الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

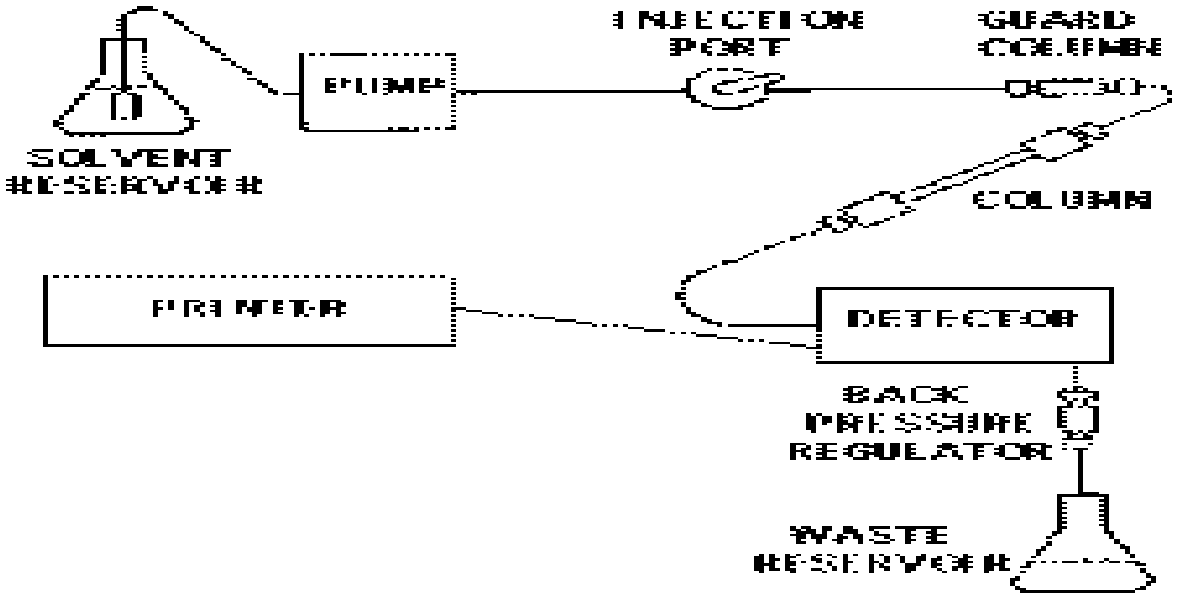
تعريف الفصل بال HPLC

هي طريقة من طرائق الفصل بالكروماتوغرافيا يتم فيها استخدام أعمدة أبعادها صغيرة تعبأ بأطوار ثابتة أبعادها صغيرة جداً فتحقق عدداً كبيراً من الطبقات النظرية التي تزيد كفاءة الفصل وتمكن من فصل تراكيز صغيرة للعينة كما توفر في كمية الطور الثابت والمتحرك المستخدمين في عملية الفصل وتقصر زمن الفصل غير أن إمرار الطور المتحرك يجب أن يتم تحت الضغط العالي.

ضخ الطور المتحرك Mobile Phase Elution

1- الضخ المتماثل isocratic elution:

يتألف الطور المتحرك في هذه الطريقة من محل واحد أو مزيج محلين بنسبة ثابتة فلايتغير تركيب الطور المتحرك طيلة عملية الفصل.

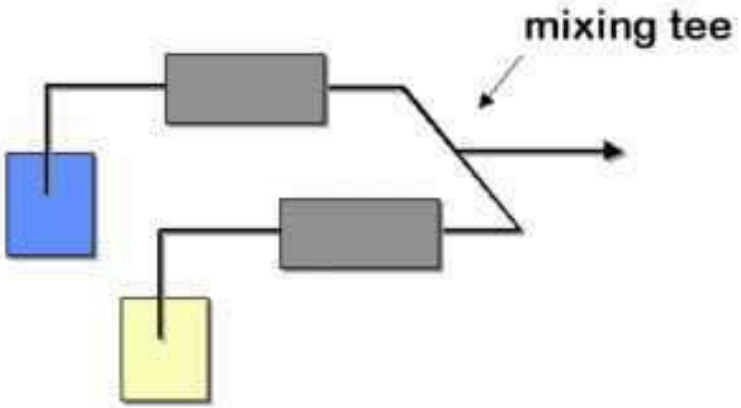


- 2- الضخ التدريجي gradient elution:
- يتألف الطور المتحرك في هذه الطريقة من محيلن أو أكثر بحيث تختلف قطبية المحلات عن بعضها ويتغير تركيب الطور المتحرك بشكل مستمر أثناء عملية الفصل.

Gradient controller

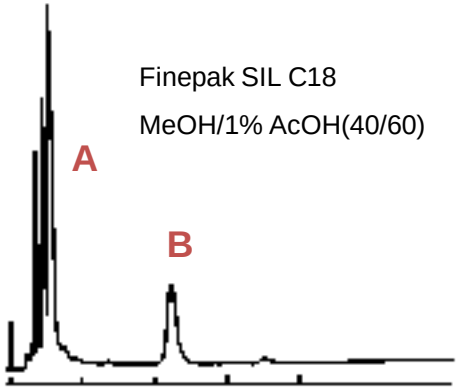
Dual pumping systems.

A valve system can be used on each pump can provide a different solvent.



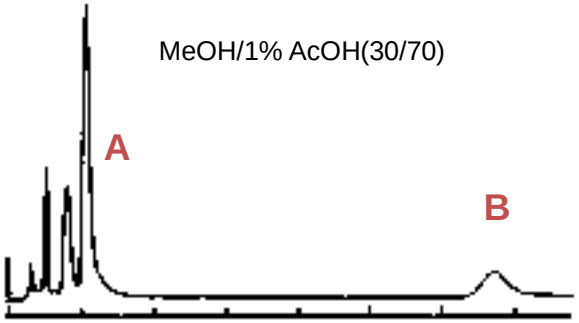
Gradient elution method

Isocratic elution method



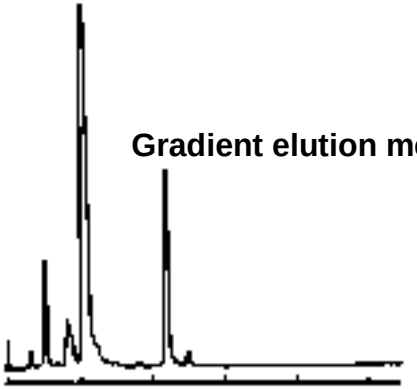
Finepak SIL C18

MeOH/1% AcOH(40/60)



MeOH/1% AcOH(30/70)

Gradient elution method



MeOH/1% AcOH

30/70→45/55

Linear Gradient、16min

A : Chlorogenic acid

B : Rutin

*** : Impurity**

أجزاء الجهاز The apparatus

-يتألف ال HPLC من الأجزاء الرئيسية التالية:

1- أوعية الطور المتحرك **Mobile phase Reservoirs**: تكون أجهزة ال HPLC الحديثة مزودة بوعاء أو أكثر مصنوع من الزجاج أو الستانلس ستيل يتسع كل منها ل 500مل من المحل المستخدم.

يمكن للفقاعات الموجودة في محلات الطور المتحرك أن تؤثر على أداء المتحريات المستخدمة في ال HPLC لذا يجب إزالة الفقاعات من الطور المتحرك قبل ضخه ويتم ذلك باستخدام الأمواج فوق الصوتية.

2- نظام الضخ Pumping Systems: يجب أن تتوفر في المضخات المستخدمة في ال HPLC الشروط التالية:

-أن تتمكن من الضخ بضغوط عالية تصل إلى 100وحدة /إنش^2

- أن تكون مصنوعة من مادة لاتتآكل بتأثير المحلات العضوية

-أن تتمتع بتكرارية جيدة

- أن تتراوح سرعة الضخ بين 0,1 – 10 مل / دقيقة

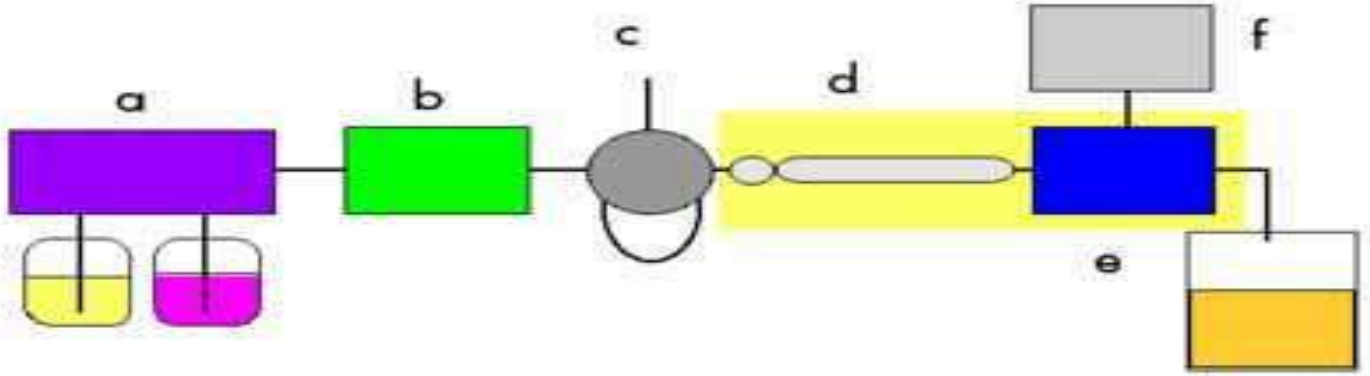
3- نظام حقن العينة **Sample Injection Systems** : هو عبارة عن حلقة متعددة الفتحات التي تكون مختلفة الأبعاد تتصل من جهة بالعينة ومن جهة أخرى بالعمود.

4- عمود الفصل: هناك نوعين من الأعمدة المستخدمة في ال HPLC:

- الأعمدة العادية: يكون طولها 10 -30 سم وقطرها 4 – 10 مم وأبعاد الحبيبات التي تملؤها 5 – 10 ميكرون.
- الأعمدة السريعة عالية الأداء high speed, high performance columns: يكون طولها 3 – 7 سم و قطرها 1 – 4 مم مملوءة بحبيبات أبعادها 3 – 5 ميكرون

4- المتحري: يجب أن تتمتع المتحريات المستخدمة بال HPLC بحساسية عالية وتكرارية جيدة واستجابة متناسبة مع كمية المادة المفصولة.

Basic HPLC equipment



a - gradient controller
b - pump/ dampning system
c - sample introduction
d - column/ precolumn
e - detector
f - data output

أهم المتحريات المستخدمة في ال HPLC

متحري قرينة الانكسار: Refractometer detector

يعتمد هذا المتحري في مبدئه على تغير قرينة انكسار الطور المتحرك نتيجة خروج المواد المفصولة معه. غير أن من عيوب هذا المتحري أنه لايمكن استخدامه في حالة الضخ المتعدد للطور المتحرك كما أنه يتأثر بدرجة الحرارة وحساسيته من رتبة **10 ppm.**

متحري الطيف الضوئي في المجال المرئي وفوق البنفسجي: UV-visible-detector:

يعد هذا المتحري الأكثر استخداماً بين جميع المتحريات حيث يمكن تحري المواد العضوية التي تحمل لون أو يمكن أن تشكل معقداً ملوناً مع كاشف معين في المجال المرئي في حين يمكن تحري معظم المواد العضوية الحاملة مولدة للونchromophore في مجال فوق البنفسجي.

كما يمتاز هذا المتحري بعدم تأثره بدرجة الحرارة كما يمكن استخدامه في حالة الضخ المتعدد للطور المتحرك, وتبلغ حساسية هذا المتحري حوالي **0.01 ppm.**

غير أن المشكلة التي تواجهنا عند العمل بهذا المتحري هو وجود امتصاص لمحلات الطور المتحرك في مجال ال UV.

يوضح الجدول التالي أطوال الأمواج الموافقة لامتصاص المحلات العضوية في مجال ال UV.

solvent	Cut off (nm)
acetone	330
Acetonitril	200
dichlormethan	233
ethanol	205
ethylacetate	255
methanol	206
tetrahydrofuran	230
Toluen	212

متحري التألق Fluorescence detector:

تعد حساسية هذه الطريقة أعلى بقليل من حساسية الطريقة السابقة وهي طريقة نوعية تعتمد على قدرة بعض المركبات العضوية على إصدار أشعة التألق عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية.

متحري مقياس الأمبير The amperometric detector:

يعد هذا المتحري نوعياً بالنسبة للمركبات الفعالة كهربائياً وله استخدامات كثيرة في المجال الحيوي كتحري آثار الكاتيكول أمين في الدماغ.

متحري الناقلية الكهربائية:Electrolytic conductivity detector

يعتمد على تغير الناقلية الكهربائية للطور المتحرك نتيجة خروج المواد المفصولة الفعالة كهربائيا معه ويعد هذا المتحري نوعياً للمركبات الفعالة كهربائياً .

متحري مطياف الكتلة:Mass specrometric detector

يقوم هذا المتحري بتحديد هوية المادة المفصولة بتحويلها إلى أيونات وفصل هذه الأيونات تبعاً لنسبة كتلتها إلى شحنتها.

الأطوار الثابتة والمتحركة المستخدمة في ال HPLC

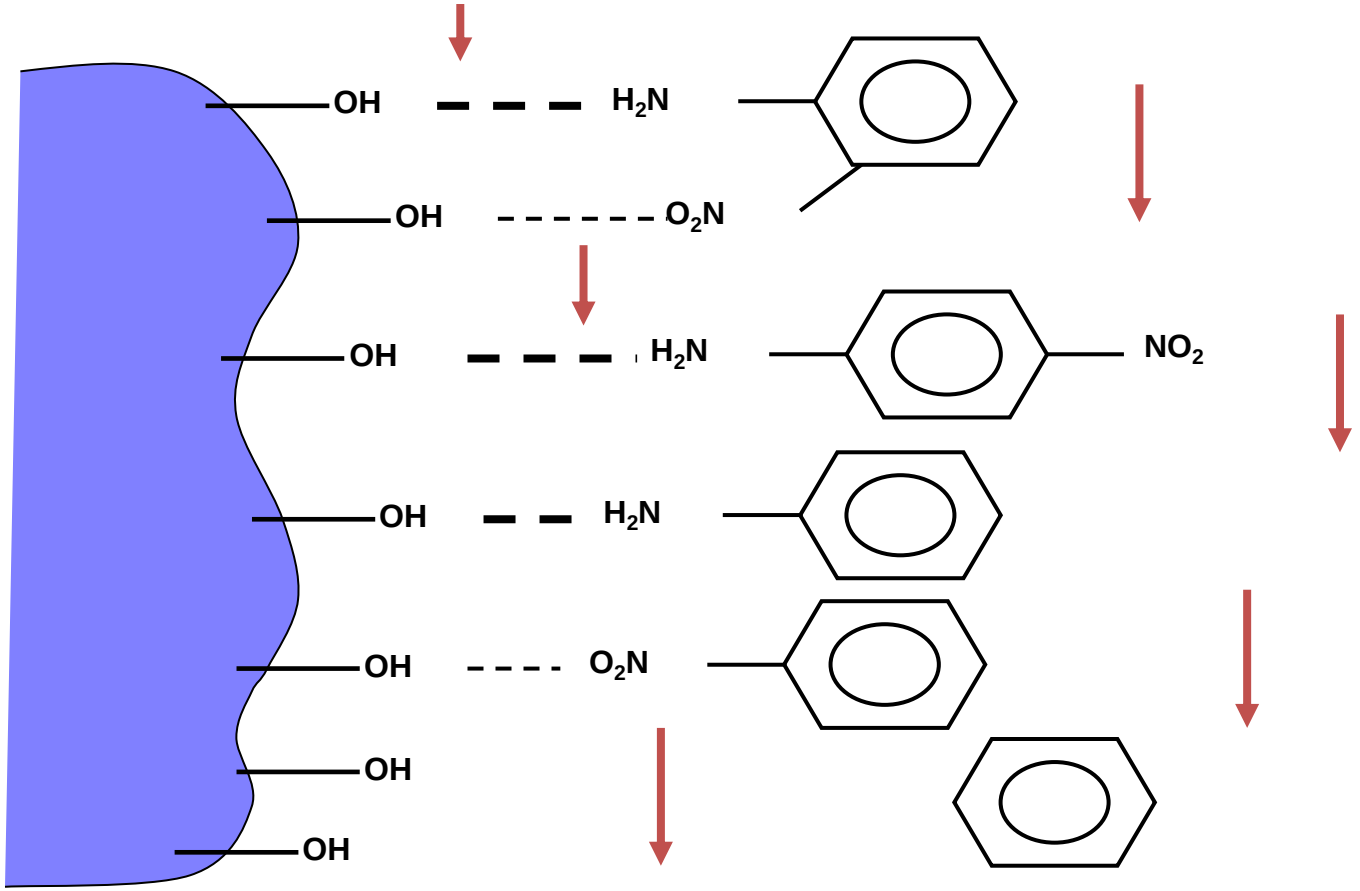
What are mobile and stationary phases for HPLC

-تعد كرماتوغرافيا الادمصاص adsorption chromatography وكروماتوغرافيا التوزع partition chromatography من أكثر الطرائق المستخدمة في ال HPLC حيث تستخدم مادة صلبة ذات طبيعة ادمصاصية كطور ثابت في الحالة الأولى بينما يستخدم طور سائل محمول على صلب خامل في الحالة الثانية. وفي الحالتين تعتمد نتائج الفصل على قطبية المادة المفصولة وقطبية الطور الثابت والمتحرك.

- تعد السيليكا والألومين وكذلك السللوز من أهم الأطوار الثابتة المستخدمة في كروماتوغرافيا الادمصاص في الHPLC .

- في كروماتوغرافيا الادمصاص يتنافس الطور المتحرك والثابت على المواد المفصولة ويبقى الطور الثابت ثابتاً خلال عملية الفصل وتتغير قطبية الطور المتحرك حتى يتم ال elution

- تعد كروماتوغرافيا الادمصاص حساسة للتأثير الفراغي للمركبات المفصولة steric effect لذا تستخدم بكثرة لفصل الإيزوميرات التي تملك عدة متماكبات configuration لذا تستخدم كروماتوغرافيا الادمصاص بكثرة لفصل مشتقات أورتو وبارا للحلقة البنزينية.

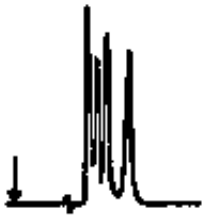


Steric effect of adsorption Chromatography

Retention behavior

n-Hex/AcOEt(60/40)

n-Hex/AcOEt(50/50)



n-Hex/AcOEt(30/70)

Polarity of sample components

- تكون كروماتوغرافيا التوزع في ال HPLC حساسة للتغيرات الضئيلة بالوزن الجزيئي للمواد المراد فصلها. وتقسم إلى نوعين:

كروماتوغرافيا التوزع بالطور العادي (NP-HPLC):

حيث يكون الطور الثابت قطبياً والطور المتحرك غير قطبي ويتم الاحتفاظ بالمواد القطبية وقتاً طويلاً في حين تغادر المواد غير القطبية عمود الفصل بسرعة.

كروماتوغرافيا التوزع بالطور العكوس (RP-HPLC):

حيث يكون الطور الثابت غير قطبي والطور المتحرك قطبي ويتم الاحتفاظ بالمواد غير القطبية وقتاً طويلاً في حين تغادر المواد القطبية عمود الفصل بسرعة. أما الطور المتحرك القطبي المستخدم في هذه الطريقة فهو محل قطبي كالأسيتونتريل , الميتانول, التتراهيدروفوران والماء وغالباً يستخدم مزيج من الماء مع أحد تلك المحلات السابقة. إن المحل العضوي الذي يمزج مع الماء في RP-HPLC يدعى المحل المعدل modifier

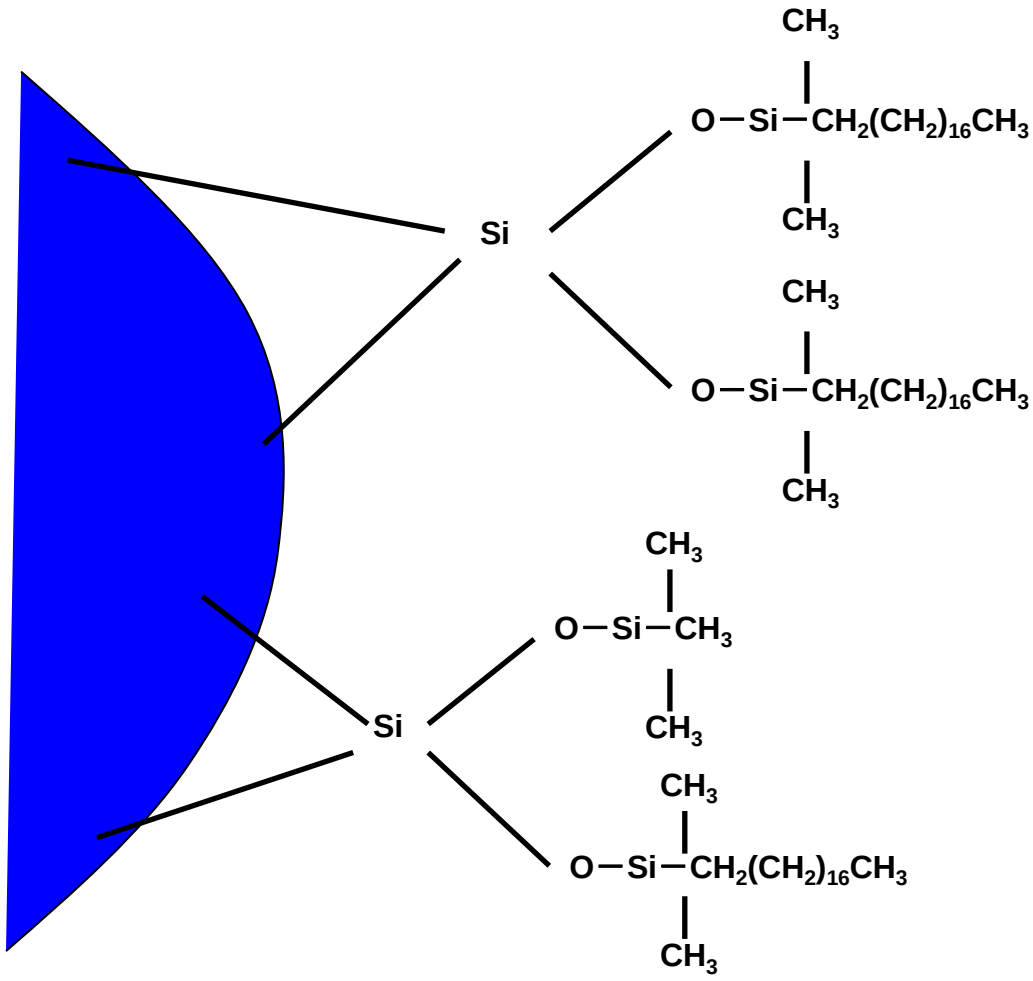
-يكون المحل المعدل ميتانول بالنسبة للمركبات الحمضية في حين يستخدم الأسيتونتريل للمركبات القلوية ويستخدم التتراهيدروفوران بكثرة للمركبات ثنائية القطب dipoles.

- يعد الأوكتيل ديسيل سيليل (العمود C18) والديسيل سيليل (العمود C8) من أهم الأطوار الثابتة المستخدمة في RP-HPLC

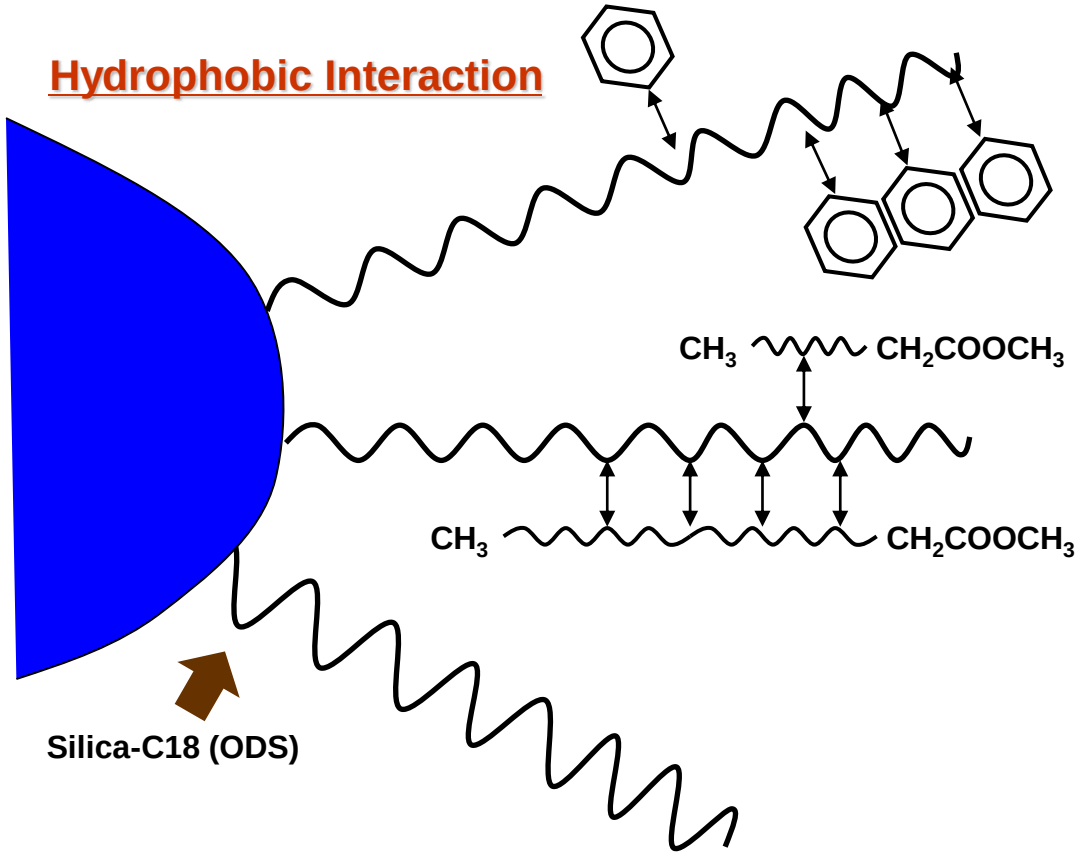
- يعد ال (PEG) من أكثر الأطوار الثابتة المستخدمة في ال NP-HPLC

- كقاعدة عامة : يستخدم ال HPLC بالادمصاص لفصل المركبات عديمة القطبية في حين يستخدم ال HPLC بالتوزع لفصل المركبات عالية القطبية وتستخدم كلتا الطريقتين لفصل بقية المواد متدرجة القطبية

Silica-C18 Packing materials



Reversed Phase Chromatography



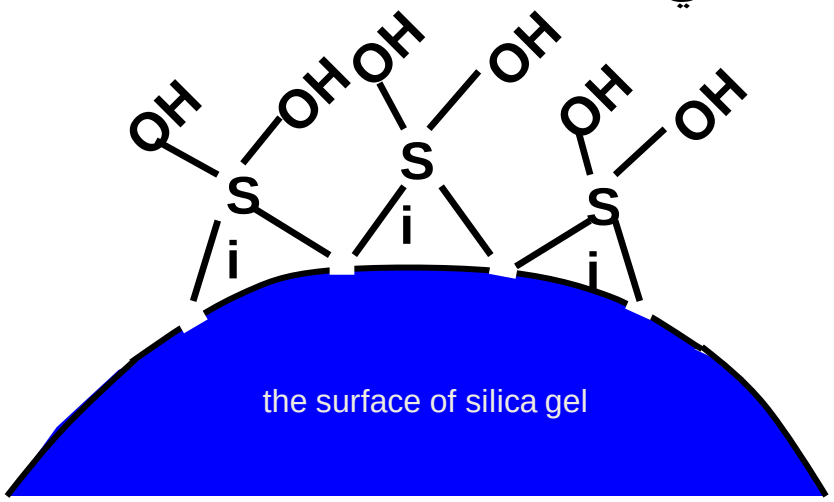
أنواع ال HPLC
Types of HPLC

-هناك أربعة أنواع رئيسة لل HPLC حسب طبيعة الطور الثابت المستخدم:

1-كروماتوغرافيا الادمصاص السائلة عالية الأداء: High Performance Adsorption Chromatography

في هذه الطريقة يكون الطور الثابت مادة صلبة ذات طبيعة ادمصاصية ويتم تثبت المواد على الطور الثابت بخاصة الادمصاص.

- تعد السيليكا أكثر الأطوار الثابتة استخداماً في هذا النوع ويعزى تأثيرها إلى مجموعات السيلانول Si- OH الموجودة في بنيتها.



2- كروماتوغرافيا التوزع عالية الأداء High Performance Partition Chromatography:

في النوع يكون الطور الثابت سائل محمول على صلب خامل وتقسم هذه الطريقة حسب طريقة توضع الطور الثابت على المادة الحاملة إلى نوعين:

Liquid-liquid chromatography: يتوضع الطور الثابت في هذه الطريقة في الفراغات بين حبيبات المادة الحاملة.

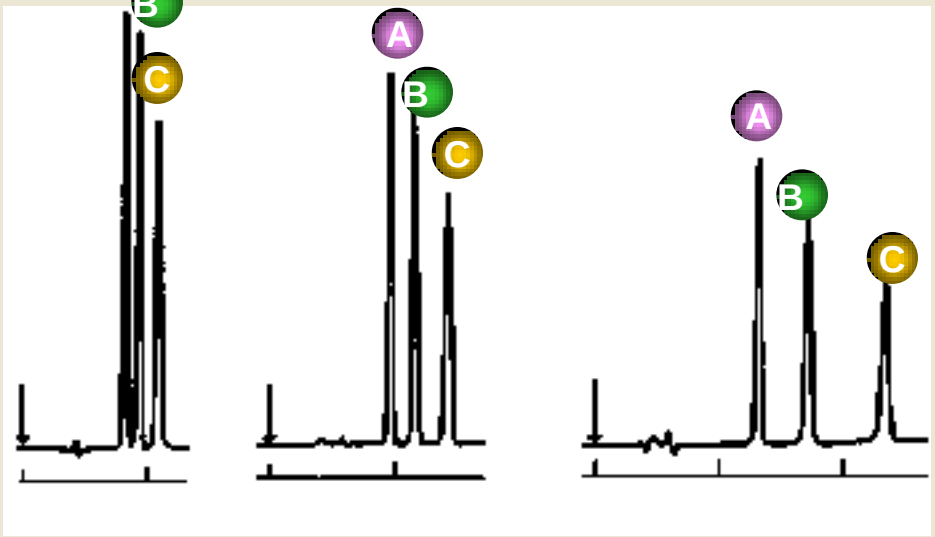
Liquid-bonded phase chromatography: حيث يتوضع الطور الثابت على المادة الحاملة بارتبطه بروابط كيميائية على سطحها

Reversed Phase Chromatography

Retention behavior in reversed phase HPLC

CH_3CN/H_2O

(50/50) (60/40) (70/30)



Carbon chain length of sample

A < B < C

A : p-Hydroxy ethyl benzoate

B : p-Hydroxy propyl benzoate

C : p-Hydroxy butyl benzoate

Low ← Polarity of Mobile phase → High

3- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني العالية الأداء: High Performance Ion-Exchange Chromatography:

يكون الطور الثابت في هذه الطريقة مبادل شوارد كاتيوني أو أنيوني ويتم الفصل بلاعتماد على تبادل الشوارد حسب المعادلات التالية:

$$x\underset{\text{solid}}{RSO_3^- H^+} + \underset{\text{solu}}{M^{+x}} \rightleftharpoons \underset{\text{solid}}{(RSO_3^-)_x M^{+x}} + \underset{\text{solu}}{x H^+}$$

$$xRN(CH_3)_3^+ OH^- + A^{-x} \rightleftharpoons [RN(CH_3)_3^+]_x A^{-x} + x OH^-$$

4- كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي العالية الأداء: High Performance Size-Exclusion Chromatography:

يكون الطور الثابت بنية تشبه المنخل ويتم فصل المواد بالاعتماد على وزنها الجزيئي وحجمها. ويكون الطور الثابت محب للماء في حال المواد القطبية ويكون محب للدسم في حال فصل المواد غير القطبية.

العوامل المؤثرة على الفصل بال HPLC

1- القطبية:

غالباً مايعتمد الفصل الناجح على تشابه قطبية مكونات العينة مع قطبية الطور الثابت. لكن في بعض الأحيان العكس هو الصحيح وخصوصاً بالنسبة للمركبات عالية القطبية جداً أو عديمة القطبية

2- الوزن الجزيئي:

غالباً ماتغادر المواد ذات الوزن الجزيئي العالي عمود الفصل ببطء بينما تبقى المواد ذات الوزن الجزيئي النخفض وقتاً قصيراً على الطور الثابت

3- ال pH:

تؤثر ال pH في تشرد بعض المركبات لذلك يجب المحافظة على pH ثابتة في بعض عمليات الفصل بال HPLC وهذا يتحقق باستخدام محلول وقاء

4- درجة الحرارة:

عند ارتفاع درجة الحرارة تقل قوة ارتباط المادة بالطور الثابت مما يجعل زمن الاحتفاظ بها صغيراً وقد يؤدي في بعض الأحيان إلى الحصول على قمم حادة يكون حساب مساحتها غير دقيق والعكس بالعكس . كما أن التوضع الفراغي يتأثر كذلك بدرجة الحرارة

مثال

- ـ تم فصل مزيج المركبات A,B,C بوساطة ال HPLC على العمود ODS باستخدام ,(H_2O/MeOH) كطور متحرك.
- A= ميتيل بنزوات , B= فينول, C = حمض كاربوكسيلي ماهي نتائج الفصل المتوقعة؟

استخدامات ال HPLC في مجال الصيدلة
Applications of HPLC

-يستخدم في مجال الرقابة الدوائية (تحاليل الهرمونات , الفيتامينات, المسكنات, المضادات الحيوية .....)

- يستخدم لفصل المركبات الحاوية ذرة كربون (كيرال)

- يستخدم لفصل المركبات الإيزوميرية

- يستخدم في التحاليل البيئية

- يستخدم في تحليل بعض المضافات الغذائية والمواد المتسربة للغذاء