الفصل الرابع عشر

★★ كروماتوجرافى السائل عالى 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 . وتتمثل 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

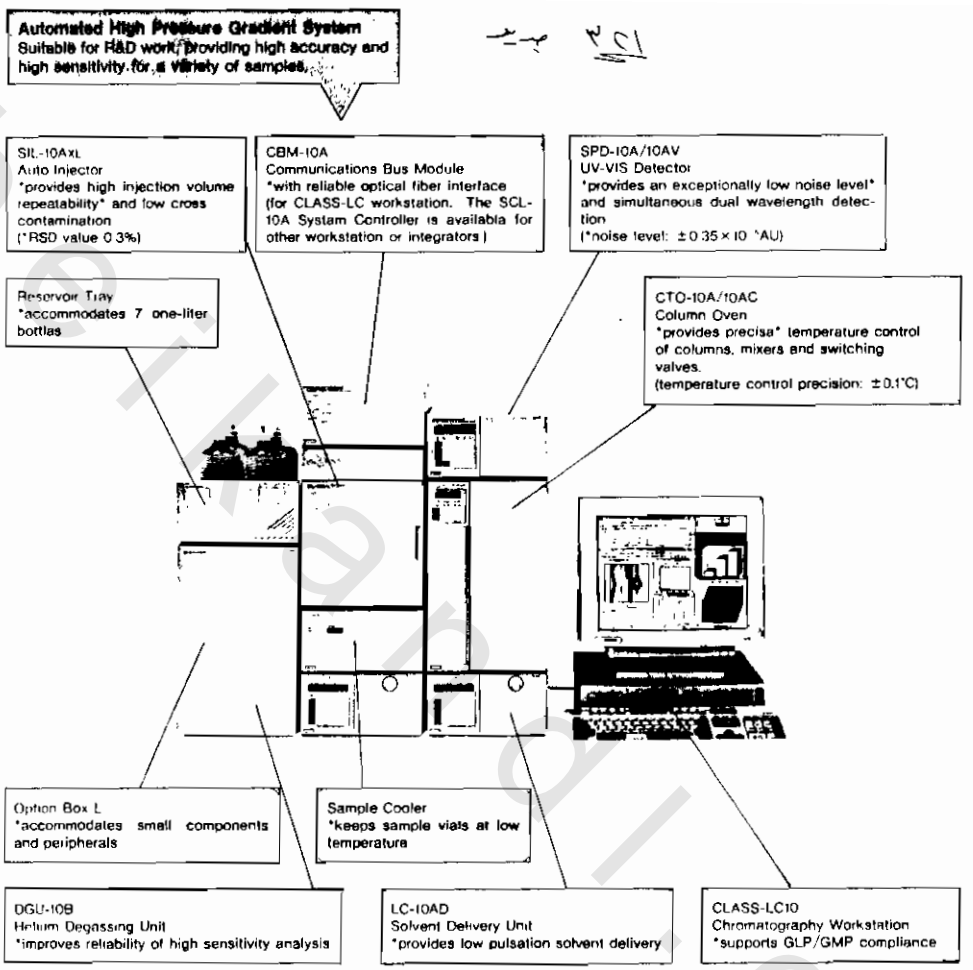
الكشاف او الكشافات مسجل البيانات

الطابعة (المسجل)

تعتبر اجهزة Hplc غاية فى التعقيد مقارنة بالاجهزة التى يستخدم فيها العمود المفتوح بينما يمكن تسمية الكروماتوجرافى السائل الحديث بانه 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 .

(أ) 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 نجاز عدد من التحليلات .

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



شکل توضیحی لمکونات جهاز HPLC

ذات المقدرة على الامداد بالطور المتحرك وبسريان ثابت ولكن بمعدلات مختلفة مع اقل شوشرة Noise مع الضغط المنخفض والعالى . وهناك المضخات الدافعة للغاز ومنها ذات المكابس الملفوفة والغازية وهى 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 الهيدروليكى لدفع السائل . يؤدى استعمال مكبسين او غشائين او اكثر الى الامداد بسريان عديم الشوشرة وهى تصلح للتشغيل المتدرج .

هناك المضخة الكابسة الميكانيكية حيث تقوم بتدفق 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 يزيح المكبس الناقل للحركة المذيب من الخزان ويدفعه الى العمود وعندما يحدث الاتزان فى نظام الدفع والتدفق يحدث بثبات تحت ضغوط مرتفعة . المخزن هنا محدود السعة بالنسبة لحجم الحافتين .

(جـ) فى نظام الكروماتوجرافى السائل عالى الاداء يفضل ان يكون نظام الازاحة متدرجا gradient وهى تفيد فى تحسين كفاءة الفصل وفى حالة المخاليط المعقدة التى لها قيم k (k فى المنحنى تعنى حجم الازاحة للمركب) على درجة كبيرة من الاختلاف . تفيد الازاحة المتدرجة فى نظام الفصل بالاستبدال الايونى بسبب ان التغير 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 عالى 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 بطئ ولا تتأثر فعالية العمود كثيرا .

(و) كما سبق القول تعتبر اجهزة Hplc ممثلة للكروماتوجرافى العمود column ونود الاشارة الى ان معظم الاعمدة تصنع من الصلب الغير قابل للصدأ او من زجاج خاص يتحمل الضغط العالى فى حدود ٥٠٠ ضغط جوى وتختلف فى الطول والقطر تبعا لنوع مادة التعبئة وتتراوح فى الطول من ١٠ – ٣٠ سم وحتى عدة امتار ومتوسط القطر الداخلى ٢,٦ ملليمتر . يمكن التحكم فى 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 اللونى الاسبكتروفوتومترى والفلوربسنس وكشافات قياس التغير فى معامل الانكسار والتأين تفيد فى حالة عدم الحاجة الى حساسية عالية . ومن اكثر الكشافات شيوعا 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 حاليا فى الاجهزة الحديثة معدات متطورة جدا للتسجيل وابراز النتائج من خلال برامج الحاسبات الالية الموجود ة فى الاجهزة .

*** التقدير الوصفى والكمى للمخلفات بواسطة جهاز Hplc :**

تتبع نفس طرق الكروماتوجرافى الغازى فى التقدير الكمى للعينات بعد فصلها بجهاز Hplc سواء بالطرق الغير كروماتوجرافية او الكروماتوجرافية والتى 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 لاكثر من كشاف تختلف فى حساسيتها فى الكشف عن نفس المركب ، وحديثا توجد اجهزة Hplc مزودة باكثر 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 رياضيا والتقدير الكمى للمركبات بنفس الطرق التى ذكرت فى كروماتوجرافيا الغاز السائل Glc .

* **تأكيد النتائج Data confirmation** :

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

١ – استعمال اعمدة مختلفة القطبية .

٢ – استعمال كشافات متخصصة .

٣ – تقييم معامل التجزئ (p-value) .

٤ – التغيرات الكيميائية من خلال الاشتقاق .

* وفيما يلى طرق حساب نتائج فصل المبيدات بواسطة جهاز الكروماتوجرافى السائل فائق القدرة Hplc .

obeikandl.com

BONDED PHASES FOR HPLC AND THEIR ABBREVIATIONS

Phase	Description
SI	**Silica** $-Si-OH$ Classic normal phase material. Suitable for separating polar non-ionic organic compounds.
C1	**TMS, SAS, Trimethyl** $-Si-CH_3$ Reversed Phase material. Unique selectivity for polar and multifunctional compounds. Least retentive of all alkyl group bonded phases for non-polar solutes.
C2	**RP-2, Dimethyl** $-Si-C_2H_5$ Reversed Phase material. Less retentive than C4, C8, or C18. More retentive than C1.
C3	**Propyl** $-SiC_3H_7$ Reversed Phase material. Used in Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) of proteins and peptides.
C4	**Butyl** $-Si-C_4H_9$ 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.
C6	**Hexyl** $-Si-C_6H_{13}$ Reversed Phase material. Useful for ion-pairing chromatography. Less retentive than C8 and C18 phases.
C8	**MOS, RP-8, LC8, Octyl** $-Si-C_8H_{17}$ 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 hydrophillic proteins.
C18	**ODS, RP-18, LC18, Octadecyl** $-Si-C_{18}H_{37}$ 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
Phenyl, C_6H_5	$-Si-CH_2CH_2CH_2$ Reversed Phase materiel. Unique selectivity. Useful for analyzing aromatic compounds. When bonded to 300Å silica, this phase is useful for HIC.

Phase	Description
CN	**CPS, PCN, Cyano, Cyanopropyl, Nitrile** $-Si-CH_2CH_2CH_2CN$ Can be employed as either a Reversed Phase or normal phase material. Slightly polar, unique selectiv ity for polar compounds in both Reversed Phase an normal phase modes. Equilibrates very rapidly, suitable for gradient separations. Useful for many pharmaceutical applications (e.g. tricyclic antidepres sants).
NH_2	**APS, Amino, Amino Propyl Silyl** $-Si-CH_2CH_2CH$ Can be employed as Reversed Phase, normal phas 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 anio and organic acids.
NO_2	**Nitro** $-Si-NO_2$ Normal phase material. Separates aromatic compounds and compounds with double bonds.
OH	**Diol, Glycerol** $-Si-CH_2CH_2CH_2OCH_2CHCH$ (OH OH) Can be employed as either a Reversed Phase or normal phase material. Reversed Phase: used for Gel Filtration Chromatography (GFC) of proteins a peptides. Normal phase: similar selectivity to silica not deactivated by small amounts of water.
SAX	**SB, Quarternary amine, Strong Base** $-Si-CH_2CH_2CH_2N^{+}(CH$ Ion exchange material. Strong anion exchangers (basic) are useful for separating nucleotides, nucle sides, and organic acids.
SCX	**SA, Sulfonic Acid, Strong Acid** $-Si-CH_2CH_2CH_2SO_2OH$ Ion exchange material. Strong cation exchangers (acidic) are useful for separating organic bases.
WAX	**PEI, DEAE, Polyethyleneimine, Diethylaminoethyl, Week Base** $-Si-CH_2CH_2N(CH_2CH_3)_2$ Ion exchange material. Weak anion exchangers (acidic) are most useful for analyzing acidic prote and peptides.
WCX	**CM, Carboxymethyl, Week Acid** $-Si-CH_2CC$ Ion exchange material. Weak cation exchangers (basic) are most useful for analyzing basic protei and peptides.

0.009

obeikandi.com

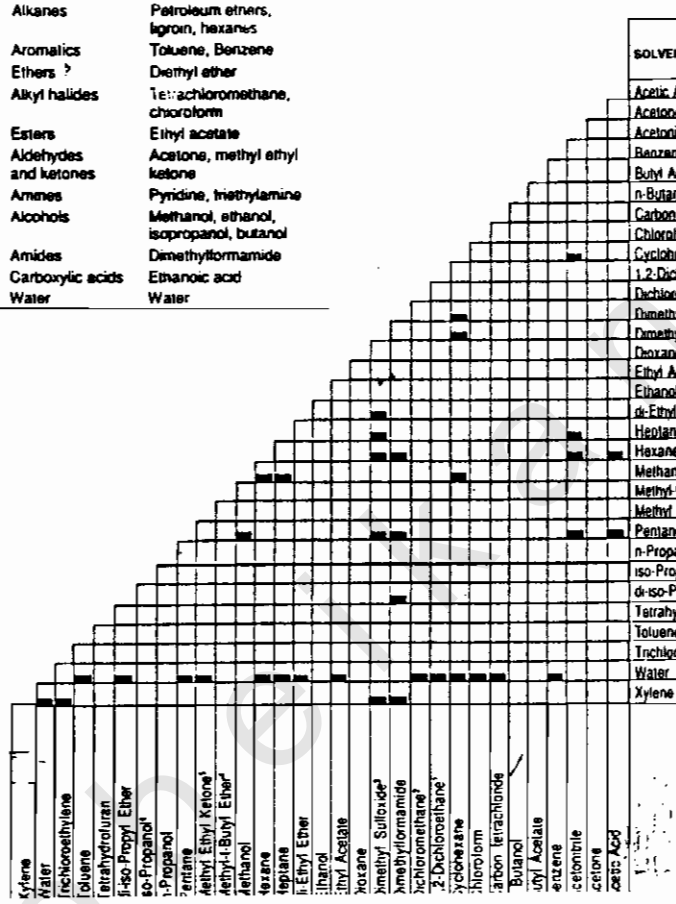
SOLVENT MISCIBILITY TABLE

0.010

POLARITY CHART

Relative Polarity	Compound Formula	Group	Representative Solvent Compounds
Nonpolar	R—H	Alkanes	Petroleum ethers, ligroin, hexanes
↓ Increasing Polarity	Ar—H	Aromatics	Toluene, Benzene
	R—O—R	Ethers	Diethyl ether
	R—X	Alkyl halides	Tetrachloromethane, chloroform
	R—COOR	Esters	Ethyl acetate
	R—CO—R	Aldehydes and ketones	Acetone, methyl ethyl ketone
	R—NH_2	Amines	Pyridine, triethylamine
	R—OH	Alcohols	Methanol, ethanol, isopropanol, butanol
	R—$COHN_2$	Amides	Dimethylformamide
	R—COOH	Carboxylic acids	Ethanoic acid
Polar	H—OH	Water	Water

SOLVENT	POLARITY INDEX	REFRACTIVE INDEX @ 20° C	UV (nm) CUTOFF @ 1 AU	BOILING POINT (°C)	VISCOSITY (cPoise)	SOLUBILITY IN WATER (% w/w)
Acetic Acid	6.2	1.372	230	118	1.26	100
Acetone	5.1	1.359	330	56	0.32	100
Acetonitrile	5.8	1.344	190	82	0.37	100
Benzene	2.7	1.501	280	80	0.65	0.18
Butyl Acetate	4.0	1.394	254	125	0.73	0.43
n-Butanol	3.9	1.399	215	118	2.98	7.81
Carbon tetrachloride	1.6	1.466	263	77	0.97	0.08
Chloroform	4.1	1.446	245	61	0.57	0.815
Cyclohexane	0.2	1.426	200	81	1.00	0.01
1,2-Dichloroethane[1]	3.5	1.444	225	84	0.79	0.81
Dichloromethane[2]	3.1	1.424	235	41	0.44	1.6
Dimethylformamide	6.4	1.431	268	155	0.92	100
Dimethyl sulfoxide[3]	7.2	1.478	268	189	2.00	100
Dioxane	4.8	1.422	215	101	1.54	100
Ethyl Acetate	4.4	1.372	260	77	0.45	8.7
Ethanol	5.2	1.360	210	78	1.20	100
di-Ethyl Ether	2.8	1.353	220	35	0.32	6.89
Heptane	0.0	1.387	200	98	0.39	0.0003
Hexane	0.0	1.375	200	69	0.33	0.001
Methanol	5.1	1.329	205	65	0.60	100
Methyl-t-Butyl Ether[4]	2.5	1.369	210	55	0.27	4.8
Methyl Ethyl Ketone[5]	4.7	1.379	329	80	0.45	24
Pentane	0.0	1.358	200	36	0.23	0.004
n-Propanol	4.0	1.384	210	97	2.27	100
iso-Propanol[6]	3.9	1.377	210	82	2.30	100
di-iso-Propyl Ether	2.2	1.368	220	68	0.37	
Tetrahydrofuran	4.0	1.407	215	65	0.55	100
Toluene	2.4	1.496	285	111	0.59	0.051
Trichloroethylene	1.0	1.477	273	87	0.57	0.11
Water	9.0	1.333	200	100	1.00	100
Xylene	2.5	1.500	290	139	0.61	0.018



■ Immiscible

□ Miscible

SYNONYM TABLE

1. Ethylene Chloride
2. Methylene Chloride
3. Methyl Sulfoxide
4. tert-Butyl Methyl Ether
5. 2-Butanone
6. 2-Propanol

HPLC THEORY AND CALCULATIONS

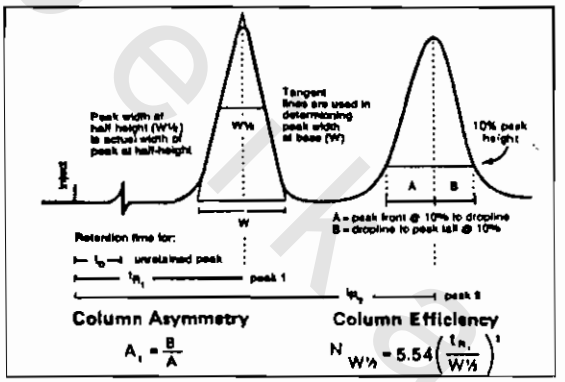
HPLC CALCULATIONS

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	a
Peak Width ½ Peak Height	5.54
Peak Width at 4.4% Peak Height (5σ method)	25
Tangent	16

The peak width at ½ height is the most commonly used method for calculating HPLC column efficiency.



PEAK ASYMMETRY: A_s = 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): α = k'1/k'2

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

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

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 • I.D.) of r1 to another with a radius of r2, the flow rate must be altered by a factor of X, where

$$X = (r2/r1)^2$$

0.008

For example, when scaling up from a 250 x 4.6mm column t 250 x 10mm I.D. column, the flow rate must be increased b factor of 4.73 in the 10mm column to generate the same lin 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 gi column dimension to any other is as follows:

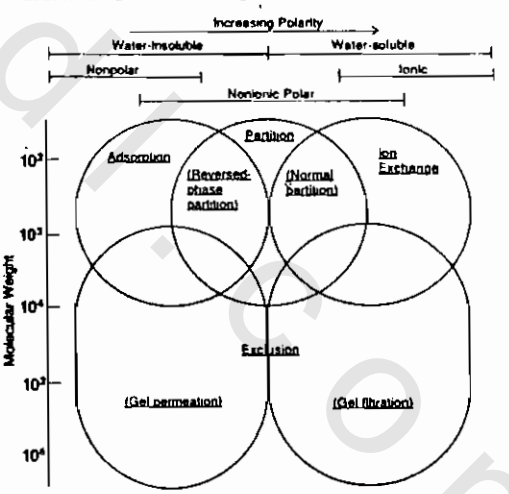
$$F2 = F1 \cdot (L2/L1) \cdot (r2/r1)^2$$

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 RETENTI

Change in	Effect on Retention Time		
Separation	t_0	Run Time	Band Spacin
Flow rate, *F*	1/*F*	1/*F*	None
Column volume, V_m	V_m	V_m	None
Increase in vol - % strong solvent	None	Decreas	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

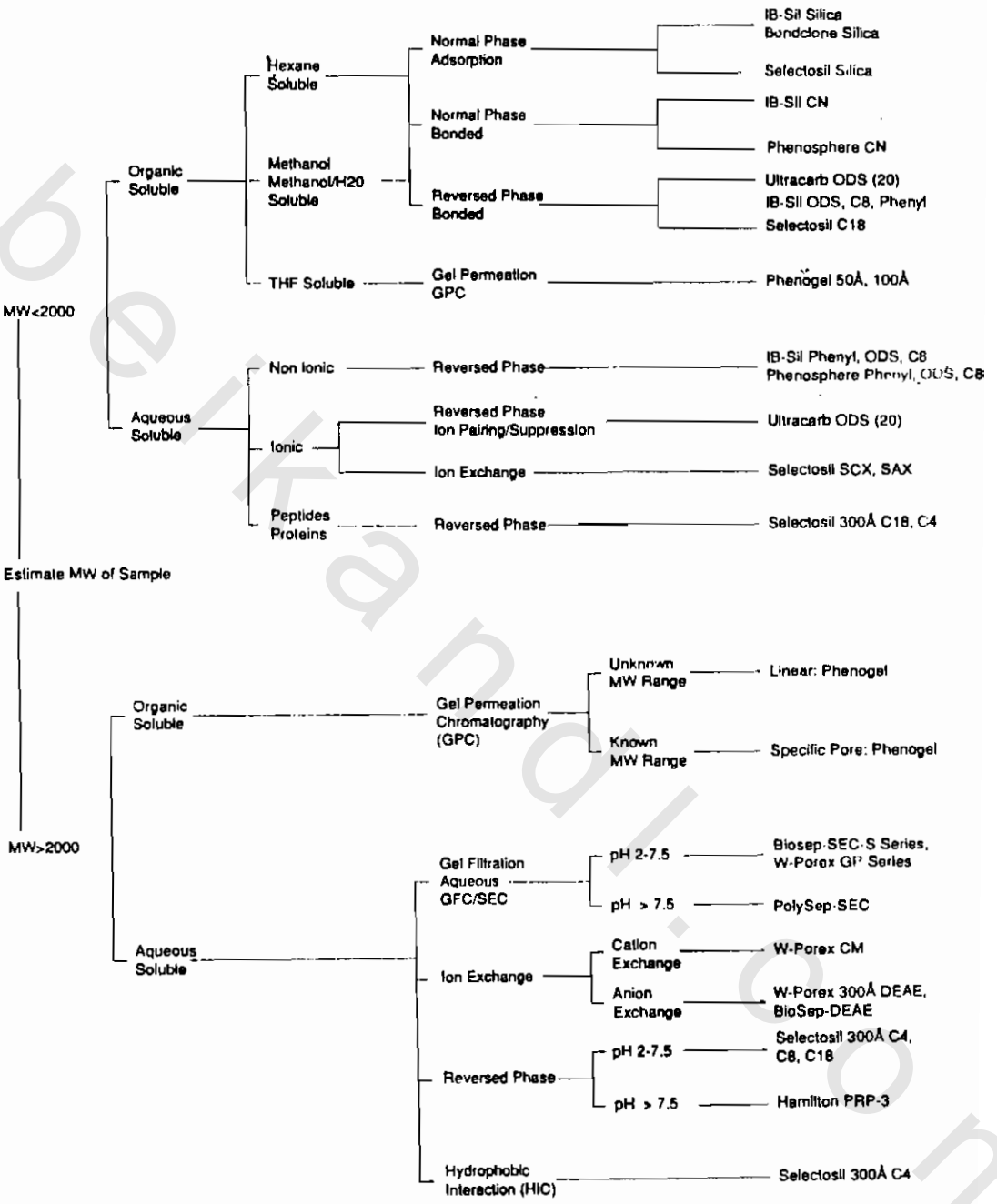
APPLICATIONS OF LIQUID CHROMATOGRAPHY



(From: D.L. Saunders, in *Chromatography*, 3rd ed, E. Heftmann, Ed., p. 81, Van No Reinhold, New York, 1975. With permission.)

OLUMN SELECTION GUIDE

les of Thumb



05

0.005

obeikandl.com