

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کاربردهای آن در زیست فناوری

تألیف

دکتر جواد حامدی

(دانشیار میکروبیولوژی دانشگاه تهران)

فاطمه ایمان پرست

(دانشجوی دکتری بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی تهران)

مریم ایمانی

(کارشناسی ارشد شیمی آلی پژوهشکده شیمی و مهندسی شیمی ایران)

دکتر سیما صدرای

(دانشیار داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران)



شماره مسلسل ۸۱۰۳

شماره انتشار ۳۵۳۴

انتشارات دانشگاه تهران

عنوان و نام پدیدآور	کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کاربردهای آن در زیست فناوری / مؤلفان: جواد حامدی، ... [و دیگران]
مشخصات نشر	تهران: دانشگاه تهران، مؤسسه انتشارات، ۱۳۹۳.
مشخصات ظاهری	۲۰۸ ص. : مصور، جدول، نمودار.
فروست	انتشارات دانشگاه تهران، شماره انتشار ۳۵۳۴.
شابک	978-964-03-6662-2
وضعیت فهرست نویسی	فایپا:
یادداشت	مؤلفان: جواد حامدی، فاطمه ایمان پرست، مریم ایمانی، سیما صدراي.
یادداشت	کتابنامه.
موضوع	کروماتوگرافی مایع.
موضوع	کروماتوگرافی مایع یا بازدهی عالی.
شناسه افزوده	حامدی، جواد، ۱۳۴۵ -
رده بندی کنگره	دانشگاه تهران، مؤسسه انتشارات
رده بندی دیویی	۵۴۴/۸۴
شماره کتابشناسی ملی	۳۵۲۶۳۰۳

این کتاب مشمول قانون حمایت از حقوق مؤلفان و مصنفان است. تکثیر کتاب به هر روش اعم از فتوکپی، ریسوگرافی، تهیه فایل های pdf، لوح فشرده، بازنویسی در وبلاگ ها، سایت ها، مجله ها و کتاب، بدون اجازه کتبی نشر مجاز نیست و موجب پیگرد قانونی می شود.

ISBN: 978-964-03-6662-2



9 789640 366622

عنوان: کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کاربردهای آن در زیست فناوری
تألیف: دکتر جواد حامدی، فاطمه ایمان پرست، مریم ایمانی، دکتر سیما صدراي

ویراستار: فرشاد رضوان

نوبت چاپ: اول

تاریخ انتشار: ۱۳۹۳

شمارگان: ۱۰۰۰ نسخه

نشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران

چاپ و صحافی: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران

«مسئولیت صحت مطالب کتاب ب مؤلفان است»

«کلیه حقوق برای نشر محفوظ است»

یها: ۱۱۰۰۰۰ ریال

خیابان کارگر شمالی - خیابان شهید فرش مقدم - مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران

http://press.ut.ac.ir - تارنما: press@ut.ac.ir

پخش و فروش: تلفکس ۸۸۳۳۸۷۱۲

فهرست مطالب

مقدمه.....	ذ
فصل اول - روش های کروماتوگرافی.....	۱
۱-۱ کروماتوگرافی گاز - مایع.....	۳
۱-۲ کروماتوگرافی تبخیر یونی.....	۵
۱-۳-۱ کروماتوگرافی رد فضایی.....	۶
۱-۳-۱-۱ کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون در زیست فناوری.....	۸
۱-۳-۲ کروماتوگرافی مایع برای ایجاد مجدد ساختار سوم پروتئین.....	۹
۱-۴-۱ کروماتوگرافی تمایلی.....	۱۱
۱-۴-۱-۱ کروماتوگرافی تمایلی و HPLC در زیست فناوری.....	۱۲
۱-۴-۲ سیستم های کروماتوگرافی تمایلی از نوع سیستم بیوتین - آویدین.....	۱۳
۱-۴-۳ کروماتوگرافی تمایلی با لیگندهای لکتین.....	۱۴
۱-۴-۴ کروماتوگرافی تمایلی برهم کنش فلزی.....	۱۵
۱-۵ کروماتوگرافی مایع - مایع.....	۱۶
۱-۶ کروماتوگرافی مایع - مایع پیوند شده.....	۱۶
۱-۷ کروماتوگرافی جامد - مایع.....	۱۷
۱-۸ کروماتوگرافی کاغذی.....	۱۷
۱-۹ کروماتوگرافی لایه نازک.....	۱۸
۱-۹-۱ کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا.....	۱۹
۱-۹-۲ کاربرد کروماتوگرافی لایه نازک.....	۲۰
۱-۱۰ کروماتوگرافی کروماتوفوکوسینگ.....	۲۱
۱-۱۱ کروماتوگرافی آب گریزی.....	۲۲
۱-۱۲ کروماتوگرافی هیدروکسی آپاتیت.....	۲۳
۱-۱۳ کروماتوگرافی کایرال.....	۲۴
۱-۱۴ کروماتوگرافی کوآلانس.....	۲۶
۱-۱۵ کروماتوگرافی مایع برای جداسازی سریع پروتئین.....	۲۷
منابع.....	۳۰
فصل دوم - مفاهیم کروماتوگرافی.....	۳۱
۲-۱ کروماتوگرام.....	۳۱

۳۲	۲-۲ زمان بازداری
۳۲	۳-۲ T_0 یا t_m زمان فاز متحرک یا حجم تهی ستون
۳۲	۴-۲ زمان بازداری نسبی
۳۳	۵-۲ عامل ظرفیت یا عامل بازداری
۳۳	۶-۲ ثابت توزیع
۳۴	۷-۲ کارایی ستون
۳۴	۸-۲ ضریب گزینش پذیری یا جداسازی
۳۴	۹-۲ قدرت تفکیک
۳۶	۱۰-۲ نظریه صفحات
۳۶	۱۱-۲ نظریه سرعت
۳۷	۱-۱۱-۲ انتشار گردابی فاکتور (۸)
۳۸	۲-۱۱-۲ انتشار مولکولی یا انتشار طولی
۳۸	۳-۱۱-۲ مقاومت در مقابل انتقال جرم در فاز ساکن و متحرک
۳۹	۱۲-۲ روش های جداسازی
۳۹	۱-۱۲-۲ کروماتوگرافی شست و شو
۴۲	۲-۱۲-۲ کروماتوگرافی جبهه ای
۴۴	۳-۱۲-۲ کروماتوگرافی جایگزینی
۴۵	منابع
۴۷	فصل سوم - کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا
۴۷	۱-۳ مقدمه
۴۸	۱-۱-۳ فاز متحرک
۴۹	۱-۱-۱-۳ امتزاج پذیری و انحلال پذیری
۵۰	۱-۱-۲-۳ ویسکوزیته حلال
۵۰	۲-۱-۳ کروماتوگرافی فاز نرمال
۵۰	۱-۲-۱-۳ فاز متحرک در کروماتوگرافی فاز نرمال
۵۲	۳-۱-۳ کروماتوگرافی فاز معکوس
۵۵	۲-۳ تعیین کیفی و کمی ترکیبات به وسیله HPLC
۵۷	۱-۲-۳ استاندارد داخلی (A _{IS})
۵۸	۳-۳ مشتق سازی

۶۲	۴-۳- مفاهیم طیف سنج فرابنفش - مری و فلورسانس
۶۳	۳-۴-۱- اجزای یک دستگاه اسپکتروفتومتر
۶۳	۳-۴-۲- قانون بیر - لامبرت رابطه بین جذب و غلظت در یک نمونه
۶۵	۳-۴-۳- عوامل موثر بر جذب کروموفور
۶۵	۳-۴-۴- طیف سنجی فلورسانس
۶۶	۳-۵- کروماتوگرافی مایع با کارایی بسیار بالا
۶۸	۳-۵-۱- بخش دستگاهی
۷۰	۳-۶- کروماتوگرافی مایع فاز معکوس و HPLC در زیست فناوری
۷۲	منابع

۷۳	فصل چهارم - معرفی اجزای دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا
۷۳	۴-۱- مخزن فاز متحرک
۷۴	۴-۱-۱- فاز متحرک
۷۵	۴-۱-۲- گاززدایی فاز متحرک
۷۷	۴-۲- پمپ‌های HPLC
۷۷	۴-۲-۱- پمپ‌های رفت و برگشتی
۷۹	۴-۲-۲- پمپ‌های دیافراگمی
۸۰	۴-۲-۳- پمپ‌های سرنگی
۸۰	۴-۲-۴- پمپ‌های چند برابر کننده فشار
۸۲	۴-۳- تزریق نمونه
۸۴	۴-۴- آشکارسازها
۸۴	۴-۴-۱- ویژگی‌های آشکارساز
۸۶	۴-۴-۲- حد تشخیص
۸۶	۴-۴-۳- آشکارسازهای UV/vis
۸۸	۴-۴-۴- آشکارساز آرایه دیودهای نوری
۹۲	۴-۴-۵- آشکارسازهای فلورسانس
۹۵	۴-۴-۶- آشکارساز الکتروشیمیایی
۹۵	۴-۴-۱۰- آشکارساز هدایت‌سنجی
۹۷	۴-۴-۲- آشکارسازهای آمپرومتری
۹۹	۴-۴-۷- آشکارساز کولومتری

۱۰۰	۴-۷-۴- آشکارساز ضریب شکست
۱۰۲	۴-۴-۸- طیف‌سنج جرمی
۱۰۷	۴-۹-۴- سایر آشکارسازها
۱۰۸	۴-۵- روش‌های کروماتوگرافی پیوندی
۱۰۸	۴-۵-۱- اسپیکرومتری جرمی - HPLC
۱۱۰	۴-۵-۲- آرایه دیودهای نوری - HPLC
۱۱۱	۴-۵-۳- آشکارساز فلورسانس - HPLC
۱۱۲	۴-۶- لوله‌های اتصال دهنده
۱۱۳	۴-۷- ستون‌ها
۱۱۴	۴-۷-۱- طراحی بست‌های انتهایی
۱۱۵	۴-۷-۲- ستون‌های میکرو
۱۱۵	۴-۷-۳- پیش‌ستون و ستون‌های محافظ
۱۱۶	۴-۷-۴- کنترل دمایی ستون
۱۱۶	۴-۸- نیاز به سوبستراها و فازهای ساکن برای HPLC
۱۱۷	۴-۸-۱- فازهای ساکن با پایه سیلیکا
۱۱۸	۴-۸-۲- ساختار سیلیکا
۱۱۹	۴-۸-۳- انواع واکنش‌گرهای ارگانوسیلان
۱۲۱	۴-۸-۴- گروه‌های عاملی، لیگاندها یا اصلاح‌کننده‌ها
۱۲۳	منابع

۱۲۵	فصل پنجم - HPLC آنالیزی در عمل و کاربرد آن در زیست فناوری
۱۲۵	۵-۱- تهیه نمونه
۱۲۷	۵-۲- نکاتی که یک کاربر در استفاده از فاز متحرک باید رعایت کند
۱۳۱	۵-۳- نکاتی که کاربر در هنگام تزریق باید توجه داشته باشد
۱۳۱	۵-۴- نکاتی که در کار با پمپ‌ها باید رعایت شود
۱۳۲	۵-۵- نکاتی که در کار با ستون باید رعایت شود
۱۳۶	۵-۶- بهینه‌سازی یک کروماتوگرام
۱۴۲	۵-۷- جایه‌جایی خط پایه در کار گردانی
۱۴۳	۵-۸- سیگنال زمینه‌ای ایجادشده به وسیله حلال
۱۵۱	۵-۹ آنالیز نمونه

۱۵۳	۵-۱۰- فاز متحرک.....
۱۵۴	۵-۱۱- کاربرد HPLC آنالیزی در زیست فناوری.....
۱۵۴	۵-۱۱-۱- شناسایی کلانولانیک اسید، مثالی از یک متابولیت برون سلولی.....
۱۵۵	۵-۱۱-۲- شناسایی پروتئین‌ها یا پپتیدهای فسفریله شده، مثالی از یک متابولیت درون سلولی.....
۱۵۶	۵-۱۱-۳- جداسازی ترکیبات گوانیدینی از نمونه‌ی خونی (پلاسما).....
۱۵۶	۵-۱۱-۴- جداسازی و آنالیز اسیدآمینها.....
۱۵۸	۵-۱۱-۵- آنالیز سموم قارچی.....
۱۶۰	۵-۱۱-۶- آفت‌کش‌ها.....
۱۶۲	منابع.....

فصل ششم - کروماتوگرافی تولیدی و کاربرد آن در زیست فناوری..... ۱۶۳

۱۶۳	۶-۱- کروماتوگرافی تولیدی.....
۱۶۸	۶-۱-۱- خالص‌سازی اجزای نمونه به وسیله HPLC.....
۱۶۹	۶-۱-۱-۱- افزایش مقدار نمونه تزریق شده به ستون.....
۱۷۰	۶-۱-۱-۲- بهینه‌سازی و افزایش مقیاس از یک روش HPLC آنالیزی IPLC تولیدی.....
۱۷۲	۶-۱-۲- نقش ستون در HPLC تولیدی.....
۱۷۳	۶-۱-۲-۱- انتخاب فاز ساکن مناسب در HPLC تولیدی.....
۱۷۵	۶-۱-۲-۲- سایز ذره و قطر ستون در HPLC تولیدی.....
۱۷۶	۶-۱-۲-۳- انتخاب از فاز متحرک.....
۱۷۷	۶-۱-۲-۴- مثالی از افزایش مقیاس از HPLC آنالیزی به HPLC تولیدی.....
۱۷۸	۶-۱-۳- جداسازی دو پروتئین نوترکیب، با ارزش زیست فناوری به وسیله IPLC تولیدی.....
۱۷۸	۶-۱-۳-۱- اریتروپوئیتین.....
۱۷۹	۶-۱-۳-۲- مهارکننده فعال کننده پلاسمینوژن بافتی.....
۱۸۲	منابع.....

واژه‌نامه فارسی..... ۱۸۳

واژه‌نامه انگلیسی..... ۱۸۹

مقدمه

کروماتوگرافی یکی از متداول‌ترین روش‌های جداسازی است، که در بیشتر شاخه‌های علوم و فناوری‌های آزمایش‌بنیان، از جمله زیست فناوری، شیمی، داروسازی، علوم زیستی، بهداشت، پزشکی، پتروشیمی، کشاورزی، صنایع غذایی و مراقبت‌های زیست محیطی در ابعاد پژوهشی و صنعتی کاربرد فراوان دارد.

اولین بار، آزمایش‌های کروماتوگرافی در سال ۱۹۰۳ به‌وسیله گیاه‌شناس روسی، میخائیل تسوت^۱، هنگام جداسازی رنگ‌های گیاهی ابداع شد. وی عصاره گیاهان استخراج شده را به ابتدای یک ستون کوتاه حاوی کربنات کلسیم وارد کرد. پس از گذراندن حلال اتر، مشاهده کرد که در ستون، نوارهای مختلف رنگی حاصل شده است (شکل ۱).^۲ او نام کروماتوگرافی را که از دو کلمه یونانی رنگ و نوشتن بود، برای این روش جداسازی انتخاب کرد.

با گذشت بیش از یک سده، در نتیجه انجام پژوهش‌های مختلف و یافتن کاربردهای گوناگون، روش پایه‌گذاری شده به‌وسیله تسوت، به یکی از ابزارهای اصلی کاربردی در علوم و فناوری‌های آزمایش‌بنیان تبدیل شده است. مسیر این پژوهش‌ها و کاربردها را می‌توان در جدول ۱ مشاهده کرد.

با وجود تنوع زیاد روش‌های کروماتوگرافی، اساسی تمام آنها مشابه است. به‌طور کلی می‌توان گفت: کروماتوگرافی شامل گروهی از روش‌های مختلف است، که به پژوهشگر توان تفکیک و تعیین هویت اجزای یک مخلوط پیچیده‌ی ترکیبات شیمیایی را می‌دهد. در همه این روش‌ها، یک فاز ساکن و یک فاز متحرک وجود دارد. فاز ساکن، در ستون یا صفحه توزیع شده است و اجزای مخلوط به وسیله‌ی جریان فاز متحرک از داخل فاز ساکن عبور داده می‌شوند، جسم حل شده^۲ بین دو فاز امتزاج ناپذیر (ساکن و متحرک)، که با آنها در تماس است، بخش متعادلی پیدا می‌کند. این تعادل، به پایداری نسبی جسم، در هر یک از دو فاز، بستگی دارد. جداسازی بر اساس اختلاف در سرعت مهاجرت اجزای مختلف نمونه استوار است. هر چه تمایل جسم حل شده به فاز ساکن بیشتر باشد، زمان لازم برای خروج آن از ستون افزایش می‌یابد.

جدول ۱- روند پیشرفت پژوهش‌ها و کاربردهای کروماتوگرافی

سال ابداع	مبدع	پیشرفت و کاربرد
۱۸۵۰	رانگ، گوپلس‌رودر و اسکونبین ^۱	- جداسازی رنگ‌های روی کاغذ صافی
۱۹۰۳	تسوت ^۲	جداسازی رنگ‌دانه‌های گیاهی به وسیله کروماتوگرافی ستونی با کربنات کلسیم
۱۹۳۱	کوهن و لدر ^۳	جداسازی کاروتن از هویج به وسیله کروماتوگرافی مایع در مقیاس انبوه
۱۹۴۱	مارتین و سینگ ^۴	- تکامل کروماتوگرافی تقسیمی
۱۹۴۷	اسپدینگ و تامپکینس ^۵	کروماتوگرافی گازی
۱۹۴۹	پورات و فلودین ^۶	- کروماتوگرافی تعویض یونی
۱۹۵۹	پیل ^۷	کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا
۱۹۶۶	بروتون ^۸	فناوری بستر متحرک شبیه سازی (SMB)

کروماتوگرافی، روش بسیار کارآمدی برای جداسازی مواد مختلف مثل پروتئین‌ها، آنانتیومرها، داروها و غیره است و امکان آنالیز دقیق نمونه در مقدار کم را فراهم می‌کند. همچنین می‌توان هر یک از اجزا را جداگانه و خالص جمع‌آوری کرد.

روش‌های کروماتوگرافی به سرعت در حال توسعه است و امروزه به تقریب نیمی از آنالیز مواد شیمیایی به روش‌های کروماتوگرافی، از جمله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC^{۱۰}) صورت می‌گیرد. این تکنیک‌ها تحول عظیمی را در روش‌های جداسازی و شناسایی ترکیبات مختلف در علوم مختلف فراهم می‌کنند.

1 - Runge, Schonbein, Goppelsroder

2 - Tswett

3 - Kuhn and Ledere

4 - Martin and Synge

5 - Spedding and Tompkins

6- Porath and Flodin

7 - Piel

8 - Simulated Moving Bed Technology (SMB)

9 - Broughton

10 - High performance liquid chromatography

تکنیک‌های کروماتوگرافی، علاوه بر کاربرد در آنالیز مواد شیمیایی، برای تهیه مواد مختلف شیمیایی و زیستی، در حد تهیه نمونه خالص برای انجام آزمایش‌های پژوهشی یا تولید صنعتی نیز، استفاده می‌شود. در این موارد، برای تهیه نمونه برای آزمایش‌های پژوهشی می‌توان از روش‌هایی مثل TLC استفاده کرد، که در روش‌های تعیین ساختاری مثل مادون قرمز، NMR یا اسپکترومتری جرمی به کار می‌رود. برای تولید انبوه مواد شیمیایی و زیستی می‌توان از سیستم‌های HPLC تولیدی استفاده کرد.

در این کتاب، پس از بررسی اجمالی روش‌های کروماتوگرافی، به بیان اصول و مبانی کروماتوگرافی پرداخته شده است. در فصل‌های بعد، ضمن ارائه جزئیات اجزای دستگاه HPLC، به بررسی نکات عملی کار با HPLC پرداخته شده است و در پایان، به بررسی HPLC تولیدی^۱ پرداخته شده است. تلاش مولفان، که تخصص‌ها و دیدگاه‌های مختلف و مکمل دارند، براین بوده تا ملزومات لازم را برای استفاده کاربران این فن، در حوزه‌های مختلف علوم زیستی فراهم کنند. در این کتاب، تنوع سابقه تحصیلی و تجربی کاربران نیز مورد توجه قرار گرفته و با پرهیز از ورود به همه جزئیات علمی و فنی، سعی شده مطالب به شیوه‌ای استفاده شدنی برای همه این کاربران آورده شود. این کتاب برای دانشجویان و پژوهشگران رشته‌های مختلف علوم زیستی (میکروبیولوژی، بیوشیمی، زیست فناوری، فیزیولوژی، علوم سلولی و مولکولی و ...)، داروسازی، کشاورزی و نیز کارشناسی‌های مشغول به خدمت در صنایع مختلف دارویی، شیمیایی، نفت، گاز، پتروشیمی، زیست‌فناوری، نانوفناوری، کشاورزی، آب و پساب، محیط زیست و دیگر صنایع مرتبط، مفید خواهد بود.

از خوانندگان محترم خواهشمند است با ارسال انتقادات و پیشنهادها خود به آدرس jhamedi@ut.ac.ir، ما را در انجام وظایف خود یاری دهند.

جواد حامدی، فاطمه ایمان پرست، مریم ایمانی، سیما صدرای