

مگنتو کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

چکیده

مگنتو کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLMC) یک روش کروماتوگرافی جدید با دو ویژگی متمایز است: (a) یک فاز ساکن با مساحت بالای سطح و خواص پارامغناطیسی متشکل از مگنتیت که در یک ژل سیلیکا قرار گرفته است و (b) یک میدان مغناطیسی (با شدت متغیر 0 تا 5/5 mT) که به طور انتخابی مواد پارامغناطیسی را در فاز ثابت با توجه به حساسیت مغناطیسی آنها نگه می‌دارد. این سیستم همچنین می‌تواند برای جدا کردن ترکیبات دیامغناطیسی مانند مولکول‌های آلی فعال از نظر بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد، اما این ابتدا باید با ترکیبات Fe و Cu کمپلکس شوند تا آنها را به پارامغناطیس تبدیل کند. در اینجا، ما setup تجربی و رابطه بین ضریب بازداری و شدت میدان مغناطیسی، یعنی نیروی برهمکنش کمپلکس‌ها را در رابطه با مگنتو مغناطیسی توصیف می‌کنیم. عبارت مشتق شده اغلب حساسیت مؤثر مغناطیسی ($\Delta\chi$) را فراهم می‌کند.

1. مقدمه

جداسازی ترکیبات مختلف با توجه به خواص مغناطیسی آنها در صنایع ساخت و استخراج از معادن معمول است [1,2]. با این حال، در سال‌های اخیر استفاده از این تکنیک در زمینه‌های دیگر مانند بیوتکنولوژی و شیمی تجزیه نیز گسترش یافته است [3]. با توجه به مزایای آن، از جمله سرعت، سادگی و گزینش پذیری، جداسازی مغناطیسی در زمینه روش‌های جداسازی کاربردی امیدوارکننده است. جداکننده‌های مغناطیسی صنعتی [4,5] برای جدا کردن ذرات فرومغناطیس یا پارامغناطیس یعنی موادی با حساسیت مغناطیسی مثبت (χ) استفاده می‌شود. با این وجود، بیشتر مولکول‌های بیولوژیکی مانند اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها دارای خواص دیامغناطیس (یعنی حساسیت منفی) یا پارامغناطیسی ضعیف (آنها تحت تأثیر میدان مغناطیسی نیستند) هستند. بنابراین بستر مغناطیسی نیاز دارد که برای ارتقاء بازداری مورد استفاده قرار گیرد. این بسترهای مغناطیسی معمولاً ذرات پلیمری با مگنتیت یا با سوسپانسیون‌های کلوئیدی ترکیبات پارامغناطیس است.

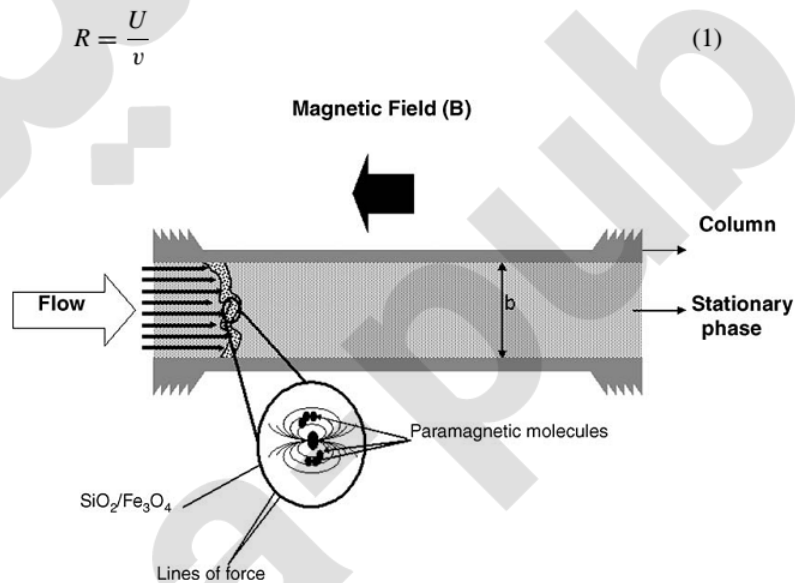
توسعه روش‌های جدید جداسازی ذرات مغناطیسی هدف چندین تیم تحقیقاتی بوده است. این تلاش‌ها منجر به ظهور مجموعه‌ای از تکنیک‌های جداسازی تجزیه‌ای شده است که مگنتوفورز نامیده شده است و برای توصیف مواد و ذرات پلیمر مورد استفاده قرار می‌گیرد [6-8]. بنابراین، سیستم تقسیم‌بندی جریان میدان (FFF) توسط Giddings در اواسط دهه 1960 و در اواخر دهه 1980 عرضه شد و در ابتدا بر اساس نیروهای گرانشی، حرارتی و الکتریکی بود. باین‌حال، در ابتدای سال 1980 استفاده از یک میدان مغناطیسی [9] این سیستم را به یک روش تجزیه‌ای با وضوح بالا و قابل اطمینان برای ذرات و پلیمرها از چند نانومتر تا 1 میکرومتر در حالت عادی و از 0.5 تا 100 میکرومتر در حالت استری تبدیل کرد [8]. روش تقسیم‌بندی نازک (SPLITT) بر اساس تفاوت در سرعت‌های حمل می‌تواند برای میدان‌های گرانشی [10] یا مغناطیسی [11] به کار گرفته شود و برای جداسازی ماکرومولکول‌ها، کلوئیدها و ذرات مفید باشد. روش SPLITT به ویژه برای جداسازی مولکول‌های بزرگ ($FW > 10^6$) مفید است. این تکنیک شناخته‌شده به نام مگنتوفورز [12] از فرروگرافی، یک روش تجزیه‌ای بر اساس رسوبدهی روی ذرات بسته به یک میدان مغناطیسی در یک جریان آزاد، تکامل می‌یابد و الگوی رسوبدهی ذرات حساس به مغناطیس از محیط معلق تحت جریان به دقت کنترل شده و شرایط میدان مغناطیسی تولید می‌شود.

در الکترو مگنتوفورز (EMP)، نظریه‌ای که توسط کلین [13] ساخته شد، ذرات از طریق یک محلول الکترولیت در جهت عمود بر میدان مغناطیسی و جریان الکتریکی مهاجرت می‌کنند، زمانی که جریان الکتریکی از طریق سیال رسانا و همگن میدان مغناطیسی عمود بر جریان به کار برده می‌شود [14]. درنهایت، جداسازی مغناطیسی با گرادیان بالا (HGMS) یک فرایند جداسازی قوی با پتانسیل عالی برای تصفیه فاضلاب صنعتی است. HGMS عمدتاً بر نیروی مغناطیسی به‌عنوان یک مکانیسم برای جذب ذرات بر روی جمع‌کننده‌ها استوار است [15, 16]. در این مقاله، ما یک مرحله دیگر را برای توسعه سیستم کروماتوگرافی که در آن فاز ساکن از ذرات با خواص پارامغناطیسی تشکیل شده است، پیش می‌بریم. این ذرات، همراه با آنالیت‌ها توسط فاز متحرک شسته می‌شوند و تحت تأثیر میدان مغناطیسی خارجی با شدت کم قرار می‌گیرند، که نقش کلیدی در فرآیند جداسازی را بازی می‌کند. بنابراین، ما در نظر می‌گیریم که اصطلاح مگنتو کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLMC) به درستی تکنیک توسعه‌یافته را توصیف می‌کند. در

اینجا، یک عبارت نظری را برای توصیف اثر میدان مغناطیسی بر زمان بازداری آنالیت نشان می‌دهیم و کاربرد آن را با تعیین حساسیت مغناطیسی آمینواسیدهای نشان‌دار شده با مس نشان می‌دهیم.

2. نظریه

مدل پیشنهادی بر اساس وجود یک فاز ساکن از ذرات پارامغناطیسی است که تحت یک میدان مغناطیسی خارجی قرار گرفته است. در این شرایط، خطوط القایی در اطراف این ذرات واقع می‌شوند (شکل 1). آنالیت‌های پارامغناطیسی با گرادپان بالا به طور تصادفی در اطراف ذرات بسته‌بندی مغناطیسی توزیع می‌شوند. آنالیت‌های پارامغناطیسی می‌توانند جذب مایعی شوند که نزدیک به سطح فاز ثابت پارامغناطیس حرکت کندتری دارند تا مایعی که در حال حرکت سریع در فضاهای بزرگ‌تر ذرات است. جداسازی به علت تفاوت نیروی جاذبه اعمال شده با شیب بالا صورت می‌گیرد. حرکت پایین باند کامپوزیتی در جداسازی با استفاده از رشته‌های خارجی به وسیله‌ی نسبت رطوبت R که یک پارامتر بدون بعد است مشخص می‌شود [17]، که در آن U سرعت آنالیت و v سرعت جریان سیال است



عکس. 1. ویژگی‌های ستون کروماتوگرافی

ذرات در این سیستم جداسازی عمدتاً تحت تأثیر نیروی مغناطیسی، نیروی پسا، نیروی گرانشی و حرکت براونی قرار گرفتند. نیروی گرانشی موازی با جریان کانال و ناچیز بود و حرکت براونی برای ذرات میکرونی مورد استفاده در این مطالعه ناچیز است. بنابراین، ما بر نیروهای مغناطیسی و پسا در این سیستم جداسازی تمرکز کردیم. سرعت ذرات با

القای مغناطیسی از تعادل نیروی مغناطیسی و نیروی پسای حاصل می‌شود. نیروی مغناطیسی (F_m) که بر روی ذرات اثر می‌گذارد، می‌تواند به صورت تابعی از حساسیت مغناطیسی آن‌ها بیان شود. عبارت "مؤثر" اشاره به محیطی است که در آن جداسازی انجام می‌شود. از این رو، حرکت ذرات در یک میدان مغناطیسی تابعی از حساسیت مغناطیسی $\Delta\chi$ آن‌ها است و این نیروی مغناطیسی را می‌توان به این صورت [14، 18، 19] بیان کرد:

$$F_m = \frac{V\Delta\chi}{2\mu_0} \nabla B^2 \quad (2)$$

که در آن V حجم ذرات، μ_0 تراوایی مغناطیسی در خلأ، ∇ اپراتور گرادیان و B شدت میدان مغناطیسی است. نیروی پسا (F_d) را می‌توان به صورت [20] بیان کرد:

$$F_d = 3\pi\eta dU \quad (3)$$

که در آن η ویسکوزیته حامل، d قطر ذرات و U سرعت مهاجرت ذرات است. بنابراین، سرعت القاء مغناطیسی (U_m) ذرات از تعادل نیروی مغناطیسی و نیروی پسا در معادلات (2) و (3) بدست می‌آید:

$$U_m = \frac{d^2 \Delta\chi \nabla B^2}{288\eta\mu_0} \quad (4)$$

معادله (4) نشان می‌دهد که سرعت القاء مغناطیسی به طور مستقیم با حساسیت مؤثر مغناطیسی ($\Delta\chi$) و شدت میدان مغناطیسی در اطراف ذرات ∇B^2 متناسب است. گرادیان اطراف ذرات به مغناطیسی شدن ذرات فاز ساکن مربوط است. از آنجایی که مغناطیس کردن ذرات با میدان اعمال شده متناسب است ذرات مغناطیسی متناسب با میدان کاربردی است، ما فرض می‌کنیم که یک رابطه‌ای بین شدت میدان مغناطیسی ذرات و ∇B^2 اعمال شده وجود دارد. بر طبق معادله (4)، افزایش در شدت میدان مغناطیسی اعمال شده (B) در ستون باعث افزایش مقدار U_m خواهد شد، سپس حرکت پایین‌تر آنالیت در کروماتوگرافی (زمان استراحت بالاتر) مشاهده می‌شود.

3. تجربی

3.1 استانداردها، معرف‌ها و نمونه‌ها

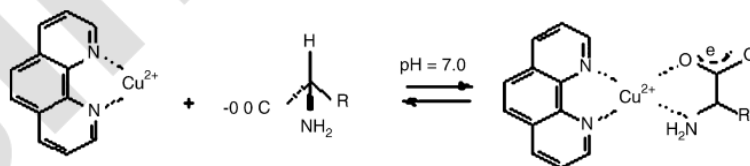
تمام محلول‌ها با حل کردن واکنشگر با گرید تجزیه‌ای در آب فیلتر شده و دیونیزه شده با مقاومت $18.3 \text{ M}\Omega\text{cm}$ و استفاده بدون تصفیه بیشتر تهیه شدند. محلول بافر فسفات (PBS) با مخلوط کردن مقادیر هم مولار از

یا HNO_3 با مقدار موردنظر از pH آن با مقدار موردنظر از HNO_3 یا NaOH تنظیم شد. یک محلول اسیدی 1 گرم در لیتر با حل کردن مقدار مناسب از هر اسید آمینه: گلیسین، آلانین، اسید بتا آمینو بوتیریک، لوسین، متیونین، هیستیدین و آسپاراژین (از آلدریچ) در PBS (0.1 M, pH 7) تهیه شد. محلول‌های استاندارد 30 میلی‌گرم در لیتر هر بار با رقیق کردن محلول استوک مربوطه تهیه شدند. این محلول‌ها در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای ایجاد خواص پارامغناطیسی در اسیدهای آمینه، آن‌ها را با حل کردن در محلول کمپلکس کننده $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ و 10،1- فنانترویلین در مقادیر استوکیومتری [21] در PBS (0.1 mol l^{-1}) مطابق با شکل 2 واکنش دادند. استانداردهای مورد استفاده توسط مخلوط کردن 1 میلی‌لیتر $\text{Cu}(\text{ophen})^{2+}$ (20 میلی‌مولار) با 300 میکرولیتر محلول استوک اسید آمینه و حجم کل تا 10 میلی‌لیتر با PBS تهیه شدند.

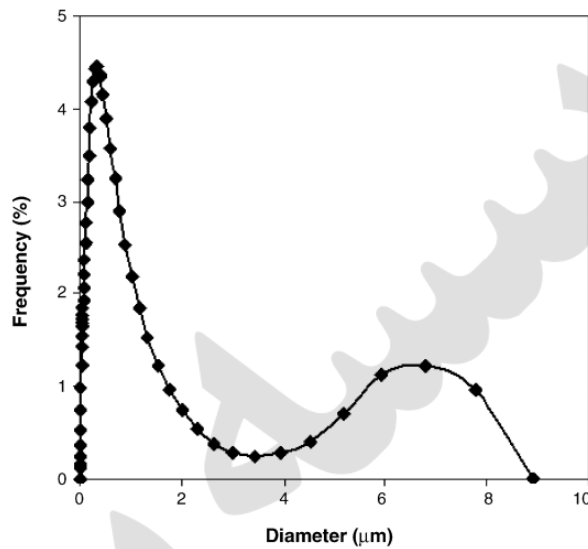
ترکیبات تشکیل شده در pH کار و قدرت یونی پایدار هستند.

3.2 سنتز فاز ساکن و آماده‌سازی ستون کروماتوگرافی

مگنتیت به‌طور هیدروشیمیایی با توجه به روش [22] Barrado و همکاران سنتز شد و به رآکتور حاوی 20 میلی‌لیتر تترا اتوکسی سیلان (TEOS)، 21/5 میلی‌لیتر آب و 16/7 میلی‌لیتر اتانول اضافه شد. پس از مخلوط شدن، pH با استفاده از NH_3 تنظیم می‌شود. هنگامی که ژل تشکیل شد، برای تکمیل روند تراکم، 24 ساعت هم زده شد. سپس ژل فیلتر شده، شسته و در دمای 50 درجه سانتی‌گراد برای 48 ساعت خشک می‌شود [23]. جامد سنتز شده فرومغناطیس است و در حضور میدان مغناطیسی دارای خواص مغناطیسی است و قدرت مغناطیسی القایی با شدت میدان مغناطیسی اعمال شده متناسب است. توزیع اندازه ذرات فاز ساکن با استفاده از یک متفرق کننده نور لیزر اندازه Horiba LA-900 با یک لیزر هلیوم نئون با طول موج 633 نانومتر و نرم‌افزار Horiba Data Systems تعریف شد.



شکل 2 واکنش کمپلکس کننده برای اعطای خواص پارامغناطیسی به اسیدهای آمینه.



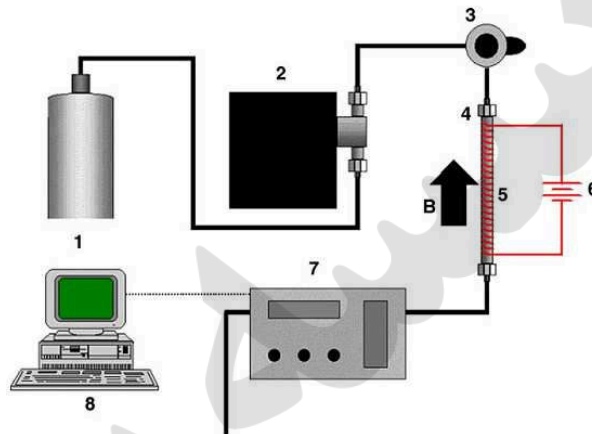
شکل 3. توزیع قطر فاز ساکن.

سنتز ژل xero در آب مقطر در دمای 25 درجه سانتی‌گراد پراکنده شد. نمونه به‌طور مداوم به‌منظور پراکنده شدن ذرات جامد در مخلوط هم زده شد. چند دقیقه بعد، اندازه‌گیری‌های پراکندگی نور لیزر انجام شد. توزیع فرکانس اندازه ذرات برای فاز ساکن ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$) در شکل 3 نشان داده شده است. دو توزیع به‌وضوح در شکل نشان داده شده است. متوسط قطر ذرات برای هر توزیع 0/5 و 6/8 میکرومتر است. اندازه ذرات کوچک‌تر به احتمال زیاد به علت ژل سیلیکا است، در حالی که اندازه دیگری با ژل سیلیکا تعبیه شده با مگنتیت مطابقت دارد. ستون استیل (4.6 میلی‌متر \times 10 سانتی‌متر) با یک سوسپانسیون $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ در محلول بافر فسفات ($\text{pH } 7, 0.1 \text{ mol l}^{-1}$) پر شد که سپس با استفاده از پمپ خلأ مکیده می‌شود. ستون با عبور PBS از میان این ستون در یک سرعت ثابت 1/0 میلی‌لیتر در دقیقه تهویه شد.

3.3. تجهیزات و شرایط آزمایشگاهی

دستگاه مورد استفاده شامل اجزای اساسی مورد استفاده برای کروماتوگرافی مایع است (شکل 4): یک ظرف برای فاز متحرک، یک پمپ فشار گاز مدل 302 گیلسون، یک مد Rheodyne. شیر تزریق 7525، یک ستون به‌عنوان مشخص شده در بالا و اسپکترومتر HP8453 UV-vis به‌عنوان آشکارساز است. ستون با یک کوپل مسی (300 دور)

پیچیده شد تا شدت میدان مغناطیسی خارجی (B) را (از 0 تا 5.5 mT) با تغییر جریان اعمال شده به سیم پیچ توسط منبع تغذیه (SCIE-PLAS, mod PSU 400/200) تنظیم کند.

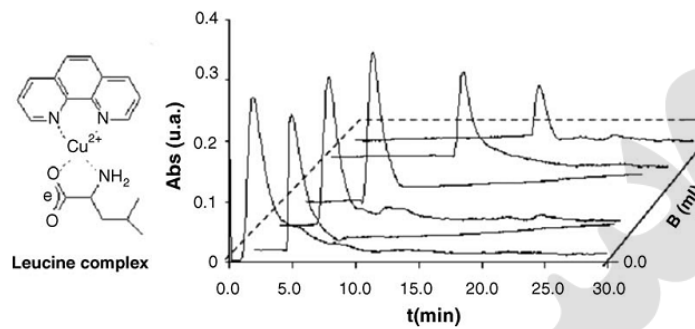


شکل 4: اجزای اصلی تنظیم (1) HPLMC فاز متحرک، (2) پمپ فشار بالا، (3) شیر تزریق، (4) ستون، (5) سیم پیچ مس، (6) منبع تغذیه (برای تنظیم شدت میدان مغناطیسی، B)، (7) آشکارساز و (8) کامپیوتر. شدت میدان مغناطیسی با استفاده از بیان $H = nI/l_c$ محاسبه شد، که در آن H قدرت میدان مغناطیسی (Am^{-1})، n تعداد پیچ خوردگی در سیم پیچ، I جریان اعمالی (A) و l_c طول سیم پیچ (متر) است. کمپلکس های پارامغناطیس آماده شده در طول موج 266 نانومتر تشخیص داده شد. فاز متحرک متانول- (25:75) PBS، pH 7 بود و حجم تزریق 25 میلی لیتر بود.

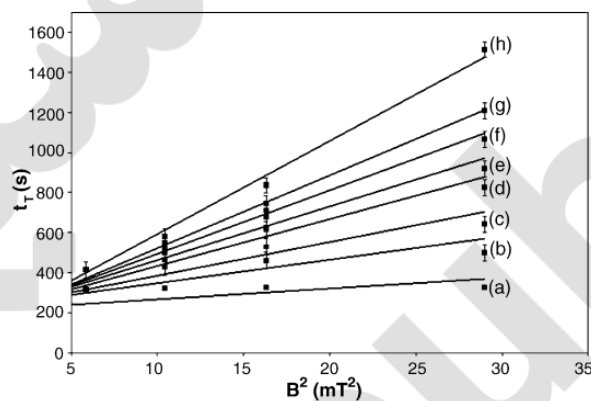
4. نتایج و بحث

برای تعیین نحوه کار این روش، اثر شدت میدان مغناطیسی بر زمان بازداری تعدادی از ترکیبات کمپلکس های سه تایی Cu^{2+} -اورتو فنانترولین-آمینواسید در هنگام تزریق به فاز متحرک (متانول-25:75 PBS، pH 7) در شرایط ذکر شده بررسی شده است. سرعت جریان فاز متحرک 1 میلی لیتر در دقیقه، طول موج تشخیص 266 نانومتر و حجم تزریق 25 میکرو لیتر.

به عنوان مثال، شکل 5 نتایج حاصل از استفاده از L-leucine را نشان می دهد. ممکن است مشاهده شود که زمان بازداری با شدت میدان مغناطیسی افزایش می یابد.



شکل 5 اثر شدت میدان مغناطیسی (B) بر زمان بازداری یک کمپلکس پارامغناطیسی L-leucine. غلظت کمپلکس، $7.6 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ؛ فاز متحرک، بافر متانول فسفات (25:75 (v/v) $\text{pH} 7$)، 0.1 mol l^{-1} ، جریان 1 میلی لیتر در دقیقه. ستون $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (100 میلی متر \times 4.6 میلی متر I.D)؛ طول موج تشخیص، 266 نانومتر؛ حجم تزریق 25 میکرو لیتر.

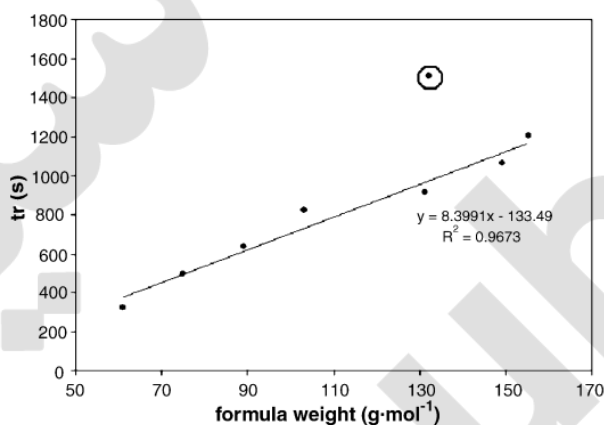


شکل 6 نمودار t_r (s) در برابر مربع میدان مغناطیسی (mT^2).

(a) $\text{Cu}(\text{o-phen})^{2+}$ ، (b) گلیسین، (c) آلانین، (d) β -آمینوبوتیریک اسید، (e) لوسین، (f) متیونین، (g) هیستیدین، (h) آسپاراژین. شرایط آزمون به عنوان شکل 5 توضیح داده شده است.

هنگامی که شدت یک میدان مغناطیسی با قدرت متفاوت تا صفر بر ستون اعمال شود ذرات Fe_3O_4 که روی سطح بستر SiO_2 (فاز ساکن) تحت القاء مغناطیسی قرار می گیرند، میدانی ایجاد می کنند که در میدان خالص حس شده توسط آنالیت های پارامغناطیسی مشارکت می کند. در غیاب همرفت و زمانی که شدت میدان مغناطیسی به اندازه کافی بزرگ تر از نیروی پسا است، نیروی مغناطیسی ایجاد شده توسط میدان خارجی می تواند جذاب باشد و در برخی موارد به اندازه کافی بزرگ باشد تا اجازه دهد که مگنتیت آنالیت های پارامغناطیسی را نگه دارد مانند موارد جداسازی

مغناطیسی با گرادیان بالا [15,16]. در امتداد قدرت صفر میدان ($U_m = 0$)، آنالیت‌های پارامغناطیسی زمان مشابهی را برای شستشو در نظر می‌گیرند. سپس حرکت با نیروی پسا مرتبط است و مقدار نسبت بازداری نزدیک به 1 است. این موضوع برخی بازداری‌های غیرانتخابی این کمپلکس‌ها در قدرت میدان صفر را نشان می‌دهد. نتایج بدست آمده، افزایش زمان بازداری را با افزایش شدت مغناطیسی ثبت شده نشان می‌دهد که احتمالاً به دلیل برهمکنش مغناطیسی با جداسازی مغناطیسی Fe_3O_4 است. با توجه به مدل پیشنهادی، زمان بازداری به مربع شدت میدان مغناطیسی اعمال شده مربوط می‌شود. شکل 6 نتایج را برای تمام اسیدهای آمینه مورد آزمایش شامل L-leucine نشان می‌دهد. درواقع، رابطه خطی بین 5 تا 30 mT^2 ممکن است در هر مورد اشاره شود و این رابطه همیشه ضریب همبستگی نزدیک به یک را نشان می‌دهد.



شکل 7 تغییرات زمان بازداری ترکیبات مختلف اسیدآمینه با توجه به وزن فرمول آن‌ها ($g \cdot mol^{-1}$).

شکل 7 همچنین رابطه خطی بین زمان بازداری t_r و فرمول وزن ترکیب را نشان می‌دهد به طوری که $t_r = 8.399$ FW-133.5 است. با استفاده از این عبارت برای محاسبه وزن فرمولی آسپاراژین مقدار 196.15 گرم در مول به دست می‌آید که از مقدار واقعی آن 132.1 گرم در مول به میزان 64.05 گرم در مول متفاوت است. این تفاوت دو برابر وزن فرمولی متانول ($32.04 \text{ g} \cdot mol^{-1}$)، یکی از اجزای فاز متحرک است. بنابراین، به نظر می‌رسد که حلال به طور جدی به ساختار کمپلکس فلز/آسپاراژین کمک می‌کند، و یک پدیده در هنگام کار با کمپلکس‌های فلزی حل شده دیده می‌شود [24].

5. نتیجه‌گیری‌ها

ما یک روش کروماتوگرافی جدید را ارائه می‌کنیم که HPLMC است. این ابزار تجزیه‌ای اولین بار به جداسازی کروماتوگرافی مولکول‌هایی دارای قدرت پارامغناطیس ضعیف در محلول، بر اساس استفاده از یک میدان مغناطیسی دست یافت. از مزایای آن این است که میدان مغناطیسی خارجی موردنیاز بسیار کمتر از آن چیزی است که در تکنیک‌هایی مانند FFF، SPLITT و مگنتوفورز استفاده می‌شود، همچنین تجهیزات موردنیاز را به حداقل می‌رساند. آنالیت‌های پارامغناطیسی با حساسیت مغناطیسی بالا در یک نمونه می‌توانند با استفاده از یک گرادیان میدان مغناطیسی جدا شوند. این روش می‌تواند به‌عنوان یک ابزار انتخابی کیفی و کمی، با ضمیمه کردن مولکول‌های دیامغناطیس با مرکز پارامغناطیس (تشکیل کمپلکس‌های فلزی) در قدرت یونی خاص و مقادیر pH مورد استفاده قرار گیرد. این روش همچنین برای جداسازی و تشخیص بسیاری از آنالیت‌های مختلف مانند آمینواسیدها، پپتیدها و پروتئین‌ها و برخی از فلزوپروتئین‌ها مفید است.