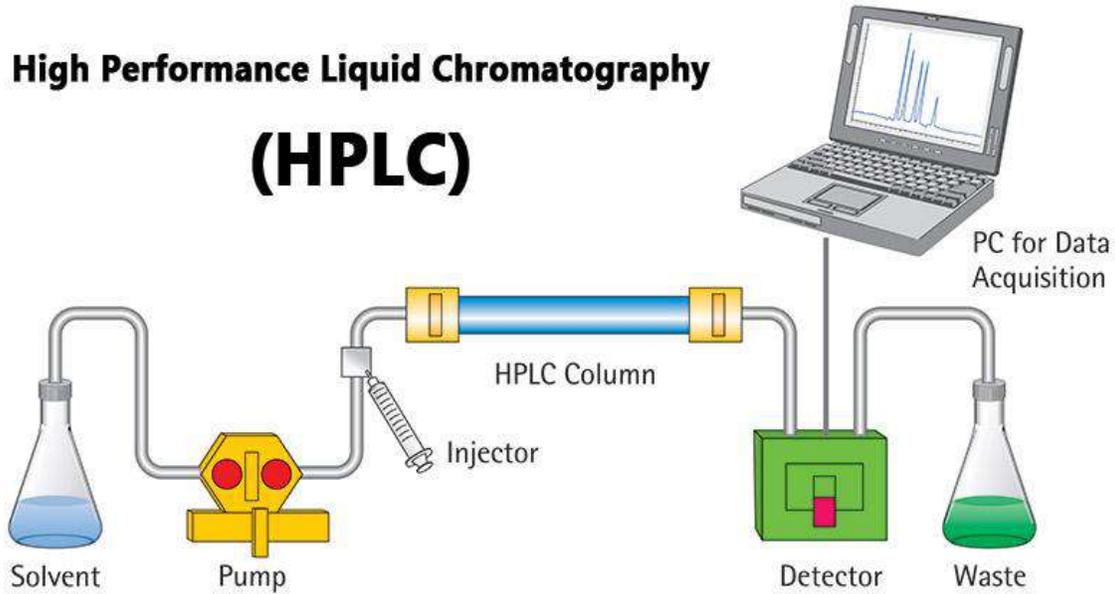


## الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC

بعد تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الدقة من أهم تقنيات الفصل الكيميائي بين المواد، وأكثرها شيوعاً في مختلف الصناعات ومجالات البحث المختلفة. تتميز أنواعها بتنوع طورها الحامل، (the mobile phase) والثابت. (the stationary phase).

كروماتوغرافيا السائل عالية الدقة تعتمد في عملها على طور حامل سائل لهذا سمي 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 HPLC ضغطاً عالياً (5000-6000) psi وقد تصل في كروماتوغرافيا الـ UHPLC حتى (18000) psi. أما في الكروماتوغرافيا الغازية فيحتاج إلى ضغوط منخفضة (15-200) psi.

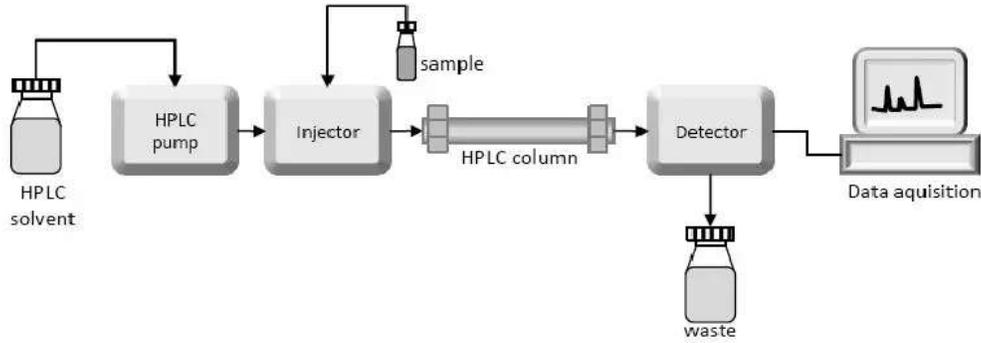
طور هذا الجهاز في أواخر السبعينيات ولقي إقبالا كبيرا من لدن الباحثين كوسيلة للفصل وتحليل المواد الكيميائية في العديد من المجالات. في الشكل الآتي نموذج مبسط لجهاز HPLC:



## مكونات جهاز HPLC :

يتكون هذا الجهاز من سبعة مكونات أساسية

- 1 - نظام توصيل المذيب (Pumpe): هو مضخة لضمان السريان الحر للطور الحامل بشكل مستمر ودقيق .
- 2 - نظام إدخال العينة (Injector) : يمكن ان يكون إلي أو يدوي ويستخدم صمامات ، عند فتحها يمكن ملاً 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.
- 3 - وعاء الطور الحامل: هو دورق يشترط فيه ان يكون نظيفاً مفرغاً من الهواء والغازات، تفادياً للخطأ في التحليل.
- 4 - العمود (Column): هو قلب الجهاز حيث تحدث عملية الفصل ، عادة ما يكون مصنوعاً من الفولاذ غير قابل للصدأ ومضاد للتآكل وينقسم إلى نوعين: أعمدة تحليلية وأخرى أولية.
- 5 - 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):
  - أ - كاشف الأشعة فوق البنفسجية UV يعتبر الأكثر شيوعاً بين الكواشف.
  - ب - الصمام الثنائي الضوئي (Photodiode).
  - ت - كاشف الفلوريسينس (Fluorescence): عالي الانتقائية والحساسية يستخدم عادة للكشف عن المركبات المتشكلة اثناء حدوث تفاعلات متسلسلة.
  - ث - كاشف الانكسار الضوئي (Refractive index): كاشف عام يمتلك حساسية محدودة.
  - ج - كاشف الناقلية: جيد الانتقائية والحساسية.
- 6 - الأنابيب الرابطة: هي مصنوعة من مادة خاملة لا تتفاعل مع مادة الوسط المتحرك والمذيبات، وتكون في العادة مصنوعة من الحديد غير قابل للصدأ أو من البلاستيك الخامل.
- 7 - جهاز الحاسوب: يستخدم كجهاز مجمع للبيانات حيث يكون متصلاً بالكاشف فيلتقط الاشارات الالكترونية الاتية منه ثم يقوم بتحليلها واخراجها في شكل رسوم تسمى كروماتوغرام.



### الآلية عمل HPLC

تتم إذابة المركبات الكيميائية المراد فصلها في مذيب حيث يتم ادخال هذا الخليط في الطور الحامل وبالاعتماد على طبيعة الجزيئات، فإنها تتفاعل أكثر أو أقل مع الطور الثابت الموجود في الانبوب المسمى بالعمود الكروماتوغرافي (chromatography column) .

كروماتوغرافيا السائل عالية الدقة (HPLC) هي طريقة تمزج بين ما هو فيزيائي وما هو كيميائي وتعتمد بالاساس على الاختلاف والتنوع في التفاعلات بين المذاب، الطور الحامل والطور الثابت(المذيب) ، نتيجة لهذه التفاعلات يحصل الفصل المطلوب.

اذ يتم بداية ضخ الوسط المتحرك داخل العمود باستخدام مضخة 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 ، اذا 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 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 :

كروماتوغرافيا الأيونية ( Ion-exchange chromatography )

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

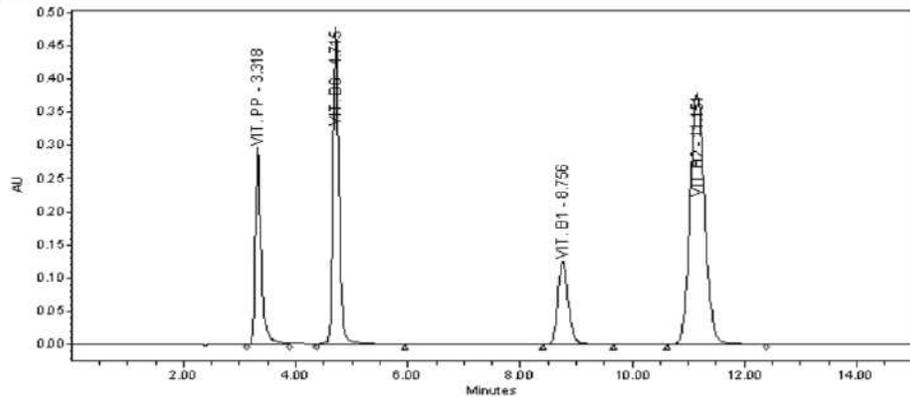
كروماتوغرافيا الأحجام ( Excluding chromatography )

هذا النوع ينطبق على الأنواع ذات الحجم الجزيئي الكبير، بحيث المحلول المراد فصل مكوناته يكون مرتبطا بالكتلة المولية (masse molair) .

كروماتوغرافيا الانجذاب (Affinity chromatography)

تقوم هذه التقنية على كون الطور الثابت يتكون من اجسام او مثبتات او 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 .

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	NESTAVIT. Standard	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard		
Vial:	1	Acq. Method:	4 VITAMINES
Injection #:	4	Channel Name:	2487Channel 1
Injection Volume:	20.00 ul	Sample Set Name:	
Run Time:	15.00 Minutes		
Column Type:	C18, L=250 mm		



Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	% Height	Amount	Units
1 VIT_PP	3.318	2164957	15.27	295029	23.08	100.000	P%
2 VIT_B6	4.715	3587391	25.30	477473	37.36	100.000	P%
3 VIT_B1	8.756	1616889	11.40	125406	9.81	100.000	P%
4 VIT_B2	11.151	6810166	48.03	380217	29.75	100.000	P%

