

|                                          |                                                                                   |                                     |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| شماره SOP : ۴۰                           |  | ناظر علمی : دکتر جلال مردانه        |
| بخش مربوطه : آزمایشگاه جامع تحقیقات      |                                                                                   | کارشناس آزمایشگاه: فاطمه نعمتی شهری |
| عنوان: دستورالعمل استفاده از دستگاه HPLC |                                                                                   | تاریخ تهیه : آذر ۱۴۰۰               |

**هدف:** این دستورالعمل روش استفاده و نگهداری دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مدل ۲۶۱۰ ساخت کمپانی AgiLENT واقع در آزمایشگاه آنالیز دستگاهی آزمایشگاه جامع تحقیقات را نشان میدهد.

**کاربرد:** آنالیز HPLC یا کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatography) یکی از روش های مهم در علم شیمی است که برای جداسازی، شناسایی و اندازه گیری مقادیر کم از مواد مورد استفاده قرار می گیرد .

HPLC از دو فاز ثابت و متحرک تشکیل شده است که فاز ثابت جامد و یا مایع (مواد متراکم شده درون ستون) و فاز متحرک مایع است. این روش با استفاده از فاز متحرک، ترکیبات یک مخلوط را روی فاز ثابت جدا می کند. در ابتدا ترکیبات در یک حلال حل می شوند، سپس تحت فشار بالا داخل یک ستون کروماتوگرافی جریان می یابند و به این ترتیب ترکیبات مخلوط در ستون از هم جدا می شوند.

میزان تفکیک پذیری به مقدار میان کنش بین ترکیبات حل شده و فاز ثابت بستگی دارد. انتخاب حلال ها و فازهای ثابت مختلف می تواند موجب تغییر میان کنش جسم حل شده با فازهای متحرک و ثابت شود. حساسیت بالا، سازگاری سریع آن برای انجام اندازه گیری های کمی، و کاربرد گسترده آن در زمینه های مختلف علوم و صنعت موجب شده که HPLC به عنوان یکی از روش های بسیار کارآمد رشد سریعی را در بین روش های جداسازی تجزیه ای داشته باشد.

HPLC یک فرایند جذب سطحی پویا است. هنگامی که مولکول‌های ماده مورد آزمایش از میان دانه‌های متراکم و متخلخل ستون حرکت می‌کنند، جذب سطحی می‌شوند. در روش‌های HPLC انواع مختلفی از نیروهای جذب سطحی، ممکن است در فرایند بازداری مؤثر باشند. مهمترین میان‌کنش‌ها در جداسازی فاز معکوس، میان‌کنش‌های آبگریز، در روش فاز نرمال، میان‌کنش‌های قطبی، و میان‌کنش‌های یونی نیز در کروماتوگرافی تبادل یونی، موجب بازداری ترکیبات می‌شوند. همه این میان‌کنش‌ها به صورت رقابتی با یکدیگر عمل می‌کنند. مولکول‌های مورد تجزیه با مولکول‌های حلال شوینده، برای جذب سطحی روی مکان‌های فعال فاز ثابت رقابت می‌کنند. بنابراین هر چه مولکول‌های مورد تجزیه، میان‌کنش قوی‌تری با سطح داشته باشند، میان‌کنش شوینده ضعیف‌تر بوده و ماده مورد تجزیه زمان طولانی‌تری روی سطح فاز ثابت باقی می‌ماند.

**مسئولیت:** تمام پرسنل و دانشجویان شاغل در آزمایشگاه با HPLC و و چگونگی کاربری آن در بخش‌های مختلف آشنا باشند و به این نکات عمل کنند.

### تجهیزات، مواد، لوازم و آماده سازی های مورد نیاز قبل از انجام کار:

سرنگ با ظرفیت های مختلف برای تزریق نمونه

ستون های کروماتوگرافی مایع

### روش کار:

۱- ابتدا کلیه قسمت های دستگاه را کنترل نموده و از سالم و آماده بکار بودن آنها اطمینان حاصل نمائید.

۲- ستون و حلال متناسب با متود کار را انتخاب نموده و ستون را نصب نمائید. لازم به ذکر است حلال ها باید

grade HPLC باشند.

۳- مخزن های حلال را با فاز متحرک مناسب (بر اساس متود) پر کرده و اولتراسونیک نمائید.

۴- سپس حلال ها را به دستگاه متصل نمائید گازهای اضافه حلال می تواند در ستون ایجاد تداخل نماید لذا حتماً باید هواگیری انجام شود

۵- سیستم را روشن نمائید و سایر قسمت های سخت افزاری دستگاه را روشن نمائید.

۶- تنظیمات مربوط به پمپ و دتکتور را با توجه به متود انجام دهید.

۷- شستشوی ستون بر اساس متود و با حلال متناسب با آن باید انجام شود.

۸- حلال ها می توانند به صورت تکی یا چند حلاله با تنظیم درصد خاص از هر کدام وارد شوند.

۹- تنظیمات مربوط به دتکتور و پمپ باید از طریق نرم افزار انجام شود.

۱۰- نمونه را در loop injection توسط سرنگ مخصوص تزریق کنید. قبل از تزریق شیر را در حالت load قرار داده و تزریق را انجام داده، سپس نرم افزار را راه اندازی کرده (کلید start) و شیر را به سمت پایین (حالت تزریق) قرار دهید. مقدار اضافه نمونه از انتهای loop خارج می شود.

۱۱- پس از اتمام فرآیند آنالیز نمونه دکمه توقف (stop) را زده و از کروماتوگرام خود انتگرال گیری می کنیم.

۱۲- بعد از کار با دستگاه مجدداً ستون را با حلال های فاز متحرک، هر کدام بطور جداگانه و به صورت ترکیب

شستشو دهید

۱۳- بعد از اتمام کار سیستم و دستگاه را خاموش نمایید.

### نکات ایمنی و کنترل کیفی قبل از انجام کار و حین کار:

بعد از اتمام کار دستگاه، مجدداً ستون را با حلال های فاز متحرک، هر کدام بطور جداگانه و به صورت ترکیبی

شستشو داده شود.

### نگهداری و مراقبت:

1- کلیه حلال های مورد استفاده در دستگاه HPLC ، باید از کیفیت عالی برخوردار بوده و از نوع grade HPLC باشند.

2- تمامی نمونه ها و محلولهای بافر تهیه شده، قبل از استفاده در دستگاه HPLC ، باید با فیلترهای ۰.۴۵mm صاف شوند

3- استفاده از حلالهای ناخالص و دارای کیفیت پایین، باعث جذب آنها در ستون، تغییر ویژگی و در نهایت گرفتگی ستون میگردد.

4- از اعمال تغییرات سریع دما یا فشار بر روی ستون، اجتناب کنید.