الفصل السادس عشر

الطرق الكروماتوغرافية العمودية – السائلة

إن كروماتوغرافيا السائل (liquid Chromatography) تُعَدُّ نوعًا من الكروماتوغرافيا، تم اكتشافه منذ عام 1890م، عندما نجح المواطن الروسي ميخائيل تيزويت بفصل عدة أصباغ نباتية مستخدماً عموداً مملوءاً بكربونات الكالسيوم كوسط ساكن، والإيثر البترولي كوسط متحرك. واستطاع أن يفصل الأصباغ النباتية، وظهرت كل طبقة بلون مميز، ومن هنا أطلق على هذه الطريقة الكروماتوغرافيا، وتعني باللاتيني الكتابة بالألوان.

واستطاع مارتن وسينج بين عامي 1930-1940 استخدام وسط ساكن مدعوم بطبقة من السيلكا جل (Silica gel)، واقترحا استبدال الوسط المتحرك السائل باستخدام غاز مناسب، ومن هنا بدأ فرع آخر من الكروماتوغرافيا ويسمى كروماتوغرافيا الغاز.

واقترح مارتن وسينج استخدام حبيبات صغيرة الحجم في الوسط الساكن وضغطًا عالياً لتحسين عملية الفصل.

16- 1 أساسيات الكروماتوغرافيا السائل:

إن جهاز الكروماتوغرافي السائل يتكون في الغالب من ست وحدات رئيسة وتشمل: نظام تزويد الوسط المتحرك، المضخة، والمبرمج، صمام العينة، العمود، المقدر وأداة عرض البيانات (مسجل).

ويتكون نظام تزويد الوسط المتحرك من أوعية زجاجية، مثبت بكل وعاء صمام، يمكن من خلاله انتشار غاز الهيليوم ليمر خلال الوسط المتحرك على هيئة فقاعات، وذلك للتخلص من كل من الأكسجين والنيتروجين الذائبين في الوسط المتحرك، إذ إن وجود هذين الغازين في الوسط المتحرك يؤدي إلى تكون فقاعات في

هذا الوسط، وعند وصولهما إلى المقدر يظهر انحراف في الخط القاعدي الأساسي. وتؤثر هذه الغازات في كفاءة عمود الفصل. وحيث إن الهيليوم عديم الذوبان في كثير من السوائل فإن تمريره في هذه السوائل سيعمل على طرد كل من الأكسجين والنيتروجين، وبما أن الهيليوم عديم الذوبان فلن تتكون فقاعات في الوسط المتحرك، ومن ثَمَّ لن تتأثر كفاءة العمود ولا استجابة المقدر.

2-16 الكروماتوغرافيا السائلة – الصلبة (Adsorption Chromatography):

تتكون هذه الطريقة من عمود يحتوي على الطور الثابت الذي يكون عادة في حالة اتزان مع الطور المتحرك في أثناء عملية الفصل. والأوساط الثابتة تكون صلبة ويتم عليها ادمصاص المكونات المراد فصلها، أو مواد أيونية مثبتة على راتنج (تبادل أيوني)، أو تكون سوائل مثبتة على سطح صلب خامل، وتسمى هذه العملية التجزيء (Partitining)، أو مادة منخلية تفصل المواد حسب أحجام جسيماتها.

وفي حالة الطور الصلب كالسيلكا تتوزع المكونات بين الوسط الثابت والوسط المتحرك. وعند استخدام الظروف المثلى من حيث سرعة جريان الوسط المتحرك واختيار الأوساط الملائمة سواء الوسط الصلب أو الوسط المتحرك، فإن العلاقة بين تركيز المادة في الوسط الصلب والوسط المتحرك تكون علاقة خطية ينتج عنها منحنى كروماتوغرافي متماثل. وإذا ما حدث تغير في العلاقة بين تركيز المادة في الوسط الصلب (عن طريق ادمصاص أعلى مثلاً) والوسط المتحرك فهذا ينتج عنه منحنى كروماتوغرافي غير متماثل، مما يدل على نقص في كفاءة العمود، وتكون عملية الفصل بمجملها غير ناجحة، وعادة ما يؤدي تشبع الوسط الصلب إلى قلة الكفاءة في الفصل. ويمكن تنشيط هذا الوسط بوضع مادة جديدة أو برفع درجة الحرارة أو عن طريق تقليل تركيز المادة المراد فصلها حتى لا يكون ادمصاصها كبيراً على الوسط الصلب، ومن ثَمَّ يمكن تحسين عملية الفصل. وتم حديثاً استخدام مواد بوليميرية كوسط صلب ثابت، ومميزات هذه المواد أنها لا تذوب في

الماء وتكون ثابتة حتى في المحاليل الحمضية، حيث تكون درجة الحموضة pH قليلة جداً. وتتكون هذه البوليمرات من راتنج البوليستايرين المتقطع الشبكة. وفي حالة مواد التبادل الأيوني يمكن تثبيت مجاميع غير عضوية ذات شحنة مناسبة على سطح المادة البوليميرية مثل تثبيت مجموعة HSO_3.

16-3 الطور المتحرك:

إن اختيار الوسط المتحرك يتم بحيث تكون الخواص التجاذبية أكثر فاعلية في الوسط الثابت منها في الوسط المتحرك، فإذا كان الطور الثابت ذا خاصية قطبية كالسيليكا مثلاً، فإن الوسط المتحرك يكون غير قطبي. فمثلاً في هذه الحالة يستخدم الهيبتان العادي (n-heptane)، أو يستخدم مخلوطاً من الهيبتان مع كلوريد الميثيلين، إذ إن الوسط المتحرك يكون مؤثراً في معامل توزيع المواد المراد فصلها بين الوسط الثابت والوسط المتحرك. ويجب أن يعمل الطور المتحرك على استبقاء المواد داخل العمود لمدة كافية لفصلها ثم بعدها تخرج المكونات من العمود، إذ إنها لو مكثت مدة أطول فإن هذا سيؤثر في المنحنيات الكروماتوغرافية، وقد يؤدي إلى تداخلها ببعضها بعضًا. وهناك العديد من المذيبات التي قد تستخدم بمفردها أو يحضر خليط منها لكي تكون عملية الفصل عالية الكفاءة، ومن هذه المذيبات الماء، الكحول الإيثيلي، الأسيتون، الأيثر، البنزين، التلوين، رابع كلوريد الكربون مرتبة حسب تناقص قطبيتها.

16- 4 العمود الكروماتوغرافي وفصل المكونات:

يتم صنع العمود الكروماتوغرافي عادة من الزجاج، ويتراوح طوله بين 15–30سم وقطره حوالي 1.5 سم. ويوضع الصوف الزجاجي في نهاية العمود لتثبيت الطور الساكن. ويتم ملء العمود بالطور الثابت، ويراعى أن تكون حبيبات الطور الثابت صغيرة ومتماثلة في الحجم، وأن تكون دائرية ما أمكن. وتوضع المكونات المراد فصلها على الطور الثابت أعلى لعمود ثم يمرر الطور المتحرك. ونتيجة لاختلاف

تجاذب المكونات مع الطور الثابت، ولاختلاف وزن جزيئات المكونات يتم سريان المكونات داخل العمود بمعدلات مختلفة، حيث إن كل مكون ينفصل عن الآخر في أثناء سيرها داخل العمود متحركة مع الوسط المتحرك إلى أن تصل إلى المقدر، وهذا المقدر يسجل إشارة عندما يصل إليه كل مكون من مكونات العينة، وتظهر هذه الإشارات على هيئة منحنيات كروماتوغرافية، وتكون عملية الفصل ناجحة إذا كانت المنحنيات الناتجة متماثلة ومفصولة عن بعضها.

5-16 الكروماتوغرافيا السائلة – السائلة (كروماتوغرافيا التجزيء):

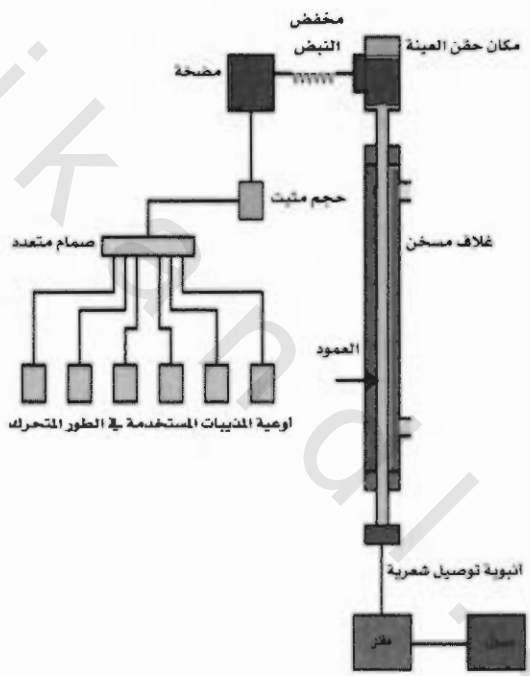
وتسمى هذه الطريقة كروماتوغرافيا التجزيء، حيث يكون الطور الثابت سائلاً يتم ادمصاصه على سطح مادة صلبة خاملة. وفي نوع آخر يكوّن السائل روابط كيميائية مع السطح الصلب الداعم، وهذه الطريقة تسمى حالة الربط (Bonded phase)، وأصبحت أكثر استخداماً من النوع الأول، حيث إن السائل المدمص على السطح الصلب غالباً ما يذوب في الطور المتحرك، وهذا يتطلب إعادة تثبيت السائل على السطح الداعم من فترة لأخرى. ويراعى دائماً أن يكون السائل المكون للطور الثابت أكثر قطبية من الوسط المتحرك إلا في حالة فصل مواد غير قطبية، ففي هذه الحالة يفضل أن يكون السائل المكون للطور الثابت أيضاً غير قطبي حتى يكون معامل التوزيع بين الطورين ذا قيمة عالية. وتستخدم في هذه الحالة دعامة صلبة غير قطبية من مسحوق المطاط، ويغطى بطبقة من سائل غير قطبي مثل البنزين ويمثل الطور الثابت. أما الطور المتحرك فيكون قطبي الجزيئات كالماء.

6-16 الكروماتوغرافيا السائلة ذات الضغط العالي

High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)

تتميز هذه الطريقة بالكفاءة والسرعة العالية، ويستخدم في هذه الطريقة عمود قصير يتراوح طوله بين 10-50 سم، وقطره الداخلي من 2-10 مم، والعمود مصنوع

من الفولاذ ليتحمل الضغط العالي المار به. ويجب أن تكون جدران العمود الداخلية ملساء حتى لا يحدث أي تغيير في شكل الوسط الثابت بداخل العمود، ولا تتكون جيوب من الوسط المتحرك مما يتسبب في زيادة عرض الطبقات، فتعطي بذلك كروماتوغراما غير متماثل يؤثر مباشرة في كفاءة العمود. وتتم تعبئة العمود بالطور الثابت، وهو عبارة عن حبيبات من الألومينا أو من السيلكا أو من مبادل راتنجي resin. وقد تغطي الحبيبات التي يبلغ قطرها بين 2-50 ميكروميترًا بطبقة رقيقة من سائل مناسب يعمل هذا السائل كطور ثابت.



شكل (16-1) مكونات جهاز كروماتوغرافيا الضغط العالي

كما يظهر في الشكل (16-1) فإن جهاز HPLC يتكون من مجموعة من الأوعية تحتوي على الوسط المتحرك الذي يمكن أن يكون سائلاً واحدًا أو مخلوطًا من السوائل، يتم اختيار نسبة كل من هذه السوائل عن طريق صمام الخلط. ويجب

طرد كل من غاز الأكسجين والنتروجين من هذا الخليط قبل أن تبدأ عملية الفصل، إذ إن وجود أي من هذين الغازين سيؤثر في استجابة المقدر، ولن يتم الحصول على خط قاعدي مستقيم، لذا يمرر غاز الهيليوم بداخل الوسط المتحرك لفترة تكفي لطرد أي غازات ذائبة بهذا الوسط، وبعد ذلك يتم ضخ الوسط المتحرك تحت ضغط مرتفع بواسطة مضخة إلى داخل الفرن خلال أنبوب حلزوني ليكتسب درجة الحرارة التي تتم عندها عملية الفصل. وفي بعض الأجهزة، يمرر الوسط المتحرك خلال عمود حماية يقوم بسحب أي مواد غريبة، مما يعمل على حماية عمود الفصل من هذه المواد لإطالة عمر هذا العمود. وتحقن العينة في الحاقن باستخدام إبرة حقن تستطيع حقن حجم بالمايكروليتر، ثم تمر العينة مع الوسط المتحرك بداخل عمود الفصل. وتحدث عملية الفصل نتيجة لتوزع مكونات العينة بين كل من الوسط الثابت والوسط المتحرك، ونتيجة للضغط العالي المستخدم وتفاوت الأوقات التي يمضيها كل مكون من مكونات العينة سواء في الوسط الثابت أو المتحرك، وباستخدام الظروف المثلى من معدل سريان الوسط المتحرك، ودرجة حرارة العمود والضغط المستخدم ينفصل كل من مكونات العينة داخل العمود، ويصل كل واحد منها إلى المقدر في أوقات مختلفة، وبذلك يظهر المنحنى الكروماتوغرافي على هيئة منحنيات متماثلة منفصلة عن بعضها. وتوجد عدة أنواع من المقدرات المستخدمة مثل مقدر الأشعة الفوق بنفسجية، وهو ذو حساسية للعديد من المركبات العضوية التي تمتص في مجال هذه الأشعة، كما يوجد مقدر يعمل على ظاهرة معامل الانكسار وكذلك المقدرات الكهروكيميائية والمقدر ذو التأين اللهبي. ومن المعروف أن كفاءة المقدرات في جهاز HPLC ليست بكفاءة المقدرات المستخدمة في كروماتغرافيا الغاز.

16- 7 تمارين على كروماتوغرافيا السائل:

أ. من المعلوم أن الوسط المتحرك يكون فاعلاً في عملية الفصل فكيف يتم اختيار الوسط المتحرك لتكون كفاءة الفصل عالية؟

2. اذكر بعض المواد التي تستخدم كوسط ثابت في كروماتوغرافيا السائل.

3. ما المبدأ الذي تقوم عليه كروماتوغرافيا التبادل الأيوني؟

4. لماذا يجب طرد الأكسجين والنيتروجين من الوسط المتحرك المستخدم في كروماتوغرافيا السائل؟

5. بين أهمية كروماتوغرافيا السائل ذات الضغط العالي ولم تُعَدُّ ذات كفاءة عالية؟

obeikandl.com