الفصل التاسع

الكروماتوجرافى الغازى

Gas - liquid chromatography

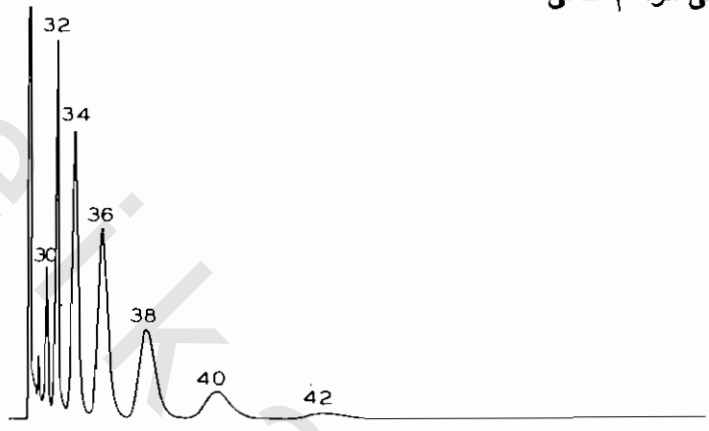
يعتبر الـ GLC بدون شك من أحسن الطرق التحليلية فى مجال كيمياء الليبيدات ويعتبر GLC طريقة فعالة لتقدير الأحماض الدهنية كميا فى مخاليطها وبالتالى فهى قادرة على اعطاء معلومات وافية من الاحماض الدهنية الغير المعروفة التركيب ويمثل GLC أحد أنواع التوزيع الكروماتوجرافى ولكن يختلف عن الأنواع الأخرى فى أن الطور المتحرك هو غاز والطور الساكن (الطور الثابت) يلتصق على مادة دعاميه خاملة كيماوية غالبا ما تكون من الـ Celite أو الطوب الحرارى ويعبأ فى أنبوبة قطرها ٣ – ٦ ملليمتر وطولها ١.٢ – ٦.٣ متر أو قد يغطى السطح الداخلى مباشرة لأنبوبة شعرية طولها ١٥ – ٦٠ متر تجرى عملية الفصل على درجة حرارة مرتفعة للمركبات ذات الوزن الجزىء العالى على العكس من المركبات ذات الوزن الجزئى المنخفض والغاز يمر خلال كاشف Detector الذى يقيس التغيرات فى الغاز .

يعتمد الفصل فى حالات التوزيع الكروماتوجرافى على الاختلافات فى معامل التوزيع للمركبات الموجودة فى المخلوط وهى تتأثر أيضا بمدى تطاير المكونات ومدى ذوبانها فى الطور الثابت وأيضا الوقت الذى يأخذه كل مكون أثناء مروره فى العمود .

وتفصل الاحماض الدهنية غالبا على صورة إسترات الميثايل باستخدام نوعين رئيسيين من الأطوار الثابته وهى القطبية Polar وغير القطبية Non - Polar وهى تختلف عن بعض بدرجة واضحة ويمكن إستخدام أطوار ثابتة مختلفة القطبيه وهى تعطى معلومات قليلة عن التركيب الكيماوى ولكنها مفيدة بدرجة ما لمعرفة تركيب الأحماض الدهنية – ويستخدم بكثرة الطور الثابت الغير القطبى Non - Polar مثل Apiezon greases أو تحضيرات Fluorinated Silicone و Non - Volatile hydrocarbons .

والأطوار القطبية Polar غالبا ما تكون عبارة عن إسترات عديدة مشتقة من كحولات ثنائية الأيدروكسيل dihydric مثل (ethylene glycol, diethylene glycol, propylene

glycol glycol, 1,4 - butanediol) وأحماض ثنائية القاعدة dibasic acids مثل (succinic, glutaric, adipic, suberic, Phthalic, iso - phthalic acids) والأطوار القطبية غالبا ما تكون أقل ثباتا حراريا من الطور الغير القطبى – عندما تجرى عمليات الفصل على درجة حرارة ثابتة isothermally تخرج المواد بسرعة من العمود على شكل شرائط وتظهر على المسجل على صورة Peaks وفى البداية يكون لـ peaks قمة حادة يتبعها Peaks ذات قمة مفلطحة كما فى الرسم التالى :



وبزيادة درجة الحرارة بصورة منتظمة temperature programming خلال عملية الفصل يمكن الحصول على Peaks تمتاز بدون إختلافات فى الشكل .

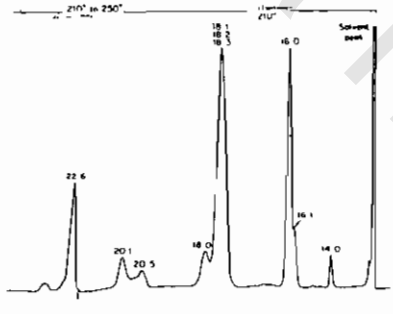
وعند جمع المركبات المفصولة من العمود خاصة اذا كان الـ detector من النوع الذى يتلف المركبات مثل Flame ionization detector فانه لا بد من وضع منظم أو مجزىء للغاز للتحكم فى الغاز الداخل أو المسموح به فقط الذى يدخل الـ detector وأمكن عن طريق الفصل الجيد بواسطة جهاز الـ GLC إثبات أن معظم الدهون الطبيعية تحتوى على عدة أنواع من الاحماض غير متوقعة وتحتوى أيضا على بعض التراكيب الغير متوقعة وعلى سبيل المثال يحتوى لبن الانسان على الأقل ٣٩ حامض دهنى ولبن البقرة يحتوى على الأقل ٨٥ حامضا دهنيا ويمكن فصل كل حامض فى المخلوط وخاصة اذا استخدمت طرق أخرى من الفصل بالأضافة الى GLC .

ويمكن أن يطبق هذا التكنيك فى حالات التقدير الكمى وهذا يأتى عن طريق قياس المساحة الموجودة تحت كل الـ Peaks عن طريق تحويل الـ Peak الى مثلث أو القطع ثم الوزن أو القياس عن طريق Planimeter أو باستعمال Integration recorder أو بواسطة recorder .

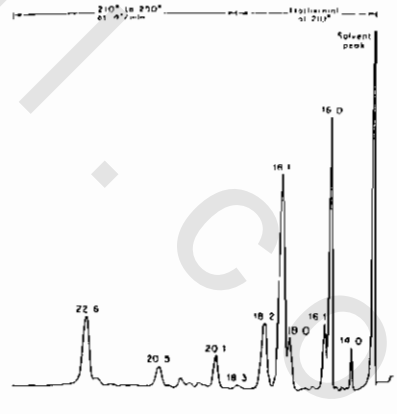
ويفصل جهاز الـ GLC الاحماض الدهنية على صورة إسترات الميثايل ولكن فى حالة الأحماض الدهنية الطيارة فانها تحول إلى مشتقات Butyl أو الـ phenyl esters (الأحماض أقل من ٣ - ٩ ذرة كربون) أى عن طريق تطويل السلسلة الذى يقلل من درجة تطايرها .

ويجب التنويه الى أن بعض الاسترات لم تخرج من العمود وأنه يلزم إجراء بعض التحويرات لخروجها من العمود والكشف عنها - ويلاحظ أنه يحدث للأحماض الدهنية غير المشبعة التى تحتوى على ثلاث روابط زوجية فى وضع متبادل Conjugated trienoic تغير فى الوضع الفراغى وإنتقال الروابط الزوجية الى موضع آخر .

ويحدث أيضا تحلل للاحماض التى تحتوى على حلقة ثلاثية غير مشبعة Cyclopropene acids والأحماض الأيدروكسيلية ثنائية الرابطة الزوجية hydroxy dienoic acid أى الأحماض التى تحتوى على نوعين من المجاميع الفعالة dimorphecolic إلا إذا أجرى التحكم فى درجة الحرارة بكفاءة عالية .



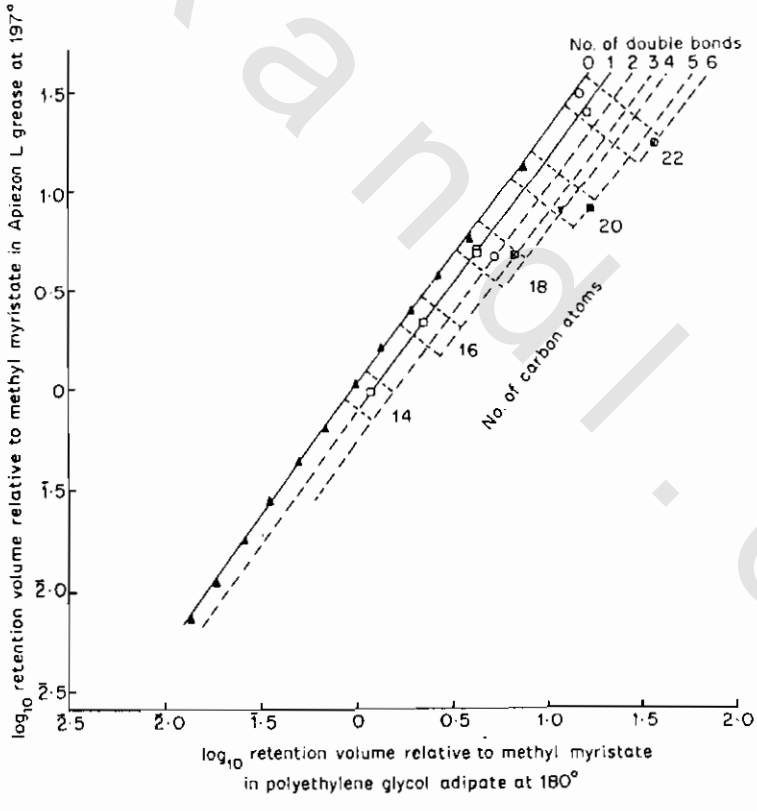
الفصل باستخدام عمود غير قطبى



الفصل باستخدام عمود قطبى

وللتعرف على الـ Peaks المتحصل عليها من مخاليط الاحماض الدهنية يجرى مقارنة للـ Retention Volume مع الاسترات القياسية Reference esters ويفضل على الأقل استعمال نوعين من الأعمدة ذات القطبية المختلفة وهذا يسمح بالتعرف على المركبات غير المعروفة ويعطى معلومات إعتبارية عن التركيبات الغير معروفة .

وعند توقيع لوغاريتم أرقام الظهور Retention times لسلسلة من المركبات المتجانسة ضد عدد ذرات كربون وتم الفصل على درجة حرارة ثابتة تعطى علاقة خط مستقيم ميله عبارة عن الظروف التى أجرى عندها الفصل مثل (درجة الحرارة – الطور الثابت .. الخ) وتعطى المركبات ذات السلاسل المتجانسة والقريبة فى تركيبها الكيماوى خطاً موازيا والأحماض الدهنية المشبعه Saturated – أحادية عدم التشبع Monoene – ثنائية عدم التشبع diene المتشابهات Iso كلها تعطى خطوطا متوازية إلا أن كل خط يعبر عن تركيبه من الأحماض الدهنية بعينها والتى تختلف فقط فى طول السلسلة كما فى الرسم التالى :



وتوجد بصفة عامة طريقتين للتعرف على الأحماض الدهنية من الـ Retention data وهما:

١ – المقارنة عن طريق وقت الظهور النسبى أى إيجاد الـ Retention time لمخاليط الأحماض بالمقارنة بالـ Retention times للمواد القياسية المستعملة مثل methyl myristate و methyl palmitate .

٢ – الطريقة الثانية وهى أقل دقة ولكنها مفيدة وهى طريقة Equivalent Chain Length (E.C.L) أو تسمى بالرقم الكربونى Carbon number وهذه القيمة تعتمد على الطور الثابت ولا تعتمد بدرجة كبيرة على ظروف التجربة مثل درجة الحرارة ومعدل السريان وأبعاد العمود .

ويلاحظ أن رقم الكربون يكون رقما صحيحا للاسترات المشبعة وهو يساوى عدد ذرات الكربون فى الحامض . فمثلا يكون رقم الكربون ١٤ لميرستات الميثايل ، ١٨ لاستيارات الميثايل .. ورقم الكربون لا يكون رقما صحيحا للاحماض الدهنية الأخرى فهو ١٧.٧ لأوليات الميثايل باستخدام عمود Apiezon L والجدول (٢٣) يبين بعض القيم لاسترات الاحماض الدهنية باستخدام أعمدة قطبية وغير قطبية

جدول(٢٤)

أرقام الكربون لبعض إسترات الاحماض الدهنية الشائعة

Carbon numbers of some common esters

METHYL ESTER	NON - POLAR APLa	SE-30 b	EGAc	POLAR DEGSd	EGSe
16:0	16	16	16	16	16
18:0	18	18	18	18	18
20:0	20	20	20	20	20
22:0	22	22	22	22	22
18:0 iso	17.6	--	17.5	17.5	--
18:0 anteiso	17.7	--	17.7	17.7	--
16:1	15.7	--	16.4	16.5	16.6
18:1 (9c)	17.7	17.8	18.4	18.5	18.5
18:1 (9a)	17.7	--	--	20.4	20.5
20:1	19.7	--	20.4	20.4	20.4
22:1	21.7	--	22.4	22.3	22.3
18:2 (9c, 12c)	17.5	--	19	19.4	19.2
18:2 (9t, llt)	18.7	--	19.9	20.7	21
18:3 (6c, 9c, 12c)	17.4	--	--	19.9	19.8
18:3 (9c, 12c, 15c)	17.5	--	19.8	20.4	20.1
18:3 (9t, 11t, 13t)	19.7	--	--	22,8	--
12 - Hydroxystearate	19.7	20	--	--	26.3
12 - Hydroxyoleate	19.4	--	--	--	26.3
12 - Acetoxystearate	19.8	20.6	--	--	24.7
12 - Ketostearate	19.3	19.8	--	--	25.4
Azelate	11.7	--	16.4	--	--

وتدل الحروف a و b و c و d و e على : Apiezon L و Silicone elastomer و Ethylene glycol adipate و Diethylene glycol succinate و Ethylene glycol succinate على التوالى . تؤثر درجة حرارة الفصل والنسبة المئوية للطور الثابت فى العمود وكذلك مدة استعمال العمود تأثيرا بسيطا على أرقام الكربون .

obeikandi.com

وترجع الأهمية من إستخدام على الأقل نوعين من الأطوار المختلفة لفصل الاحماض الدهنية من الأمثلة التالية :

يمكن تمييز الـ anteiso - stearate, iso - stearate عن الـ Oleate باستخدام عمود قطبى Polar ولا يمكن ذلك باستخدام عمود غير قطبى Non - Polar .

وأيضا يمكن تمييز استرات الاحماض الغير مشبعة C_{18} مثل الـ Linoleate, oleate, Linolenate, isolinolenate على عمود قطبى Polar ولا يمكن ذلك باستخدام عمود غير قطبى non - Polar وقد يختلط الأمر للتمييز ما بين اللينولينات واسترات C18 الا اذا تم الفصل باستخدام عمود غير قطبى .

والاحماض الدهنية غير المشبعة العادية لها ارقام ثابته تدل على نهاية السلسلة الكربونية End carbon chain (ECC) فهى ٣ و ٦ و ٩ فمثلا الاحماض :

و (8, 11, 14, 17) 20:4 له رقم ECC يساوى ٣ .

و (8, 11, 14) 20:3 له رقم ECC يساوى ٦ .

و (8,11) 20:2 له رقم ECC يساوى ٩ .

ويمتاز كل حامض من هذه الأحماض بأن أول رابطة زوجية تقع ما بين ذرات الكربون ٨ و ٩ من الطرف الكربوكسيلى وأن معامل الفصل النسبى لهذه الاسترات المقابل لـ ECC هو كما يلى :

EEC	معامل الفصل Separation factor
٣ و ٦	١,٢٧
٦ و ٩	١,١٩
٣ و ٩	١,٥١

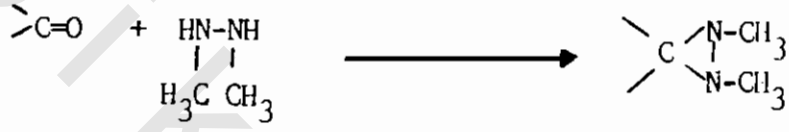
ويعبر عن معامل الفصل النسبى بأنه النسبه بين أوقات الظهور النسبيه Ratios of relative retention times وبغض النظر عن عدد ذرات الكربون وعدد الروابط الزوجية للأحماض الدهنية فانه يمكن إستخدام معامل الفصل للتنبأ بدرجة عدم التشبع ومواضع الروابط الزوجية لاسترات الميثايل للأحماض الدهنية – فمثلا عند قسمة وقت الظهور Retention time لحامض

obeikandl.com

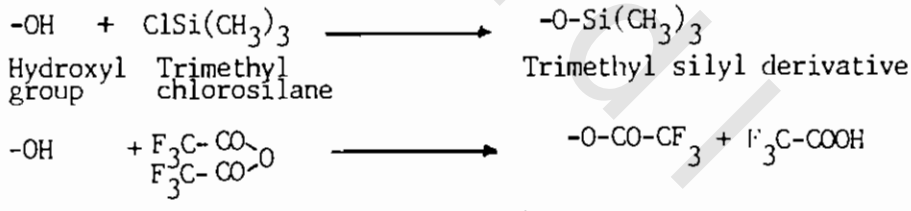
مجهول على وقت الظهور لحامض قياسى مثل (8,11,14) 20:3 الذى له ECC ١٩ . ١ وأن نتيجة القسمة ٢٧ . ١ فهذا يدل على أن الحامض المجهول لا بد وأن له رقم ECC يساوى ٣ .

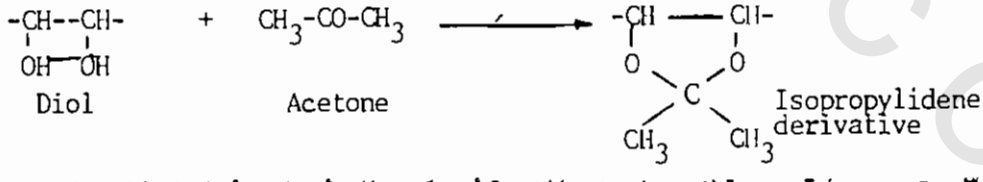
ويمكن الحصول على معلومات مفيدة إضافية عن المكونات الغير معروفة التركيب والتعرف عليها بواسطة GLC وذلك بعد اجراء بعض التعديلات الكيماوية عليها فمثلا :

١ - تحول المركبات الكيتونية الى مشتقات N,N - dimethyl hydrazides أو تختزل المركبات الكيتونية الى مركبات إيدروكسيلية .



٢ - تؤكسد الاسترات الايدروكسيلية لتعطى إسترات كيتونية التى يجرى لها بعد ذلك عملية أسترة أو تحول الى مشتقاتها ثلاثى ميثايل السيلايل أو ثلاثى فلورو أسيتيل أو ايزوبروبيليدين .





٣ - تجرى عملية هدرجة للإسترات غير المشبعة أو تؤكسد إلى أحماض أحادية وثنائية القاعدية قصيرة السلسلة .