# الكـــرومـــاتـوغـرافـيــا

## مـاهـي الكـــرومـــاتوغرافيـــا

تم ايجاد مصطلح الكروماتوغرافيا السائلة في بدايات عام 1900 كنتيجة لأبحاث عالم النبات الروسي

Mikhail S. Tswett , حيث ركزت أبحاثه الرائدة على فصل الأصبغة النباتية المستخلصة بواسطة المحلات بعمود محشو بجزيئات ( جسيمات)

قام تويست بملىء عمود زجاجي مفتوح من الأعلى ببعض الجزيئات (حشوة) وهي نوعان من المواد التي وجدها مفيدة له وهي بودرة الطباشير (كربونات الكالسيوم) والألومينا

وقام بصب العينة (خلاصة متجانسة من أوراق النبات المستخلصة بواسطة محل) في العمود وتركها تتغلغل في الحشوة , بعد مرور العينة في العمود بفعل الجاذبية قام بصب كمية من المحل النقي , ظهرت عصابات (اشرطة) من الألوان المختلفة في العمود لأن بعض المركبات كانت تتحرك بسرعة أكبر من الأخرى

أرجع تويست هذه العصابات مختلفة الألوان إلى مركبات مختلفة موجودة أصلاً في العينة. حيث أنه أوجد طريقة تحليلية لهذه المركبات تعتمد على الاختلاف ما بين قدرة المركبات على الانجذاب للجزيئات.

المركبات التي انجذبت لجزيئات الحشوة لمدى كبير كانت تتحرك ببطء بينما الجزيئات التي انجذبت إلى جزيئات المحل تحركت بسرعة أكبر ويمكن وصف هذه العملية كما يلي:

المركبات الموجودة في العينة توزعت أو تجزأت بشكل متباين ما بين المحل المتحرك ( الطور الناقل ) وبين الجزيئات المسماة بالطور الثابت ما جعل كل مركب يتحرك بسرعة مختلفة , مما سبب فصل هذه المركبات

صاغ تويست اسم الكروماتوغرافيا من التسمية اليونانية Chroma وتعني اللون وGraph وتعني الكتابة وذلك لوصف تجربته الملونة , ومن المستغرب أن كلمة tsweet بالروسية تعني اللون

أصبحت الكروماتوغرافيا السائلة بأشكالها المختلفة من أقوى طرائق الكيمياء التحليلية

**طرائق الكروماتوغرافيا السائلة**

يمكن انجاز عمليات الكروماتوغرافيا السائلة باستخدام طرق مسطحة

(الطريقة 1و 2) أو باستخدام طرق العمود (الطريقة 3)

كروماتوغرافيا العمود تعتبر من أقوى الطرق ويمكنها استيعاب

عدد كبير من العينات. في جميع الأحوال يجب إذابة العينة في

سائل ينقل بعد ذلك على سطح أو داخل الجهاز الكروماتوغرافي

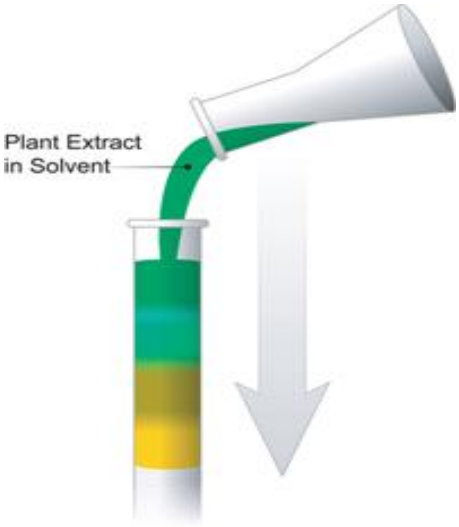



FIGURE A

**التقنية 1:** توضع العينة على شكل قطرات فوق طبقة رقيقة من الجسيمات الكروماتوغرافية (الطور الثابت) والمثبتة على سطح طبق زجاجي ثم تترك لتتغلغل داخل الطبقة [ الشكل B]

تغمس الحافة السفلية لهذه الطبقة في محل , يتم انتقال المحل عن طريق الخاصة الشعرية عبر الجزيئات الجافة و يرتفع نحو الأعلى , تدعى هذه الطريقة ( كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC )

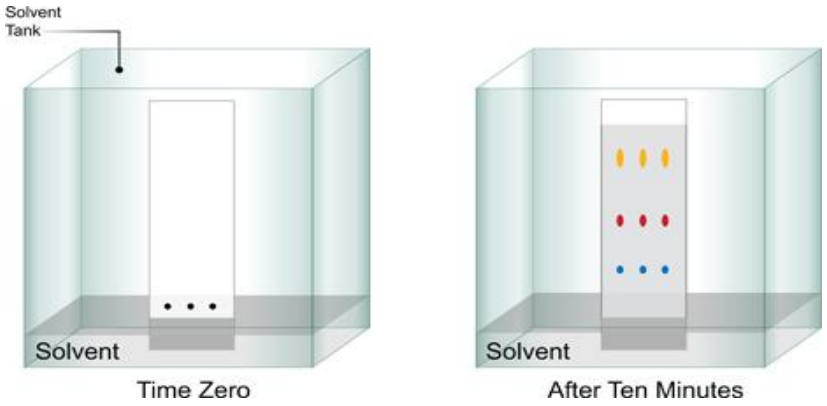



FIGURE B

إن العينة السوداء هي مزيج من أصبغة غذائية أحمر , أزرق , أصفر وقد تم فصلها بطريقة كروماتوغرافية

**التقنية 2** :في الشكل C يتم وضع قطرات العينة على سطح ورقة ( طور ثابت ) ثم يتم إضافة المحل ( الطور المتحرك ) في مركز هذه القطرة لعمل انتشار قطري نحو الخارج

وهذا نوع من الورق الكروماتوغرافي ( ورق الكروماتوغرافيا التقليدي يعمل بطريقة مشابهة لكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC ذو الانتشار الخطي .

في الصورة العلوية نشاهد نفس الصبغة السوداء توضع على الورقة

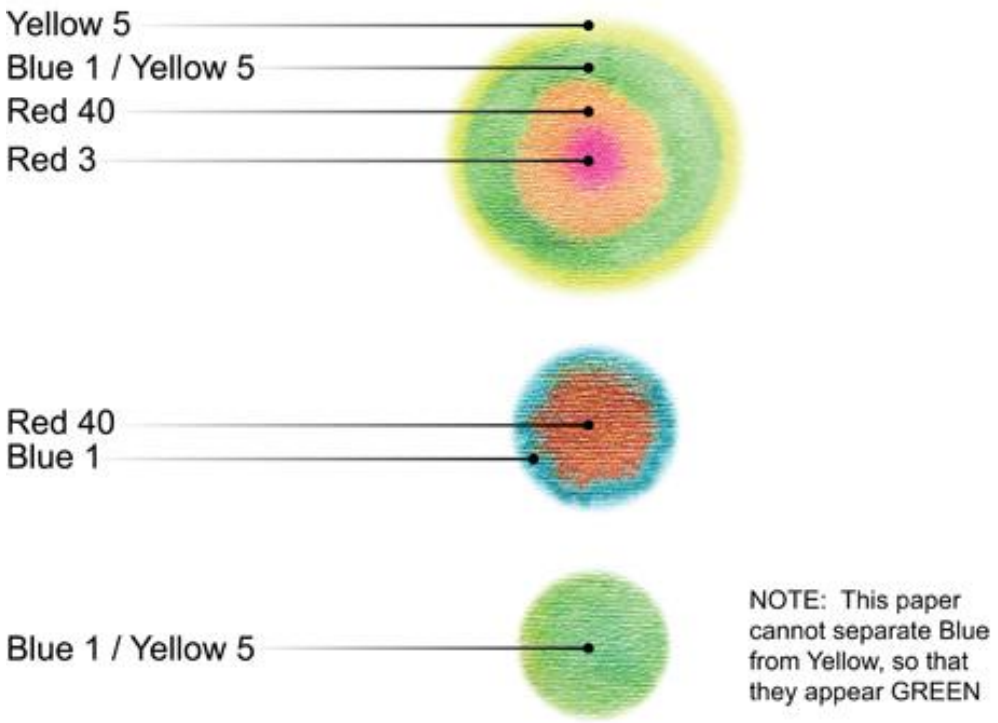



FIGURE C

لاحظ أن الاختلاف في قوة الفصل لهذه الورقة بالتحديد مقارنة مع TLC:

إن وجود الحلقة الخضراء يدل على أن الورقة غير قادرة على فصل اللونين الاصفر والازرق عن بعضهما لكنها قادرة على فصلهما عن اللون الأحمر

في الصورة السفلية تم وضع العينة الخضراء المكونة من نفس اللونين الاصفر والأزرق على الورقة وكما هو متوقع لم تستطع الورقة فصل الصباغين عن بعضهما وفي الوسط اللون الارجواني المكون من الاحمر والأزرق قد اضيف للورقة وتم فصلهما بشكل جيد

**التقنية 3 :** في هذه الطريقة وهي أقوى الطرق تمر العينة عبر عمود يحوي جسيمات مناسبة (طور ثابت) وتدعى الحشوة الكروماتوغرافية , يتدفق المحل وهو الطور المتحرك عبر الجهاز

في طريقة الاستخلاص من الطور الصلب SPE يتم وضع العينة أعلى العمود ويقوم تيار المحل المتحرك بحمل العينة عبر الجهاز الكروماتوغرافي , وكما في تجربة Tswett يتم فصل المركبات في العينة وذلك اعتمادا على تحركها بسرعات مختلفة عبر الجهاز , وهنا يتم وضع العينة السوداء في العمود ويتم استخدام محل مختلف في كل مرحلة من أجل تحقيق عملية الفصل

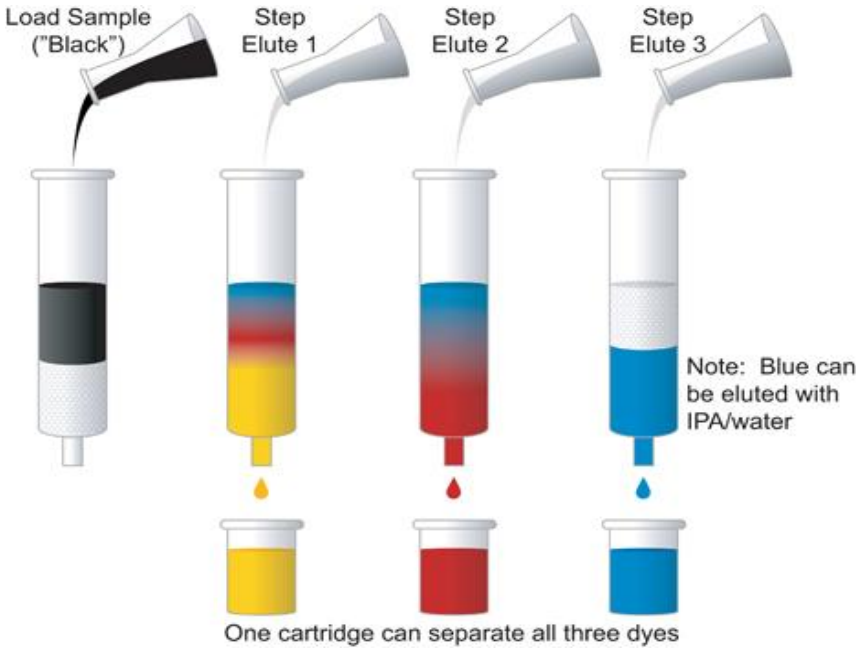



FIGURE D-1 Column Chromatography – Solid-Phase Extraction SPE]

عند استخدام العمود كجهاز كروماتوغرافي هناك عدة طرق لتحقيق التدفق والذي قد يكون بفعل الجاذبية أو باستخدام طريقة التفريغ الهوائي في الأعمدة المقاومة للضغط

القطر المناسب للجسيمات المستخدمة في هذه الحالة أكبر من 50 ميكرون لذلك فإن هناك مقاومة أقل لتدفق السائل

تعتبر الأعمدة المفتوحة مثال عن هذا كما في تجربة Tsweet بالإضافة إلى أن الأعمدة البلاستيكية الصغيرة المشابهة في شكلها لإبر الحقن يمكن حشوها بمادة واستخدامها في تحضير العينة ويسمى هذا الاجراء بالاستخلاص من الحالة الصلبة solid-phase extraction [SPE] وهنا يسمى الجهاز الكروماتوغرافي بالخرطوش cartridge الذي يستخدم مبدأ التدفق تحت التفريغ الهوائي لفصل العينات المعقدة قبل تحليلها لاحقاً

يتطلب تحسين عملية الفصل استخدام جزيئات ذات الحجوم الأصغر من 10 ميكرون , لكن الجزئيات ذات الحجوم (الأبعاد) الصغيرة تمتلك مقاومة أكبر للتدفق لذلك فإن ذلك يتطلب استخدام ضغط أعلى من أجل الوصول إلى معدل التدفق المطلوب , ويلزم في هذه الحالة استخدام مضخات وأعمدة مقاومة للضغط العالي

عندما نستخدم ضغط مناسب قابل للارتفاع إلى ضغوط عالية لجعل المحل يتدفق خلال العمود عندئذ تسمى هذه الطريقة HPLC

**ماهي كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي HPLC**

إن الاسم المختصر HPLC تم ايجاده من قبل العالم الراحل Casaba Horváth في مؤتمر بيتسبورغ للكيمياء التحليلية عام 1970 وقد أشار منذ البداية إلى حقيقة أن الضغط العالي تم استخدامه من اجل توليد التدفق المطلوب من أجل كروماتوغرافيا الأعمدة

المضخات المستخدمة بداية الأمر كان لها قدرة على توليد ضغط 500 رطل psi (35 بار) وهذا ما يسمى كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي HPLC

شهدت بدايات عام 1970 قفزة كبيرة في مجال التكنولوجيا , وكانت أجهزة الكروماتوغرافيا الجديدة قابلة للتطوير بحيث تولد ضغطا يصل إلى 6000 رطل ( 400 بار )

بدت الـ HPLC كطريقة راسخة متضمنة حواقن محسنة وأجهزة كشف وأعمدة بعد منتصف عام 1970 مع مواصلة التطور خلال ذلك الوقت بجزيئات أصغر حجما وأيضا ضغط اعلى .

تعتبر الـ HPLC اليوم واحدة من أقوى طرق الكيمياء التحليلية ولها القدرة على الفصل والتحليل الكمي والنوعي للمركبات الموجودة في أي عينة قابلة للإنحلال في السائل

في هذه الأيام يمكن تحليل المركبات ذات تركيز الأثر (أقل من مرتبة PPT) بسهولة

ويمكن إجراء التحليل بال HPLC على كل العينات تقريباً كالعينات الصيدلانية والغذائية والأغذية ذات الأثر العلاجي nutraceuticals ومواد التجميل والأنسجة وعينات الطب الشرعي والكيماويات الصناعية

FIGURE D-2

**ما هو الـ UPLC**

في عام 2004 تم إحداث تحسينات إضافية في الأجهزة والأعمدة للحصول على زيادة أكبر في قوة الفصل والسرعة والحساسية في الكروماتوغرافيا

تم تصميم أعمدة بحشوة ذات أقطار جسيمات أقل من 1.7 ميكرون وأجهزة ذات قدرات نوعية لتمرير الطور الناقل عند ضغوط تصل إلى 15000 رطل (1000 بار) للوصول إلى مستوى جديد من الأداء , إن نظاما جديدا بشكل كلي تم ايجاده لعمل أداء أعلى للكروماتوغرافيا السائلة يعرف الآن باسم UPLC

في أيامنا هذه يتم إجراء أبحاث أساسية من قبل العلماء تتضمن جسيمات ذات أقطار أصغر من 1 ميكرون وضغوط أكبر من 100000 رطل (6800 بار) وهذا يعطينا لمحة عما نأمل حصوله في المستقبل

## كيف تعمل الكروماتوغرافيا السائلة HPLC

إن مكونات جهاز الكروماتوغرافيا السائلة موضحة في الشكل E

يحوي الخزان على المحل والمسمى بالطور المتحرك , مضخة ذات ضغط مرتفع ( نظام توزيع المحل ) تقوم بتوليد وقياس معدل تدفق محدد , عادة مايكون من رتبة ميللي لتر في الدقيقة , حاقن ( آلي ) يستطيع حقن العينة داخل تيار الطور المتحرك باستمرار والذي يقوم بدوره بنقل العينة للعمود , العمود يحوي الحشوة الكروماتوغرافية اللازمة لحدوث عملية الفصل الكروماتوغرافي , هذه الحشوة تسمى الطور الثابت لأن مكانها محجوز داخل الجهاز الكروماتوغرافي , ويلزم أيضا مكشاف لرؤية عصابات المواد المفصولة والخارجة من العمود معظم المواد تكون عديمة اللون لذلك لا يمكن تمييزها بالعين

يتحرك الطور المتحرك خارجا من المكشاف ثم يرمى في النفايات كما يمكن جمعه إذا كان ذلك مطلوبا

إذا كان الطور المتحرك يحتوي على مركب تم فصله , فإن الجهاز له القدرة على تجميع هذه الأجزاء من السائل المطرود خارجا والحاوي على المادة النقية لاستخدامها في دراسات اخرى تسمى هذه الطريقة preparative chromatography

لاحظ أننا نستخدم أنابيب ضغط عالي وتجهيزات اخرى لربط المضخة مع مكونات الحاقن والكاشف من أجل ايجاد طريق لمرور الطور المتحرك والعينة والمواد المفصولة

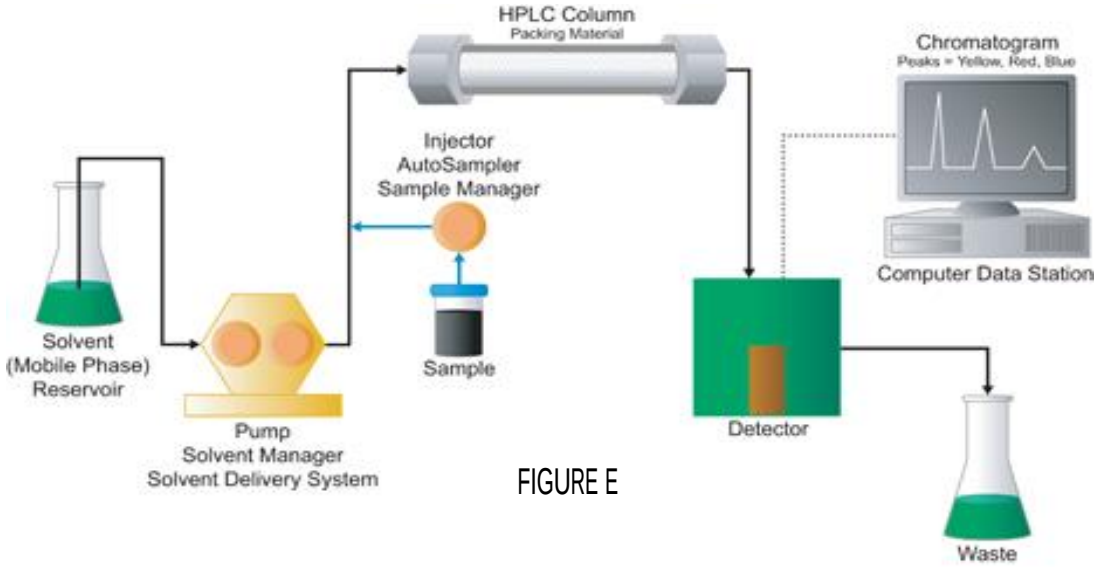



FIGURE E

يتم وصل المكشاف مع الكومبيوتر الذي يعالج المعطيات وهو جزء من جهاز الـ HPLC وهو الذي يقوم بتسجيل الاشارات الكهربائية اللازمة لإعداد التقرير الظاهر على الشاشة ولتحديد نوع المركبات وتركيزها في العينة

بما أن المركبات الموجودة في العينة مختلفة فيما بينها , لذلك تم تطوير العديد من المكشافات فعلى سبيل المثال إذا كان المركب يمتص الضوء مافوق البنفسجي يمكننا استعمال مكشاف الـ UV , وإذا كان المركب يتفلور يمكن استعمال مكشاف الفلورة , حتى إذا كان المركب لا يمتلك المواصفات السابقة يمكن استعمال مكشاف أكثر شمولاً مثل evaporative-light-scattering detector (ELSD) كاشف انتثار الضوء .

ويعتبر استخدام عدة مكشافات بشكل متسلسل من أقوى الطرق , مثلاً UV / ELSD مع جهاز مطياف الكتلة MS لتحليل نتائج الفصل وهذا يعطينا معلومات شاملة حول المادة المراد تحليلها وذلك منذ الحقنة الأولى

إن دمج مطياف الكتلة مع جهاز الكروماتوغرافيا يسمى LC/MS

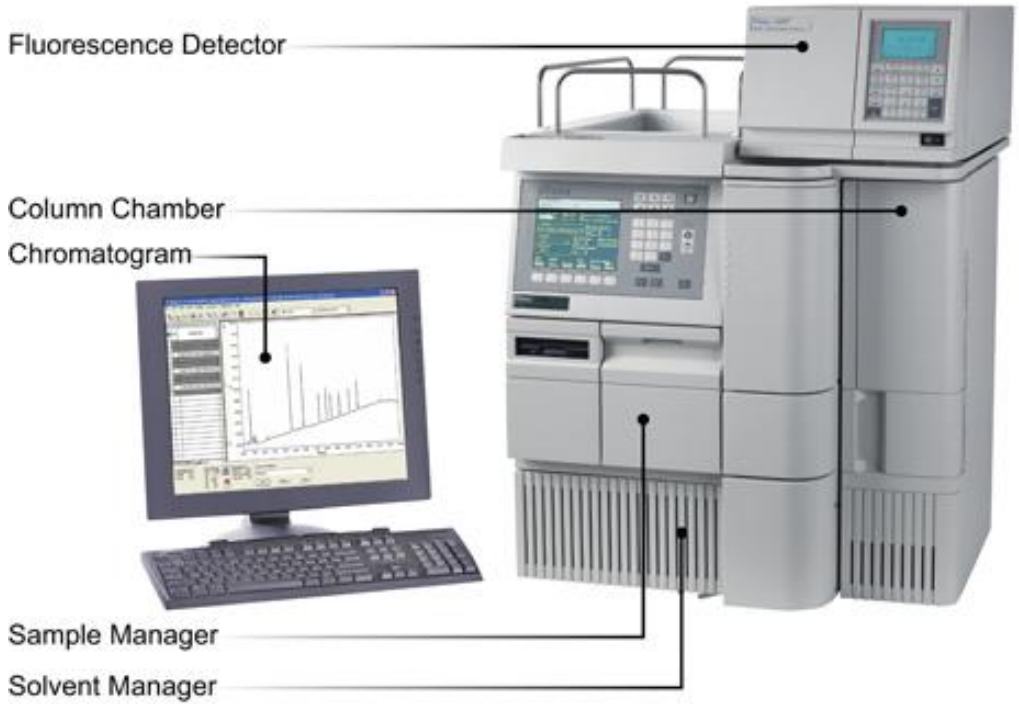



FIGURE F

## طريقة عمل الـ HPLC

يمكن أن نفهم كيفية تحقيق عملية الفصل للمركبات الموجودة في العينة بالنظر إلى الشكل G

يدخل الطور المتحرك إلى العمود من اليسار مارا عبر الحشوة ويخرج من اليمين

يتم تمثيل اتجاه التدفق بالسهم الأخضر , انظر أولا للصورة العلوية وهي تمثل حالة العمود في الزمن صفر أي لحظة الحقن عند دخول العينة والبدء بتكوين مجموعة منفصلة .

العينة المشاهدة هنا هي مزيج من الصباغ الأصفر والأحمر والأزرق وتبدو في مدخل العمود كعصابة سوداء

وفي حقيقة الأمر فإن العينة يمكن أن تكون أي شيء يمكنه الانحلال في محل ما , بشكل افتراضي يمكن أن تكون المواد عديمة اللون والعمود عاتم ولذلك نحن بحاجة لمكشاف لرؤية المواد فور خروجها

بعد عدة دقائق حيث يكون تدفق المحل أصبح مستمرا عبر جزيئات الحشوة يمكننا رؤية شرائط الصبغات تتحرك بشكل منفرد بسرعات مختلفة ويعود سبب ذلك إلى التنافس بين الطور المتحرك والطور الثابت لجذب الصبغات أو المواد المنحلة إليه

كما يمكن ملاحظة أن الصباغ الأصفر يتحرك بأكبر سرعة وهو على وشك الخروج من العمود , إن الصباغ الأصفر محب أو منجذب للطور المتحرك أكثر من باقي الأصبغة لذلك فهو يتحرك بأكبر سرعة وهي سرعة قريبة من سرعة الطور المتحرك نفسه , الصباغ الأزرق محب للطور الثابت أكثر من الطور المتحرك , إن انجذابه القوي لجزيئات الحشوة يجعله يتحرك ببطء واضح جدا ,بتعبير آخر هو من أكثر المواد القابلة للاحتفاظ أو البقاء في هذا المزيج , الصباغ الأحمر يمتلك انجذابا وسطا للطور المتحرك لذلك فهو يتحرك بسرعة متوسطة عبر العمود بما أن الشرائط تتحرك بسرعات متباينة لذلك يمكننا فصلها بطريقة كروماتوغرافية

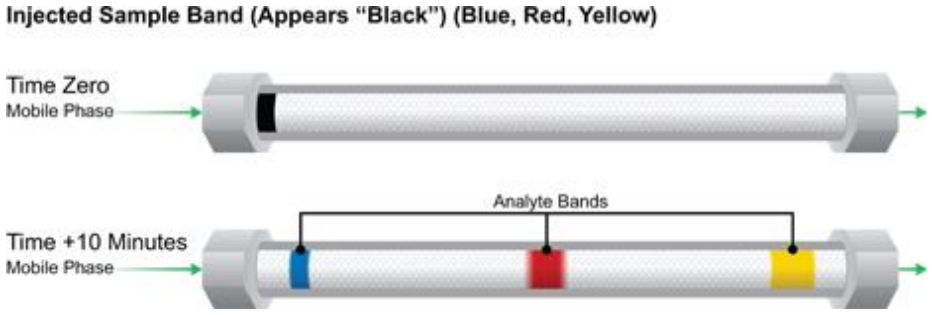



Figure G: Understanding How a Chromatographic Column Works – Bands

**ماهو المكشاف :**

عندما تخرج مجموعة الصبغات المنفصلة من العمود فإنها تمر فورا داخل المكشاف الحاوي على خلية تتدفق عبرها العينة والتي تقوم بكشف كل مركب يتم فصله بعد معرفتها بخلفية عن الطور المتحرك

في حقيقة الأمر فإن محاليل من مركبات عديدة عند تراكيز ملائمة للفصل الكروماتوغرافيا تكون عديمة اللون

المكشاف الملائم هو الذي لديه القدرة على الاحساس بوجود المركب وإرسال إشارة كهربائية معبرة عنه إلى جهاز الكومبيوتر , يمكننا انتقاء مكشاف من بين أنواع عديدة اعتمادا ًعلى صفات وتراكيز المركبات المراد فصلها وتحليلها

**ما هو التقرير Chromatogram:**

التقرير هو شرح عملية الفصل الكيميائية الحاصلة في جهاز الكروماتوغرافيا , سلسلة من القمم التي تبدا بالارتفاع بدءا من الخط الأساسي baseline يتم رسمها فوق محور الزمن , كل قمة تمثل استجابة المكشاف لكل مادة ويتم رسم التقرير باستخدام جهاز الكومبيوتر

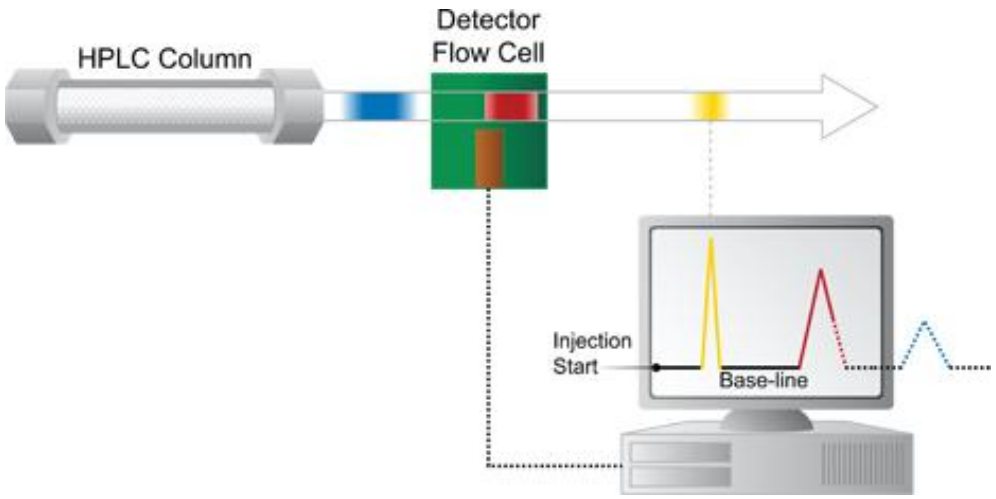



FIGURE H

في الشكل H تم مرور الصباغ الأصفر بشكل كامل عبر الخلية ( Cell) الخاصة بالمكشاف , تم تشكيل إشارة كهربائية وإرسالها للكومبيوتر , وظهر التقرير الناتج على شاشة الجهاز

لاحظ أن التقرير بدأ بالظهور منذ لحظة حقن العينة كخط مستقيم يظهر في أسفل الشاشة وهذا يدعى baseline وهو يمثل استجابة المكشاف للطور المتحرك النقي عبر الزمن , عندما تبدا المادة الصفراء بالمرور عبر خلية المكشاف يتم إرسال إشارة قوية للكومبيوتر يبدأ الخط بالانحناء صاعدا في البداية ثم نازلا بشكل متناسب مع تركيز المادة في العينة وهذا ما يشكل القمة على التقرير

بعد خروج المادة الصفراء بشكل كامل من خلية المكشاف يعود مستوى الإشارة الكهربائية إلى الـ baseline ويكون السائل المتدفق عبر الخلية هو الطور المتحرك النقي

وبما أن الصباغ الأصفر يتحرك بأكبر سرعة ويطرد أولا من العمود لذلك فهو يشكل القمة الأولى في التقرير

بعد فترة قصيرة يصل الصباغ الاحمر للخلية تبدا الإشارة الخارجة من المكشاف بالارتفاع عن مستوى الـ baseline فور دخول المادة الحمراء للخلية وتبدا القمة الممثلة للمادة الحمراء بالارتسام على في هذا الشكل IH , المادة الحمراء لم تمر من الخلية بشكل كامل و يرينا الشكل كيف ستبدو المادة داخل الخلية والقمة العائدة لها على التقرير إذا قمنا بإيقاف الجهاز عن العمل عند تلك اللحظة , لذلك فإن معظم المادة الحمراء تم مرورها عبر الخلية وتم رسم القمة التابعة لها كما هو واضح من خط الرسم (المستمر ) , إذا تابعنا العمل بعد أن توقفنا سيتم مرور كامل الصباغ الأحمر عبر خلية المكشاف وسيتم إكمال رسم القمة ( الخط المنقط )

الصباغ الأزرق (أكثر المواد بقاءً في العمود ) يتحرك بأقل سرعة ويتم طرده من العمود بعد الصباغ الأحمر

الخط المنقط يرينا كيف سيبدو التقرير الكامل فيما إذا تركنا العملية تجري حتى النهاية

إنه لمن الممتع ملاحظة أن عرض القمة الخاصة بالصباغ الأزرق (قاعدة المثلث) هو الأكبر بينما هو الأضيق في العمود الكروماتوغرافي ثم يصبح الأعرض بعد الخروج من العمود وهذا بسبب أنه يتحرك بشكل أبطأ عبر الحشوة الكروماتوغرافية ويحتاج لزمن أكبر وحجم أكبر من طور المتحرك للخروج بشكل كامل

بما أن الطور المتحرك يمر بمعدل ثابت فهذا يعني أن الحزمة الزرقاء أعرض وأكثر تمديدا من البقية

وبما أن استجابة المكشاف تتناسب مع تركيز المادة فإن القمة الممثلة للصباغ الأزرق تكون أقل ارتفاعا وأعرض من باقي القمم

**التحليل الكمي والنوعي للمركبات:**

في الشكل H تم تمثيل ثلاثة أصبغة بثلاث قمم مفصولة كل في وقته المحدد في التقرير الكروماتوغرافي

كل مادة خارجة من العمود في المكان المحدد تم قياسها بمقارنة الزمن من لحظة الحقن (الزمن صفر) حتى لحظة تشكل اعلى نقطة في القمة من خلال مقارنة زمن الاحتباس (الاستبقاء) لكل مادة مع زمن الاحتباس لمادة قياسية معروفة التركيز في نفس الجهاز ونفس الطور المتحرك والثابت وعندئذ يمكن للمحلل أن يعرف نوع المادة .

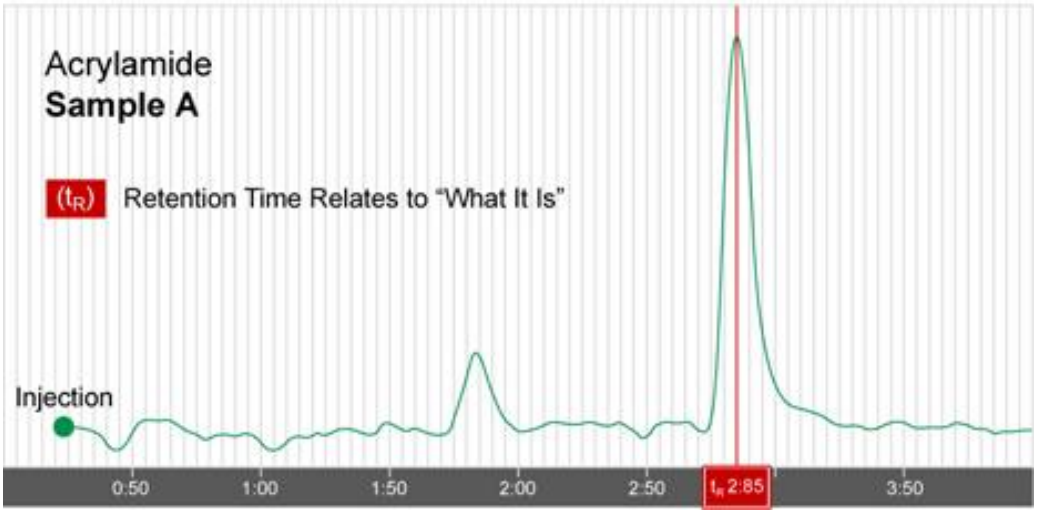



Figure I-1: Identification

في التقرير الظاهر في الشكل I-1 يمكن للمحلل أن يعرف أنه ضمن شروط التحليل هذه فإن المادة المحللة acrylamide يمكن فصلها وخروجها من العمود عند الزمن 2.85 دقيقة (زمن الاحتباس الخاص بالمادة)

كل عينة جديدة تحوي الأكريل أميد تحقن في هذا الجهاز ضمن نفس الشروط فإنه سيتم رسم القمة عند الزمن 2.85 (العينة B في الشكل I-2 )

لكي تعرف بشكل أفضل لماذا تتحرك بعض المواد أبطأ من غيرها (أي يتم الاحتفاظ بها بشل أفضل) راجع الفصل الكروماتوغرافي

حالما تتم معرفة هوية المادة فإن المعلومة المهمة التالية هي ما هو مدى تواجد المركب في العينة

التقرير الكروماتوغرافي والمعلومات الواردة فيه والآتية من المكشاف تساعدنا في حساب تركيز كل مركب .

المكشاف يستجيب بشكل أساسي لتركيز المركب حالما يتدفق عبر حجرة المكشاف و كلما كان تركيز المادة أكبر سوف يتم إرسال إشارة أقوى ويرى ذلك على شكل قمة أكثر ارتفاعاً فوق الـ baseline

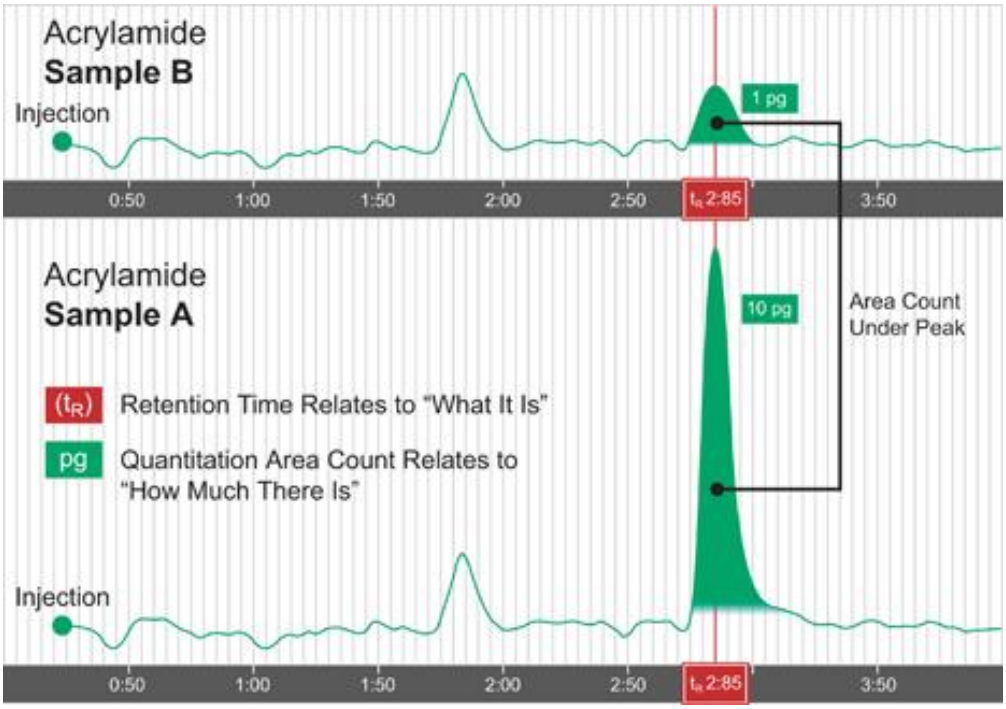



Figure I-2: Identification and Quantitation

في هذا الشكل التقرير الخاص بالمادة A و B على نفس محور الزمن موضوعان فوق بعضهما البعض , تم حقن نفس حجم العينة في كلا الحقنتين , كلا التقريرين يعرضان قمة عند زمن الاحتفاظ 2.85 مما يشير إلى أن كل عينة تحوي على الأكريل أميد لكن تقرير العينة A يعرض لدينا قمة أكبر للأكريل أميد , أن المساحة المتوضعة تحت القمة أو مساحة القمة هو قياس تركيز الأكريل أميد في هذا المثال تم حساب قيمة هذه المساحة وتضمينها في التقرير عن طريق جهاز الكومبيوتر

إن مساحة القمة في العينة A أكبر بعشر مرات منها في العينة B

باستخدام محاليل قياسية standards (معلومة التركيز) يمكن معرفة أن العينة A تحوي 10 بيكو غرام من الأكريل أميد وهي أكبر بعشر مرات من الكمية في العينة B ( 1 بيكو غرام )

لاحظ وجود قمة اخرى لم يتم تحديدها قد خرجت من العمود عند الزمن 1.8 دقيقة في كلا العينتين

بما ان مساحتي القمتين في كلتا العينتين متماثلة فإن هذا المركب غير المعروف له نفس التركيز في كلتا العينتين

**الفصل المتماثل والمتدرج في الكروماتوغرافيا السائلة**

يوجد نوعان لإمرار العينة في الكروماتوغرافيا السائلة , تدعى الأولى التصفية المتماثلة isocratic elution وهنا فإن الطور المتحرك سواء أكان محلا نقيا أو مزيجاً من المحلات فإن تركيبه يبقى ثابتا خلال العملية الكروماتوغرافية

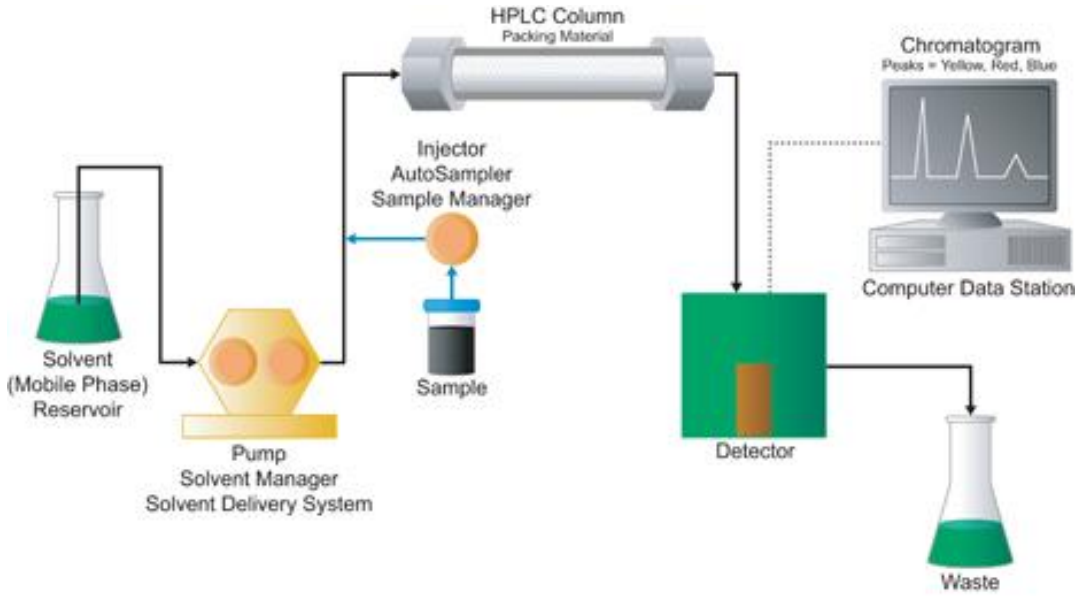



Figure J-1: Isocratic LC System

النوع الآخر يسمى الطرد أو التصفية المتدرجة gradient elution وكما هو واضح من التسمية : يتغير تركيب الطور المتحرك خلال عملية الفصل , هذا النوع مفيد من أجل العينات الحاوية على مواد تختلف كثير فيما بينها بالقطبية , ومع تقدم عملية الفصل الكروماتوغرافي تزداد قدرة الطور المتحرك على طرد المواد المحتفظ بها في العمود

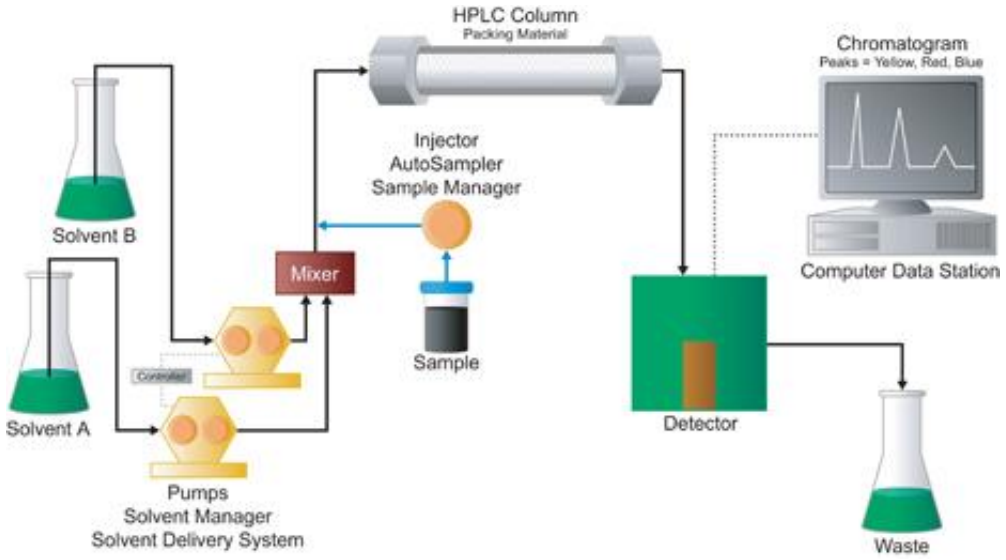



Figure J-2: High-Pressure-Gradient System

في هذا المثال المبسط J-2 يوجد عبوتان لمحلين ومضختين , يتم التحكم بسرعة كل مضخة بواسطة البرنامج لتلقي كمية أكبر أو أقل من كل محل خلال سير عملية الفصل

يتم جمع التيارين ودمجهما في جهاز المزج لتكوين الطور المتحرك ذو التركيب المطلوب ويتم ايصاله للعمود مادامت العملية الكروماتوغرافية مستمرة

في البداية فإن الطور المتحرك يحوي على نسبة أكبر من المحل الأضعف (A) بمرور الزمن فإن نسبة المحل الأقوى (B) تزداد وذلك تبعا للجدول الزمني المعد مسبقا

لاحظ في الشكل Figure J-2 أن جهاز المزج يقع بعد المضخة لذلك فإن التصفية المتدرجة تتم تحت ضغط عال

بعض الأنظمة الكروماتوغرافية مصممة لمزج عدة محلات تحت ضغط منخفض ويكون المزج قبل المضخة الوحيدة و يقوم الصمام الموزع للمحلات بالانتقاء مابين أربع زجاجات مغيرا تركيب الطور المتحرك بمرور الزمن انظر الشكل J-3

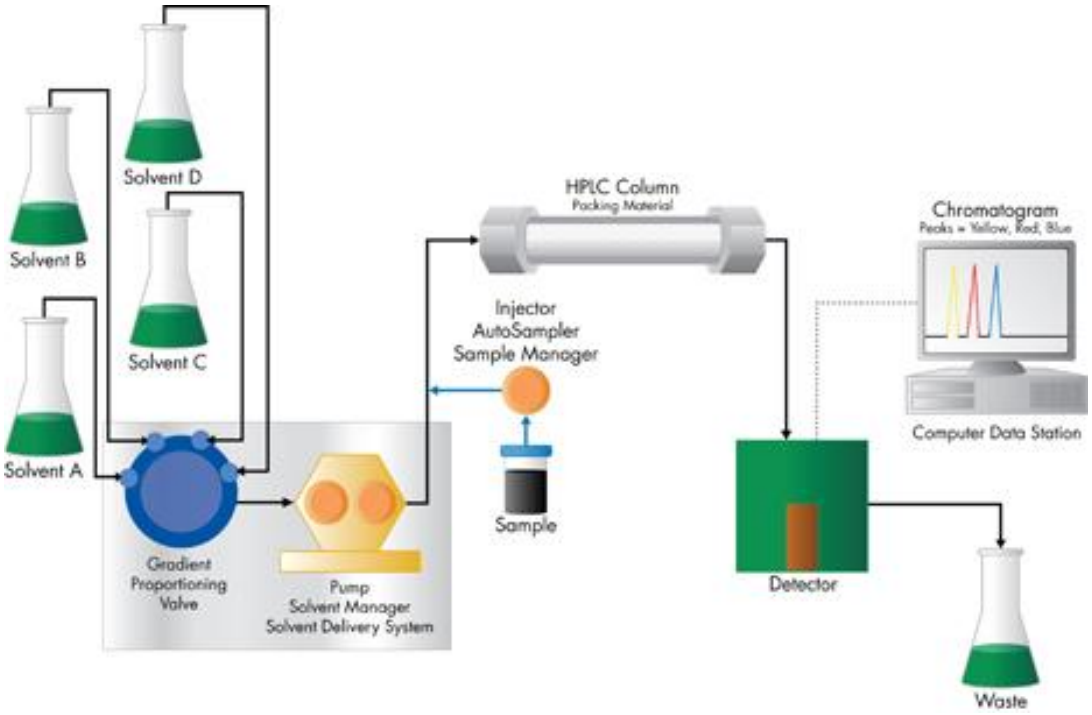



Figure J-3: Low-Pressure-Gradient System

**السلم الكروماتوغرافي**

لقد تحدثنا عن كيفية إعطاء الكروماتوغرافيا للنتائج التحليلية والتي يمكن استخدامها لتحديد المواد الموجود في العينة كماً ونوعاً

لكن يمكن استخدام الكروماتوغرافيا لتنقية وتجميع كميات معينة من كل مركب باستخدام مجمع من جهة تدفق المواد بعد المكشاف هذه العملية تسمى preparative chromatography الشكل K

في هذا النوع من الكروماتوغرافيا يمكن للمحلل أن يجمع عيناته الخاصة فور خروجها من العمود (في مثالنا هذا الأصفر والأحمر والأزرق)

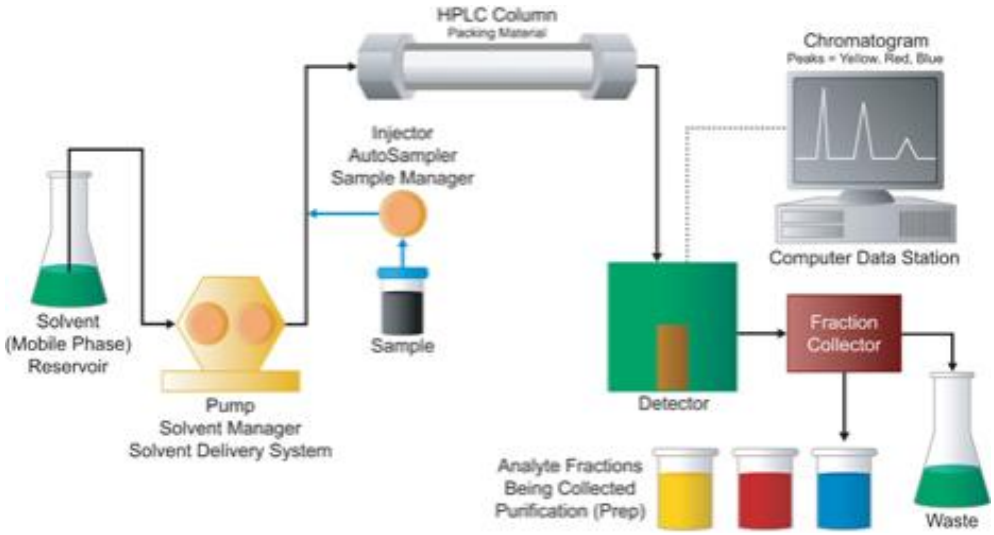



Figure K: HPLC System for Purification: Preparative Chromatography

يقوم المجمع الجزئي بجمع السوائل الخارجة بشكل انتقائي والتي أصبحت الآن موادا نقية كما يتم تحريك الأوعية عند أزمنة معينة ولذلك فكل وعاء سيجمع عينة خاصة بكل قمة

يقوم العلماء بتحديد الأهداف والغايات لكل درجة نقاوة والكميات أيضا مقترنة بمعرفة مدى تعقيد العينة وطبيعة وتركيز المادة المحللة , هذه الأهداف بدورها تحدد كمية العينة اللازمة للعملية وقدرة (امكانيات) الجهاز الكروماتوغرافي أيضا

بشكل عام عندما يزداد حجم العينة فإنه سيزداد حجم العمود والمضخة ستحتاج لقدرة أكبر من أجل معدل التدفق

تحديد قدرة واستيعاب النظام الكروماتوغرافي يسمى السلم الكروماتوغرافي HPLC scale

الجدول A يعرض عددا من السلالم الكروماتوغرافية وأهدافها

| Scale | Chromatographic Objective |
|---|---|
| Analytical | Information [compound ID and concentration] |
| Semi–preparative | Data and a small amount of purified compound [< 0.5 gram] |
| Preparative | Larger amounts of purified compound [> 0.5 gram] |
| Process [Industrial] | Manufacturing quantities [grams to kilograms] |

Table A: Chromatography Scale

إن القدرة على زيادة الانتقائية باستخدام مجموعة من الأطوار الثابتة والمتحركة محققة أكبر قدرة فصل ممكنة ما بين مكونين من مكونات العينة أمر بالغ الأهمية في تحديد الاحتياجات اللازمة لرفع مستوى الفصل (انظر المناقشة حول أنواع الفصل)

عندئذ تصبح مسألة السعة هي رفع حجم العمود [Vc] إلى مستوى كمية العينة اللازم حقنها وانتقاء حجم الجزيئات المناسب مع تحديد الضغط والكفاءة

حجم العمود تابع لطول الحشوة [L] والقطر الداخلي [i.d.] محددين بذلك كمية الحشوة التي يمكن أن يحتويها العمود ( الشكل L )

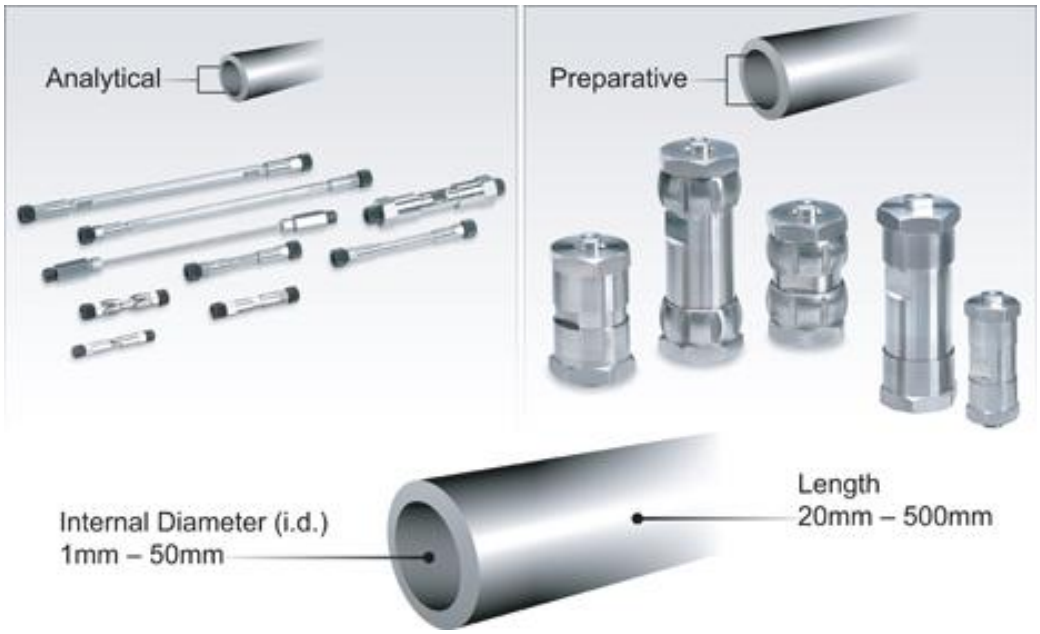



Figure L: HPLC Column Dimensions

بشكل عام تتراوح أطوال الأعمدة ما بين 20 mm إلى 500 mm, ومابين 1 mm إلى 100 mm بالنسبة للقطر الداخلي

عندما يرتفع مستوى السلم الكروماتوغرافي فإن أبعاد العمود ستزداد وخاصة في منطقة إجراء المقاطع ضمن العمود ولتحسين انتاجية العمود يجب أن يزداد معدل تدفق الطور الثابت بالتناسب مع مناطق إجراء المقاطع ضمن العمود

إذا كان المطلوب هو استخدام جسيمات ذات اقطار اقل من أجل قوة فصل أكبر , فإنه يجب تصميم مضخات تؤمن معدل تدفق أعلى عند ضغط راجع عال backpressure , على سبيل المثال: التطبيق ذو الإشارة الحمراء X سوف يستخدم عمود بقطر داخلي 10–40 mm حاوي على حشوة بقطر جسيمات يتراوح مابين 5 - 15 ميكرون

يتم حساب طول العمود اعتمادا على طول المسار اللازم للمركب النقي أن يقطعه خلال كل عملية وعلى قوة الفصل اللازمة

| Scale | 1- 8mm Column Diameter | 10- 40mm Column Diameter | 50-100mm Column Diameter | >100mm Column Diameter | Particle Size micron |
|---|---|---|---|---|---|
| Analytical | X | | | | 1.7 -10 |
| Semi-Prep | | X | | | 5 - 15 |
| Prep | | | X | | 15 -100 |
| Process | | | | X | 100+ |

Table B: Chromatography Scale vs. Column Diameter and Particle Size

**المكونات الصلبة للعمود:**

يجب أن يحوي العمود على حشوة كروماتوغرافيا (طور ثابت) تستخدم للتأثير على عملية الفصل

يجب أن يقاوم الضغط الراجع backpressure الناشئ خلال التصنيع وخلال الاستخدام

ايضا يجب ان يؤمن تدفقا للعينة قابل للتحكم بحجمها الأدنى (وله حجم ميت معدوم dead volume ولايسمح بالتسرب )

وبمكان دخول العينة inlet ومكان خروجها من العمود outlet وأن يكون خاملا كيميائيا تجاه العينة والطور الثابت والطور المتحرك

معظم الأعمدة مركبة من الستانلس ستيل لمقاومة الضغط العالي

يمكن استخدام الـ ( polyetheretherketone ) PEEK : (وهو مادة بلاستيكية مطورة ) وأيضاً الزجاج عند الضغوط المنخفضة وأيضاً عندما يتطلب الأمر سطوحا خاملة من أجل تطبيقات كيميائية أو حيوية معينة

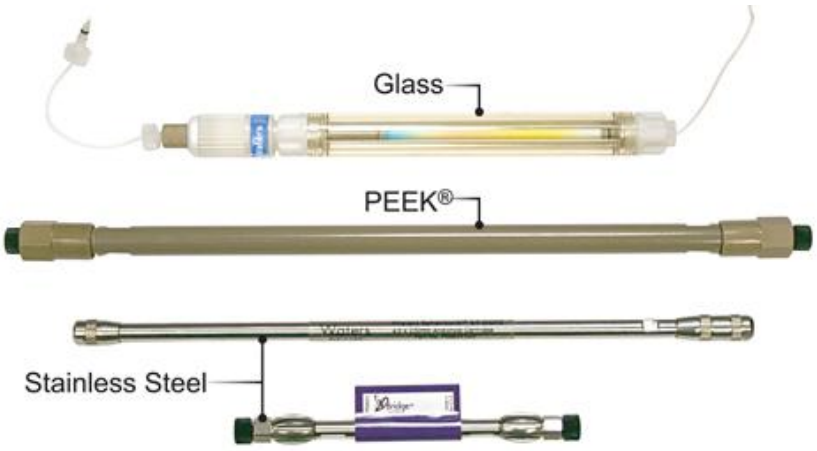



Figure M-1: Column Hardware Examples

العمود ذو الجدار الزجاجي يؤمن رؤية جيدة في الشكل M-2 تم ايقاف التدفق بينما لاتزال أشرطة مكونات العينة ضمن العمود , يمكن ان نرى ان الاصبغة الثلاث في العينة المحقونة قد تم فصلها داخل العمود المادة الصفراء تتحرك بسرعة وهي على وشك الخروج من العمود

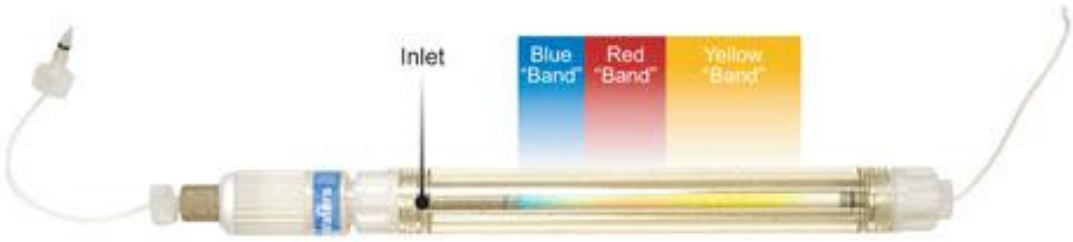



Figure M-2: A Look inside a Column

**أداء عملية الفصل ( قوة الفصل** Resolution )

إن درجة الفصل ما بين مركبين تسمى resolution -RS ,هناك عاملان أساسيان يحددان قوة الفصل الكلية (resolution) التي نحصل عليها من عمود معين وهما : قوة الفصل الميكانيكية العائدة لطول العمود وحجم الجزيئات وانتظام جزيئات الحشوة (التجانس) , وقوة الفصل الكيميائية القادمة من التنافس الفيزيوكيمائي على المركبات ما بين الحشوة من جهة والطور المتحرك من جهة أخرى .

إن الكفاءة هي قياس لقوة الفصل الميكانيكية , بينما الانتقائية هي قياس لقوة الفصل الكيميائية

**قوة الفصل الميكانيكية –الكفاءة** Efficiency

إذا كانت حشوة العمود ثابتة ومتوزعة بشكل متجانس فإن قوتها الفاصلة الميكانيكية محددة بطول العمود, وحجم جزيئات الحشوة وهي تسمى أيضا بالكفاءة وغالبا ما تقاس وتقارن برقم الصفيحة plate number (N)

الحشوات ذات الجزيئات صغيرة الحجم لديها كفاءة اعلى وضغط راجع أعلى (ضغط مقاوم backpressure).

من أجل حجم جزيئات ثابت يمكن الحصول على قوة فصل ميكانيكية أكبر بزيادة طول العمود لذلك تتم المفاضلة وقبول أحد العوامل التالية: زمن أطول للعملية الكروماتوغرافية واستهلاك أكبر للمحل وضغط راجع أعلى

الأعمدة الأقصر تقلل جميع هذه المتغيرات لكنها أيضا تقلل من قدرة الفصل الميكانيكية انظر الشكل N

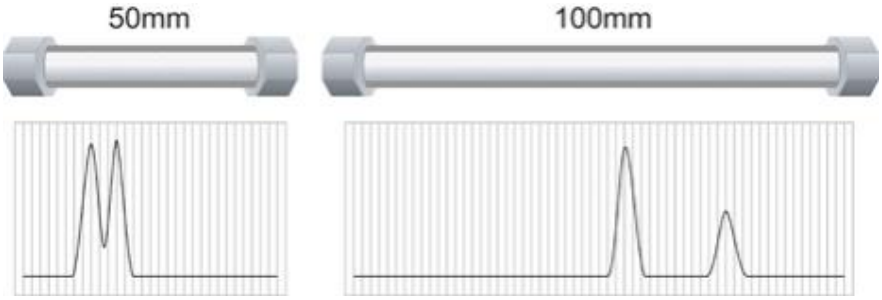
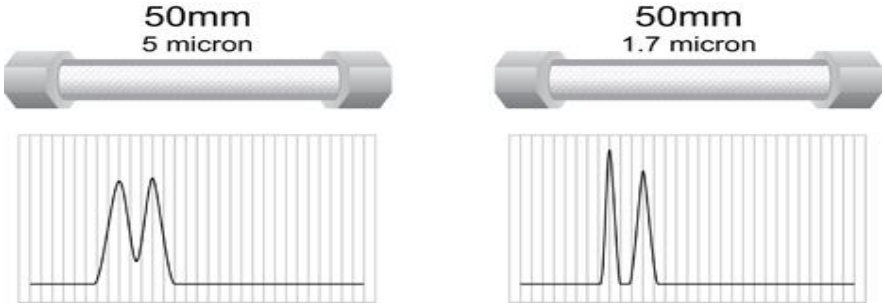



Figure N: Column Length and Mechanical Separating Power [Same Particle Size




[Figure O: Particle Size and Mechanical Separating Power [Same Column Length

**الانتقائية -قوة الفصل الكيميائية** Selectivity

إن اختيار المجموعة المكونة من الجزيئات الكيميائية (الطور الثابت) وتركيب الطور المتحرك سوف يحدد قوة الفصل الكيميائية (اي كيف يتم تغيير سرعة كل مادة متحركة نحو الخارج)

إن تحسين الانتقائية هو أقوى طريقة لتحقيق الفصل , مما يلغي حاجتنا للوصول إلى أقصى قوة فصل ميكانيكية ممكنة

لتحقيق عملية الفصل ما بين مركبين محددين يجب على المحلل أن يختار ما بين عدة تراكيب للأطوار الساكنة والمتحركة وطرق الاحتجاز (نوع العملية الكروماتوغرافية) وهذا ما سيتم شرحه لاحقاً

**أنماط الفصل بالـ HPLC**

بشكل عام يمكن استخدام ثلاث خصائص أساسية للمركبات لإجراء الفصل الكيميائي:

القطبية - الشحنة الكهربائية - الحجم الجزيئي

لننظر أولاً إلى القطبية وإلى نمطين من الكروماتوغرافيا يعتمدان على هذه الخاصية: كروماتوغرافيا الطور الطبيعي وكروماتوغرافيا الطور المنعكس

**عمليات الفصل المعتمدة على القطبية:**

إن بنية الجزيء و الفعالية والصفات الفيزيوكيميائية محددة بترتيب الذرات المكونة له والروابط فيما بينها

ضمن الجزيئة الواحدة : إن ترتيباً محددا لذرات محددة يسمى بالزمرة الوظيفية حيث يكون مسؤولا عن صفات خاصة وتفاعلات كيميائية يمكننا التنبؤ بها

هذه البنية غالبا ما تحدد فيما إذا كانت الجزيئة قطبية أو غير قطبية , يتم تصنيف الجزيئات العضوية ضمن فئات تبعا للزمر وظيفية أساسية التي تحويها هذه الجزيئات

باستخدام طريقة الفصل المعتمدة على القطبية فإن الاحتفاظ الكروماتوغرافي لأنواع مختلفة من الجزيئات يتم تحديده عن طريق معرفة طبيعة ومكان هذه الزمر الوظيفية

كما هو موضح بالشكل P يمكن تصنيف أنواع من الجزيئات عن طريق الاحتفاظ النسبي وذلك ضمن مجال واسع من القطبية الكروماتوغرافية المتدرجة من شديد قطبية إلى غير قطبي

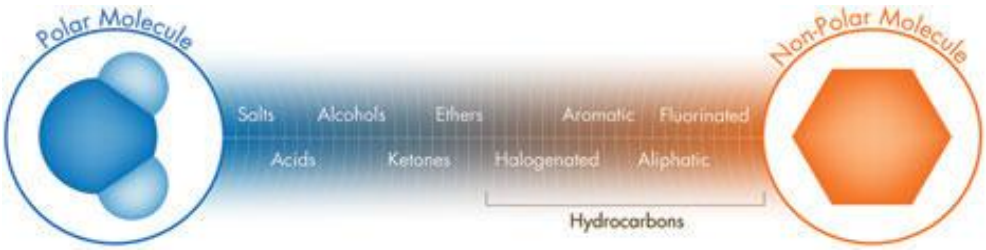


Figure P: Chromatographic Polarity Spectrum by Analyte Functional Group

الماء هو جزيئة قطبية صغيرة ذات عزم ثنائي القطب كبير والبنزن مركب هيدروكربوني عطري يعتبر مركب غير قطبي

المركبات ذات القطبية الكروماتوغرافية المتشابهة تميل إلى أن تنجذب لبعضها البعض والمركبات ذات القطبية المتباينة تبدي تجاذبا ضعيفا جدا فيما بينها

هناك طريقة أخرى لفهم ذلك عن طريق التماثل الوظيفي: الزيت غير قطبي والماء قطبي لذلك فهما لايمتزجان

خلافا لما هو عليه الحال في المغناطيسية حيث ينجذب القطبان المختلفان فإن عمليات الفصل الكيميائي المعتمدة على القطبية تعتمد التجاذب القوي بين المتماثلات وتجذب أضعف مابين الأضداد و تذكر : (الشبيه يجذب الشبيه ) في الكروماتوغرافيا المعتمدة على القطبية

Figure Q: Proper Combination of Mobile and Stationary Phases Effects Separation Based on Polarity

لتصميم جهاز فصل كروماتوغرافي فإنه علينا خلق منافسة على المواد المختلفة والموجودة ضمن العينة عن طريق اختيار طور متحرك وطور ثابت بقطبيات مختلفة ( انظر الشكل Q )

عندئذ فإن المركبات في العينة والمشابهة في قطبيتها للطور الثابت (حشوة العمود) سيتم تأخير خروجها لأنها ستنجذب بقوة إلى حشوة العمود والمركبات ذات القطبية المشابهة للطور المتحرك ستنجذب إليه بشكل أفضل من غيرها وتتحرك بسرعة أكبر

في هذه الطريقة المعتمدة على الاختلافات في الانجذاب مابين كل مركب وكل طور يتم تحقيق الفصل عن طريق تغيير سرعات المواد المحللة

الأشكال R-1, R-2, R-3 ترينا مجالات القطبية الكروماتوغرافية النموذجية للأطوار المتحركة والأطوار الثابتة والعينات المحللة

لننظر في كل شكل من الاشكال الثلاث لنعرف كيف يستطيع المحلل الكروماتوغرافي أن يختار الأطوار لتحسين عملية الانجذاب اللازمة لتحقيق الفصل الكروماتوغرافي المعتمد على القطبية

Figure R-1: Mobile Phase Chromatographic Polarity Spectrum

في الشكل R-1 تم ترتيب بعض المحلات المعروفة وفقا للقطبية الكروماتوغرافية وفق سلسلة تسمى eluotropic series

إن جزيئات الطور المتحرك تتنافس مع المادة المراد تحليلها على المواقع الفعالة في الطور الثابت وتأخذ مكانها مما يؤدي لتحرك هذه المادة المنحلة بسرعة عبر العمود

يعتبر الماء من أكثر الجزيئات قطبية ويقع في طرف الجدول أما الهكسان (هيدروكربون خطي) يعتبر من أقل الجزيئات قطبية ويقع في الطرف المقابل من الجدول وفيما بينهما يوجد محلات و مزائج من المحلات المركبة بنسب ملائمة لتلبي الحاجات المحددة للفصل , يمكن ترتيبها حسب قوة الطرد حيث أن نهاية هذا السلم تمثل أقوى طور متحرك يعتمد على طبيعة سطح الطور الصلب حيث يتم التنافس على جزيئات المادة المحللة

Figure R-2: Stationary Phase Particle Chromatographic Polarity Spectrum

السيليكا هي مادة فعالة ذات سطح محب للماء يحوي على زمر السيلانول الحمضي (سيليكون حاوي على كحول متناظر) , وبناء على ذلك فهي تقع في نهاية الطرف القطبي لسلم الاطوار الساكنة كما هو واضح في الشكل R-2 وتعتبر من الجزيئات عالية القطبية

يمكن تعديل فعالية أو قطبية السيليكا بربطها مع مواد أقل قطبية وهي على الترتيب

cyanopropylsilyl- CN n-octylsilyl- C8 n-octadecylsilyl- C18, ODS كزمر وظيفية على السيليكا , تعتبر الـ C18 حشوة كارهة للماء وغير قطبية

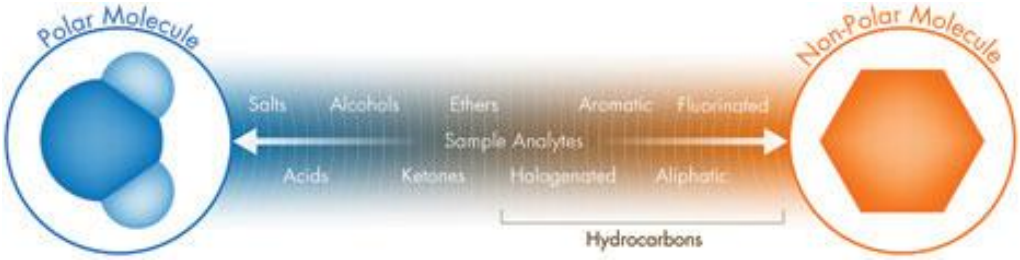



Figure R-3: Compound/Analyte Chromatographic Polarity Spectrum

الشكل R-3 يعيد عرض سلسلة القطبية الكروماتوغرافية للعينة المبينة في الشكل P بعد تحديد قطبية الطور الثابت والمتحرك , ومن أجل طور ثابت معين يجب على المحلل اختير طور متحرك يعمل على ابقاء المادة المحللة بداخله وأن لا يكون قويا جدا بحيث يصبح من الصعب طردها خارجاً

بالنظر فيما بين المحلات المتقاربة فيما بينها بالقوة يجب على المحلل أن يأخذ بعين الاعتبار تركيبة الطور المتحرك التي تستغل الاختلافات الصغيرة في قطبية وانحلالية المواد المحللة لزيادة انتقائية الجهاز لكروماتوغرافي

الشبيه يجذب الشبيه , كما يفهم من هذا الشرح , إن اجراء عملية فصل تعتمد على القطبية يحتاج إلى معرفة بالعينة وخبرة بالمواد المحللة و طرق الاستبقاء

وتلخيصا لما سبق : على المحلل اختيار التركيب الأفضل للطور المتحرك وجزيئات الطور الثابت بفروق مناسبة بالقطبية , وعندما تتحرك المادة عبر العمود فإن القاعدة (الشبيه يجذب الشبيه) سوف تحدد ماهي المادة التي ستتحرك ببطء وماهي المادة التي تتحرك بسرعة أكبر

**كروماتوغرافيا الطور الطبيعي:**

نجح Tswett في عملية فصل المستخلصات النباتية باستخدام طور ثابت قطبي (الطباشير في عمود زجاجي) مع طور متحرك أقل كثيرا في القطبية أو غير قطبي هذا النمط التقليدي للكروماتوغرافيا أصبح معروفا باسم كروماتوغرافيا الطور الطبيعي

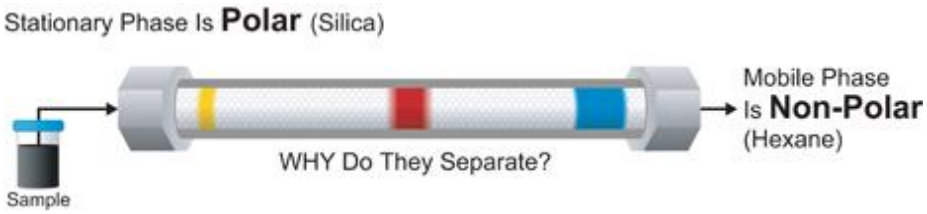



Figure S-1: Normal-Phase Chromatography

الشكل S-1 يظهر الفصل الكروماتوغرافي بطريقة الطور الطبيعي للأصبغة الثلاث. الطور الثابت قطبي ويقوم بالاحتفاظ بقوة بالصباغ الأصفر القطبي , الطور المتحرك غير القطبي في هذه المنافسة سوف يحصل على الصباغ الأزرق والذي يعتبر أيضا غير قطبي نسبيا ثم يطرد خارجا بسرعة

بما أن الصباغ الأزرق مشابه للطور المتحرك (كلاهما غير قطبي) لذلك فهو يتحرك أسرع من غيره , هذا هو نموذج الكروماتوغرافيا الطور الطبيعي عبر السيليكا باستخدام محل عضوي 100 % بدون أي وجود للماء

**كروماتوغرافيا الطور المنعكس:**

إن مصطلح كروماتوغرافيا الطور المنعكس يصف النمط الكروماتوغرافي المعاكس تماما لـ كروماتوغرافيا الطور الطبيعي , عن طريق استخدام طور متحرك قطبي وطور ثابت غير قطبي

الشكل S-2 يظهر مزيج الاصبغة الثلاث وهي تنفصل عن بعضها باستخدام هذا الأسلوب

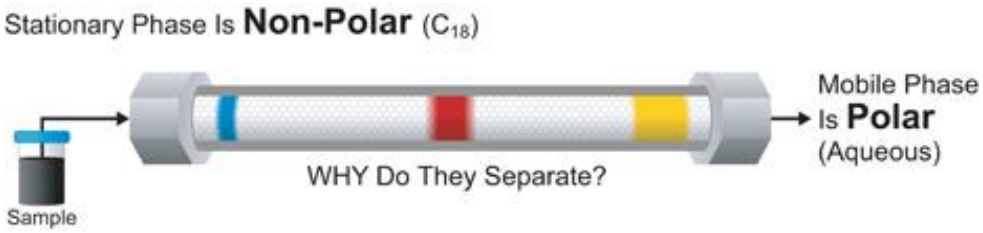



Figure S-2: Reversed-Phase Chromatography

إن اكثر المركبات بقاء ً داخل العمود هو الصباغ الازرق غير القطبي لان انجذابه للطور الثابت غير القطبي هو الأكبر , الصباغ الاصفر القطبي أقل المركبات احتجازا في العمود وسيفوز به الطور المتحرك القطبي المائي في هذه المنافسة ثم يتحرك بسرعة عبر العمود ويطرد أولاً (الشبيه يجذب الشبيه)

الآن وبسبب تطبيقاتها الواسعة تغطي كروماتوغرافيا الطور المنعكس حوالي 75 % من تطبيقات الكروماتوغرافيا

معظم هذه التطبيقات تستخدم محلول مائي لمادة عضوية قطبية كالميثانول والأسيتو نتريل كطور متحرك , وهذا يؤمن التفاعل الملائم ما بين المادة المراد تحليلها مع السطح غير القطبي للطور الثابت

السيليكا المطعمة بالـ C18 (وتدعى أحيانا ODS) هي أكثر الحشوات شهرة في هذا النمط من الفصل

الجدول C يظهر تلخيصا موجزا لخواص الاطوار في نوعي الفصل الكروماتوغرافي المعتمد على القطبية , تذكر أنه من أجل النمط المعتمد على القطبية (الشبيه يجذب الشبيه )

| Separation Mode | Stationary Phase [particle] | Mobile Phase [solvent] |
|---|---|---|
| Normal phase | Polar | Non-polar |
| Reversed phase | Non-polar | Polar |

Table C: Phase Characteristics for Separations Based on Polarity

**كروماتوغرافيا التفاعلات الأليفة للماء HILIC**

يمكن عرض الـ HILIC على أنها نمط موسع من كروماتوغرافيا الطور الطبيعي , في كروماتوغرافيا الطور الطبيعي الطور المتحرك هو مادة عضوية 100 % ولايوجد فيه سوى آثار من الماء وفي مسامات حشوة العمود

المادة المحللة القطبية ترتبط بقوة إلى الطور الثابت وقد لا تخرج أبدا من العمود

إن إضافة القليل من الماء (أقل من 20 %) للطور المتحرك العضوي وعادة ما يكون الأسيتونتريل ( aprotic solvent) يجعل فصل وخروج المركبات القطبية المرتبطة بقوة إلى عمود الطور الطبيعي (أو المرتبطة بشكل ضعيف في نمط الطور المنعكس) أمرا ممكنا

الماء , هو محل شديد القطبية يتنافس بشكل فعال مع المواد القطبية المراد تحليلها على المواقع الفعالة في الطور الثابت

يمكن استخدام الـ HILIC سواء بالتصفية المستمرة أو المتدرجة , المركبات القطبية المنجذبة في البداية إلى الجزيئات القطبية في الحشوة يمكن طردها خارجاً بزيادة قطبية الطور المتحرك عن طريق إضافة المزيد من الماء

تطرد المواد المنحلة خارج العمود وفقا لزيادة الالفة تجاه الماء , تضاف المحاليل الواقية أو الأملاح للطور المتحرك لإبقاء المواد القابلة للتشرد ضمن شكل شاردي محدد

**كروماتوغرافيا التفاعلات الكارهة للماء HIC**

HIC هو نوع من كروماتوغرافيا الطور المنعكس يستخدم لفصل الجزيئات الحيوية الضخمة كالبروتينات. وعادة ما يكون مفضلاً على غيره وذلك للحفاظ على التجاذبات فيما بينها في المحلول المائي متجنبين التماس مع مركبات عضوية أو سطوح تؤدي إلى نزع أو تخريب طبيعتها البروتينية

تستغل طريقة HIC الصفات الكارهة للماء للجزيئات الضخمة مع أطوار ثابتة كارهة للماء ايضا

مثل C4 C18 Silica

في بداية الأمر فإن التراكيز المرتفعة للملح في الماء ستشجع البروتين على البقاء ضمن العمود , يتم إجراء عملية الفصل المتدرج عن طريق خفض تركيز الملح وبهذه الطريقة تخرج الجزيئات البروتينية تبعا لزيادة كراهيتها تجاه الماء

**عمليات الفصل المعتمدة على الشحنة (كروماتوغرافيا التبادل الشاردي) IEC**

من اجل عمليات الفصل المعتمدة على القطبية الشبيه سينجذب نحو الشبيه والمختلف سيُطرد , في كروماتوغرافيا التبادل الشاردي والطرق الأخرى المعتمدة على الشحنة الكهربائية سوف تكون هذه القاعدة معكوسة : (الشبيه يمكن أن يطرد والمتخالفات ستنجذب نحو بعضها )

الأطوار الثابتة في كروماتوغرافيا التبادل الشاردي تتميز عن بعضها البعض بطبيعة وقوة الزمر الحمضية والقلوية على سطحها وانواع الشوارد التي ستنجذب وتبقى محتجزة

تستخدم طريقة تبادل الشحنات الموجبة Cation exchange في فصل الشوارد ذات الشحنة الموجبة على سطوح سالبة , والعكس بالعكس : تبادل الشحنات السالبة anion exchange يستخدم لاستبقاء وفصل الشحنات السالبة على سطوح موجبة , مع كل نوع من أنواع التبادل الشاردي هناك اسلوبين للفصل والتصفية على الأقل

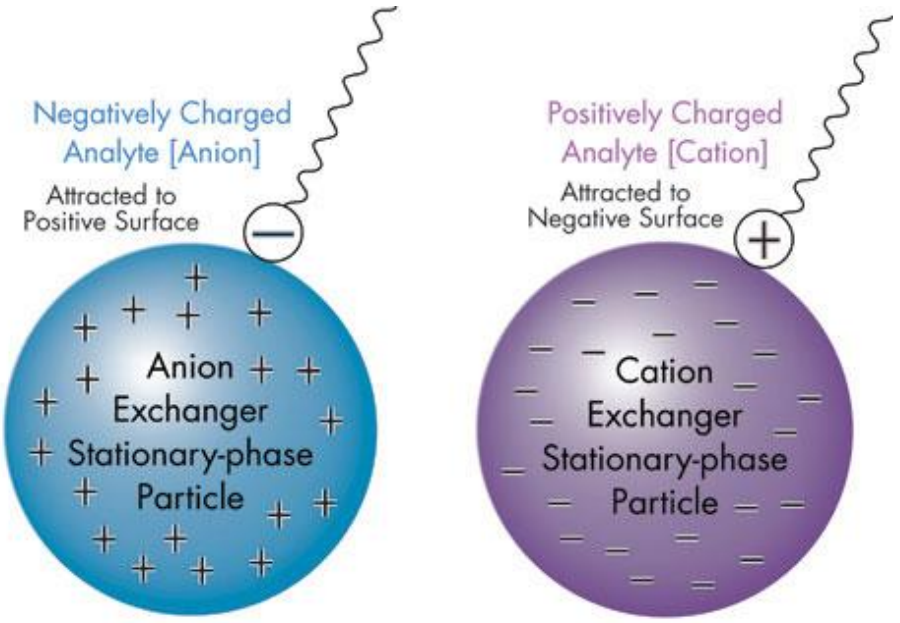



Figure T: Ion-Exchange Chromatography

أعمدة التبادل الشاردي القوية تحمل زمر وظيفية مثل الأمينات الرباعية أو حموض السلفونيك المتشردة دائما. وتستخدم عادة لفصل واحتجاز الشوارد الضعيفة , هذه الشوارد الضعيفة يمكن طردها عن طريق ازاحتها باستخدام طور متحرك يحوي شوارد ترتبط بقوة اكبر مع المواقع الفعالة على العمود

وبشكل متبادل الشوارد الضعيفة يمكن أن تبقى في العمود ثم يتم تعديلها في مكان تواجدها عن طريق تغيير درجة حموضة (pH) الطور المتحرك مسببا فقدان التجاذب وطردها خارجا

أعمدة التبادل الشاردي الضعيفة الحاملة للأمينات الثانوية والزمر الحمضية الكربوكسيلية يمكن رفع أو حفض درجة حموضتها وبالتالي افقداها القدرة على احتجاز الشوارد

عندما تشحن (تتشرد) فإنه يمكن استخدامها لفصل واحتجاز الشوارد القوية. إذا لم نستطع إخراج هذه الشوارد من العمود بالإزاحة , عندئذ فإن مواقع التبادل الموجودة على الطور الثابت سيتم تعديلها , بإيقاف التجاذب مابين الشوارد والسماح للمواد المشحونة بالخروج من العمود

| Analyte Type | *Weak* ACID e.g., $pK_a$ ~ 5 | | *Strong* ACID | *Weak* BASE e.g., $pK_a$ ~ 10 | | *Strong* BASE |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Charge State vs. pH* | No charge at pH < 3 | − [anion] at pH > 7 | − [anion] Always Charged | + [cation] at pH < 8 | No Charge at pH > 12 | + [cation] Always Charged |
| **Stationary Phase Particle** | *Strong* Anion Exchanger | | *Weak* Anion Exchanger e.g., $pK_a$ ~ 10 | *Strong* Cation Exchanger | | *Weak* Cation Exchanger e.g., $pK_a$ ~ 5 |
| Charge State vs. pH* | + Always Charged | | + at pH < 8 | No Charge at pH > 12 | − Always Charged | No Charge at pH < 3 | − at pH > 7 |
| **Mobile Phase pH Range** | | | | | | |
| to Retain analyte [capture] | pH > 7 | | pH < 8 | pH < 8 | | pH > 7 |
| to Release analyte [elute] | pH < 3 | | pH > 12 | pH > 12 | | pH < 3 |

Table D: Ion-Exchange Guidelines

عندما يتم تعديل المبادلات الشاردية الضعيفة فإنه يمكنها فصل واحتجاز المواد بتفاعلات كارهة للماء (الطور المنعكس) أو محبة للماء (طور طبيعي)

وفي تلك الحالات تعتمد قوة الطرد (تصفية المواد) على قطبية الطور المتحرك (الشكل R-1) وبالتالي المبادلات الشاردية الضعيفة تستخدم للفصل المختلط (فصل يعتمد على القطبية والشحنة)

الجدول D يوجز لنا مبادئ الفصل الأيوني , فمثلاً للاحتفاظ بمادة شديدة القلوية ( عادة ماتكون موجبة الشحنة) استخدم مبادل شاردي موجب وضعيف كطور ثابت عند درجة حموضة أكبر من 7 , مما يضمن شحن جزيئات السطح بشحنة سالبة

لطرد الأساس القوي قم بتخفض قيمة ال pH للطور المتحرك إلى أقل من 3 مما يلغي شحنة السطح ويلغي أيضاً قدرة المبادل الشاردي على الاحتفاظ بالشوارد

لاحظ أن الـ pKa هي قيمة الـ pH التي يكون عندها نصف الزمر الوظيفية مشحونة والنصف الآخر متعادل , لكي نحافظ على المادة المحللة المتعادلة أو المشحونة كلياً وعلى جزيئات السطح ( الحشوة ) فإنه يجب ضبط درجة الـ pH بدرجتين تحت قيمة الـ pKa

لاتقم باستخدام مبادل شاردي موجب قوي للاحتفاظ بالأسس القوية لأن كلاهما سيبقى مشحوناً ومنجذباً نحو الآخر , ما يجعل طرد الأساس من العمود عملية مستحيلة ولن يكون ذلك ممكناً إلا عن طريق إغراق المبادل الموجب بأساس قوي منافس يعطينا استبقاء أشد ويحل محل المركب المدروس وذلك بنجاحه التنافس على المواقع الفعالة في المبادل

هذا الاسلوب نادرا ما يكون عملياً أو آمناً في الـ HPLC والـ SPE

الحموض والأسس القوية جداً خطرة جدا في التعامل ويمكن أن تسبب تآكل المواد المكونة للعمود وضررا لحركة الموائع في الجهاز

**عمليات الفصل المعتمدة على الاستبعاد الحجمي SEC والنفاذ عبر الهلام GPC**

في عام 1950 اكتشف Porath و Flodin أنه يمكن فصل الجزيئات الحيوية اعتمادا على حجومها بشكل أفضل من فصلها على أساس الشحنة أو القطبية وذلك عبر إمرارها أو تنخيلها ( نفوذها ) عبر بوليمير الديكستران الكاره للماء والحاوي على مسامات يمكن تحديدها مسبقا تسمى هذه العملية بالترشيح عبر الهلام gel filtration, بعد ذلك تم استخدام طريقة مشابهة لفصل الجزيئات المتعددة الصناعية والبوليميرات باستخدام بوليميرات عضوية كحشوة ومسامات ذات قطر معين هذه العملية تدعى بالنفاذ عبر الهلام GPC gel-permeation

تم اجراء عمليات فصل مشابهة باستخدام سيليكا ذات مسمات محددة وسميت كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي [size-exclusion chromatography [SEC].

إن الأجهزة الكروماتوغرافية التي ادخلت على نطاق تجاري عام 1963 كانت مصممة لتطبيقات الـ GPC

جميع هذه التقنيات تتم بشكل نموذجي على أطوار ثابتة مصنعة بمسام ذات أقطار بمجالات واسعة مما يمكن المادة المراد تحليلها من الدخول او استبعادها من العمود عن طريق تكبير او تصغير حجم المسام

الجزيئات الأصغر تتغلغل بشكل أكبر في المسام عبر مرورها في الحشوة أما الجزيئات الأكبر فيمكنها أن تمر عبر مسامات ذات حجم محدد فقط لذلك فهي تبقى لوقت أقصر في العمود

الجزيئات الأكبر يمكن أن يتم استبعادها بشكل كامل من المسام وستمر فقط بين الجزيئات (جزيئات الحشوة) مما يجعلها تطرد من العمود باستخدام حجم صغير

يتم اختيار الطور المتحرك لسببين: الأول هو أنها محلات جيدة للمادة المحللة والثاني انها تمنع أي تداخل معتمد على القطبية أو الشحنة بين المادة المحللة وسطح الحشوة وبهذه الطريقة فإن الجزيئات الكبيرة تطرد اولاً بينما الصغيرة تتحرك بسرعة أبطأ لأنها تتحرك داخلة وخارجة من عدد أكبر من المسامات ثم تطرد لاحقاً وفقا لحجومها بترتيب تنازلي ومن هنا يمكننا قول القاعدة البسيطة: الأكبر يأتي أولاً

بما أنه من الممكن أن نربط ما بين الوزن الجزيئي للبوليمير و حجمه في المحلول فإن كروماتوغرافيا النفاذ عبر الهلام GPC قامت بتطوير طريقة إبداعية لتصنيف البوليميرات على أساس الوزن الجزيئي للبوليمير والذي بدوره يحدد الصفات الفيزيائية التي يمكن ان تحسن او تنقص من فعالية البوليمير وجودته

(كيف نميز ما بين البوليمير الجيد والبوليمير السيء) .

www.waters.com