جامعة الانبار/كلية العلوم/ قسم الكيمياء

اسم المادة:- طرائق الفصل

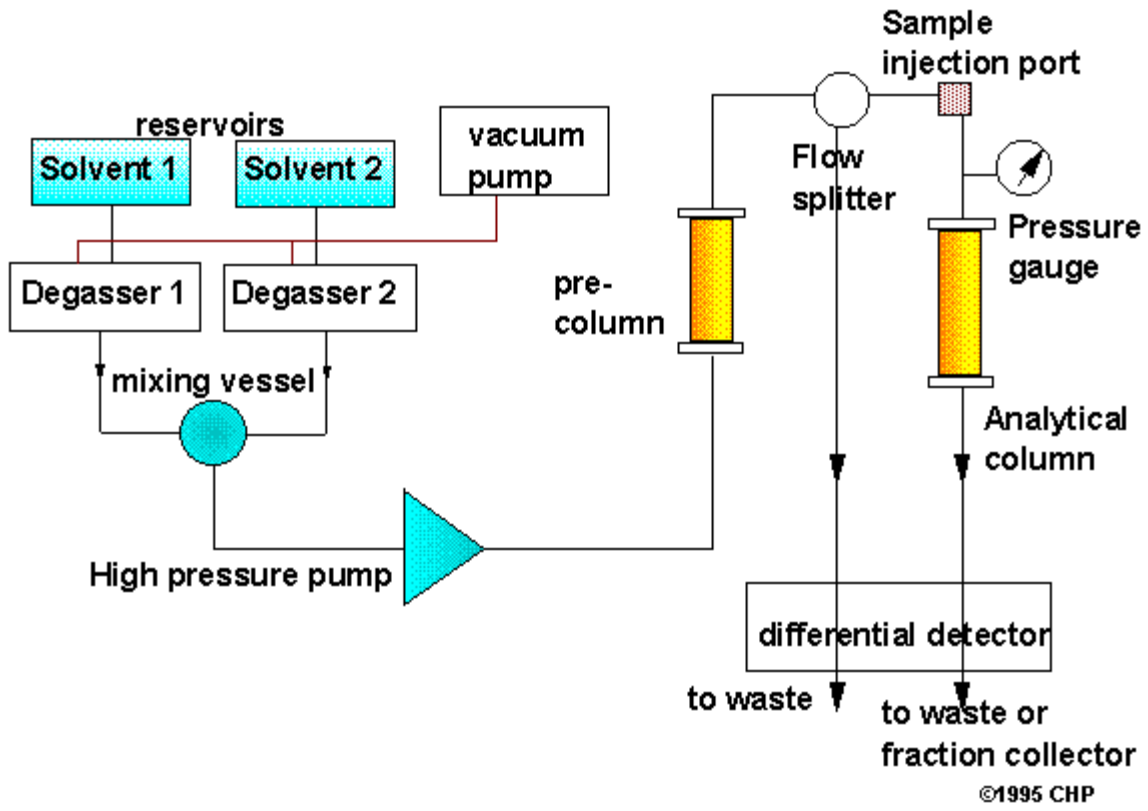
عنوان المحاضرة :- كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي

اسم التدريسي :- وهران منعم سعود

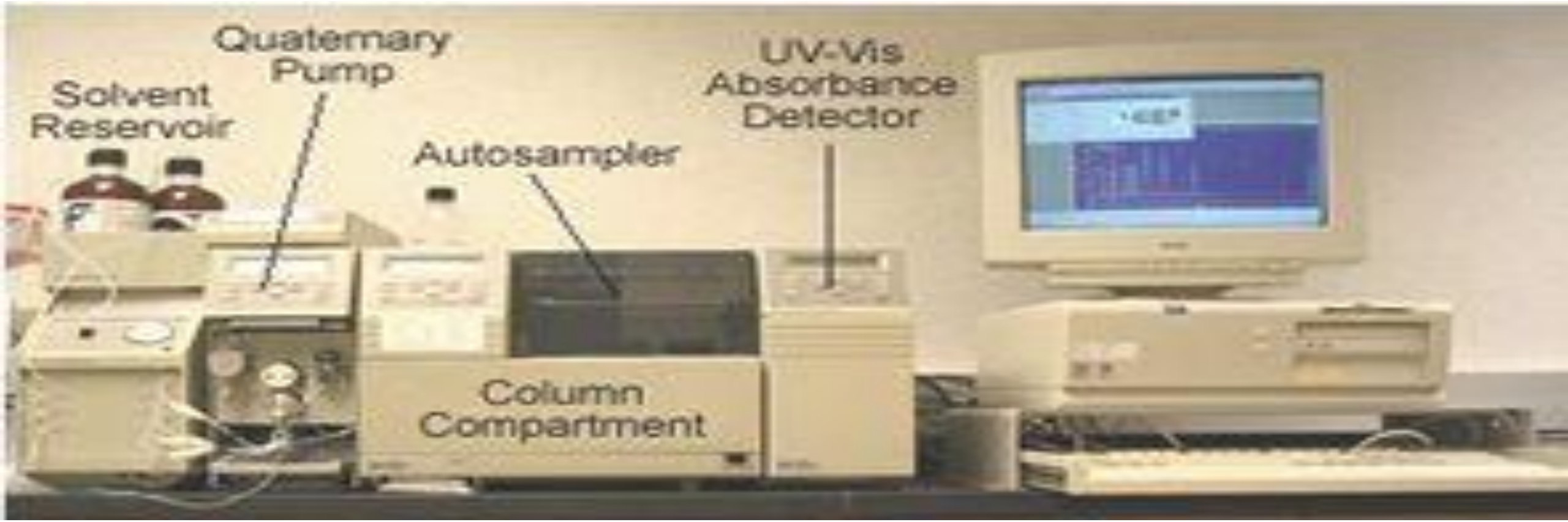
كروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي (HPLC)

الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)، هو شكل من أشكال الكروماتوغرافيا العمودية وغالبا ما تستخدم في الكيمياء الحيوية والكيمياء التحليلية لفصل وتحديد، وقياس المركبات في مزيج واحد، حيث تستخدم عمود يحتوي على الطور الثابت ومضخة تحرك الطور المتنقل المراد تحليله (MOBILE PHASE)، وكاشف لتحديد زمن الاحتباس لكل مادة، حيث أن زمن الاحتباس يختلف من مادة لأخرى، بسبب الاختلاف في الروابط البينية بين المادة المراد تحليلها والمادة الثابتة في العمود مما يؤخر ظهور المادة على الكاشف.

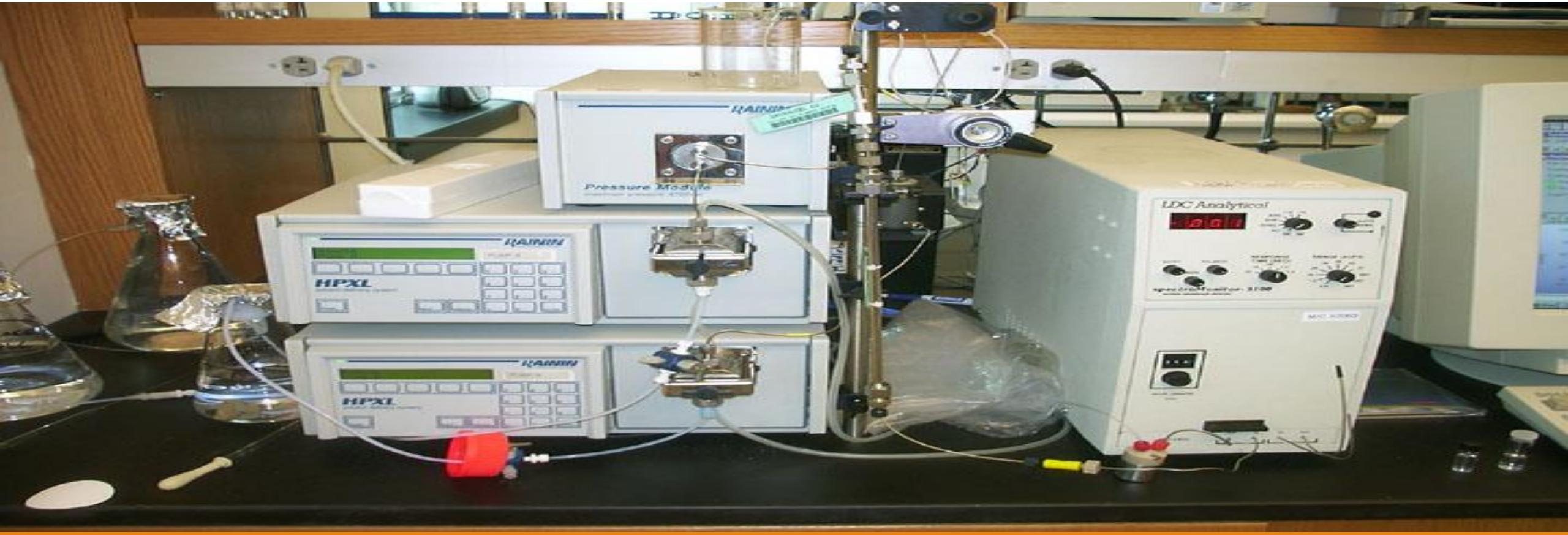
HPLC system


Sample
injection port
reservoirs
Solvent 1
Solvent 2
vacuum
pump
Flow
splitter
Pressure
gauge
Degasser 1
Degasser 2
pre-
column
mixing vessel
Analytical
column
High pressure pump
differential detector
to waste
to waste or
fraction collector
©1995 CHP

HPLC MACHINE



HPLC MACHINE



الطور الساكن في كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي

من بين العوامل العديدة التي بجب أن تؤخذ بنظر الاعتبار بهذه التقنية هي طبيعة المواد و المكونات المراد فصلها، الكفاءة المطلوبة للعمود المستخدم لهذا الغرض وسعته (اي الحد الأعلى من حجم النموذج الذي يمكن ادخاله الى العمود دون حصول تبدلات أو تغيرات في معامل التوزيع)

فالمواد الصلبة المازة المستخدمة في كروماتوغرافيا سائل - صلب يمكن استخدامها بنجاح لغرض فصل المركبات ذات الأوزان الجزيئية الواطئة نسبيا (أقل من ٢٠٠٠) والتي لها بولا رية واطئة ومن المواد الصلبة الشائعة الاستخدام كأطوار ساكنة على شكل حبيبات صغيرة جدا ومنتظمة هو جل السيليكا

ان وجود مجامع - O,H,Si - على جل السيليكا يجعلها ذات طبيعية حامضية ضعيفة لها القابلية على جذب المركبات القاعدية ، وبصورة عامة يمكن القول ان مقدار او قوة هذا الجذب تتوقف على قوة قاعدية المركبات) فالمركب الاعلى قاعدية هو الذي يمكث مدة أطول على العمود)

اما الا لومينا - وبسبب خواصها القاعدية - تستخدم الفصل المركبات الحامضية .

(كذلك تستخدم مادة البولي امايد / الاسم التجاري(٦ - Nylon) كطور ساكن صلب في فصل المركبات التي لها القابلية على تكوين أواصر هيدروجينية مع الامايد

التمائم القشرية

تستخدم أيضا في تقنية كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي ، كريات زجاجية صلبة بقطر (٥-٢٠) مايكرومتر كمادة ساندة للطور الساكن، حيث تطلى هذه الكريات بمادة مسامية نفوذية تتراوح ١،٢ مايكرومتر تحمل كطور ساكن

ان عملية تعبا العمود بمثل هذه التمائم تكون سهلة عادة للكمية النسبية لحجمها مقارنة مع حجم المواد المازة الصلبة

ان سبب انخفاض كفاءة هذه التمائم هو الانخفاض النسبي لمساحتها السطحية مقارنة مع الحبيبات المايكروئية المستخدمة بشكل مباشر . الا انه بالرغم من الكفاءة الواطئة نسبيا لهذه التمائم فان اغلب اعمدة المستخدمة في تقنية كروما توغرافيا الأداء العالي تعبأ بمثل هذه التمائم .

وأغلب ما يستخدم كمادة طلاء لهذه التمائم هي الالومينا ، كذلك تستخدم مادة البولي امايد لهذا الغرض بسبب قابليتها على الانضغاط

. اما اذا كانت الأوزان الجزيئية للمركبات المطلوب فصلها عالية كالأدوية مثلا فنستخدم اطوار ساكنة سائلة لغرض فصلها ، وفي كثير من الأحيان يستخدم نظام الطور المعكوس عند استخدام الاطوار السائلة الساكنة ان الاطوار السائلة الساكنة ترتب كيميائيا بسطح المادة الساندة ، ومن هذه المواد السائلة المستخدمة كالأطوار الساكنة بنظام الطور المعكوس هو الاوكتيل-C_{18} H_{37} ،C_8-H_{17} والاوكتاد اسيل

كما يمكن استخدام بعض السوائل القطبية (طور مستقيم) مثل الامينات والنيتريلات كاطوار ساكنة وسائلة.

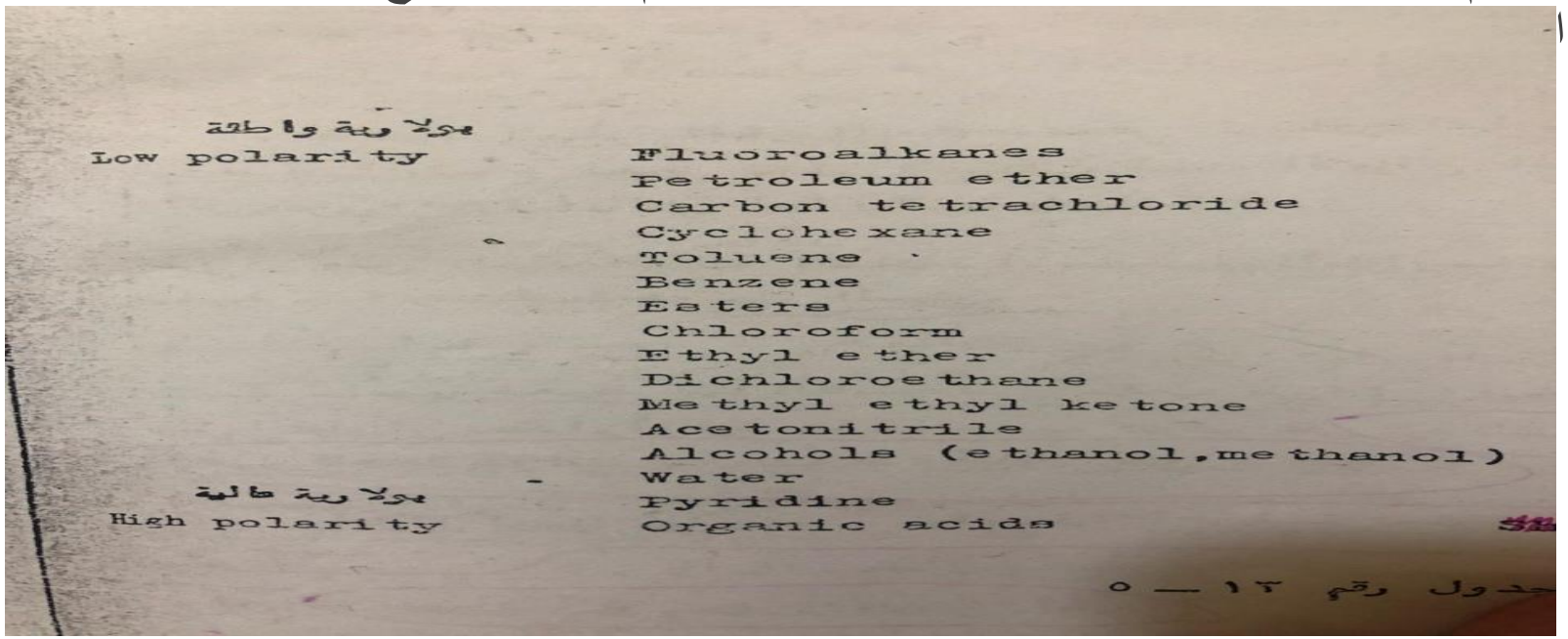
الطور المتحرك

المواد المدرجة في الجدول ادناه ممكن استخدامها كأطوار سائلة متحركة .

ويتم اختيار المذيب حسب الطورالساكن ففي نظام الطور المعكوس يتم اختيار طور متحرك سائل بولاري

، اما في العام الطور المستقيم ، وفي كثير من الأحيان يستخدم خليط من السوائل كطور متحرك • وبصورة عامة فإن خليط من سائل مثل الكحول وسائل غير بولاري مثل الهيدروكوربونات يستخدم بشكل واسع كطور متحرك

، وبهذه الطريقة يمكن السيطرة على بولاية الطور المتحرك حسب نسبة المزج وحسب الحالة المعروضة كما أن من الشي المهم لاختيار الطور المتحرك هو عدم تشويش المذيب على أجهزة الكشف ، فعند استخدام كشاف من نوع الاشعة فوق البنفسجية فالمذيب يجب ان لا تكون له قابلية ا



بولارية واطئة Low polarity	Fluoroalkanes Petroleum ether Carbon tetrachloride Cyclohexane Toluene Benzene Esters Chloroform Ethyl ether Dichloroethane Methyl ethyl ketone Acetonitrile Alcohols (ethanol, methanol) Water Pyridine Organic acids
بولارية عالية High polarity	

جدول رقم ١٢ — ٥

تزداد سرعة الطور المتحرك عند وجود ضغط عال بين مدخل العمود ومنفذه . هذا الفرق يمكن الحصول عليه عن طريق زيادة الضغط عند مدخل العمود باستخدام مضخة مصممة بشكل خاص

اما الضغط في منفذ العمود فيكون عادة مقارب او مساوي للضغط الجوي

- وبالاستعانة بهذه المضخات يمكن السيطرة على سرعة الطور المتحرك، وبعض هذه المضخات مصممة لأخذ عدة مذيبات من عدة اواني ، وقادرة على تغيير نسبة المذيب في الطور المتحرك ، الامر الذي يجعلها صالحة لغرض التحليل بطريقة الاسترداد او التصفية التدريجية وتكون عادة برمجة لأداء هذه المهمات ،

فالمذيب يضخ بواسطة المضخة الخاصة من الحاوية التي تحويه الى العمود الاولى لغرض تنقيته من الشوائب .وعند خروج المذيب من العمود الاول يدخل الى غرفة حقن النموذج ، وهي غرفة صغيرة تستوعب كمية محددة ومضبوطة من الا نموذج (عادة بين ١٠ مايكرولتير و ٢ ملي) وعند مدخل هذه الغرفة يوجد صمام الغرفة يمكن بواسطته التحكم باتجاه سير الطور المتحرك ، حيث يمكن ان يمر المذيب الى عود الفصل مباشرة أو عن طريق الغرفة ، حيث يحمل معه النموذج الى عمود الفصل ، وعلى العمود يتم فصل المكونات الواحد عن الاخر بصورة متتالية.

الاعمدة

- في اجهزة كروماتوغرافيا الأداء العالي تستخدم على الاغلب اعمدة بطول٢٥، ٢٠ ، ٥٠ أو ١٠٠ سم ذات أقطار بحدود ٢ ـ ٥ ملم

تعبأ هذه الاعمدة بشكل محكم بمادة الطور الساكن المكونة من حبيبات صغيرة جدا ومنظمة جدا - وبسبب صغر حجم حبيات الطور الساكن وانتظامها فستكون مساحتها المعرضة للتماس مع مكونات النموذج كبيرة جدا ، الأمر الذي يودي الى زيادة كبيرة في كفاءة الفصل ومن هنا اكتسبت الطريقة اسم كروماتوغرافيا الاداء العالي • والطريقة تستخدم اجهزة معقدة نسبيا لغرض التغلب على الصعوبات الناجمة بسبب اعادة الطور الساكن لحركة الطور المتحرك وتزداد سرعة الطور المتحرك عند وجود فرق ضغط عال من دخل العمود ومنفذه هو هذا الفرق يمكن الحصول عليه من طريق زيادة الضغط عند مدخل العمود باستخدام مضخة مصممة بشكل خاص (لذا تسمى الطريقة الضغط العالي) اما الضغط في منفذ العمود فيكون عادة او مساوي للضغط الجزيئي.

الكشافات

عند خروج المكونات من منفذ العمود تدخل الى الكشاف الموضوع عند المنفذ

والكشافات الشائعة الاستخدام في هذه التقنية مبنية على اساس الانسياب في خلية ميكروية

(تستوعب دفعات مستمرة من النموذج يتراوح حجم كل دفعة بين ٥ الى ١٠ مايكرو ليتر) موضوعة في فوتومتر طيف الأشعة فوق البنفسجية ، ويستخدم مصباح زئبقي ذو ضغط واطئ كمصدر ، ويقاس الامتصاص في خط٢٥٤ نانومتر ، حيث أن أغلب المركبات العضوية الاروماتية والمركبات التي تحتوي رابطة مزدوجة (غير مشبعة) لهذا الحد او ذاك في هذا الطول الموجي، بما ان اغلب المذيبات لا تمتص اشعاعات في المنطقة المرئية او فوق البنفسجية.

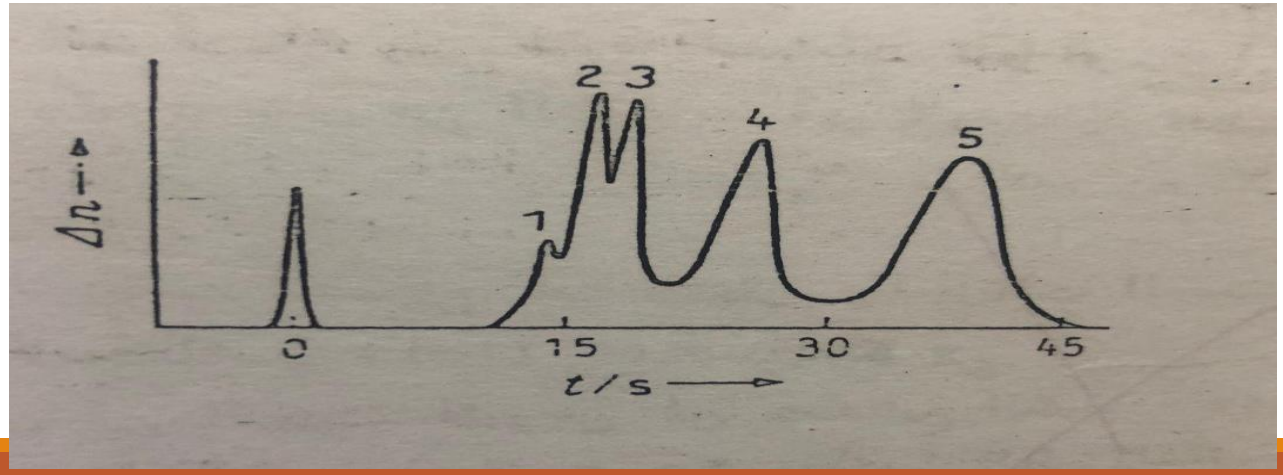
اما النوع الثاني من الكشافات فيعتمد إلى القياس المستمر في الفرق في معامل الانكسار بين الطور المتحرك النقي من جهة ومعامل انكسار الطور المتحرك الحامل لمكونات النموذج من الجهة الاخرى كما تستخدم ايضا اجهزة قياس الفلورة

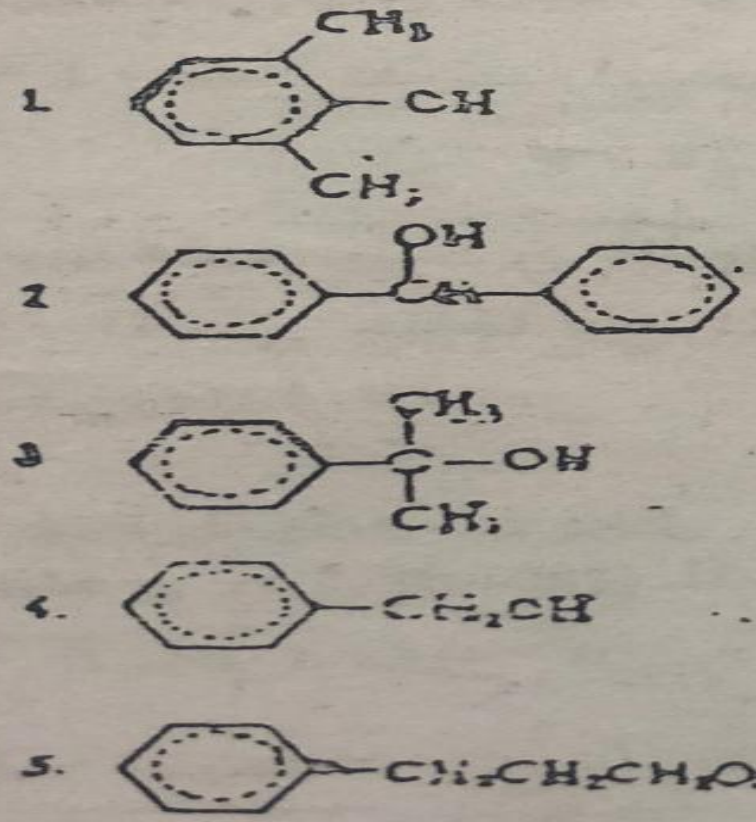
استخدامات كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي:

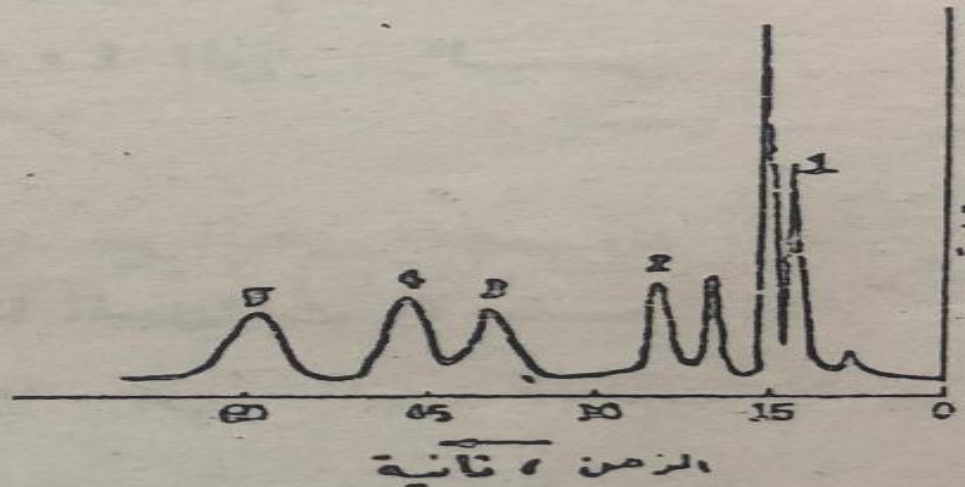
لكون التقينه حساسة جدا وعالية الأداء (عالية الكفاءة) بسبب استخدامها ضغط عالي استخدمت لحل كثير من المشاكل المعقدة. فهي تستخدم بشكل واسع في حقول الصيدلة وتحضير الادوية وفصل المركبات الطبيعية وتحليل المواد الغذائية وتحليل السموم المستخدمة في مكافحة الآفات الزراعية وغير ذلك من التطبيقات الكثيرة .

لشكل ادناه - يبين فصل وتقدير أربعة مركبات تستخدم في تحضير مواد مكافحة الآفات الزراعية على عمود معبأ بجل السيليكا اومتصل بجهاز فولمتير لغرض التقدير الكمي للمكونات.

استغرقت وقت العملية ٤٥ ثانية فقط والمركبات كما مبينة في الحزم هي Aldrin حزمة رقم ٢ و DDT حزمة رقم ٣ و DDD حزمة رقم ومادة الليددان Lindan حزمة رقم ٥ اما حزمة رقم ١ فهي شوائب •







ل(٢ ١ — ٥) : فصل خمسة من المركبات الاروماتية الهيدروكسيلية في أقل من ٦٠ ثانية باستخدام عمود ٢٥٠ ملم x ٢٢ كلم محملاً بحبيبات مجهرية من السيليكا حوالى ٧٥ الكستروم) .

المصادر

١-الاسس العامة للتحليل الكيميائي والوزني د.**صفاء رزوقي المرعب** .الجزء الثاني .

٢-**طرق الفصل في التحليل الكيميائي ،البرتين حبوش، جامعة بغداد .**

٣- التطبيقات العملية في التحاليل الكيميائية الآلية وطرائق الفصل – اسماعيل خليل الهيتي