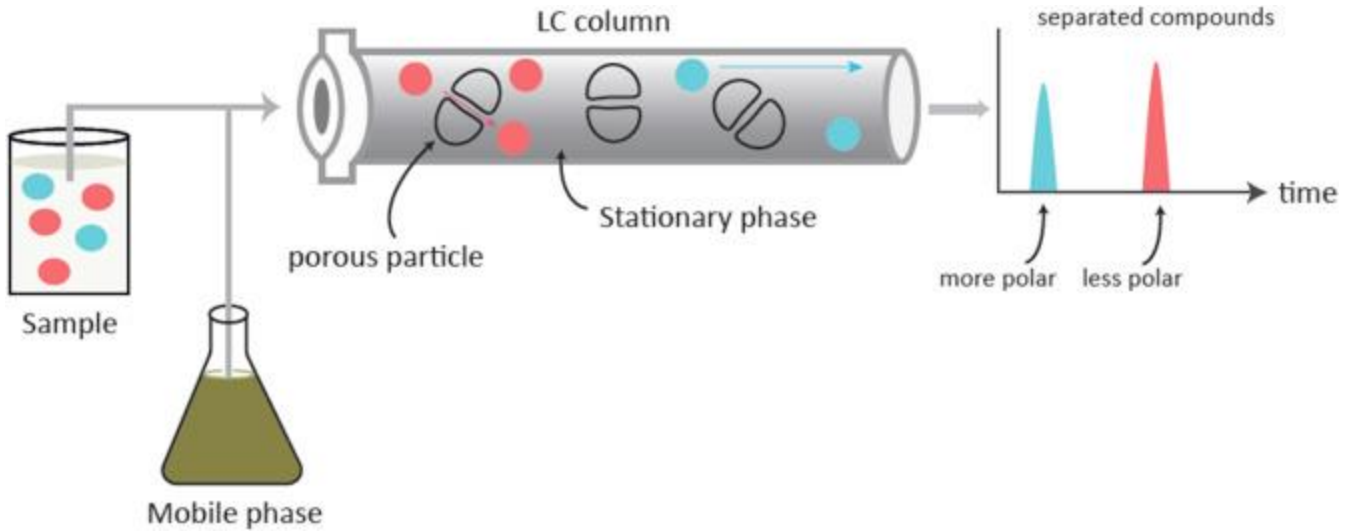
phase hydroxylated methacrylate, L × I.D. 30 cm × 7.5 mm, 12 µm particle size

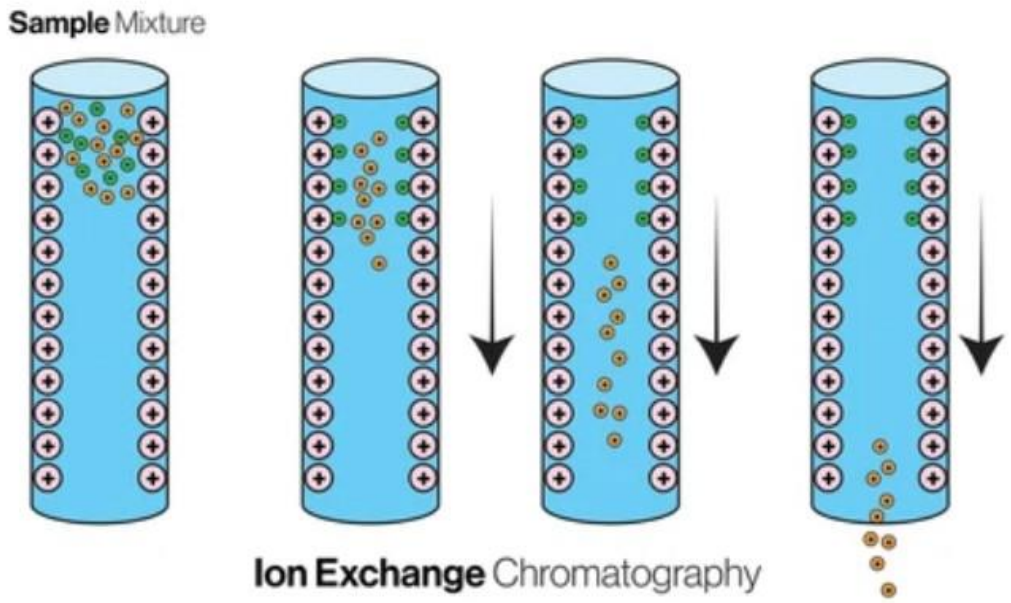
sigmaaldrich.com

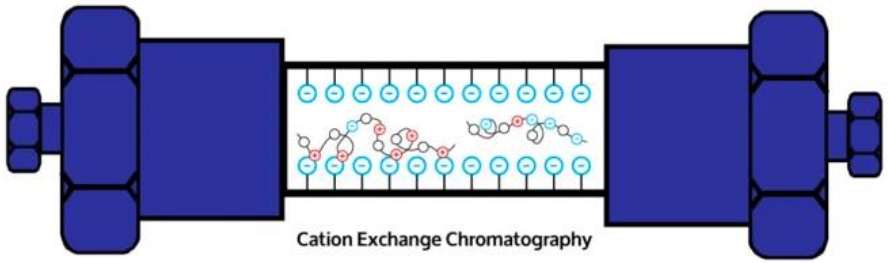

Decreasing Temperature
Phase transition
Elution from hydrophilic surface
Adsorption via hydrophobic interaction

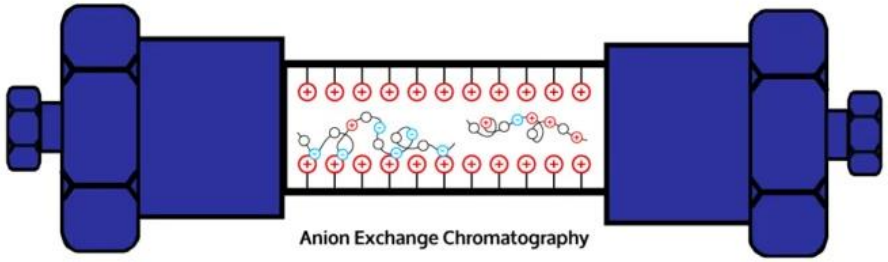
hydrophobic bioactive molecules
Packed silica beads modified with temperature-responsive polymer


REGIS
EVOKE™ C18 10µm
1-760409-300
Serial #54874
EVOKE C18 5µm


LC column
separated compounds
Sample
porous particle
Stationary phase
time
more polar
less polar
Mobile phase

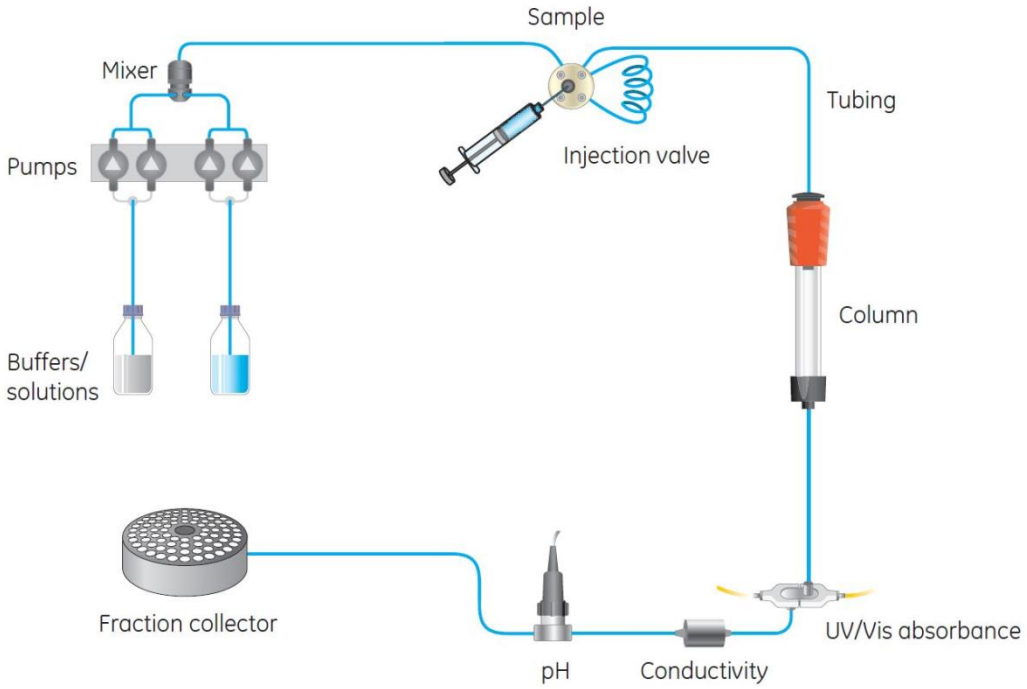

Sample Mixture
Ion Exchange Chromatography


Cation Exchange Chromatography

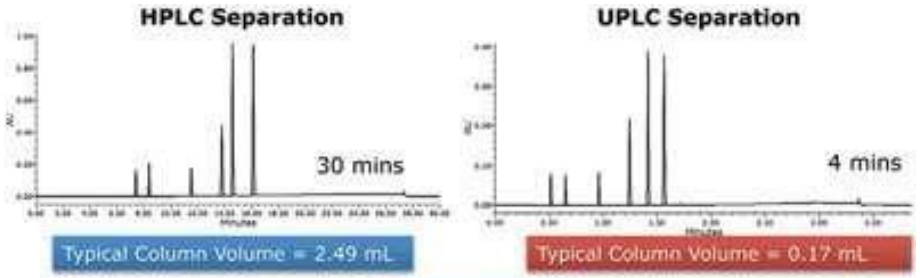

Anion Exchange Chromatography

PRP-X100

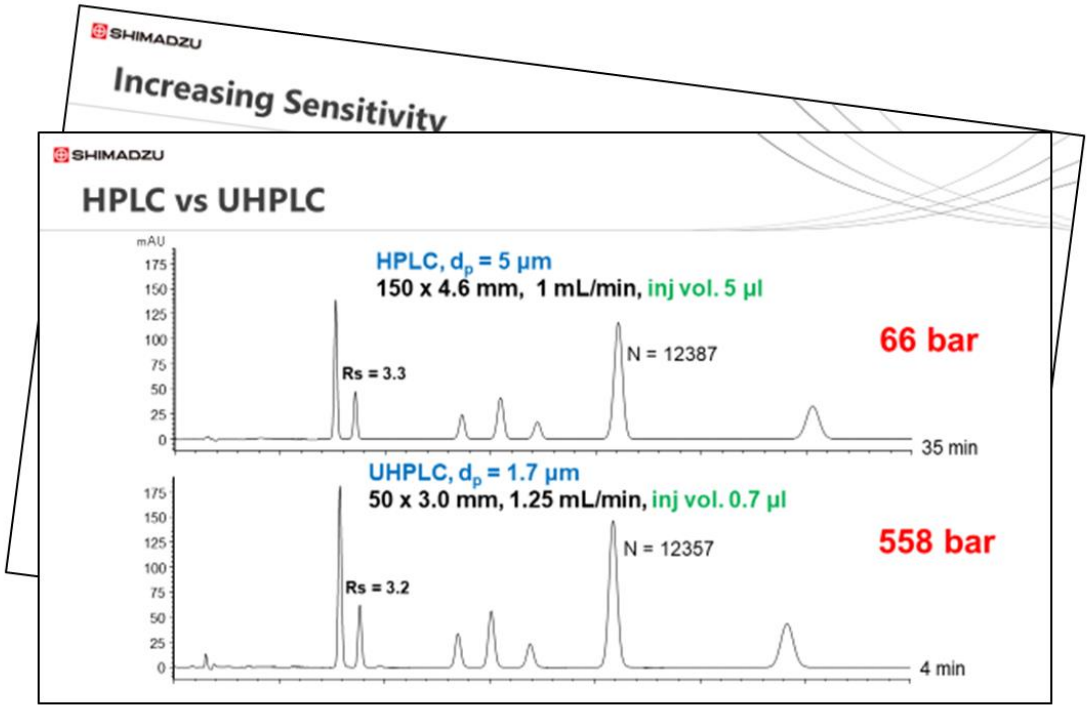

HAMILTON
THE MEASURE OF EXCELLENCE
N+


Sample
Mixer
Tubing
Pumps
Injection valve
Column
Buffers/
solutions
Fraction collector
pH
Conductivity
UV/Vis absorbance



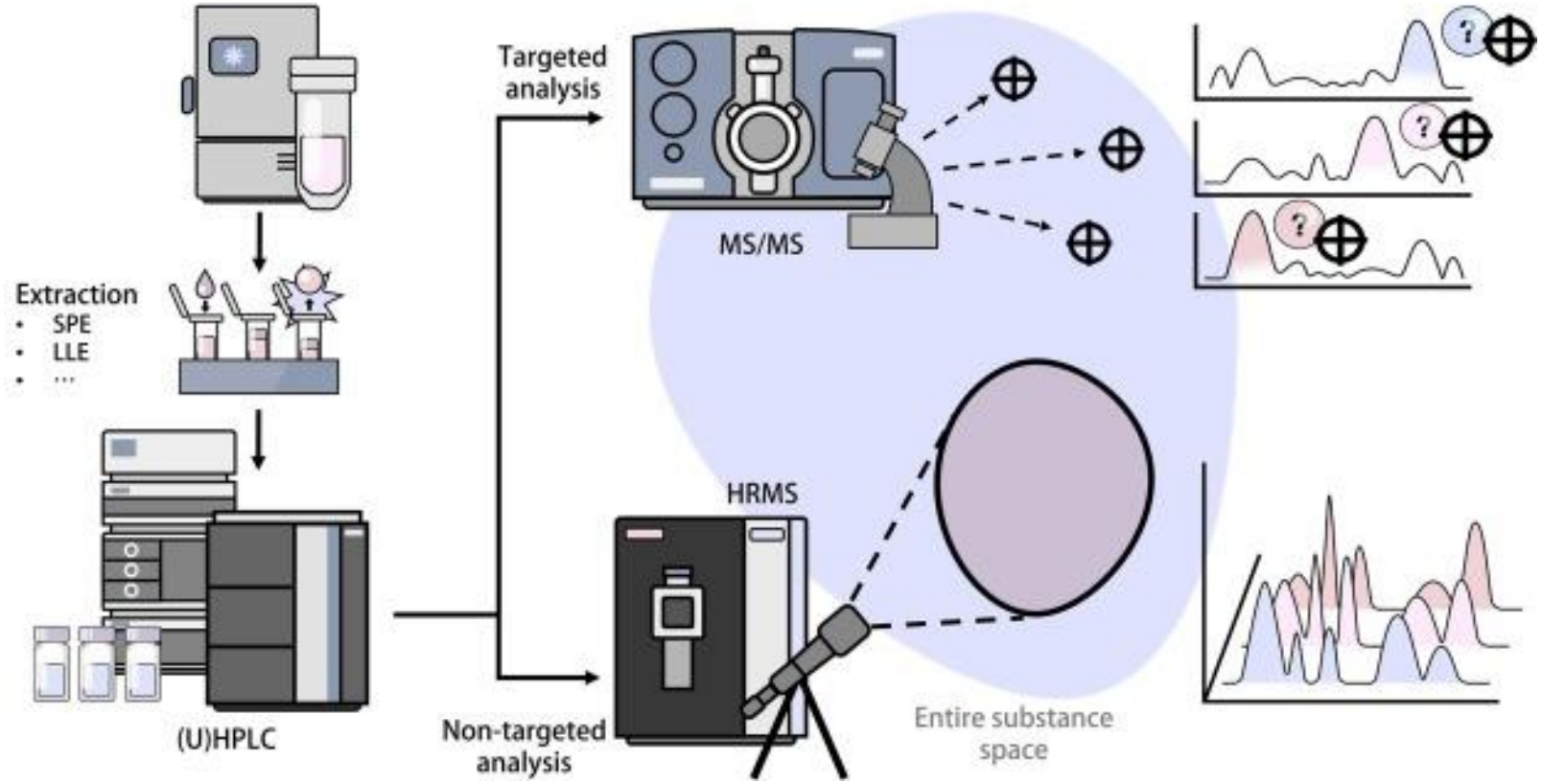


HPLC		UPLC Reduction	UPLC	
Run Time	30 min.	87%	Run Time	3.86 min.
Solvent Consumed	30 mL	83%	Solvent Consumed	4.97 mL
Sample Consumed	20 µL	93%	Sample Consumed	1.0 µL





Sample preparation & LC-MS analytics




Topaz® System
SCIEX
Topaz® System
SCIEX

۱. HPLC چیست و چگونه کار می‌کند؟

پاسخ: HPLC یک تکنیک کروماتوگرافی است که برای جداسازی ترکیبات بر اساس برهمکنش‌های شیمیایی و فیزیکی بین ترکیبات نمونه و فازهای ثابت و متحرک استفاده می‌شود. در این روش، نمونه از طریق یک ستون پرشده با ماده ثابت عبور داده می‌شود و فاز متحرک (حلال) ترکیبات را به ستون منتقل می‌کند.

---

۲. تفاوت بین HPLC و UHPLC چیست؟

پاسخ: UHPLC (کروماتوگرافی مایع با فشار بسیار بالا) نسخه پیشرفته‌تری از HPLC است که از ستون‌های با ذرات کوچک‌تر و فشار بالاتر استفاده می‌کند. این تکنیک دقت و سرعت بهتری دارد و زمان تحلیل را کاهش می‌دهد.

۳. چه نوع آشکارسازهایی در HPLC استفاده می‌شود؟

پاسخ: رایج‌ترین آشکارسازهای HPLC عبارتند از آشکارساز UV-VIS، فلورسانس، اشعه مادون قرمز (IR)، رسانایی الکتریکی و فتودیوید آرایه (PDA). انتخاب آشکارساز به نوع آنالیت بستگی دارد.

---

۴. فاز متحرک در HPLC چیست و چگونه انتخاب می‌شود؟

پاسخ: فاز متحرک یک حلال یا ترکیبی از حلال‌ها است که نمونه را از طریق ستون منتقل می‌کند. انتخاب فاز متحرک به نوع ترکیبات آنالیت و سازگاری آن‌ها با فاز ثابت بستگی دارد.

---

۵. ستون HPLC چیست و چگونه انتخاب می‌شود؟

پاسخ: ستون HPLC یک لوله پرشده با مواد ثابت است که ترکیبات را بر اساس خواص شیمیایی آن‌ها جدا می‌کند. ستون‌ها با توجه به اندازه ذرات، نوع مواد ثابت و سازگاری با نمونه انتخاب می‌شوند.

۶. فاز معکوس (RP-HPLC) چیست؟

پاسخ: در RP-HPLC، فاز ثابت غیرقطبی و فاز متحرک قطبی است. ترکیبات قطبی با فاز متحرک سریع‌تر حرکت می‌کنند و زودتر از ستون خارج می‌شوند.

---

۷. چه نوع فازهای ثابت در HPLC استفاده می‌شود؟

پاسخ: فازهای ثابت شامل سیلیکا، سیلیکا اصلاح‌شده (C۱۸، C۸)، فازهای قطبی و فازهای یون‌تبادل‌گر هستند. نوع فاز ثابت به نوع جداسازی مورد نیاز بستگی دارد.

---

۸. چرا دما در HPLC مهم است؟

پاسخ: دما می‌تواند بر سرعت جریان فاز متحرک و رفتار آنالیت در ستون تأثیر بگذارد. معمولاً دما بین ۲۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد کنترل می‌شود تا بهترین شرایط جداسازی حاصل شود.

۹. چرا باید فاز متحرک را قبل از استفاده در HPLC فیلتر و دگاز کرد؟

پاسخ: فیلتر کردن و دگاز کردن فاز متحرک از ورود ذرات معلق و حباب‌های هوا به سیستم جلوگیری می‌کند که می‌تواند باعث اختلال در کارکرد ستون و آشکارساز شود.

---

۱۰. زمان بازداری (Retention Time) چیست و چگونه محاسبه می‌شود؟

پاسخ: زمان بازداری مدت زمانی است که یک ترکیب از زمان تزریق تا خروج از ستون نیاز دارد. این زمان برای شناسایی ترکیبات در HPLC استفاده می‌شود.

---

۱۱. آیا می‌توان از HPLC برای تجزیه و تحلیل ترکیبات پیچیده استفاده کرد؟

پاسخ: بله، HPLC قادر است ترکیبات پیچیده با چندین جزء را به خوبی جداسازی کند. با استفاده از شرایط مناسب، حتی ترکیبات مشابه نیز قابل جداسازی هستند.

۱۲. گرادیان فاز متحرک چیست و چه زمانی استفاده می‌شود؟

پاسخ: گرادیان به تغییر تدریجی ترکیب فاز متحرک در طول زمان اشاره دارد. این روش برای بهبود جداسازی ترکیبات با ویژگی‌های متفاوت و کاهش زمان آنالیز استفاده می‌شود.

---

۱۳. پارامترهای مهم در کارکرد HPLC چیستند؟

پاسخ: پارامترهای مهم شامل سرعت جریان فاز متحرک، دما، فشار سیستم، نوع ستون، و نوع فاز متحرک هستند.

---

۱۴. چگونه می‌توان یک مشکل در HPLC را تشخیص داد؟

پاسخ: مشکلات در HPLC ممکن است شامل افزایش فشار، افت کارایی ستون، زمان بازداری ناپایدار یا نشت از اتصالات باشد. با مانیتور کردن فشار و بازبینی اجزای سیستم می‌توان مشکلات را تشخیص داد.

۱۵. چرا تنظیم pH در فاز متحرک مهم است؟

پاسخ: تنظیم pH فاز متحرک می‌تواند بر روی یونیزاسیون ترکیبات و رفتار آن‌ها در فاز ثابت تأثیر بگذارد، که این امر بر روی جداسازی تأثیر مستقیم دارد.

---

۱۶. چرا از مواد شیمیایی افزودنی در فاز متحرک استفاده می‌شود؟

پاسخ: افزودنی‌های شیمیایی مانند بافرها برای تثبیت pH و جلوگیری از تجزیه نمونه‌ها و بهبود بازده جداسازی استفاده می‌شوند.

---

۱۷. چه تفاوتی بین HPLC فاز نرمال و فاز معکوس وجود دارد؟

پاسخ: در HPLC فاز نرمال، فاز ثابت قطبی و فاز متحرک غیرقطبی است، در حالی که در فاز معکوس فاز ثابت غیرقطبی و فاز متحرک قطبی است.

۱۸. چرا باید HPLC را کالیبره کرد؟

پاسخ: کالیبراسیون HPLC برای اطمینان از صحت و دقت اندازه‌گیری‌ها ضروری است. کالیبراسیون معمولاً با استفاده از مواد مرجع استاندارد انجام می‌شود.

---

۱۹. آیا می‌توان از HPLC برای آنالیز نمونه‌های زیستی استفاده کرد؟

پاسخ: بله، HPLC به طور گسترده‌ای برای تجزیه و تحلیل نمونه‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، پپتیدها و اسیدهای نوکلئیک استفاده می‌شود.

---

۲۰. چه زمانی باید ستون HPLC تعویض شود؟

پاسخ: ستون HPLC باید زمانی تعویض شود که کارایی آن کاهش یابد، فشار افزایش یابد، یا توانایی جداسازی ترکیبات به طور قابل توجهی کاهش یابد. این می‌تواند به دلیل انباشت ذرات یا آسیب به فاز ثابت رخ دهد.

به دلیل دقت بالا و توانایی تفکیک مؤثر ترکیبات، در بسیاری از صنایع و علوم مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله کاربردهای مهم این روش می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

صنایع داروسازی: برای کنترل کیفیت داروها، تشخیص ناخالصی ها و تعیین مقدار مواد مؤثره. این روش برای بررسی ترکیبات دارویی، آزمایش‌های فارماکوکینتیک و ارزیابی پایداری داروها استفاده می شود.

بیوشیمی و زیست‌شناسی: برای تجزیه و تحلیل پروتئین ها، پپتیدها، اسیدهای آمینه و متابولیت های زیستی. این روش در مطالعات ژنتیکی و بررسی مسیرهای زیستی نقش مهمی دارد.

صنایع غذایی: برای شناسایی مواد افزودنی، رنگ های خوراکی، و کنترل کیفیت مواد غذایی. با استفاده از HPLC می‌توان میزان آلاینده های غذایی مانند مایکوتوکسین ها را نیز تعیین کرد.

محیط زیست : برای اندازه گیری آلاینده های آب، خاک و هوا. این روش برای تشخیص فلزات سنگین، مواد آلی فرار و آلاینده های صنعتی به کار می‌رود.

صنایع شیمیایی: برای بررسی و کنترل فرآیندهای تولید و تعیین خلوص مواد شیمیایی. HPLC به ویژه در تولید مواد پلیمری و مواد آرایشی و بهداشتی اهمیت دارد.

کلینیکال: تجزیه و تحلیل آمینواسیدها، ویتامین ها و هوموساینس ها.

روش‌های مختلفی برای آنالیز داده های HPLC وجود دارد که هرکدام برای کاربردهای خاصی مناسب هستند:

آنالیز کیفی: در این روش، ترکیبات موجود در نمونه با استفاده از مقایسه زمان بازداری با استانداردهای شناخته شده شناسایی می‌شوند. اگر زمان بازداری یک ترکیب با نمونه استاندارد مطابقت داشته باشد، می‌توان آن را شناسایی کرد.

آنالیز کمی: برای تعیین غلظت دقیق یک ترکیب خاص در نمونه، از مساحت قله های کروماتوگرام استفاده می‌شود. روش‌های مختلفی مانند استاندارد داخلی، استاندارد خارجی و روش های کالیبراسیون برای کمی سازی به کار می روند.

آنالیز تخریب و پایداری: بررسی پایداری ترکیبات در شرایط مختلف مانند دما، نور، pH و زمان انجام می‌شود. این روش در صنایع دارویی برای تعیین ماندگاری و شناسایی محصولات جانبی حاصل از تخریب مواد به کار می‌رود.

آنالیز ماتریس پیچیده: در این روش، نمونه هایی که شامل ترکیبات مختلف و پیچیده هستند، بررسی می شوند. نمونه های زیستی مانند خون، ادرار و سرم از این دسته هستند که معمولاً به مراحل آماده سازی ویژه نیاز دارند تا نتایج دقیق تری ارائه شود.

1.بررسی الگوی کروماتوگرافی

در این مرحله، داده‌های کروماتوگرافی به‌دقت تحلیل می‌شوند تا ویژگی‌های الگوی جداسازی ترکیبات ارزیابی شود.
این بررسی شامل تحلیل شکل کلی پیک ها، نظم زمانی قله ها و تشخیص الگوهای خاص است.

2.بررسی شدت پیک ها

برای تعیین شدت نسبی پیک‌های کروماتوگرام، از روش‌هایی مانند مقایسه با کروماتوگرام‌های استاندارد و انتگرال‌گیری از مساحت زیر پیک‌ها استفاده می‌شود.
این مرحله در تعیین میزان ماده موردنظر اهمیت زیادی دارد.

3.تعیین میزان ماده موردنظر

این مرحله شامل استفاده از استانداردهای موجود و روش‌هایی مانند محاسبه مساحت پیک ها و تعیین غلظت به کمک کالیبراسیون خارجی یا داخلی است. این روش در کنترل کیفیت مواد دارویی و غذایی اهمیت زیادی دارد.

4.شناسایی پیک ها

در این مرحله، پیک های موجود در کروماتوگرام شناسایی و تفسیر می‌شوند. این مرحله در صنایع داروسازی برای کنترل کیفیت و تشخیص ناخالصی های دارویی کاربرد دارد.

5.تحلیل داده ها با روش های آماری

روش های آماری در تفسیر کروماتوگرام شامل آنالیز تفاضلی، تحلیل عاملی و آنالیز کلوزپ هستند که هر کدام در شرایط خاصی استفاده می شوند .

1.شناسایی ترکیبات با استفاده از زمان بازداری

مقایسه زمان بازداری قله های به دست آمده با استانداردهای شناخته شده یک روش رایج برای شناسایی ترکیبات است.

2.کمی سازی با استفاده از مساحت قله

روش استاندارد داخلی: یک ترکیب با غلظت مشخص به نمونه ها اضافه می‌شود و نسبت مساحت پیک ها مقایسه می شود.

روش منحنی کالیبراسیون: مقادیر مشخصی از ترکیب موردنظر تزریق شده و منحنی استانداردی رسم می شود.

3.بررسی عوامل مؤثر بر تغییر زمان بازداری

pH فاز متحرک: ترکیبات یونی به شدت تحت تأثیر تغییرات pH قرار می گیرند.

دمای ستون: افزایش دما معمولاً باعث کاهش زمان بازداری می شود.

ترکیب فاز متحرک: تغییر درصد حلال های آلی یا آبی در فاز متحرک می تواند تأثیر چشمگیری بر بازداری ترکیبات داشته باشد.

4.خطاهای رایج در HPLC و راهکارهای کاهش آن

خطاهای تصادفی: معمولاً در اثر تغییرات ناخواسته در شرایط آزمایشگاهی ایجاد می‌شوند.

خطاهای سیستماتیک: ناشی از خرابی آشکارساز، تغییرات غیرمنتظره در فشار سیستم و آلودگی ستون هستند.

انتخاب آشکارساز مناسب: برای بهبود دقت نتایج، انتخاب آشکارساز مناسب مانند UV-Vis، فلورسانس یا آشکارساز جرمی ضروری است.

5.مقایسه روش های استانداردسازی

استاندارد داخلی: یک ماده با غلظت مشخص به نمونه اضافه می شود تا نوسانات در تزریق و آنالیز به حداقل برسد.

استاندارد خارجی: محلول های استاندارد جداگانه تهیه و برای محاسبات استفاده می‌شوند. این روش ساده تر است اما نیاز به دقت بالایی در آماده سازی دارد.

با استفاده از این روش ها و بهینه سازی شرایط کروماتوگرافی، می‌توان دقت و صحت داده های HPLC را افزایش داد و تحلیل دقیق تری از نتایج ارائه کرد.

HPLC Calibration

Pump

1. Flow Accuracy
2. Gradient Compostion

Auto sampler

1. Carry Over
2. Linearity of Autoinjector

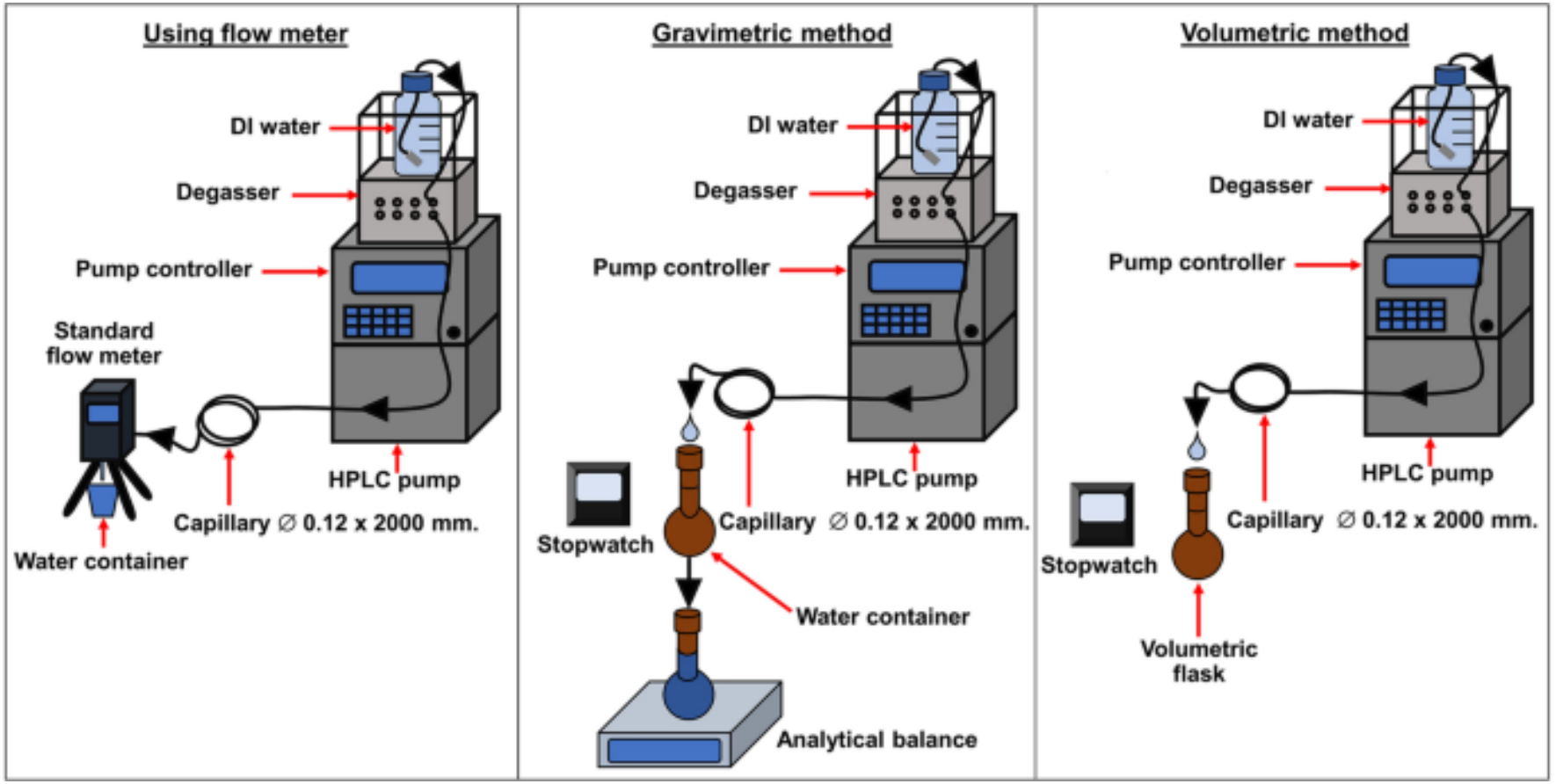
Column Compartment

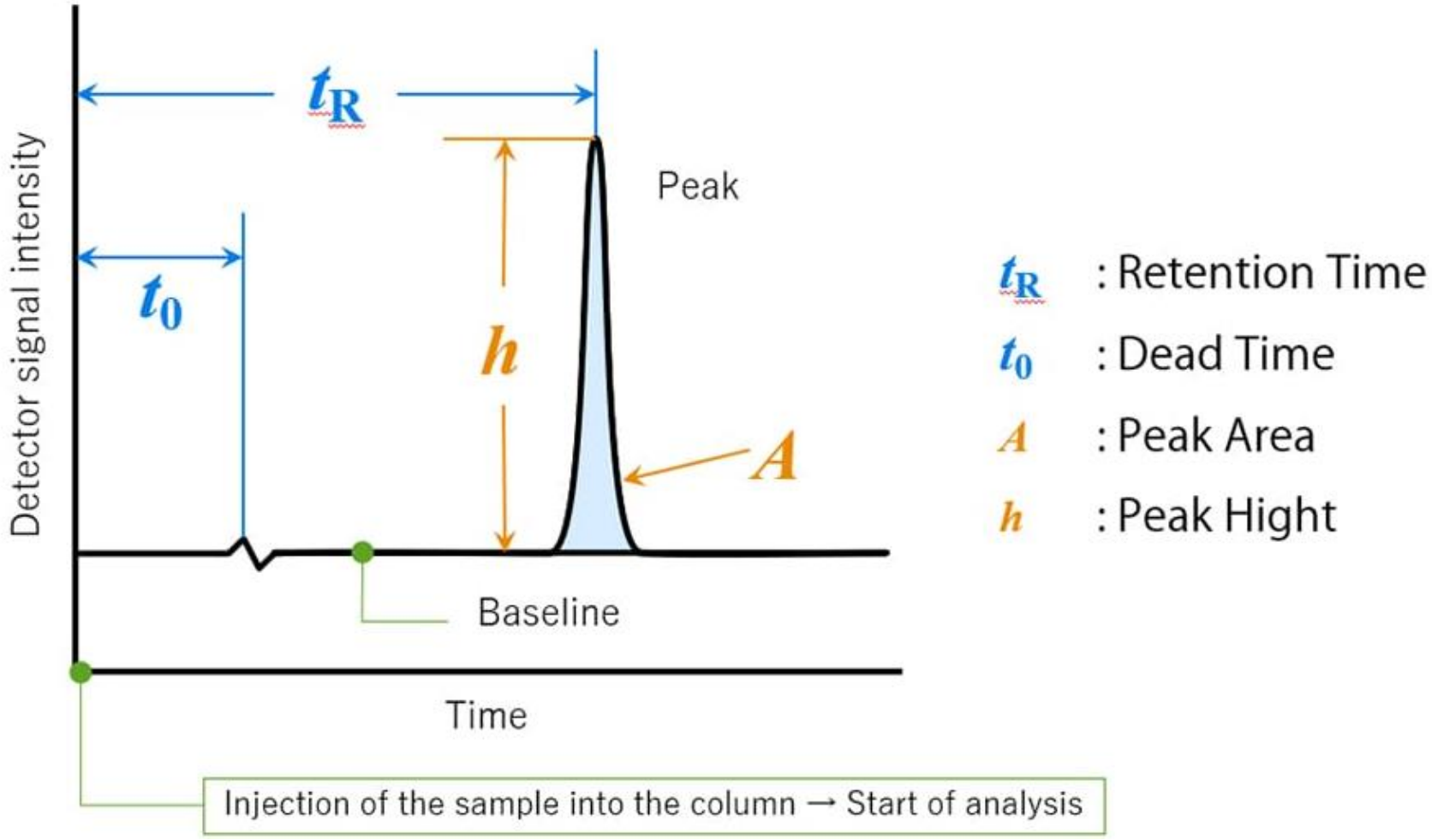
1. Temperature Accuracy

Detector

1. Detector linearity
2. Wavelength accuracy
3. Drift & Noise




Using flow meter
DI water
Degasser
Pump controller
Standard flow meter
HPLC pump
Capillary ∅ 0.12 x 2000 mm.
Water container
Gravimetric method
DI water
Degasser
Pump controller
HPLC pump
Stopwatch
Capillary ∅ 0.12 x 2000 mm.
Water container
Analytical balance
Volumetric method
DI water
Degasser
Pump controller
HPLC pump
Stopwatch
Capillary ∅ 0.12 x 2000 mm.
Volumetric flask

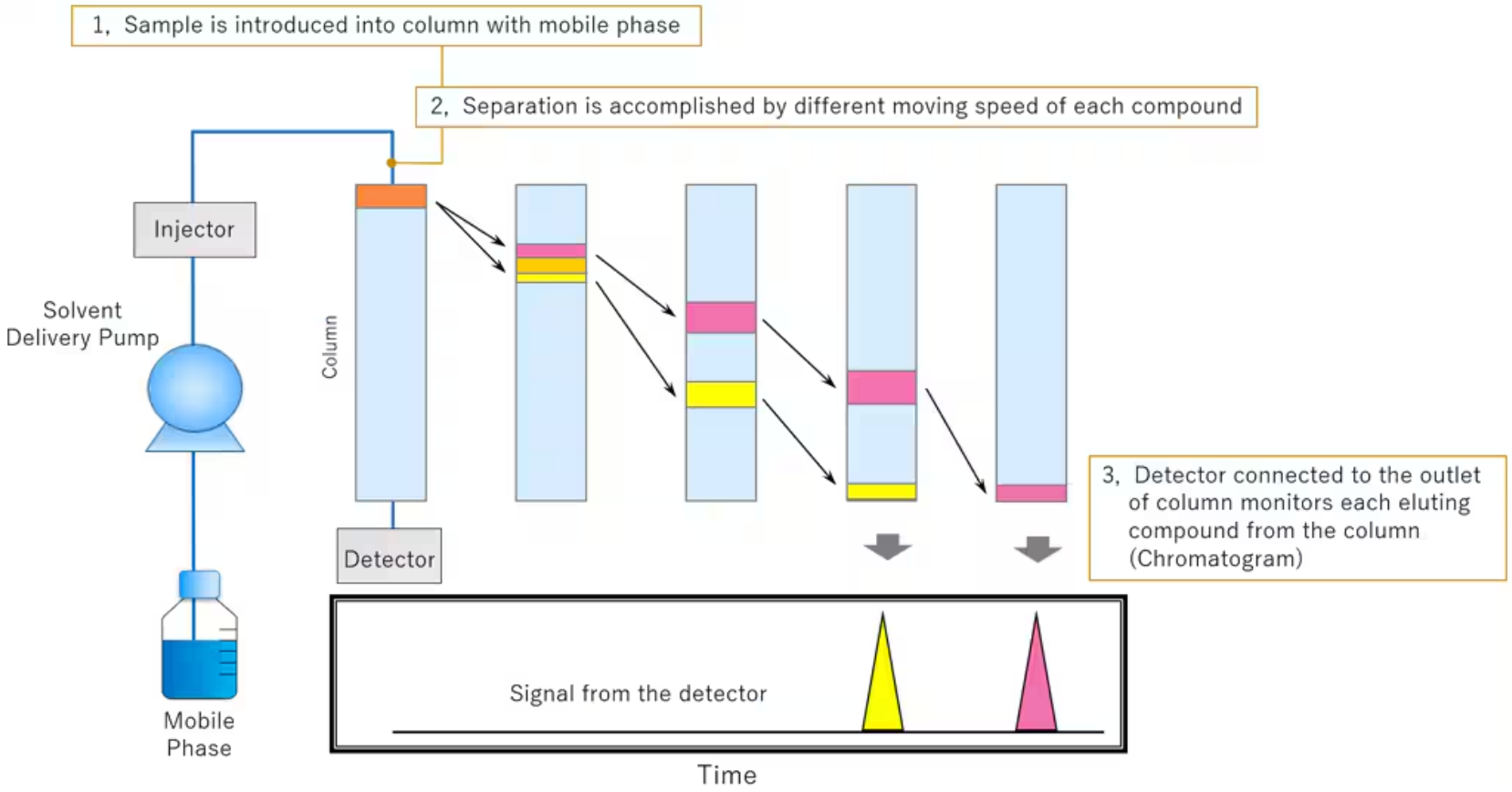


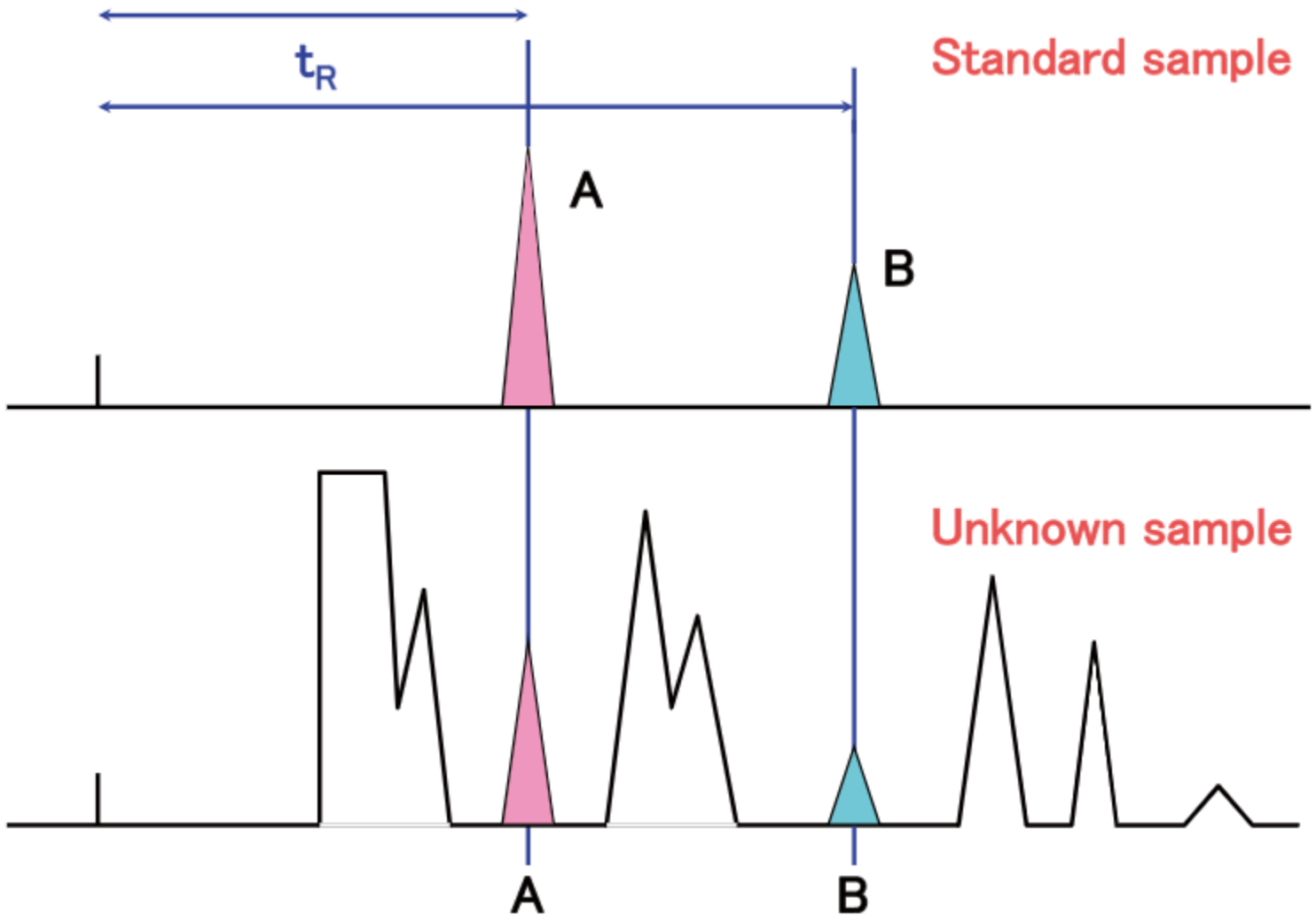
t_R : Retention Time

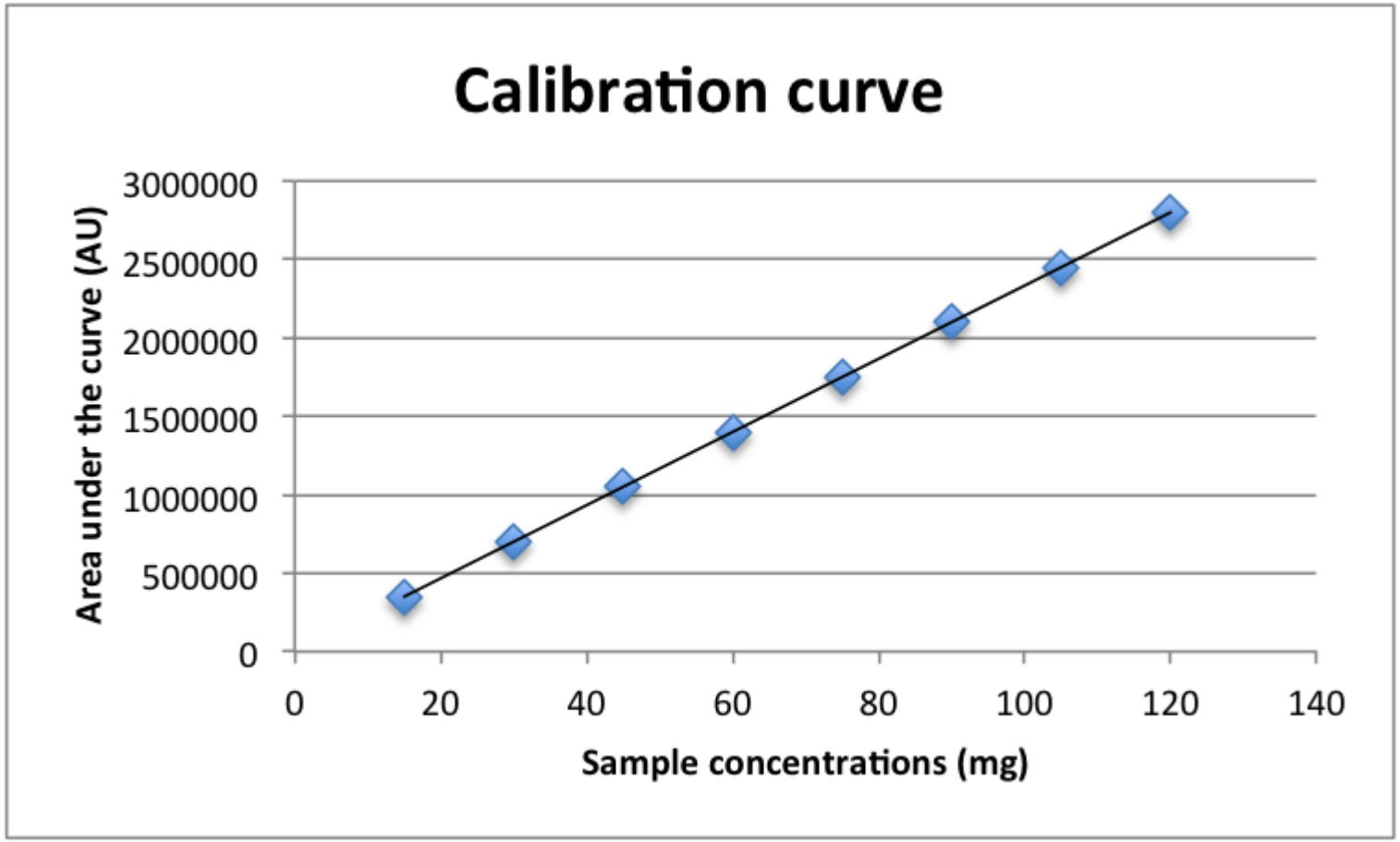
t_0 : Dead Time

A : Peak Area

h : Peak Hight


1, Sample is introduced into column with mobile phase
2, Separation is accomplished by different moving speed of each compound
Injector
Solvent
Delivery Pump
Column
Detector
Mobile
Phase
3, Detector connected to the outlet of column monitors each eluting compound from the column (Chromatogram)
Signal from the detector
Time


t_R
Standard sample
A
B
Unknown sample
A
B


Calibration curve
Area under the curve (AU)
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Sample concentrations (mg)

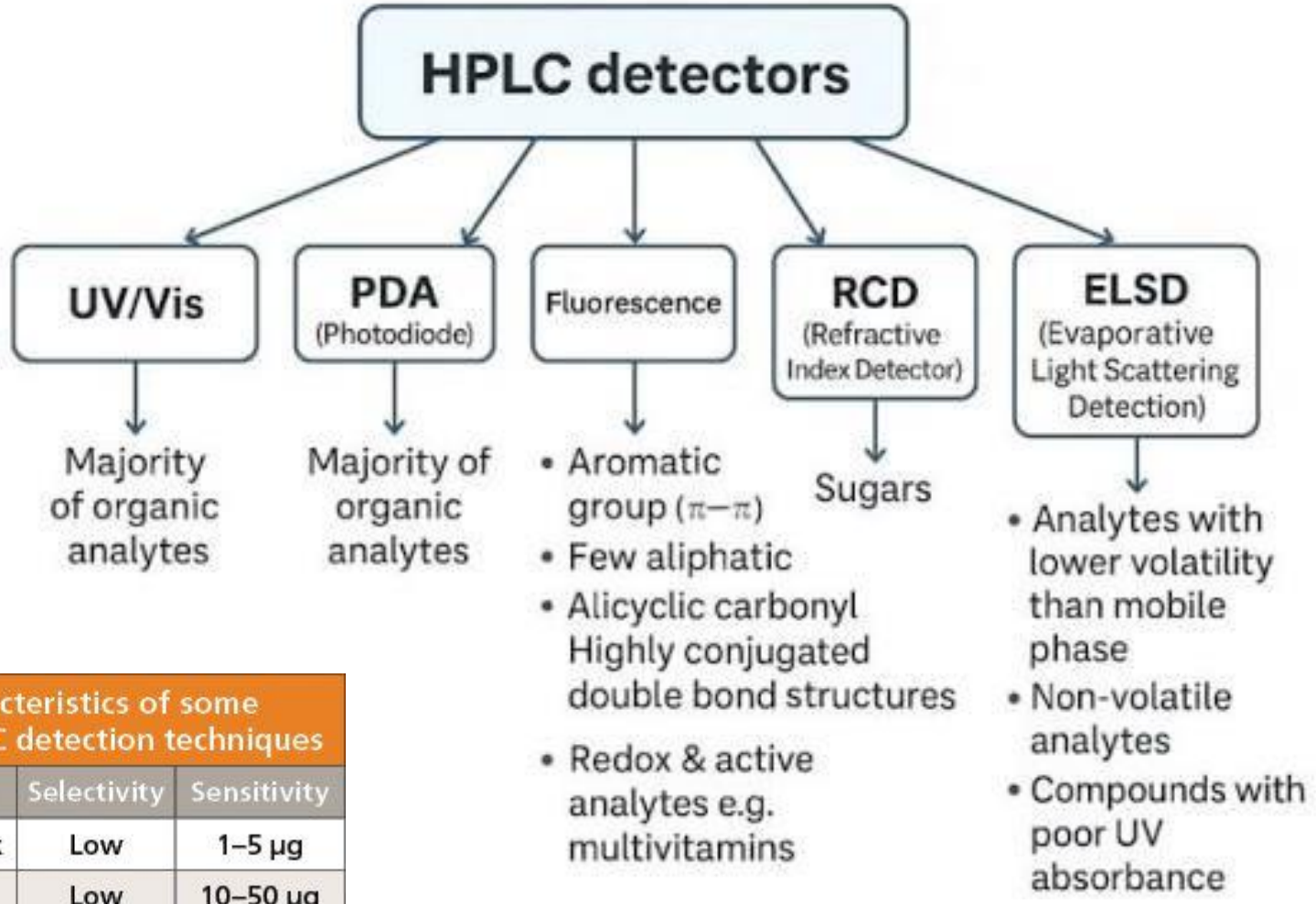


Table I: Characteristics of some common HPLC detection techniques

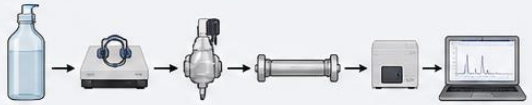
Detector	Selectivity	Sensitivity
Refractive index	Low	1–5 µg
Conductivity	Low	10–50 µg
UV–visible	Medium	0.5–1.0 ng
Electrochemical	High	50–500 pg
Fluorescence	High	10–100 pg
ELSD	Low	0.1–1.0 ng
CAD	Low	0.1–1.0 ng

HPLC چیست؟

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)
یک کنیک آنالیزی برای جداسازی،
شناسایی و اندازه‌گیری اجزای یک نمونه است.

00:00:10

اجزای اصلی HPLC



00:01:20

1. فاز متحرک (حلال)

حلال یا ترکیبی از حلال‌ها

• نمونه را داخل سیستم حمل می‌کند.

انتخاب نوع و نسبت حلال‌ها
بر اساس نوع آنالیز انجام می‌شود.



00:02:15

پمپ



• فاز متحرک را با فشار بالا از
طریق سیستم عبور می‌دهد.

• فشار معمولاً بین 50 تا 400 بار
است.

00:03:10

3. انژکتور

• مقدار مشخصی از نمونه را
وارد جریان فاز متحرک می‌کند.

• معمولاً حجم تزریق بین
5 تا 20 میکرولیتر است.



00:04:05

4. ستون

• محل جداسازی ترکیبات نمونه
بر اساس برهم‌کنش آن‌ها با فاز ثابت.

• انواع ستون‌ها بر اساس فاز ثابت،
اندازه ذرات و طول ستون متفاوت است.



00:05:15

5. دتکتور

• ترکیبات خروجی از ستون را
شناسایی و مقدار آن‌ها را اندازه‌گیری
می‌کند.

• انواع UV-Vis, PDA, FLD, RI



00:06:20

6. سیستم داده‌برداری

• سیگنال دتکتور را دریافت، پردازش
و به صورت کروماتوگرام نمایش می‌دهد.

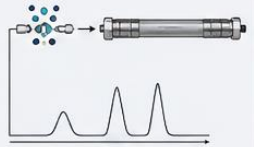
• امکان محاسبه زمان بازداری، مساحت
پیک و غلظت را فراهم می‌کند.



00:07:25

نحوه کار HPLC

1. فاز متحرک توسط پمپ با فشار بالا عبور می‌کند.
2. نمونه تزریق شده و به ستون می‌رود.
3. ترکیبات بر اساس قطبیت و برهم‌کنش با فاز ثابت
از ستون جدا می‌شوند.
4. دتکتور آن‌ها را شناسایی و سیگنال ثبت می‌کند.
5. سیستم داده‌برداری نتایج را نمایش می‌دهد.



00:08:30

آماده‌سازی سیستم

1. ستون را نصب و جهت جریان را بررسی کنید.
2. فاز متحرک را آماده و Degas کنید.
3. حباب‌ها را از سیستم خارج کنید.
4. سیستم را در دما و شرایط مناسب پایدار کنید.



00:09:40

اجرای آنالیز

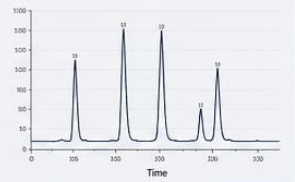
1. نمونه را از فیلتر 0.45 میکرون عبور دهید.
2. نمونه را در ویال قرار دهید.
3. حجم تزریق را تنظیم کنید.
4. روش (زمان، دما، دتکتور و فاز متحرک)
را اجرا کنید.



00:10:45

نکات مهم

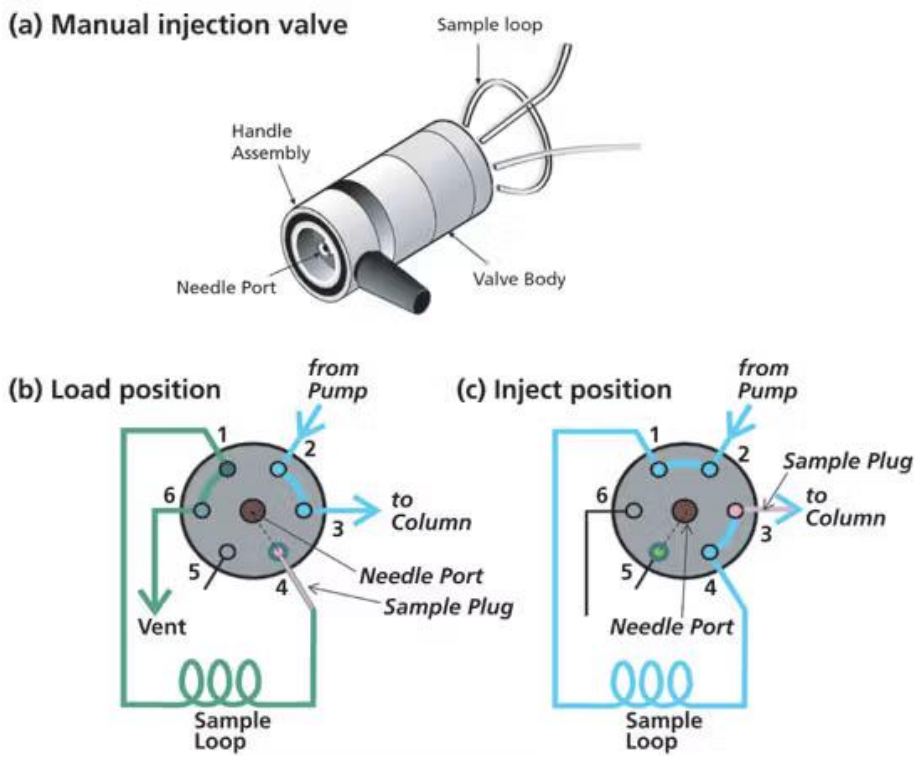
✓ همیشه از حلال و ستون مناسب استفاده کنید.
✓ سیستم را تمیز نگه دارید.
✓ از فشار و دمای مجاز تجاوز نکنید.
✓ کالیبراسیون و نگهداری دوره‌ای انجام دهید.



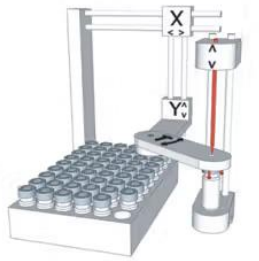
00:11:55

HPLC یک ابزار قدرتمند برای جداسازی و تحلیل دقیق ترکیبات در صنایع دارویی، غذایی، محیط زیست و تحقیقات علمی است.

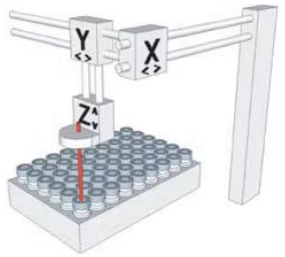



(a) Manual injection valve
Sample loop
Handle Assembly
Needle Port
Valve Body
(b) Load position
from Pump
1
2
3
4
5
6
to Column
Needle Port
Sample Plug
Vent
Sample Loop
(c) Inject position
from Pump
Sample Plug
to Column
Needle Port
Sample Loop

(a) Vial-to-needle configuration



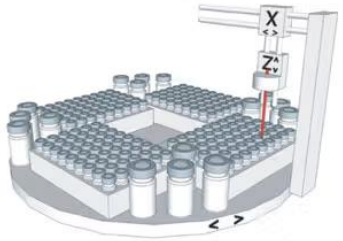
(b) Needle-to-vial configuration
(b1) Static tray with *xyz*

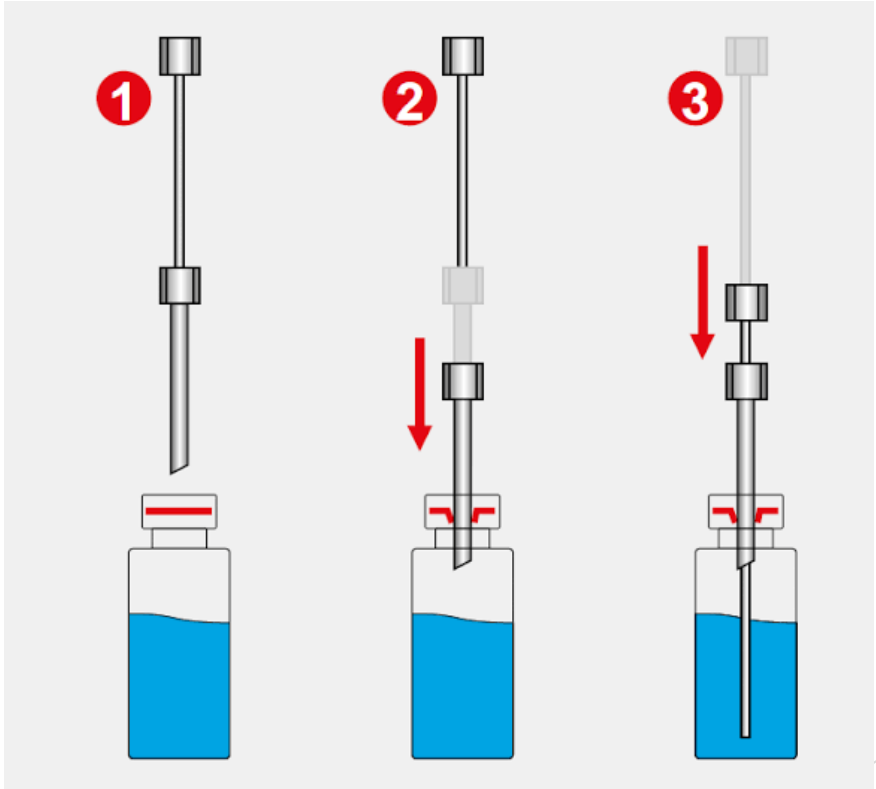


(b2) Static tray with *xy* theta

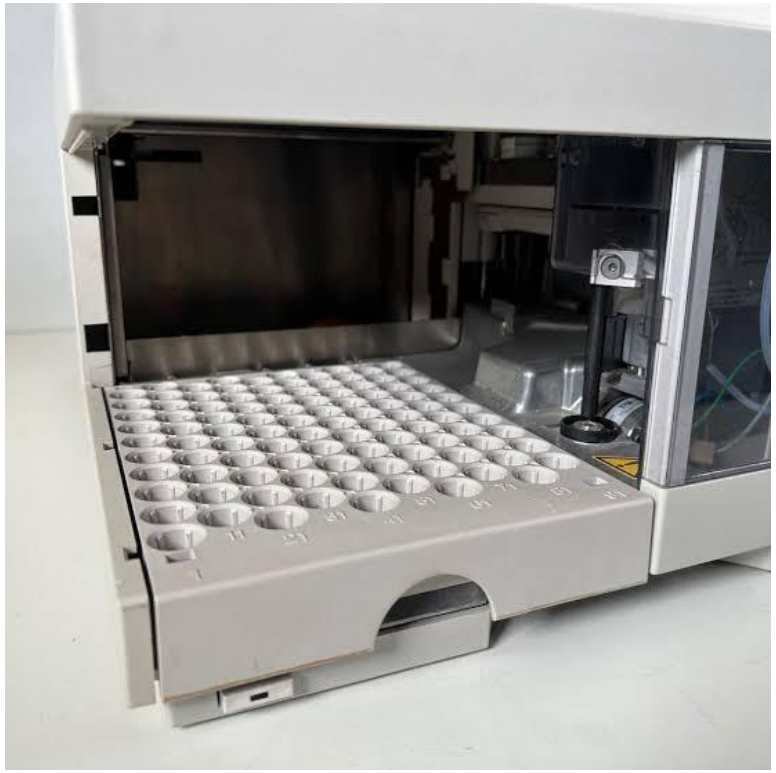


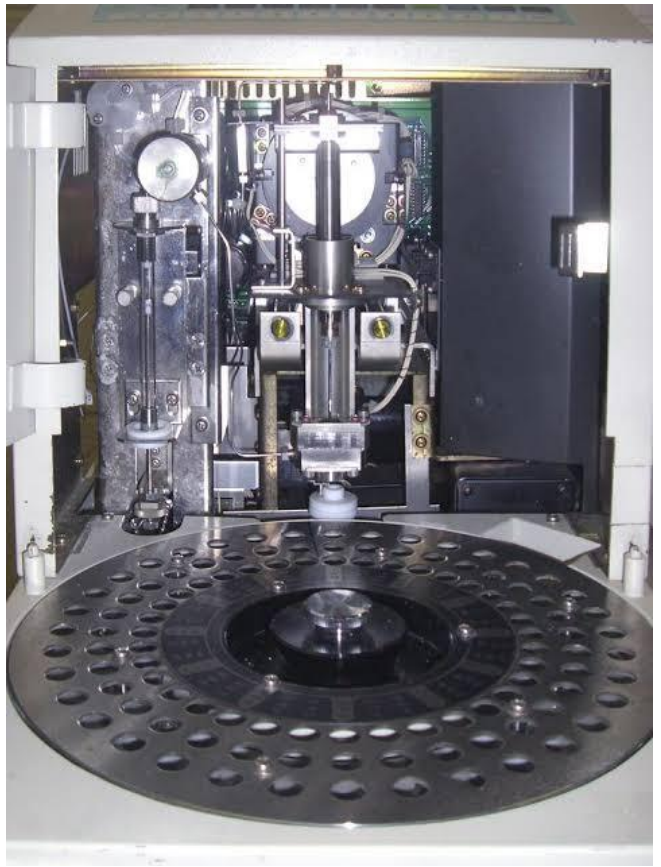
(b3) Sample carousel with *xz* drive

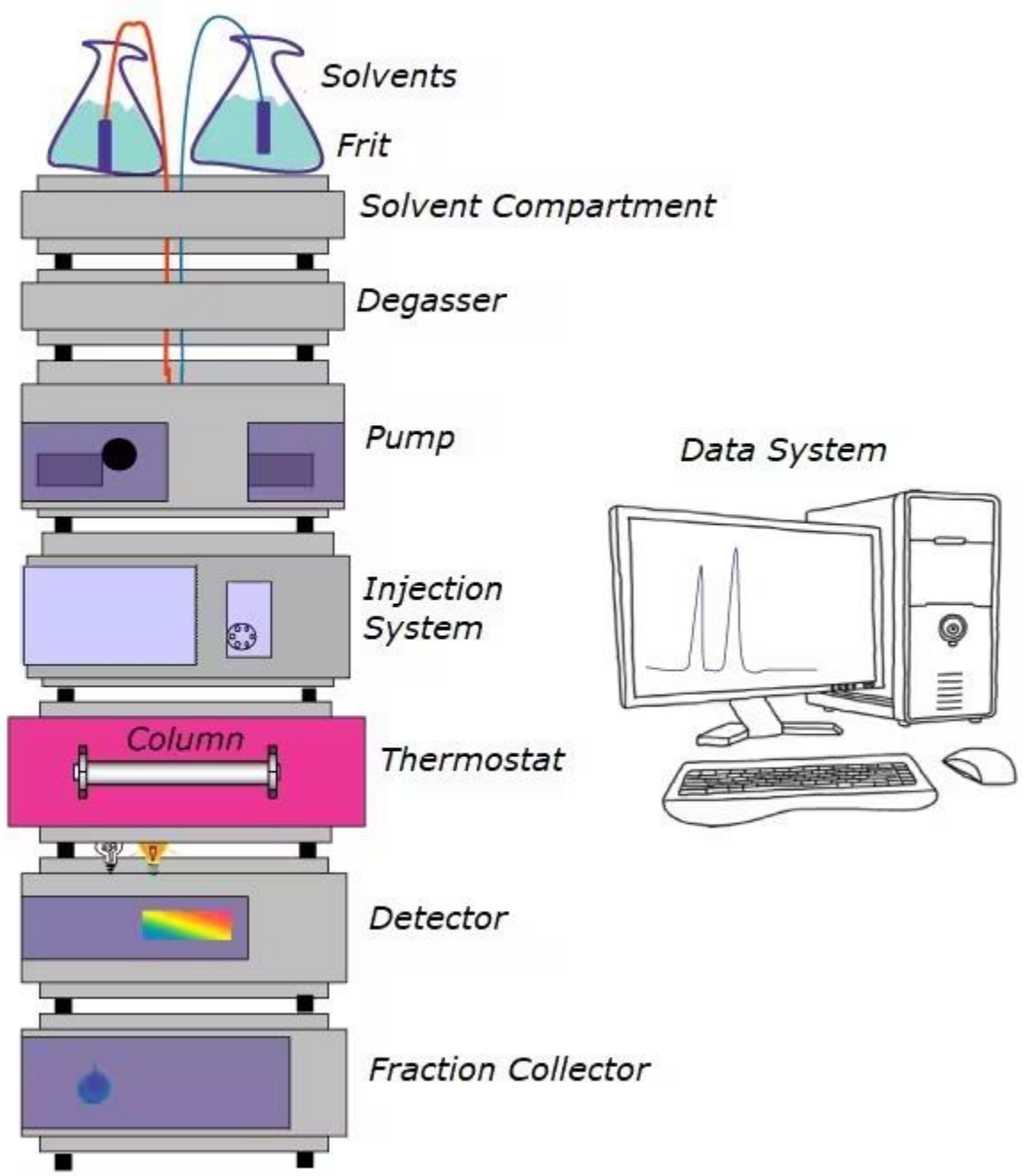











Solvents
Frit
Solvent Compartment
Degasser
Pump
Injection System
Column
Thermostat
Detector
Fraction Collector

Data System

HPLC TROUBLESHOOTING GUIDE

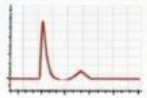
Symptoms → Possible Causes → Solutions



NO PEAKS / NO SIGNAL

- No sample injected
- Detector lamp off
- Wrong wavelength
- Mobile phase not flowing
- Air bubbles in system

✓ Check injector & lamp
✓ Verify wavelength
✓ Purge system



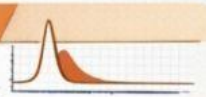
LOW PEAK RESPONSE



- Low injection volume
- Sample degradation
- Detector sensitivity low
- Column deterioration

✓ Increase volume
✓ Fresh sample
✓ Increase gain

PEAK FRONTING



- Column overload
- High sample concentration
- Column void

✓ Reduce volume
✓ Dilute sample
✓ Replace column

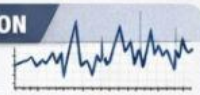
HIGH BACK PRESSURE



- Blocked column
- Dirty filter
- Viscous mobile phase
- Salt precipitation

✓ Flush/replace
✓ Column
✓ Change filter

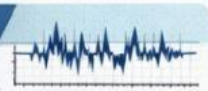
PRESSURE FLUCTUATION



- Air bubbles in pump
- Check valve fault
- Leak in system

✓ Purge pump
✓ Fix valves
✓ Check for leaks

BASELINE NOISE



- Bubbles in detector
- Solvent contamination
- Lamp aging

✓ Degas mobile phase
✓ Use fresh solvents
✓ Replace lamp

BASELINE DRIFT



- Temperature change
- Gradient issues
- Composition change

✓ Control temperature
✓ Equilibrate system
✓ Fresh mobile phase

QUICK DAILY CHECKLIST ✓

✓ Filter mobile phase (0.45 µm)
✓ Degas solvents
✓ Use guard column
✓ Flush system
✓ Check pressure

HPLC TROUBLESHOOTING

1 Baseline Noise

Cause:
Detectorcontamination air bubbles, temperature fluctuation

Solution:
Clean deterar cell

Clean detector cell, degas mobile phase, maintain constant

2 Baseline Drift

Change in moble phase composition, temperature instability, detector lamp aging

Solution:
use lamp

Use fresh mobile phase, stabilize temperature, replace lamp if needed

3 Retention Time Shift

Flow rate changes, column temperature variation, mobile phase composition drift

Solution:
Verify pump flow, control column

Verify pump flow, control column temp, prepare fresh mobile

4 Peak Tailing

Column contemination, poor column packing, strong sample-station-ary phase interaction

Solution:
conden por dispention

Flush column with strong solvent, use guard column

5 Ghost Peaks

Carryover contamination in mobile phase or injector

Solution:
rinse wita purity solvent

Clean injector, rinse with stronglvent, use high-purity

6 Split Peaks

Incomplete sample dissolution, poor column condition, or system leaks

Solution:
fropre prit

Filter andidissolve samples properly, ceh

7 Ghost Peaks

Carryover contamination in mobile phase or injector

Solution:
niese pon

Clean injector, rinse with strongolvent

8 Air Bubbles in System

Poor degassing, leaks in pump inlet

Solution:
purge pump

Solution:
Degas solvent, purge pump, tighten connec-tions

