

الفصل الرابع عشر

★★ كروماتوجرافى السائل على الأداء

High performance liquid chromatography (HPLC)

* من افضل الاجهزة فى الكشف عن مخلفات المبيدات فى المكونات البيئية المختلفة مهما كانت درجة تواجدها وفى حدود تركيزات قليلة للغاية وهو يتميز بقدرة عالية أو فائقة فى تحليل مخلفات المبيدات فى وقت سريع جدا وبكفاءة عالية ومن خلال خطوات بسيطة مقارنة بما هو متبع مع الكروماتوجرافى الغازى العادى . وتمثل الخبرة الجيدة فى استعمال هذه الوسيلة المتطورة فى المقدرة على فصل المنحنيات عن بعضها . وقبل الخوض فى النظرية التى بنى عليها عمل هذا الجهاز نشير باختصار الى تركيب وتشغيل نموذج من Hplc حتى نستطيع فهم اسلوب ونظرية الجهاز .

* تركيب وتشغيل جهاز Hplc :

الرسم التالى يوضح مكونات جهاز Hplc :

خزان المذيب	
وسيلة التدريج	المضخة أو المضخات
خافض العينة	
العمود	
منظم الحرارة	
الكشاف أو الكشافات	مسجل البيانات
الطابعة (المسجل)	

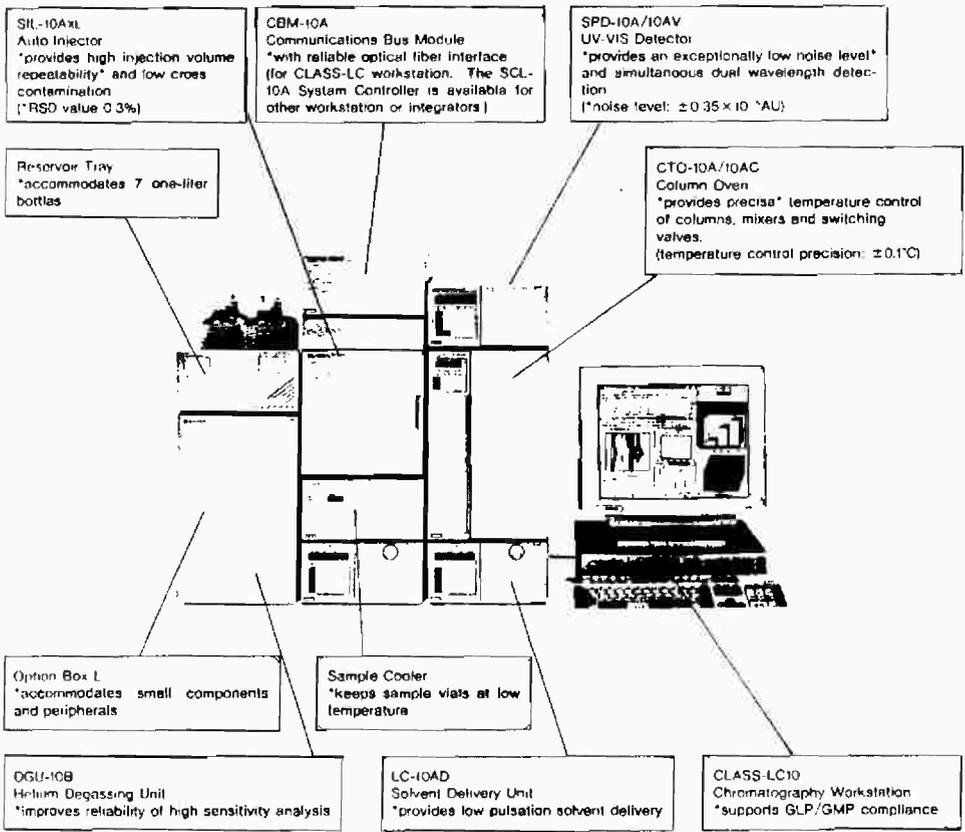
تعتبر اجهزة Hplc غاية فى التعقيد مقارنة بالاجهزة التى يستخدم فيها العمود المفتوح بينما يمكن تسمية الكروماتوجرافى السائل الحديث بأنه كروماتوجرافيا العمود حيث من الضرورى ان تكون كل المكونات التى تلامس المذيب مقاومة لنظم المذيبات المائية والعضوية المستخدمة . وكما سبق القول يتوقف اختيار الكشاف على الحساسية والمقدرة فى الكشف والتعريف . الفصل السريع والدقيق يتطلب اعمدة خاصة تتميز بالكفاءة والثبات كما يجب ان يكون سريان المذيب بمعدل ثابت ايضا .

(١) بصرف النظر عن نوع الخزان الا انه يجب ان يكون قادرا على تزويد وحدة أو وحدات الضخ بالمذيب الكافى لعمليات التقدير والكشف وبحجم كافى لا يجاز عدد من التحليلات .

(ب) تعتبر المضخة أو المضخات أو نظام الضخ نفسه من اهم الاجزاء الموجودة فى اجهزة HPLC حيث تقوم المضخة بدفع الوسط المتحرك (المذيب) داخل العمود وهناك مضخات ذات حجم ثابت أو ضغط ثابت أو تتميز بالصفتان (تحقق حجم وضغط ثابتين) ويفضل انواع المضخات

Automated High Pressure Gradient System
 Suitable for R&D work, providing high accuracy and high sensitivity for a variety of samples.

٢٢١



شكل توضيحي لمكونات جهاز HPLC

ذات المقدرة على الامداد بالطور المتحرك وبسريان ثابت ولكن بمعدلات مختلفة مع اقل شوشرة Noise مع الضغط المنخفض والعالي . وهناك المضخات الدافعة للغاز ومنها ذات المكابس الملفوفة والغازية وهي تعتمد على ضغط الغاز فى الدفع والنوع الملفوف يصلح لتوفير الضغط الثابت (١٥٠٠ ضغط جوى) ولكنها لا تستخدم كثيرا فى التشغيل المتدرج بينما النوع الدافع للغاز يصلح فى التشغيل المتدرج . هناك المضخات الدافعة للسائل حيث تستخدم فى نظام الكبس الضخ الهيدروليكي لدفع السائل . يؤدى استعمال مكبسين او غشائين او اكثر الى الامداد بسريان عديم الشوشرة وهي تصلح للتشغيل المتدرج .

هناك المضخة الكابسة الميكانيكية حيث تقوم بتدق المذيب اثناء دفعة شوط المكبس السابقة وتعيد ملء غرفة المكبس اثناء دفعة شوط السحب المرتدة وعادة يتم تشغيل مكبسين أو أكثر لانقاص الشوشرة ويمكن الحصول من هذه المكابس على سريان ثابت والتشغيل على ضغوط مرتفعة والمخزن غير محدود السعة كما يمكن الحصول على التدرج باستعمال مضختان يتم التحكم فيهما الكترونيا .

هناك المضخة الخاصة وفيها يزيج المكبس الناقل للحركة المذيب من الخزان ويدفعه الى العمود وعندما يحدث الاتزان فى نظام الدفع والتدق يحدث بثبات تحت ضغوط مرتفعة . المخزن هنا محدود السعة بالنسبة لحجم الحافتين .

(ج) فى نظام الكروماتوجرافى السائل على الاداء يفضل ان يكون نظام الازاحة متدرجا gradient وهي تنفيذ فى تحسين كفاءة الفصل وفى حالة المخاليط المعقدة التى لها قيم k (k) فى المنحنى تعنى حجم الازاحة للمركب) على درجة كبيرة من الاختلاف . تنفيذ الازاحة المتدرجة فى نظام الفصل بالاستبدال الايونى بسبب ان التغيير فى قوة ايون الايدروجين PH مع الوقت تعتبر فى غاية الاهمية والفائدة .

(د) يتم حقن العينة باستعمال حقنة على ضغط مرتفع مع ايقاف تدفق المذيب وتكون نتيجة الحقن جيدة اذا وضعت العينة مباشرة فى قمة العمود . يلاحظ ان مدخل الحقن ذو ضغط على قد يصل الى ١٥٠٠ ضغط جوى والحاكم الموجود فى فتحة الحقن يجب الا يتأثر بالمذيب ويكون هناك توافق معه كما يجب ان يقاوم الضغوط العالية المرتدة . تمتاز طريقة استخدام الحقن كما فى الكروماتوجرافى الغازى بأنها بسيطة واقتصادية وتجيز تحميل احجام متغيرة من العينة فى نطاق ضيق على قمة العمود والمشكلة فى هذه الطريقة تتمثل فى الضغط العالى واحتمالات تفتيت الحاكم بواسطة ابرة الحقن ومن ثم تتراكم فى قمة العمود مما يؤدى الى نقص فى كفاءة العمود وانسداد مسار المذيب وزيادة كبيرة فى الضغط المرتجع او المرتد .

(هـ) يمكن ايقاف تدفق المذيب فى اتجاه سريان الحقن مما يؤدى الى هبوط الضغط ومن ثم يسهل الحقن مما يزيل الضغط المرتجع ويؤدى استئناف سريان المذيب الى معاودة حمل العينة فى العمود ويكون انتشار السائل بطىء ولا تتأثر فعالية العمود كثيرا .

(و) كما سبق القول تعتبر اجهزة Hplc مثلة للكروماتوجرافي العمود column ونود الاشارة الى ان معظم الاعمدة تصنع من الصلب الغير قابل للصدأ او من زجاج خاص يتحمل الضغط العالي في حدود ٥٠٠ ضغط جوى وتختلف في الطول والقطر تبعاً لنوع مادة التعبئة وتراوح في الطول من ١٠ - ٣٠ سم وحتى عدة امتار ومتوسط القطر الداخلى ٦, ٢ ملميمتر . يمكن التحكم في درجة حرارة العمود باستعمال الافران ذات التسخين الهوائى والحمامات المائية ووحدات التسخين التى تسخن وتبرد عن طريق دوران المياه . يمكن استخدام جهاز Hplc على درجة حرارة المعمل اما درجات الحرارة العالية يمكن الاستفادة منها فى تقليل احجام الاحتجاز وتقليل سرعة سريان المذيب . ولا يمكن تجاهل اهمية منظم درجة حرارة الكشاف فى الحفاظ على ثبات النظم الاسبكتروفوتومترية .

(ز) يمكن لهذا الجهاز العمل على معظم انواع الكشافات المتاحة بدرجة تتوقف على الحساسية المطلوبة فى التحليل ومثال ذلك الكشاف اللوني الاسبكتروفوتومترى والفلوريسنس وكشافات قياس التغير فى معامل الانكسار والتأين تفيد فى حالة عدم الحاجة الى حساسية عالية . ومن اكثر الكشافات شيوعاً فى اجهزة Hplc كشافات الاشعة فوق البنفسجية uv وهناك كشافات ذات مدى موجى كبير من ١٩٠ - ٨٠٠ نانوميتر حيث يمكنها الكشف عن كميات ضئيلة للغاية من المبيدات فى حدود نانوجرامات او اجزاء منها .

(ح) يتوفر حالياً فى الاجهزة الحديثة معدات متطورة جدا للتسجيل وابرار النتائج من خلال برامج الحاسبات الالية الموجودة فى الاجهزة .

* التقدير الوصفى والكمى للمخلفات بواسطة جهاز Hplc :

تتبع نفس طرق الكروماتوجرافي الغازى فى التقدير الكمى للعينات بعد فصلها بجهاز Hplc سواء بالطرق الغير كروماتوجرافية او الكروماتوجرافية التى تعتمد على مطابقة قيم فترة الاحتجاز (النسبى) Retention time بالقيم الموجودة فى المعامل او بقيم العينات القياسية شريطة ان يتم الفصل تحت نفس ظروف التشغيل والفصل . ويمكن قياس النسبة بين درجة الاستجابة لأكثر من كشاف تختلف فى حساسيتها فى الكشف عن نفس المركب ، وحينئذ توجد اجهزة Hplc مزودة بأكثر من كشاف احدهما لقياس معامل الانكسار والاخر للامتصاص الضوئى او كشافان ذو مقدرة على الامتصاص الضوئى مختلفة . الطرق الغير كروماتوجرافية تعتمد على الجواهر الكشافة المناسبة للتفاعلات الكيميائية ويمكن الاستعانة ببعض الاجهزة المنظورة لتعريف المركبات المفصولة مثل جهاز الرنين النووى المغناطيسى Nuclear magnetic Resonance (NMR) أو جهاز قياس الكتلة Mass spectrometer (Ms) أو الاشعة تحت الحمراء IR .

يتم تحليل المنحنيات رياضياً والتقدير الكمى للمركبات بنفس الطرق التى ذكرت فى كروماتوجرافيا الغاز السائل Glc .

* تأكيد النتائج Data confirmation :

يمكن اتباع الطرق التالية لتأكيد النتائج التي تحصل عليها من الفصل الكروماتوجرافي سواء
بالـ Hplc أو Glc :

- ١ - استعمال اعمدة مختلفة القطبية .
- ٢ - استعمال كشافات متخصصة .
- ٣ - تقييم معامل التجزئ (p-value) .
- ٤ - التغيرات الكيميائية من خلال الاشتقاق .

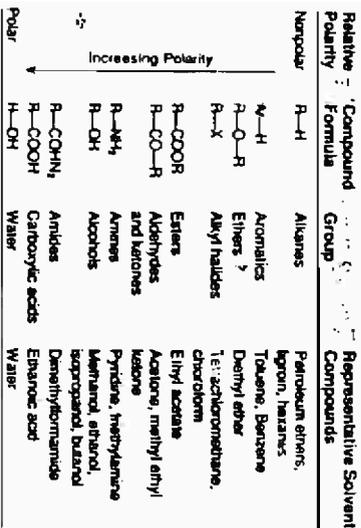
* وفيما يلي طرق حساب نتائج فصل المبيدات بواسطة جهاز الكروماتوجرافي السائل فائق
القدرة Hplc .

BONDED PHASES FOR HPLC AND THEIR ABBREVIATIONS

Phase	Description	Phase	Description
S1	Silica $-\text{Si}-\text{OH}$ Classic normal phase material. Suitable for separating polar non-ionic organic compounds.	CN	CPS, PCN, Cyano, Cyanopropyl, Nitrile $-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ Can be employed as either a Reversed Phase or normal phase material. Slightly polar, unique selectivity for polar compounds in both Reversed Phase and normal phase modes. Equilibrates very rapidly, suitable for gradient separations. Useful for many pharmaceutical applications (e.g. tricyclic antidepressants).
C1	TMS, SAS, Trimethyl $-\text{Si}-\text{CH}_3$ Reversed Phase material. Unique selectivity for polar and multifunctional compounds. Least retentive of all alkyl group bonded phases for non-polar solutes.	NH ₂	APS, Amino, Amino Propyl Silyl $-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ Can be employed as Reversed Phase, normal phase or weak anion exchange material. Reversed Phase useful for separating carbohydrates. Normal phase alternative selectivity to silica, not deactivated by small amounts of water. Ion exchange: weak anion exchanger when used with buffers. Separates anion and organic acids.
C2	RP-2, Dimethyl $-\text{Si}-\text{C}_2\text{H}_5$ Reversed Phase material. Less retentive than C4, C8, or C18. More retentive than C1.	NO ₂	Nitro $-\text{Si}-\text{NO}_2$ Normal phase material. Separates aromatic compounds and compounds with double bonds.
C3	Propyl $-\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_7$ Reversed Phase material. Used in Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) of proteins and peptides.	OH	Diol, Glycerol $-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ Can be employed as either a Reversed Phase or normal phase material. Reversed Phase: used for Gel Filtration Chromatography (GFC) of proteins and peptides. Normal phase: similar selectivity to silica not deactivated by small amounts of water.
C4	Butyl $-\text{Si}-\text{C}_4\text{H}_9$ Reversed Phase material. Useful for ion-pairing chromatography. Offers less retention than C8 and C18 phases for non-polar solutes. When bonded to 300Å silica, it is an ideal phase for analyzing large proteins and hydrophobic peptides.	SAX	SB, Quarternary amine, Strong Base $-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{Cl})$ Ion exchange material. Strong anion exchangers (basic) are useful for separating nucleotides, nucleosides, and organic acids.
C6	Hexyl $-\text{Si}-\text{C}_6\text{H}_{13}$ Reversed Phase material. Useful for ion-pairing chromatography. Less retentive than C8 and C18 phases.	SCX	SA, Sulfonic Acid, Strong Acid $-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ Ion exchange material. Strong cation exchangers (acidic) are useful for separating organic bases.
C8	MOS, RP-8, LC8, Octyl $-\text{Si}-\text{C}_8\text{H}_{17}$ Reversed Phase material. Similar selectivity to C18 but less retentive. Wide applicability (e.g. pharmaceuticals, nucleosides, steroids). When bonded to 300Å silica, it is an ideal phase for peptides, peptide mapping, and small hydrophilic proteins.	WAX	PEI, DEAE, Polyethylamine, Diethylaminoethyl, Weak Base $-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ Ion exchange material. Weak anion exchangers (acidic) are most useful for analyzing acidic proteins and peptides.
C18	ODS, RP-18, LC18, Octadecyl $-\text{Si}-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ Classic Reversed Phase material. Most retentive for non-polar solutes. Excellent for ion-pairing chromatography. Wide applicability (e.g. nucleosides, nucleotides, steroids, pharmaceuticals, vitamins, fatty acids, environmental compounds). When bonded to 300Å silica, this phase is perfect for separating small hydrophilic peptides.	WCX	CM, Carboxymethyl, Weak Acid $-\text{Si}-\text{CH}_2\text{COO}^-$ Ion exchange material. Weak cation exchangers (basic) are most useful for analyzing basic proteins and peptides.
Phenyl, C ₆ H ₅	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$  Reversed Phase material. Unique selectivity. Useful for analyzing aromatic compounds. When bonded to 300Å silica, this phase is useful for HIC.		

SOLVENT MISCIBILITY TABLE

POLARITY CHART



SOLVENT	REFRACTIVE INDEX	REFRACTIVE INDEX @ 20°C	UV (mμ) CUTOFF	BOWEN POINT (°C)	VISCOSITY (cP @ 20°C)	SOLUBILITY IN WATER (g/100g)
Acetic Acid	1.372	1.372	230	118	1.26	100
Acetone	1.359	1.359	330	56	0.32	100
Acetonitrile	1.344	1.344	190	82	0.37	100
Benzene	1.501	1.501	280	80	0.65	0.18
n-Butyl Acetate	1.394	1.394	254	125	0.73	0.43
n-Butanol	1.399	1.399	215	118	2.98	7.81
Carbon Tetrachloride	1.465	1.465	253	77	0.97	0.08
Chloroform	1.476	1.476	245	61	0.57	0.815
Cyclohexane	1.426	1.426	200	81	1.00	0.87
1,2-Dichloroethane	1.444	1.444	225	84	0.79	0.87
Diethylformamide	1.424	1.424	235	41	0.44	1.1
Dimethylformamide	1.431	1.431	258	155	0.32	100
Dimethyl sulfoxide	1.478	1.478	268	189	2.00	100
Ethanol	1.372	1.372	260	77	0.45	8.7
Ethyl Acetate	1.380	1.380	210	73	1.20	100
di-Ethyl Ether	1.353	1.353	220	75	0.32	6.89
Hexane	1.387	1.387	200	98	0.39	0.0003
Heptane	1.375	1.375	200	69	0.33	0.001
Hexanol	1.379	1.379	205	65	0.60	100
Methanol	1.369	1.369	210	55	0.27	4.8
Methyl-Butyl Ether	1.379	1.379	328	80	0.45	24
Methyl Ethyl Ketone	1.358	1.358	200	36	0.23	0.004
Perchloric Acid	1.384	1.384	210	97	2.27	100
n-Propanol	1.377	1.377	210	82	2.30	100
iso-Propanol	1.368	1.368	220	68	0.37	100
di-iso-Propyl Ether	1.407	1.407	215	65	0.55	100
Tetrahydrofuran	1.477	1.477	273	87	0.57	0.11
Toluene	1.495	1.495	285	111	0.59	0.051
Triethylamine	1.333	1.333	208	190	1.80	100
Water	1.300	1.300	290	139	0.81	0.018
Xylene						

Immiscible
 Miscible

SYNONYM TABLE
 1. Ethers
 2. Methylenes
 3. Methyl Sulfoxides
 4. Methyl-Butyl Ethers
 5. 2-Dimethylamino
 6. 2-Propanol

HPLC THEORY AND CALCULATIONS

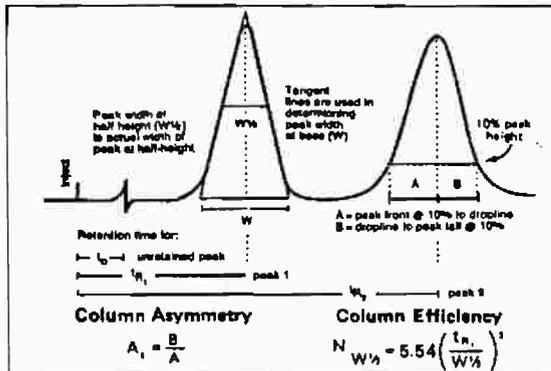
HPLC CALCULATIONS

COLUMN EFFICIENCY: In general, N = Number of Theoretical Plates, a is a constant depending on method used, t_r = retention time of peak, and W = the peak width at a given peak height.

$$N = a \left(\frac{t_r}{W} \right)^2$$

Method	N
Peak Width $1/2$ Peak Height	5.54
Peak Width at 4.4% Peak Height (5σ method)	25
Tangent	16

The peak width at $1/2$ height is the most commonly used method for calculating HPLC column efficiency.



PEAK ASYMMETRY: $A_1 = B/A$ at 10% peak height.

CAPACITY FACTORS (RELATIVE RETENTION): The Capacity Factor, k' , of a sample component is a measure of the degree to which that component is retained by the column relative to an unretained component.

$$k' = (t_r - t_0) / t_0$$

Where t_r is the elution time of retained component, and t_0 is the elution time of the unretained sample.

SELECTIVITY: (α): $\alpha = k'_1 / k'_2$

RESOLUTION: R_s , defined as the amount of separation between two adjacent peaks, is given by

$$R_s = (1/4) (\alpha - 1) (N)^{1/2} (k'/1 + k')$$

where k' is the average value for the two peaks.

ADJUSTING FLOW RATE FOR DIFFERENT COLUMN IDS: When scaling up from analytical to preparative modes or when scaling down from analytical to microbore LC, it is often desirable to keep retention times constant. The flow rate can be adjusted so that the columns operate at the same linear velocity. When switching from a column with a radius (0.5 x I.D.) of r_1 to another with a radius of r_2 , the flow rate must be altered by a factor of X , where

$$X = (r_2 / r_1)^2$$

0.008

For example, when scaling up from a 250 x 4.6mm column to 250 x 10mm I.D. column, the flow rate must be increased by factor of 4.73 in the 10mm column to generate the same linear velocity as that of the 4.6mm I.D. column, as derived below

$$X = (5.0 / 2.3)^2 = 4.73$$

The general formula which will convert flow rate from any given column dimension to any other is as follows:

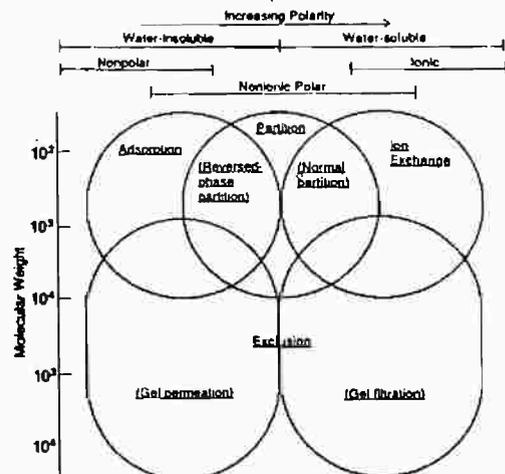
$$F_2 = F_1 * (L_2 / L_1) * (r_2 / r_1)^2$$

Where: L = length of the column, in mm
 r = radius of the column, in mm
 F = flow rate, in ml/min
 1 designates the first, or reference, column
 2 designates the second column

EFFECT OF DIFFERENT CONDITIONS ON SAMPLE RETENTION

Change in Separation	t_0	Effect on Retention Time	Band Spacing
Flow rate, F	$1/F$	$1/F$	None
Column volume, V_m	V_m	V_m	None
Increase in vol. - % strong solvent	None	Decrease	Small change
New strong solvent	None	Changes	Changes
pH value	None	Changes	Changes
Column packing (e.g., cyano vs C18)	Little	Changes	Changes
Increase temperature	None	Decrease	Small change
New mobile phase additives	None	Changes	Changes

APPLICATIONS OF LIQUID CHROMATOGRAPHY



(From: D.L. Saunders, in Chromatography, 3rd ed, E. Heltmann, Ed., p. 81, Van Nostrand Reinhold, New York, 1975. With permission.)

COLUMN SELECTION GUIDE

les of Thumb

