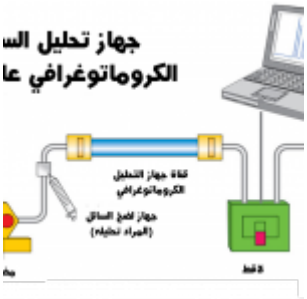


كروماتوغرافيا السائل عالية الدقة (HPLC)

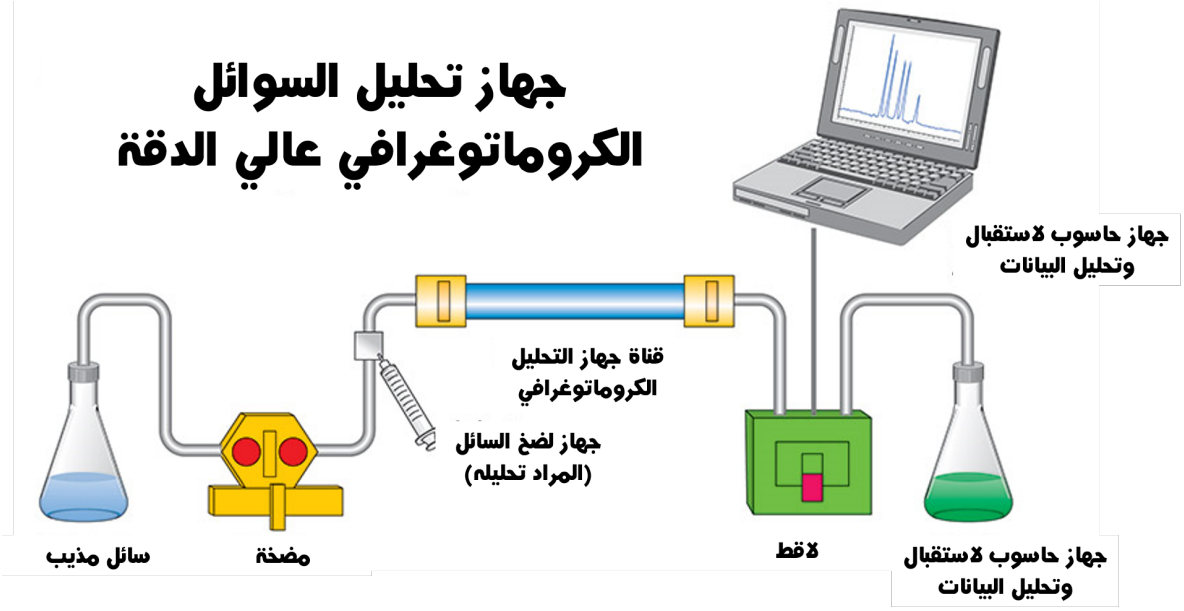
تعتبر تقنية الكروماتوغرافيا السائل عالية الدقة من أهم تقنيات الفصل الكيميائي بين المواد، وأكثرها شيوعا في مختلف الصناعات ومجالات البحث المختلفة. تتمايز أنواعها بتنوع طوريها الحامل(the mobile phase) ,والثابت (the stationary phase).

من بين أنواع الكروماتوغرافيا نجد كروماتوغرافيا السائل عالية الدقة (HPLC) وكروماتوغرافيا الغاز (GC). في هذا المقال سنتطرق بالأساس لكروماتوغرافيا السائل (HPLC) وسنقوم بتعريف مبسط وموجز لهذه التقنية، عناصرها وكيفية عملها.

تعريف HPLC

ذكرنا سابقا بأن أنواع الكروماتوغرافيا تتعدد بتعدد أنواع الطور الحامل و الثابت. فكروماتوغرافيا السائل عالية الدقة تعتمد في عملها على طور حامل سائل لهذا سميت بهذا الاسم. تستخدم هذه التقنية لتحديد هوية المركبات والسوائل ذات درجات الغليان المرتفعة (أي التي تملك وزن جزيئي مرتفع نسبياً) وتعتمد آلية الفصل على درجة التوزع للمحلول الحاوي على المركب المدروس بين الطور الحامل (السائل) والطور الثابت الموجود ضمن العمود. تحتاج كروماتوغرافيا ال HPLC ضغطاً عالياً (5000-6000) 1psi وقد تصل في كروماتوغرافيا ال UHPLC حتى (18000) psi. أما في الكروماتوغرافيا الغازية فيحتاج الى ضغوط منخفضة (150-200) psi.

طور هذا الجهاز في أواخر السبعينيات ولقي اقبالا كبيرا من لدن الباحثين كوسيلة للفصل وتحليل المواد الكيميائية في العديد من المجالات. في الشكل الاتي نموذج مبسط لجهازHPLC :



مكونات جهاز ال HPLC

يتكون هذا الجهاز من سبعة مكونات أساسية

- نظام توصيل المذيب (Pumpe): هو مضخة لضمان السريان الحر للطور الحامل بشكل مستمر ودقيق
- نظام إدخال العينة (Injector) : يمكن ان يكون إلي أو يدوي ويستخدم صمامات . عند فتحها يمكن ملا تجويف العينة بحجم من 10 إلى 50 ميكرو لتر. وعند غلق الصمامات تذهب العينة الى مجرى الطور الحامل ذي الضغط العالي حيث ترسل الى العمود ليتم تحليلها.
- وعاء الطور الحامل: هو دورق يشترط فيه ان يكون نقيا نظيفا مفرغا من الهواء والغازات، تفاديا للخطأ في التحليل.
- العمود (Column): هو قلب الجهاز حيث تحدث عملية الفصل. عادة ما يكون مصنوعا من الفولاذ غير قابل للصدأ ومضاد للتآكل وينقسم إلى نوعين: أعمدة تحليلية وأخرى أولية.
- الكاشف (the detector) : وظيفته مراقبة المواد المذابة المراد استخلاصها عند خروجها من العمود، فهو يبعث اشارات كهربائية تتناسب مع مستوى خاصية معينة لدى مادة الطور الحامل.

من بين الكواشف المستخدمة في الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء (HPLC):

- كاشف الأشعة فوق االبنفسجية UV يعتبر الأكثر شيوعاً بين الكواشف.
- الصمام الثنائي الضوئي (Photodiode).
- كاشف الفلوريسينس (Fluorescence): عالي الانتقائية والحساسية يستخدم عادة للكشف عن المركبات المتشكلة اثناء حدوث تفاعلات متسلسلة.
- كاشف الانكسار الضوئي (Refractive index): كاشف عام يمتلك حساسية محدودة.
- كاشف الناقلية: جيد الانتقائية والحساسية.
- جهاز الحاسوب: يستخدم كجهاز مجمع للبيانات حيث يكون متصلا بالكاشف فيلتقط الاشارات

الالكترونية الاتية منه ثم يقوم بتحليلها واخراحها في شكل رسوم تسمى كروماتوغرام .

كيفية عمل HPLC

تتم اذابة المركبات الكيميائية المراد فصلها في مذيب حيث يتم ادخال هذا الخليط في ا لطور الحامل وبالاعتماد على طبيعة الجزيئات، فإنها تتفاعل اكثر او اقل مع الطور التابث الموجود في الانبوب المسمى بالعمود الكزوماتوغرافي (chromatography column) .

كروماتوغرافيا السائل عالية الدقة (HPLC) هي طريفة تمزج بين ماهو فزيائي وما هو كيميائي وتعتمد بالاساس على الاختلاف والتنوع في التفاعلات بين المذاب، ا لطور الحامل والطورالتابث. نتيجة لهذه التفاعلات يحصل الفصل المطلوب.

حيث يتم بداية ضخ الوسط المتحرك داخل العمود باستخدام مضخة تستطيع ذات ضغط عالي ومن ثم يتم حقن العينة المراد فصلها من خلال حاقن، لتنتقل العينة الى العمود، حيث تتم عملية الفصل ويقوم الكاشف باعطاء اشارة لكل مكون من مكونات العينة ، لتظهر النتيجة على هيئة كروماتوغرام , ادا نجح الفصل فكل ذروة (pic) يمثل مكونا من الخليط المراد فصله .كل الذروات pics المسجلة تسمى او يطلق عليها كروماتوغرام . للحصول على نتيجة ممتازة يجب تطبيق ضغط عال يفوق 100 bars .

على مستوى العمود يتم توزيع المركبات في المحلول وفقا للانسجام بين الطور المتحرك والطور الثابت.

تعرفنا سابقا ان جهاز ال HPLC يقوم بفصل مكونات العينة ثم التعرف عليها ويتم الفصل عن طريق توزيع العينة ما بين الوسط المتحرك ويكون سائل والاخر ثابت ويكون سائل او صلب .يمكن تقسيم الكروماتوغرافيا حسب نوع القوى المسؤولة عن الفصل الى ثلاثة انواع سنقوم بتعريف كل واحدة على حدة :

كروماتوغرافيا الأيونية (Ion-exchange chromatography)

يتميز هذا النوع بكون الطور الثابت عبارة عن مبادل للأيونات سواء تعلق الامر بالأنيونات او الكاتيونات حيث يتفاعل المحلول الأيوني مع الشحن الموجودة في الطور الثابت للجهاز HPLC وتتم عملية الكشف عبر القياسات التوصيلية .

كروماتوغرافيا الأحجام (Excluding chromatography)

هذا النوع ينطبق على الأنواع ذات الحجم الجزيئي الكبير، بحيث المحلول المراد فصل مكوناته يكون مرتبطا بالكتلة المولية (masse molaire) شرط ان تكون > 10 000 1-g.mol) الكتلة المولية).

كروماتوغرافيا الانجذاب (Affinity chromatography)

تقوم هذه التقنية على كون الطور الثابت يتكون من اجسام او مثبتات او عادة اي مواد تستطيع الارتباط بشكل انتقائي بالجزيئات المراد تحليلها من العينة حين مرورها، حيث تستطيع هذه الجزيئات الانجذاب او الارتباط مع تلك الاجسام او المثبتات ويتم احتجازها في العمود تبعا لدرجة انجذابها .

المصادر :

.1

https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc

Meunier A. Chromatographie. *ITBM-RBM News*. 2006;27(1). doi: .2

.https://doi.org/10.1016/S1297-9570(06)80032-4

Deepak Bhanot 2015, How are Gas Chromatography (GC) and High- .3

Performance Liquid Chromatography(HPLC) different

http://lab-training.com/2015/10/03/how-are-gas-chromatography-gc-and-high-performance-liquid chromatography-different