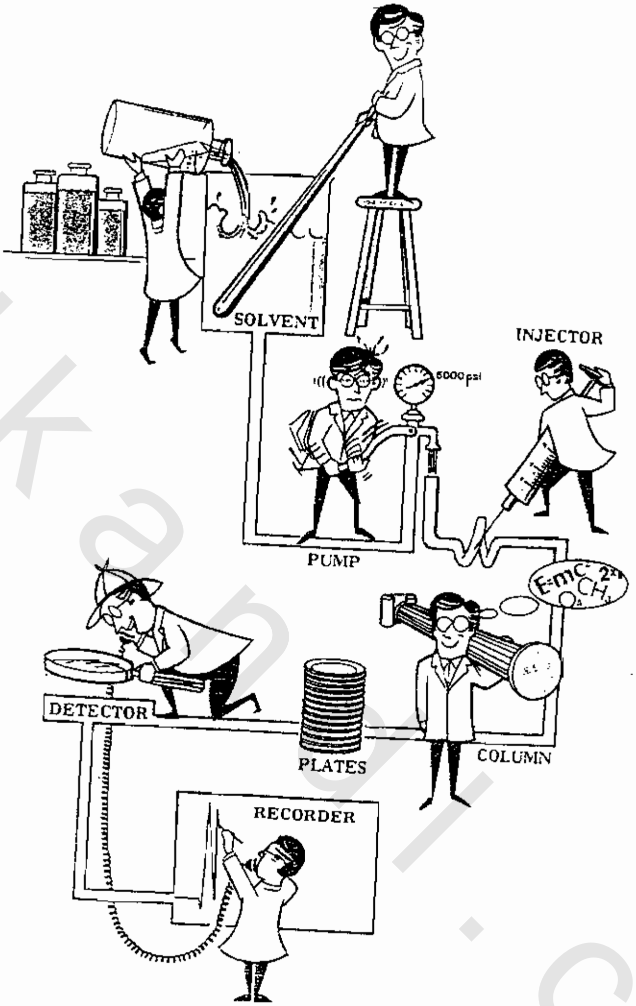
سادساً: التحليل الكروماتوجرافي السائل Liquid Chromatography

يرجع تاريخ الكروماتوجرافى الى عام ١٩٠٣ حين أجرى العالم الروسى M.Tswell تجاريه على فصل صبغات الكلوروفيل باستخدام عمود يحتوى على مسحوق الطباشير. ومضت حقبة من الزمن تم خلالها التغلب على مشكلتى: السرعة وكفاءة الفصل حيث تمكن العالمان Martin & Synge الحاصلان على جائزة نوبل عام ١٩٤٠ من وضع الأساس النظرى لميكانيكية الفصل الكروماتوجرافى الغازى وبذلك مهدا الطريق الى حدوث تطورات كبيرة من جهة الأجهزة والنظريات الخاصة بالتحليل الكروماتوجرافى الغازى ونتيجة لذلك ظهرت أجهزة التحليل الكروماتوجرافى السائل والتى تعتمد على استخدام طور متحرك سائل بدلا من الغاز- وفى البداية كانت أجهزة التحليل الكروماتوجرافى السائل غير دقيقة ثم تبع ذلك تحسينات تكنيكية سواء فى المضخات ذات الضغط العالى -المواد المعبأة- الكشف عن مكونات العينة.

يعتبر HPLC أحد الطرق الأساسية لتحليل العديد من المواد العضوية. وهو يمتاز مثل طرق التحليل الكروماتوجرافى الأخرى بالدقة والحساسية العالية كما أن مدى استخداماته لا تعتمد على تطاير العينة أو تأثرها بدرجة الحرارة كما هو الحال فى GLC ويمتاز جهاز HPLC بكفاءته العالية جدا بالإضافة إلى إستخدامه فى فصل العديد من المركبات المختلفة.

٦-١- أساسيات: Principles of HPLC

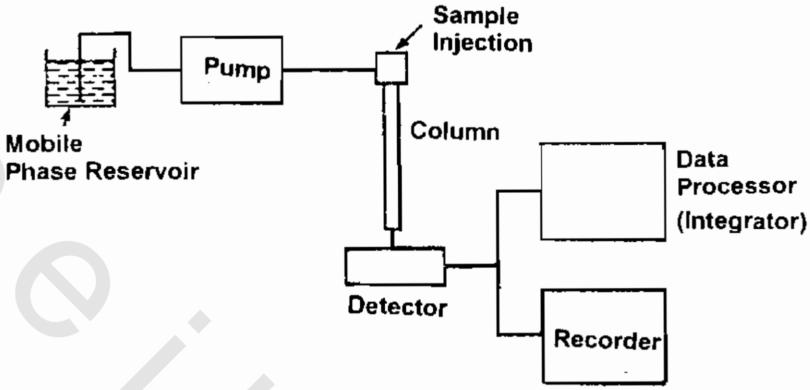
يتكون جهاز الكروماتوجرافى السائل من: مضخة- الحقن- العمود- الكاشف- المسجل. ويعتبر العمود هو قلب النظام. ويتكون الطور الثابت من جزيئات ذات حجم ميكرونى (micron size, 10^{-6} M) لذلك يحتاج الفصل الى مضخة ذات ضغط عال لدفع الطور المتحرك داخل العمود.



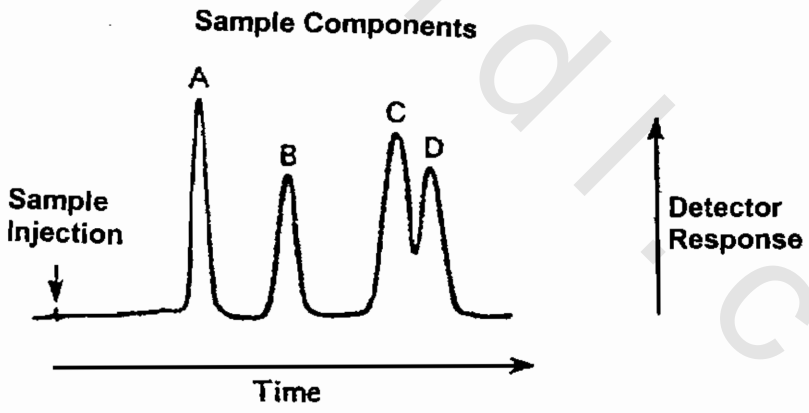
التحليل الكروماتوجرافى السائل

Liquid Chromatography

obeikandl.com



الأجزاء الرئيسية لجهاز التحليل الكروماتوجرافى السائل



كروماتوجرام يبين فصل مكونات العينة

obeikandl.com

يقوم جهاز HPLC بفصل مكونات العينة ثم التعرف عليها وتقديرها كميا. ويتم الفصل عن طريق توزيع العينة ما بين طورين أحدهما طور متحرك والآخر طور ثابت سائل أو صلب. وعادة يكون الطور الثابت فى عمود طوله حوالى ٢٥سم وقطره الداخلى ٤مم وتعتمد كفاءة الفصل على مواصفات العمود وبصفة خاصة على قطر جزيئات المادة المعبأة ويلاحظ أن خفض قطر الجزيئات يؤدى إلى تحسين أداء العمود ومن ناحية أخرى يرفع الضغط للحصول على معدل سريان مناسب للطور المتحرك خلال العمود ولهذا السبب فإن أجهزة HPLC الحديثة يعبر عنها بالضغط العالى للكروماتوجرافى السائل.

وبغض النظر إذا كانت المادة المعبأة ذات حجوم واحدة Uniform فإنه يتطلب ضغط عالى نسبيا لتعطى معدل السريان المطلوب وهو ٣ مل/ دقيقة فإذا كان العمود أبعاده ٢٥ × ٤ مم ومعبأة بجزيئات قطرها ١٥ ميكرومتر فإنه يتطلب حوالى ٣٠ ضغط جوى للحصول على معدل سريان ١ مل/ دقيقة من الهكسان والى ضغط جوى مقداره ٥٠ للحصول على معدل سريان مشابه للمذيبات الأكثر لزوجة مثل الماء والشكل فى صفحة (٧٠) يبين الأجزاء الرئيسية لجهاز HPLC. تدفع المضخة الطور المتحرك داخل عمود الفصل ثم يمر خلال الـ Detector فإنه يحدث تغير فى الإشارات الكهربائية حيث تسجل على خريطة متحركة لتعطى كروماتوجرام (صفحة ٧٠).

وبصفة عامة تبدأ العملية الكروماتوجرافية بحقن مكونات المخلوط Solutes فى قمة العمود- يحدث الفصل بعد دفع المخلوط والطور المتحرك داخل العمود وأخيرا ينفصل كل مكون من مكونات المخلوط على حدة من العمود- يكشف عن المركبات المفصولة سواء بكاشف عام universal أو خاص specific معتمدا على خواص مكونات العينة التى يجرى تقديرها. تظهر إستجابة الكاشف Detector response نتيجة لوجود أى مكون على ورقة المسجل Chart recorder

والذى يسمى بالكروماتوجرام. ولجمع وتخزين وتحليل النتائج الكروماتوجرافية فإنه يلزم وجود حاسب آلى Computer مرتبطا مع المسجل. والجدير بالذكر أن كاشف الكروماتوجراف يعطى إشارات Signals تظهر على شكل Peaks ذو شكل ناقوسى Bell shaped والذى يمثل تركيز المكون المفصول.

يمتاز الكروماتوجرام بالآتى :-

١- الوقت الذى يأخذه أى مركب يمر خلال العمود تحت ظروف موحدة يكون ثابتا ويسمى Retention time ومقارنة أرقام الـ Retention times مع المواد القياسية يعطى وسيلة للتحليل الوصفى.

٢- تتناسب المساحة تحت كل Peak فى الكروماتوجرام تناسبا طرديا مع تركيز المكون فى العينة وبالتالى فإن التحليل الكروماتوجرافى السائل يمكن استخدامه فى التقدير الكمى.

٦-٢- تركيب جهاز التحليل الكروماتوجرافي السائل:-

(١) المضخة Pump

الشروط الواجب توافرها فى جهاز ضخ المذيبات كما يلى:-

أ - تعطى مقدرة على ضخ المذيب بمعدل صفر- ١٠ مل/ دقيقة.

ب - الحجم الداخلى أقل ما يمكن بحيث يعطى معدل سريان للطور السائل ثابتا سواء عند مقدمة المضخة أو عند بداية العمود.

جـ - يجب أن تكون النبضات (معدل السريان/ الضغط) أقل ما يمكن حيث أن ثبات معظم أنواع الـ Detectors يتناسب عكسيا مع النبضات Pul-sation.

obeikandi.com

د- ذات قوة ضغط عالى تعطى سريان عالى للطور المتحرك خلال الأعمدة والضغط المطلوب يعتمد على لزوجة المذيب وحجم جزيئات المادة المعبأة بالإضافة إلى أبعاد العمود.

ولمنع نبضات الضغط فإنه يستعمل مضخة ذات مكبسين Dual Pistons بحيث يكون أحدهم دائما فى مرحلة الضغط والآخر فى مرحلة الملأ Refill.

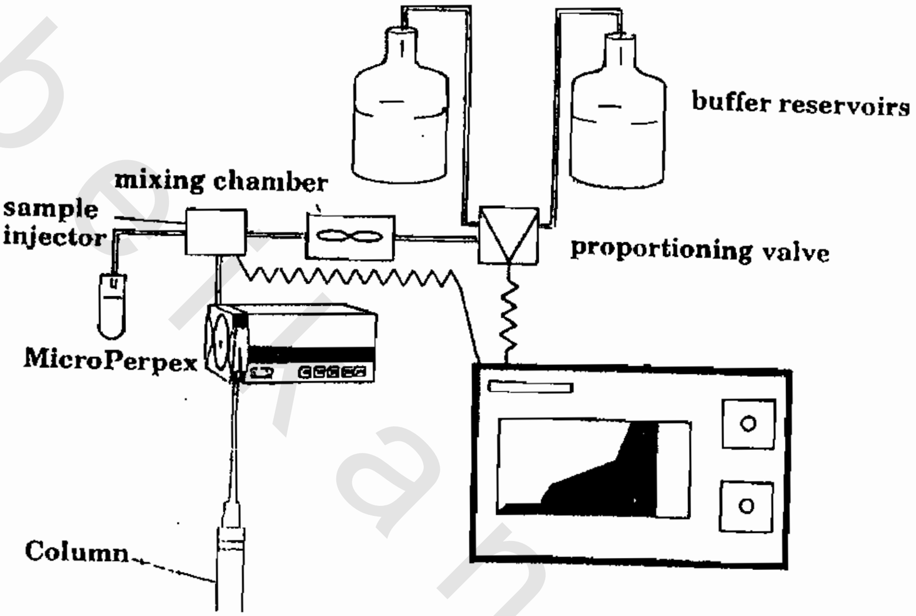
الإستخلاص التدريجي: Gradient Elution

فى بعض تطبيقات التحليل الكروماتوجرافى السائل HPLC يجب تغيير تركيب الطور المتحرك بطريقة محكمة ويسمى هذا التكنيك بالإستخلاص التدريجى ويبدأ الإستخلاص التدريجى بإستعمال طور متحرك معين واحد ثم يضاف إليه تدريجيا كميات متزايدة من المذيب الثانى خلال التحليل والتغيير المطلوب فى التركيب إما أن يكون زيادة خطية فى تركيز المذيب الثانى مع الوقت أو تركيب معقد (انظر صفحة ٧٤) توجد طرق متعددة لتغيير تركيب المذيب خلال عملية الاستخلاص التدريجى فبإستخدام مضخة لها مكبس ذو حركة ترددية Reciprocating Piston Pump تخلط المذيبات بعد خروجها من المضخة Down Stream بواسطة صمام توزيع Proportioning Valve ويوجد صمام تحكم Controller يعطى البروجرام المطلوب فى تغيير المذيب أثناء الفصل (انظر صفحة ٧٤).

حقـن العينـات: Sampling

توضع العينة داخل العمود إما بواسطة محقن Syringe أو بواسطة صمام حقن والمحاقن المستخدمة عادة فى GLC لا تصلح فى حالة الضغط العالى للتحليل الكروماتوجرافى السائل وتوجد محاقن خاصة للـ HPLC وصمامات

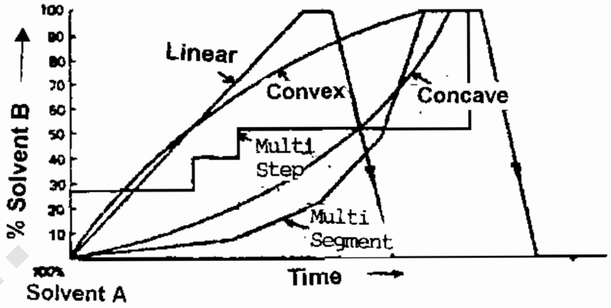
obeikandi.com



جهاز يبين الاستخلاص التدريجى

obeikandi.com

الحقن لها القدرة على الحقن عند الضغط العالى وهى أيضا تحقن حجوم مضبوطة Reproducible.



برامج الاستخلاص التدريجى

الأعمـــدة: Columns

إن أبعاد العمود فى جهاز HPLC هى ٢٥ x ٤مم وتصنع الأعمدة أحيانا من الزجاج وعادة تستعمل أعمدة مصنوعة من الصلب Steel نظرا لضغط الطور المتحرك العالى ويجب أن يكون الجدار الدخلى للأنبوبة المكونة للعمود ناعمة Smooth ويجب أن تكون المسافة ما بين العمود والـ Detector أقل ما يمكن لمنع استعراض الـ Peak ويتم التحليل بواسطة HPLC فى درجة حرارة الغرفة ولكن فى بعض الحالات فإنه من المرغوب أن تكون حرارة العمود مرتفعة ولذلك تستخدم أعمدة ساخنة حيث يجرى الفصل عند درجة حرارة تقع ما بين ٦٠–٨٠°م وأعمدة الـ HPLC غالية الثمن ولذلك يجب العناية بها لمنع تلف أدائها.

يوضع قرص Disc مسامى عند بداية العمود لمنع مرور أى مادة صلبة داخل العمود. ويلاحظ أن عدد n لهذه الأعمدة يتراوح بين ٥٠٠٠٠ إلى ٢٥٠٠٠٠.

الكواشـــف Detectors

بعد مرور الطور السائل داخل العمود يمر خلال الكاشف حيث يعطى خط Base Line ثابت ويجب أن يستجيب لمكونات العينة حيث يعطى إشارات كهربائية تظهر على هيئة كروماتوجرام ويجب أن تكون الإستجابة الكهربائية للكاشف تتناسب خطيا مع تركيز كل مكون فى العينة المراد تحليلها وهذا يؤدى الى تقدير مكونات العينة كميا. (انظر صفحة ٧٧).

وعادة تكون إستجابة معظم الكواشف خطية حتى حد معين وعلى ذلك وجب التأكد من أن الكاشف يعمل حتى مدى التركيز الخطى.

والكواشف المستخدمة فى حالة HPLC تقع تحت قسمين رئيسين:

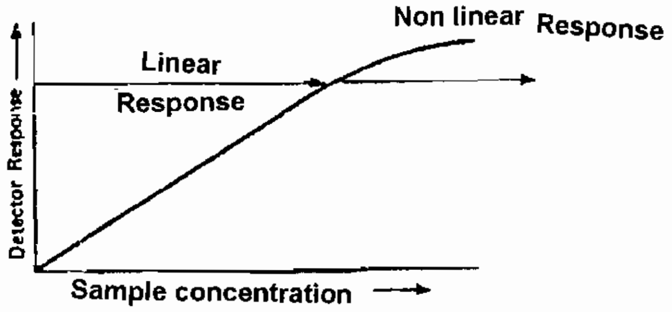
١- كواشف تقدر بعض خصائص الطور المتحرك مثل التوصيل أو معامل الإنكسار والكواشف من هذا النوع ذات حساسية منخفضة ولكنها تكشف عن أغلب إن لم يكن كل مكونات العينة.

٢ - كواشف تقدر بعض خصائص معينة لمكونات العينة مثل الإمتصاص عند أطوال موجية معينة والكواشف من هذا النوع لها حساسية عالية وليس من الضرورى أن تستجيب لكل مكونات العينة.

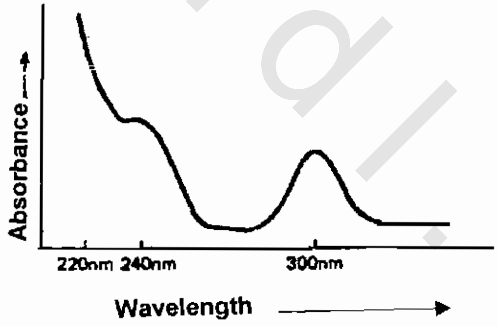
أولا: كاشف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية:

Ultraviolet absorbance detector.

يعتبر هذا الكاشف أكثر أنواع الكواشف انتشارا فى التحليل الكروماتوجرافى السائل ولا تحدث تكسير لمكونات العينة ويكشف عن تركيزات قليلة جدا تصل الى $١٠^{-٩}$ جم من العينة (نانوجرام) وطريقة عمله تعتمد على أساس أن العديد من المركبات العضوية تمتص إشعاعات فى منطقة UV والشكل فى صفحة (٧٧)



العلاقة بين استجابة الكاشف وتركيز العينة



العلاقة بين الإمتصاص عند أطوال موجية مختلفة وتركيز مكون العينة

obeikandl.com

يبين منحنى الإمتصاص الطيفى ويلاحظ أن أقصى إمتصاص يحدث عند طول موجة واحدة.

ويحدث نتيجة لإمتصاص أشعة UV تغير فى الطاقة الداخلية للجزىء وبالتالى تغير فى تركيبة الإلكترونى فالمركبات التى تحتوى على روابط مشبعة تمتص كمية قليلة من أشعة UV بالمقارنة بالمركبات غير المشبعة.

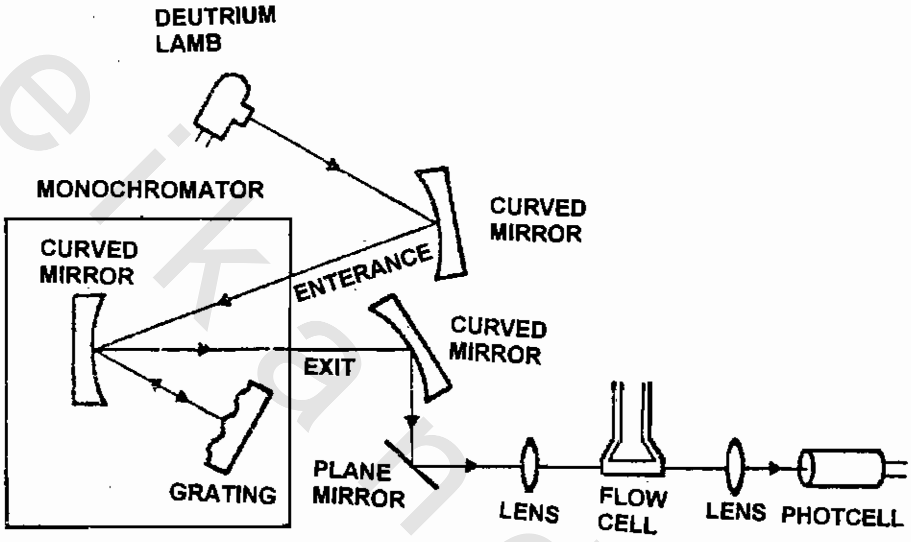
وفى الحقيقة أن الإمتصاص لوجود رابطة زوجية واحدة يكون نسبيا ضعيفا وتظهر أقصى إمتصاص عند طول موجة من ١٩٠– ٢٠٠ وفى حالة الروابط غير المشبعة المتبادلة Conjugated لمركب فإنه يمتص مقدار كبير وأن أقصى إمتصاص يتحرك نحو طول الموجة الأطول.

تسمى المجموعة الفعالة فى الجزىء والتى تسبب امتصاص فى UV مجموعة كروموفورية وتوجد مجاميع لا تمتص فى منطقة UV فى الجزىء ولكن تؤثر فى الـ Spectrum عن طريق انتقال أقصى امتصاص أو زيادة أو خفض قيمة الإمتصاص وبصفة عامة فإن المجاميع غير القطبية مثل الميثايل لها تأثير قليل فى حين أن المجاميع القطبية مثل الأمين أو النيترو تستطيع أن تغير جوهريا فى Spectrum الخاص بالمركب. والامتصاص فى منطقة الـ UV يحكمه قانون Beer- Lambert، الذى يربط ما بين نسبة الضوء الساقط الى الضوء الناقد مع تركيز المركبات فى محلول العينة وطول الخلية التى بها العينة وعند أى طول موجى فإن:

$$\text{Log } I_o / I = KCL \text{.............} (1)$$

ويعرف الإصطلاح $\text{Log } I_o / I$ باسم Absorbance والثابت K يسمى معامل الإمتصاص Extension Coefficient، ومن المعادلة (١) يتضح أنه

obeikandl.com



رسم تخطيطى يبين مكونات كاشف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية

obeikandi.com

عندما يمر شعاع فى منطقة الـ UV خلال محلول العينة فى خلية Cell ذات أبعاد ثابتة فإن الإمتصاص يتناسب خطيا مع تركيز العينة.

ومصدر إشعاعات UV فى حالة الكاشف UV لجهاز HPLC هو لمبة زئبق أو لمبة الديتريم ولمبة الزئبق تبعث دائما إشعاع ذو طول موجى واحد وهو ٢٥٤ نانومتر والكواشف التى تعمل بمصدر الإشعاع هذا تعمل فقط عند هذا الطول الموجى وللقياس عند أطوال موجية أخرى فإنه لابد من تغيير اللمبة ثم يخرج إشعاعات ذات أطوال موجية فى المدى من ١٩٠– ٣٨٠ وبإستخدامها مع موحد الموجات Monochromator فإنه يمكن إجراء التقدير الكمى على المدى ١٩٠– ٣٨٠.

والكواشف التى تعمل على أطوال موجية مختلفة تتميز عن الكواشف التى تعمل عند طول موجة واحدة بالآتى:–

١– يمكن ضبط طول الموجة التى تحدث عندها أقصى امتصاص للمادة المراد تقديرها للوصول الى أقصى حساسية.

٢– فى بعض التحليلات يكون لها الصفة الإختيارية Sensitivity فمثلا فى حالة التحليلات الدقيقة جدا Trace analysis فإنه يمكن التحكم فى اختيار طول الموجة التى عندها فقط تمتص المركبات الموجودة على هيئة آثار وبالتالى تمنع مشاكل التداخل من وجود مكونات ذات تركيز عالى بالعينة.

ثانيا: كاشف معامل الإنكسار Refractive index (RI)

يعتمد عمل هذا الكاشف على تقدير معامل الإنكسار للطور المتحرك حاملا المركبات المفصولة. يجب أن تكون درجة حرارة خلية العينة Sample cell

وخلية البلانك Blank Cell ثابتة وإن الإختلاف فى درجة الحرارة يكون فى حدود ٠,٠٠١م. وحساسية هذه الكواشف أقل من حساسية كواشف UV فهى تكشف فى حدود ١٠$^{-٦}$ جم من العينة (ميكروجرام). تستخدم هذه الكواشف فى حالة المركبات التى ليس لها خواص الإمتصاص.

ثالثا: الكواشف الفلورية: Fluorimetric

يعرض محلول المركبات المفصولة من العمود إلى أشعة فوق البنفسجية من هذه الكواشف عند طول موجة معينة Excitation wavelength (أشعة تؤدى الى تهيج مكونات العينة) وتخرج الطاقة الفلورية من محلول العينة عند طول موجى أطول Emission wavelength (طاقة انبعاث) وهى التى يجرى قياسها .تستخدم هذه الكواشف فى تقدير المركبات التى لها خاصية الفلورة أو مع المركبات التى تتحول الى مشتقات فلورية. تمتاز هذه الكواشف بأن لها حساسية أعلى من كواشف الأشعة فوق البنفسجية ولذلك تستخدم فى تقدير المركبات التى توجد على هيئة آثار.

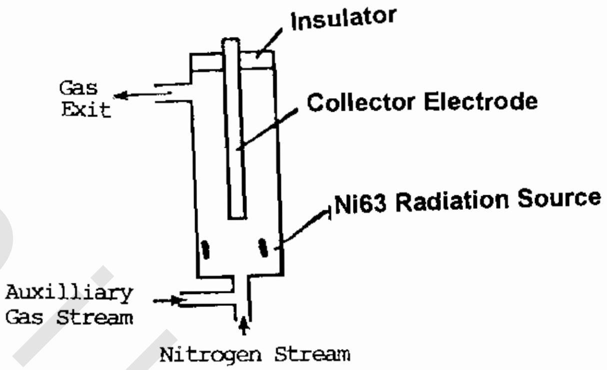
رابعا: Electron Capture detector (ECD)

يمتاز هذا الكاشف بحساسية عالية وله الصفة الإختيارية ويتكون من مصدر إشعاع Ni^{63} وزوج من الإلكترودات يمر خلالهما فولت قطبى Polarizing Voltage. يمر غاز خامل مثل النيتروجين خلال الكاشف الذى يحدث له تأين بواسطة الإشعاع Radiation. ونتيجة لهذا التأين يمر تيار ما بين الالكترودين الذى يكبر ويسجل. والشكل فى صفحة (٨٢) يبين تركيب الكاشف ECD.

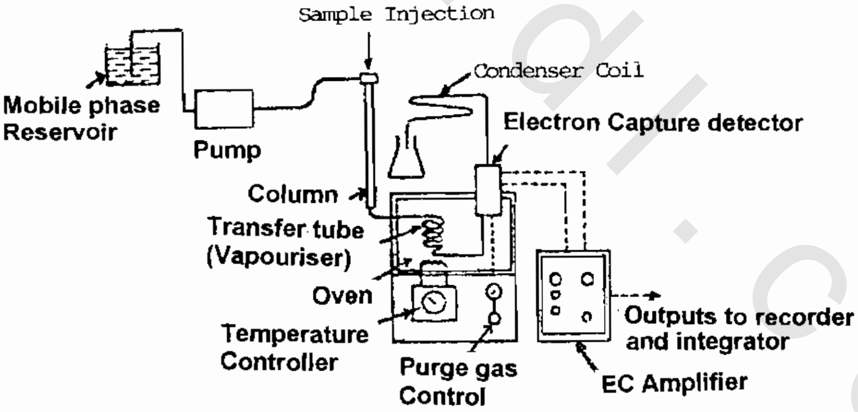
تظهر بعض المركبات تآلف للإلكترونات فإذا دخلت مادة من هذا النوع خلال ECD فتكون النتيجة هى خفض عدد الإلكترونات فى الحجرة وبالتالى يقل

$$N_2 + \beta \longrightarrow N_2^+ + e^-$$

تأين غاز النيتروجين بأشعة بيتا



أجزاء كاشف ECD



رسم تخطيطى يبين مكونات جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائل مزود بكاشف ECD

obeikandi.com

التيار المار ما بين الإلكترودين ومن ناحية أخرى نجد أن المركبات التى ليس لها تآلف للإلكترونات عند مرورها خلال الكاشف تحدث تأثير قليل أو ليس لها تأثير على Standing current وعلى ذلك فإن ECD له الصفة الإختيارية ويستجيب فقط للمركبات التى ترتبط بالإلكترونات مثل الهالوجينات ومركبات النيترو وبعض المواد الأخرى ذات الأنوية العطرية المتعددة.

يمر Column elutent خلال أنبوبة من الحديد الغير القابل للصدأ حيث يسخن الى درجة حرارة كافية لتطاير المذيب ومكونات العينة. ثم تمرر الأبخرة الى ECD عن طريق تيار من النيتروجين. وهناك أنبوبة متصلة بالـ ECD من الحديد الغير قابل للصدأ تعمل كمكثف حيث يجمع الطور المتحرك السائل.

وأن أفضل مذيب كطور متحرك فى نظام EC/ LC هو الذى يظهر أقل تآلف ممكن بالنسبة للإلكترونات مثل الهكسان أو الأيزوأوكتان ولكن يفضل كروماتوجرافيا استخدام طور متحرك أكثر قطبية. ويمكن استخدام طور متحرك يتكون من هكسان أو أيزوبروبانول مضافا اليه مذيبات مثل الميثانول- أيزوبروبانول- الخ.. وهذا يؤدى الى رفع قطبية الطور المتحرك وتسمى المذيبات التى ترفع من قطبية الطور المتحرك باسم Modifiers وتعتمد الكمية التى تضاف من هذه المذيبات على نوع الـ Modifier ومعدل السريان، فيما يلى أنواع الـ Modifier المعتاد إضافتها لرفع قطبية الطور المتحرك وهى: ٣٪ ميثانول- ٧,٥٪ ايزوبروبانول- ١٥٪ تتراهيدروفيوران- ١٠٪ Dioxin- ١٥٪ بنزين.

ويجب عدم استخدام مذيبات تحتوى على أكسجين حيث تعمل على الإرتباط مع الإلكترونات ولذلك يجب إمرار غاز النيتروجين خلال الطور المتحرك للتخلص من الأكسجين. أيضا يجب تخلص المذيبات من الشوائب التى ترتبط مع الإلكترونات.

٦-٣-الطـــور المتحـــرك: Mobile phase

يقوم الكروماتوجرافى السائل بتحليل العينات التى تختلف فى درجة ذوبانها ويتم فصل مكونات العينة نظرا لوجود تداخل Interaction ما بين مكونات العينة والمادة المعبأة والطور المتحرك- ويجب أن تذوب العينة فى الطور المتحرك كما يجب أن يلائم الطور المتحرك نظام الكشف Detection system فإذا كان الكاشف من نوع UV مثلا فإنه يجب على الطور المتحرك ألا يظهر أى امتصاص على طول الموجة التى يجرى عليها التقدير.

القطبيـــة: Polarity

يستخدم لفظ القطبية بكثرة فى التحليل الكروماتوجرافى لوصف خصائص المواد المعبأة داخل العمود -الأطوار المتحركة- والمواد عديمة القطبية هى التى لا تحتوى فى تركيبها الجزئى على مجاميع فعالة تكون روابط ايدروجينية مثل الهيدروكربونات المشبعة (هكسان مثلا) والمواد القطبية هى التى تحتوى على مجاميع فعالة مثل هيدروكسيل- أمين- كربوكسيل .... الخ.

وتقسم المذيبات المستخدمة فى جهاز HPLC كطور متحرك تبعا لقطبيتها ويختلف الى حد ما سلوك المذيب تبعا لنوع المواد المعبأة داخل العمود والشكل فى صفحة (٨٥) يبين عدة مذيبات مرتبة تبعا لقطبيتها باستخدام عمود معبأ بمادة السليكاجيل. ويمكن تحضير طور متحرك ذو قطبية معينة عن طريق خلط مذيبين أو أكثر يختلفان فى القطبية.

والجدير بالذكر أن الفصل الجيد فى حالة GLC يعتمد على اختيار العمود حيث توجد أعمدة معبأة بأطوار ثابتة عديدة وفى حالة HPLC فإن الفصل الجيد يعتمد على نوع وظروف الطور المتحرك وعلى ذلك:

تعتمد كفاءة الفصل على إتباع النقاط التالية:

١ – نوع الطور المتحرك سواء كان عضوى أو مائى.

٢– تركيب الطور المتحرك سواء أكان مذيب واحد أو أكثر من مذيب.

٣– درجة حموضة pH الطور المتحرك.

٤ – المواد التى تضاف الى الطور المتحرك مثل الأمينات– الأحماض– محاليل منظمة– منظفات.

Increasing polarity ↓

n-Pentane
n-Hexane
Iso-octane
cyclohexane
Diethyl ether
Chloroform
Dichloromethane
Tetrahydrofuran
Dioxan
Acetonitrile
Iso-propanol
Ethanol
Methanol
Water

* المذيبات شائعة الاستخدام فى جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائل مرتبة تبعا لقطبيتها

ويشترط فى الطور المتحرك ما يلى:-

١ – نقى

٢– رخيص الثمن وسهل الحصول عليه

٣– تذوب فيه مكونات العينة

obeikandl.com

٤- لا يغير فى طبيعة العمود.

٥- يلائم الكاشف.

٦- له لزوجة منخفضة.

٧- يمكن استرجاعه من العينة بسهولة وإعادة إستخدامه مرة أخرى إذا أمكن ذلك.

يجب قبل استخدام الطور المتحرك إتباع ما يلى:

١- يرشح قبل دخوله المضخة لمنع انسداد الصمامات Valves.

٢- يجرى إزالة الهواء من الطور المتحرك لأن الهواء يؤدى عند دخوله الى الكاشف الى تكوين noise بجانب الإشارات Signals.

تخلص الطور المتحرك من الهواء Solvent degassing

يذوب الهواء فى كل المذيبات المستخدمة كطور متحرك فى HPLC ومع ذلك فإن درجة ذوبان الهواء تختلف اختلافا كبيرا فالمذيبات القطبية وبصفة خاصة الماء لها درجة ذوبان عالية بينما المذيبات الغير القطبية مثل الهكسان لها درجة ذوبان منخفضة. ويؤدى الهواء المذاب فى المذيب الى تقليل كفاءة صمامات المضخة وأيضا عند استخدام كاشف UV تتكون فقاعات فى الخلية Flow cell مما يؤدى الى عدم ثبات Base line ولهذا يجب التخلص من الهواء فى المذيب قبل إستخدامه.

وهذا يتم بعدة طرق منها:-

١- غليان المذيب تحت مكثف عاكس يتبعه التبريد قبل الإستعمال.

٢- استخدام تفريغ.

obeikandl.com

٣- امرار غاز الهيليوم خلال المذيب حيث يحل الهيليوم محل الهواء الذى له درجة ذوبان منخفضة جدا.

٤- استخدام جهاز Ultrasonic لطرد الهواء.

توجد ثلاث طرق لإمرار الطور المتحرك خلال الطور الثابت وهى:

١- استخلاص متدرج Gradient elution.

٢- تدرج حرارى Temperature programming.

٣- تدرج فى معدل السريان Flow programming.

والتكنيك الأول هو الأكثر كفاءة حيث يعطى فصل واضح بالمقارنة بالطريقتين الأخيرتين.

يختلف الإستخلاص المتدرج عن الاستخلاص الثابت Isocratic elution

(استخلاص بطور متحرك ذو تركيب ثابت) فى أنه:

١- يقلل من حدوث Tailing للـ Peak.

٣- يقلل من مقدار عرض قاعدة الـ Peaks أى تزيد من حساسية وكفاءة الفصل.

التـــوزيع Distribution

عند إضافة مادة ما الى نظام مكون من سائلين لا يمتزجان فإنه تختلف قابلية هذه المادة للذوبان فى كلا السائلين وأن تركيز المادة فى الطورين تكون ثابتة عند درجة حرارة معينة وتعرف نسبة التوزيع بمعامل التوزيع Partition coefficient وفى حالة التوزيع الكروماتوجرافى يتم فصل مكونات العينة عن طريق استخدام التوزيع المنافس للعينة ما بين الطورين السائلين إحداهما الطور

obeikandi.com

الثابت داخل العمود والآخر الطور المتحرك. ويعتمد هذا التوزيع على الذوبان النسبى Relative solubility للمكونات فى كل الطورين. ونظرا لإختلاف الذوبان النسبى لمكونات المخلوط فإنها تمضى Spent أوقات مختلفة فى الطور الثابت وفى النهاية يخرج من العمود كل مكون على حده وعلى مدى التداخلات مع الطور الثابت فإنها تتحكم فى درجات الإرتباط (المركبات ذات الإرتباط المنخفض تخرج Elute من العمود قبل المكونات الأكثر ارتباطا). وتبعا لطبيعة خاصية التوزيع فإنه يوجد نوعان وهما الفصل العادى Normal phase والفصل المعاكس Reverse phase وفى حالة الفصل العادى يستخدم طور ثابت قطبى لفصل مكونات العينة القطبية وطور متحرك غير قطبى أما طريقة الفصل المعاكس فإنه يستخدم طور ثابت غير قطبى وطور متحرك قطبى لفصل المركبات غير القطبية.

Reverse phase chromatogram	**Normal phase chromatogram**
طور ثابت: غير قطبى	طور ثابت: قطبى
طور متحرك: قطبى	طور متحرك: غير قطبى
قطبية المخلوط: غير قطبى	قطبية المخلوط: قطبى

٦-٤- الأطوار الثابتة المرتبطة كيماويا

Chemical bounded stationary phases

يلاحظ فى الأعمدة المستخدمة فى أجهزة HPLC أن الطور الثابت يغطى مادة دعامية مثل السليكا ويرتبط فقط بقوى طبيعية Physical forces ويجب أن يظل تركيز الطور الثابت داخل العمود ثابتاً ولهذا فإنه من الضرورى استخدام طور متحرك لا يذيب الطور الثابت وأنه من الصعوبة عمليا وجود نظام يشتمل على طور ثابت/ طور متحرك لا يفقد من العمود باستمرار كميات من الطور الثابت نظرا لذوبانه فى الطور المتحرك وللتغلب على هذه المشكلة فإنه من

obeikandl.com

الممكن تشبيع الطور المتحرك بواسطة الطور الثابت قبل مروره داخل العمود وحيث أن الذوبان يعتمد على درجة الحرارة فإنه يجب أن يظل المتشبع Satura-tor والعمود عند نفس درجة الحرارة.

وهناك حل أفضل لهذه المشكلة وهو أن يرتبط الطور الثابت كيماويا على سطح المادة الدعامية وهذا يجعله غير ذائب فى الطور المتحرك وهناك العديد من التفاعلات المختلفة التى تستخدم لربط الجزىء العضوى الى سطح السيليكا كما فى المعادلات التالية (انظر صفحة ٨٩). الرابطة Si-O-R يمكن تحليلها مائيا وعلى ذلك يمكن استخدام مذيبات مائية كطور متحرك فى هذا النوع من الأعمدة والرابطة Si- R & Si- O- Si- R_3 شديدة الثبات ويمكن إستخدام هذه الأطوار الثابتة مع جميع المذيبات الشائعة فى أجهزة HPLC ونتيجة إختلاف التركيب الكيماوى للأكليل (R) فإنه يمكن الحصول على أطوار ثابتة مرتبطة كيماويا ذات مدى واسع من القطبية. والجدول فى صفحة (٩٠) يبين الرموز الكيميائية لأهم الأطوار الثابتة المرتبطة كيماويا على سطح مادة السيليكاجيل.

1. $\equiv Si - OH \quad + \quad ROH \longrightarrow \quad \equiv Si - O - R$

Silica surface

2. $\equiv Si - OH \quad + \quad R_3SiC1 \longrightarrow \quad \equiv Si - O - SiR_3$

3. (a)

$\equiv Si - OH \quad + \quad SoC1 \longrightarrow \quad \equiv Si - C1$

4. (b)

$\equiv Si - C1 \quad + \quad RLi \longrightarrow \quad \equiv Si - R$

تكوين الأطوار الثابتة المرتبطة كيماويا على مادة السلیكا

obeikandl.com

المواد المعبأه شائعة الاستعمال المحتويه على روابط كيماوية

stationary phase	Type	PELLICULAR	MICROPOROUS
octadecyl (c_{18})	non polar (aliphatic)	CO:PELL ODS PERMAPHASE ODS BONDAPAK C_{18}-CORASIL PERISORB RP	PATISIL 10 ODS ODS-HYPERSIL LICHROSORB C_{18}
phenyl	non polar (aromatic)	BONDAPAK PHENYL/CORASIL	
alkyl nitrate (cyano)	medium polarity	CO:PELLPAC	PARTISIL 10 PAC LICHROSORB-CN
ether	medium polarity	PERMAPHASE ETH	
alkyl amine ($-NH_2$)	medium polarity		LICHROSORB-NH_2
diol	high polarity		μ -BONDAPAK NH_2 LICHROSORB DIOL

يوجد نوعان من الأطوار الثابتة وهما:

النـــــوع الأول:

يعبأ العمود بمادة ذات محيط دائرى قطره حوالى ٤٠ ميكرون وسمك الطور الثابت حوالى ١-٢ ميكرومتر ويسمى Pellicular وهو سهل التعبئة وذو كفاءة فصل جيد.

النـــوع الثانـــى:

تستخدم جزيئات صغيرة جدا من مادة السيليكا مسامية (5-10 um) وهذه الجزيئات Micro particulate phase chromatography صعبة فى تعبئتها بالمقارنة بالنوع الأول ولكنها تعطى فصل أفضل بكثير.

وعموما توجد ثلاثة أنواع من الأطوار الثابتة وهى:

١- جزيئات شديدة الصلابة Solid particles

٢- جزيئات مسامية بدرجة بسيطة Pellicular resin

٣- جزيئات مسامية بدرجة عالية Porous resin

يتكون النوع الأول من مادة شديدة الصلابة Rigid وذات تركيب خارجى غير منفذ ونتيجة لسطحه الصلب فإنه يكتسب خاصية الفصل السريع ونظرا لصغر مساحة سطحه الخارجى فإنه تستخدم حجوم صغيرة من العينة وتقل كفاءة الفصل بزيادة حجم المخلوط المراد فصل مكوناته وعندما تكون مساحة السطح الخارجى للطور الثابت كبيرة كما فى حالة النوع الثانى فإنها تزيد من كفاءة الفصل وأيضا يزداد حجم المخلوط المحقون. وفى النوع الثالث ذو المسامية العالية فإنها تعطى فصل عالى جدا ولكن قد تزيد من وقت التحليل. ويوجد عامل آخر

هام يؤثر على الفصل وهو حجم الجزيئات. فالجزيئات ذات القطر الصغير تؤدى الى تحسين كفاءة الفصل وعلى ذلك يجب استخدام الجزيئات الصغيرة كلما أمكن ذلك. ووجد أن القطر المثالى وهو ٣ ميكرون كما أن قطر الجزيئات حتى ١٠ ميكرون تعطى فصل جيد وعند زيادة القطر عن ذلك تنخفض كفاءة الفصل- وهناك نقطة أخرى هامة وهى يجب أن تكون أقطار الجزيئات متجانسة وأن أى اختلاف فى القطر يؤدى إلى سلوك مكونات المخلوط مسارات متعددة وهذا يقلل من كفاءة الفصل.

والجدول التالى (صفحة ٩٣) يبين بعض المواد المعبأة المحتوية على روابط كيمياوية وشائعة الإستعمال.

اختيار المادة المعبأة والطور المتحرك:-

عند اختيار المادة المعبأة والطور المتحرك لفصل مكونات العينة بواسطة جهاز HPLC يجب الأخذ فى الاعتبار بالنقاط التالية:

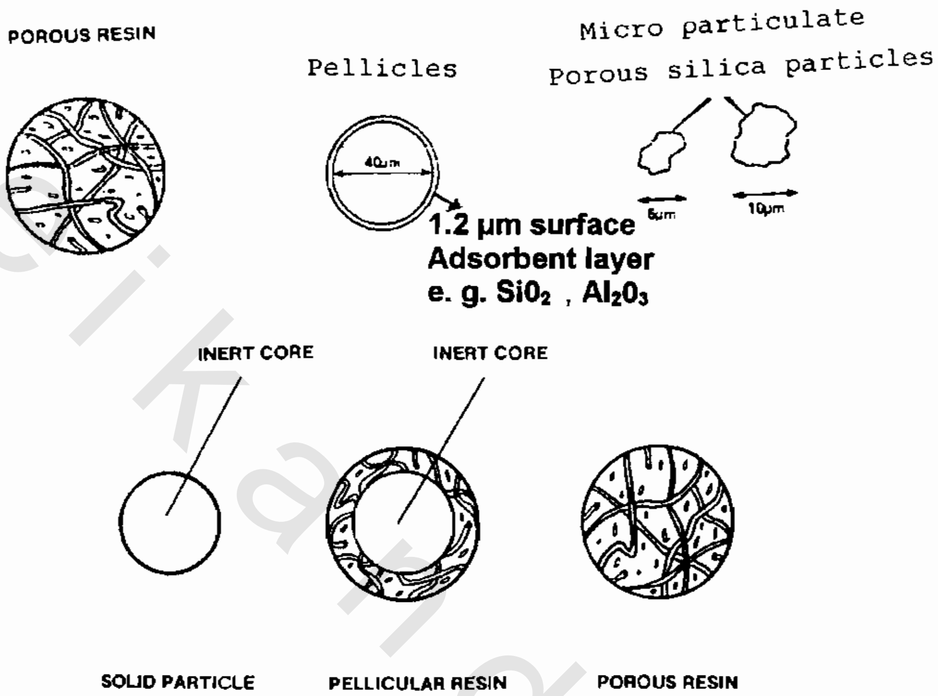
١- التركيب الكيماوى لمكونات العينة أو بمعنى آخر نوعية المجاميع الفعالة (حامضية، قاعدية، ألدهيدية... الخ).

٢- ذوبان مكونات العينة هل تذوب فى مذيب عضوى، تذوب فى ماء، تذوب فى قلوى، تذوب فى حمض.

٣- توافق استجابة مكونات العينة مع الكاشف.

٦-٥- التقدير الكمي Quantitative analysis

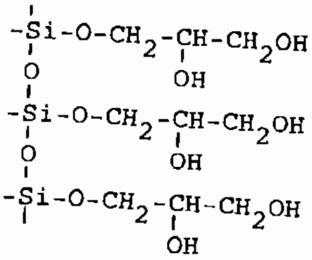
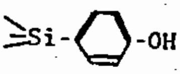
تختلف إستجابة الكاشف فى HPLC من مركب الى آخر فمثلا إستجابة UV تعتمد على معامل الإمتصاص لمكونات العينة وإستجابة الكاشف ECD يعتمد على تآلف إلكترونات العينة وأن أفضل طريقة للتقدير الكمى هى عمل Calibra-



* الاطوار الثابتة

obeikandl.com

* التركيب الكيماوى لبعض أنواع الأطوار الثابتة المرتبطة كيماويا على سطح مادة السيليكا

MODE	FUNCTIONALITY	STRUCTURE OF BONDED GROUP
NORMAL PHASE	AMINO	$-NH_2$
	CYANO (NITRILE)	$-CN$
	DIOI	
REVERSED PHASE	DIMETHYLSILYL	$=Si(CH_3)_2$
	OCTYLSILYL	$\equiv Si-CH_2-(CH_2)_6-CH_3$
	OCTADECYLSILYL	$\equiv Si-CH_2-(CH_2)_{16}-CH_3$
	PHENYSILYL	

obeikandl.com

tion لإستجابة الكاشف بإستخدام مركب قياسى Reference يضاف إلى محلول العينة أى طريقة Internal standardization وهى تشمل الخطوات التالية:-

١- يجرى تحليل للعينة للحصول على كروماتوجرام لمعرفة عدد ونوع مكوناتها. تختار مادة لا توجد ضمن مكونات العينة ولها وقت ظهور يقع ما بين Two peaks للعينة على الكروماتوجرام.

٢- تقدر استجابة الكاشف لكل مكون من مكونات العينة منسوبا الى المادة الداخلية وذلك بإجراء التحليل للعينة المحتوى على المادة القياسية ويجب معرفة تركيز كل مكون من مكونات العينة بالضبط ويلاحظ أن:

مساحة الـ Peak لأى مكون تتناسب طرديا مع تركيزه فى العينة.

.. مساحة الـ Peak = K x تركيزه فى العينة

حيث أن K هو معامل إستجابة الكاشف لمركب معين

وبالنسبة الى المكون A (انظر صفحة ٩٦) فإن:

Peak area (A) = K_A x Concentration (A)...... (١)

وبالنسبة للمادة القياسية الداخلية (IS) فإن

Peak area (IS) = K_{IS} x Concentration (IS)..... (٢)

بقسمة المعادلة (١) على المعادلة (٢) نستنتج ما يلى:

Peak area (A) / Peak area (IS) =(K_A/K_{IS}) x Concentration (A)/Concentration (IS) (٣)

تعرف النسبة K_A / K_{IS} بمعامل استجابة الكاشف للمركب A منسوبا الى المادة القياسية أو K_1 بالنسبة للمكون الأول وتجرى نفس العملية بالنسبة لباقى مكونات العينة لإستنتاج قيم معاملات الإستجابة لها (k_2, k_3, K_4,... etc).

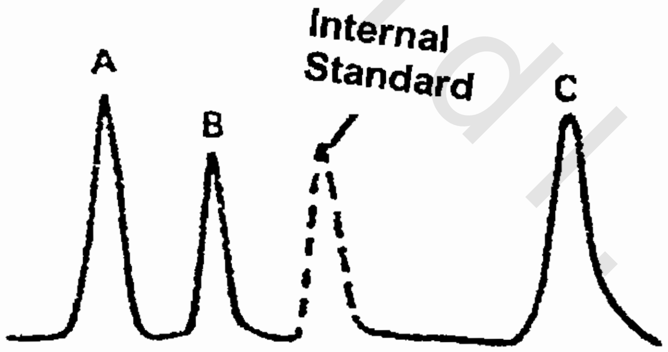
obeikandl.com

وعمليا تضاف كمية معروفة بالضبط من المادة القياسية الى العينة المراد تحليلها ثم يجرى التحليل بواسطة جهاز الكروماتوجرافى ومن المعادلة (٣) نستنتج المعادلة (٤).

Concen. (A) = Peak area (A) / Peak area (IS). Concen. (IS)/ K_1 (٤)

بوضع قيم مساحات الـ Peaks من الكروماتوجرام ومعاملات الإستجابة النسبية من التحليل Calibration analysis وتركيز المادة القياسية المضاف فى المعادلة (٤) فإنه يمكن حساب تركيز كل مكونات العينة.

وحيث أن هذه الطريقة تعتمد على نسبة مساحات الـ Peaks وليس على وزنة العينة فإن دقة القياس فى هذه الطريقة لا تعتمد على الكمية المحقونة بالضبط ولكن تعتمد على دقة حساب مساحات الـ Peaks.



* كروماتوجرام يبين فصل مكونات عينة ما بالإضافة إلى مادة قياسية داخلية

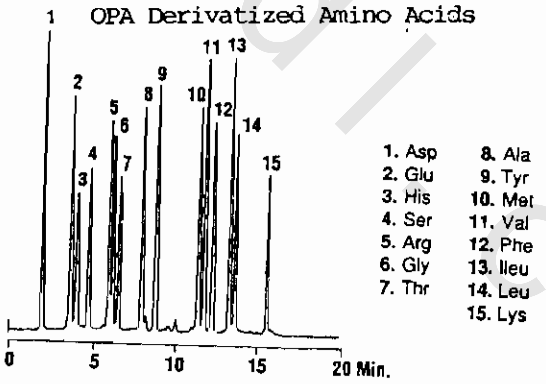
obeikandl.com

٦-٦- ظروف الفصل المختلفة لبعض مشتقات الأحماض الامينية:

١- مشتقات OPA للأحماض الأمينية:-

نوع العمود	Altima C18
أبعاد العمود	٢٥٠ X ٤ سم
تركيب الطور المتحرك	A: 50 mM Na Ac buffer, pH 5.7, 5% THF THF = Tetra Hydro furan
برنامج الاستخلاص التدريجى	الزمن (دقيقة) : صفر ١٥ ٥ B٪ : ١٠ ٦٥ ١٠
معدل سريان الطور المتحرك	٢ مل/ دقيقة
الكاشف	Fluorescence

الكروماتوجرام التالى يبين تتابع ظهور مشتقات OPA للأحماض الأمينية.



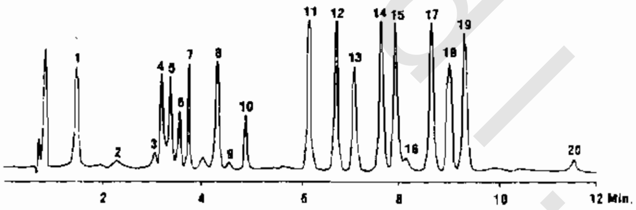
obeikandl.com

٢ - مشتقات الـ Dansyl للأحماض الأمينية:-

نوع العمود	Aquapore RP- 300 C8
أبعاد العمود	٢٢٠ X ٤,٦ مم
درجة حرارة العمود	٥٥ م
تركيب الطور المتحرك	A: 0.05 M Formic acid, 0.06 M Acetic Acid, to pH 2.6 with Na OH B: A with 35% V/V isopropanol
برنامج الاستخلاص التدريجي	الزمن (دقيقة): صفر ٣٠ ١,٥ ٨,٥ B%: صفر ٣٥ ١٠ ٨٥
معدل سريان الطور المتحرك	٤ مل/ دقيقة
الكاشف	UV عند طول موجه ٢٥٤

والكروماتوجرام التالى يبين تتابع ظهور مشتقات Dansyl للأحماض الأمينية.

Dansylated Amino Acids



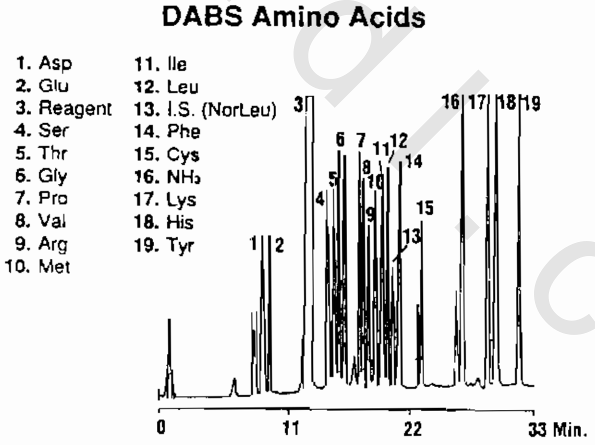
1. Cysteic acid
2. Histidine
3. Ammonia
4. Arginine
5. Serine
6. Aspartic acid
7. Glutamic acid
8. Threonine
9. Glycine
10. Alanine
11. Proline
12. Methionine
13. Valine
14. Norvaline
15. Phenylalanine
16. Cystine
17. Isoleucine
18. Leucine
19. Lysine
20. Tyrosine

obeikandl.com

٣- مشتقات DABS للأحماض الأمينية:-

نوع العمود	Spheri-RP-18
أبعاد العمود	٢٢٠ x ٤,٦ مم
تركيب الطور المتحرك	A: Na O Ac with 5% DMF, pH 6.5 B: Acetonitrile DMF: Dimethyl Formamide
برنامج الاستخلاص التدريجي	الزمن (دقيقة): صفر ٣٠ ٤٢ ٤٤ ٤٦ B%: ١٠ ٣٥ ٥٥ ٥٥ ٨٥
معدل سريان الطور المتحرك	١ مل/ دقيقة
الكاشف	UV/VIS عند طول موجه ٤٣٦

والكروماتوجرام التالى يبين تتابع ظهور مشتقات DABS للأحماض الأمينية.

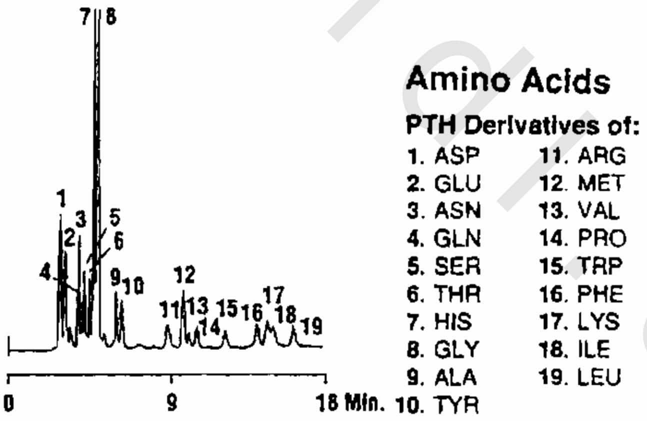


obeikandi.com

٤ - مشتقات الـ PTH للأحماض الأمينية:-

نوع العمود	Ultrasphere C18
أبعاد العمود	٢٥٠ X ٤,٦ مم
درجة حرارة العمود	٥٥ م
تركيب الطور المتحرك	A: 0.1 M Na OAc: Acetonitrile, pH4.9
معدل سريان الطور المتحرك	١ مل/ دقيقة
الكاشف	UV عند طول موجه ٢٥٤

والكروماتوجرام التالى يبين تتابع ظهور مشتقات الـ PTH للأحماض الأمينية.



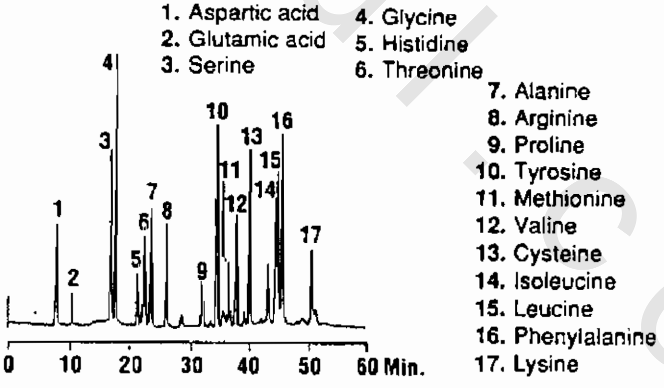
obeikandi.com

٥- مشتقات الـ PTH للأحماض الأمينية:-

نوع العمود	Econosphere- C8
أبعاد العمود	٢٥٠ x ٤,٦ مم
تركيب الطور المتحرك	A: 50 mM ammonium acetate, pH 4.6 B: 100 m M ammonium acetate, pH 6.8 Methanol (20: 80)
برنامج الاستخلاص التدريجى	الزمن (دقيقة) : صفر ٣٠ ١٢ ٣٠ B% : صفر ٣٥ ٢٠ ٣٠
معدل سريان الطور المتحرك	١ مل / دقيقة
الكاشف	UV عند طول موجه ٢٥٤

والكروماتوجرام التالى يبين تتابع ظهور مشتقات الـ PTC للأحماض الأمينية.

Phenylisothiocyanate (PTC)
Amino Acids



obeikandl.com

مميــزات طــرق HPLC

وقت الفصل يكون قصيراً، أكثر حساسية، ولا يحتاج الفصل الى درجة حرارة عالية No elevated temperature، ومع ذلك فإن طرق الـ HPLC لها عيوب.

عيــوب طـــــرق HPLC

تعتمد غالبية طرق فصل مشتقات الأحماض الأمينية على جزيئات السيليكاجيل الكروية Spherical silica gel المغطاة بطبقة من جزيئات عضوية ومرتبطة بروابط تساهمية. وهذه الطبقة تمثل الطور المعاكس Reversed phase وهى عبارة عن سلاسل هيدركربونية تحتوى على ١٨ ذرة كربون (C18 alkyl chain).

المشـــــكلة الأولــــى

تتمثل المشكلة الأولى فى محدودية Limited تماثل النتائج باستخدام أعمدة HPLC خاصة فى فصل الأحماض الأمينية. فمثلا تختلف كفاءة الفصل من عمود لآخر نظراً لاختلاف طريقة تحضير العمود بالمصنع. هذا يعنى أنه عند تغيير العمود لابد من الضرورى إجراء التجارب على العمود الجديد ليعطى الفصل المناسب. وتظهر هذه المشكلة بوضوح لانخفاض فترة صلاحية Life time استخدام أعمدة الطور المخالف. ويلاحظ أنه تنتهى صلاحية استخدام أعمدة الـ HPLC بعد حقن عدة مئات قليلة من العينات وبالتالى لابد من إهمالها Dis-carde أو إعادة تنشيطها Regenerate. ويلاحظ أنه عند تكوين مشتقات للأحماض الأمينية تصبح أكثر كرها للماء Hydrophobic عما كانت عليه، وهذا يؤدى إلى فصل بواسطة الطور الكروماتوجرافى المعاكس Reversed phase ولكن من ناحية أخرى فإن الخاصية الكارهة للماء تقلل بدرجة كبيرة الاختلافات

obeikandi.com

بين الأحماض الأمينية. بالإضافة إلى ذلك إذا احتاجت مشتقات الأحماض الأمينية إلى خطوة استخلاص فإن بعض الأحماض الأمينية يمكن فقدها جزئيا. وهذا يؤدى إلى تغيير فى تركيب محتوى الأحماض الأمينية وبالتالى الحصول على نتائج غير صحيحة.

المشكلة الثانية

تتمثل فى المجاميع الفعالة الأخرى الموجودة فى السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية فتكون الاستجابة قليلة لأحماض السيستئين، الليسين والهيدروكسى ليسين. أيضا يمكن للحمض الأمينى الواحد أن يعطى أكثر من Peak بدلا من Peak واحد بسبب تكون مشتقات مختلفة.

المشكلة الثالثة

تتمثل فى العينة نفسها Matrix of the sample. فمن النادر ما توجد عينة تحتوى فقط على أحماض أمينية ماعدا المخلوط القياسى للأحماض الأمينية. وقد تتداخل مكونات العينة مع الجواهر المستخدمة لتقدير مشتقات الأحماض الأمينية، وبالتالى نحصل على نتائج غير دقيقة.

سابعا: آلية فصل الأحماض الأمينية باستخدام المبادلات الآيونية

ان استخدام المبادل الكاتيونى Cation exchanger (طور ثابت) مع تغيير فى درجة حموضة pH المحلول المنظم (طور متحرك) فإنه يمكن فصل مدى واسع من الأحماض الأمينية، وهذه هى الفكرة الأساسية التى يعتمد عليها جهاز تحليل الأحماض الأمينية.

وفيما يلى توضيح أكثر لكروماتوجرافيا التبادل الأيونى:-

obeikandi.com