کروماتوگرافی درفاز گازی ومورد استعمال آن

در مطالعهٔ Lipochimie

نوشتهٔ:

دکترعطاءالله دانش‌راد

دانشکدهٔ فنی

عمل کروماتوگرافی که امروزه درآزمایشگاههای تحقیق انواع آن مورد استفاده قرارمیگیرد یکی از روشهای مطمئنی است که برای تفکیک وتجزیهٔ کمی اجسام موجود دریک مخلوط بکار میرود. معمولاً کروماتوگرافی درفازمایع بااستفاده ازیک‌ستون اکسیدآلومنیوم یا کروماتوگرافی روی کاغذ وحتی بروی صفحات شیشه‌ای امروزه درتمام آزمایشگاههای تجسس ازجمله روشهای کلاسیک تفکیک میباشد. ولی مهمترودقیقتر ازهمه کروماتوگرافی درفازگازی است.

علت اصلی تفکیک درکلیهٔ روشهای کروماتوگرافی یکی نبودن تمایل اقامت اجسام موجود درمخلوط موردآزمایش درفازثابت ومتحرك میباشد. فاز ثابت ممکن است ستون اکسید آلومنیوم. صفحهٔ کاغذ. صفحهٔ شیشه ویا بالاخره درمورد کروماتوگرافی درفازگازی جسم مخصوصی باشد که قبلاً درستون کروماتوگرافی وارد شده است. حال آنکه فاز متحرك درمورد کروماتوگرافی درفازگازی یک گاز مناسب ودرموردسایرانواع حلال معینی میباشد.

کروماتوگرافی درفازگازی

کروماتوگرافی درفازگازی که برای اولین بارتوسط جیمز[1] ومارتن[2] درسال ۱۹۵۲ عملاً مورد استفاده واقع گردید امروزه یکی از روشهای بسیار دقیق و قوی برای تفکیک وشناسایی و حتی اندازه‌گیری کمی اجسام موجود دریک مخلوط میباشد.

ازنظر تئوری کروماتوگرافی درفازگازی اطلاعات دقیق و وسیعی در اختیار میگذارد ما ذیلاً فقط موارد استعمال آنرا بحث کرده وخصوصاً مطالعات خود را درحدود مواد چرب محدود میسازیم.

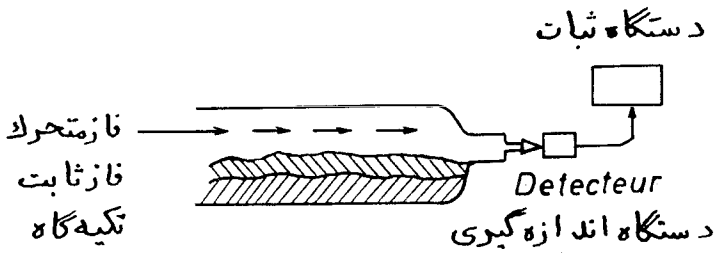
اصول این روش که آنرا غالباً کروماتوگرافی گاز- مایع نیزمینامند بشرح زیر میباشد:

یک ستون که ممکن است شکلهای مختلف داشته باشد از دانه‌های ریز جسم جامد بی‌اثری بنام تکیه‌گاه[3] پرشده است این دانه‌ها توسط مادهٔ آلی (مایع درشرایط عمل) موسوم به‌فاز ساکن[4] یافازثابت

---

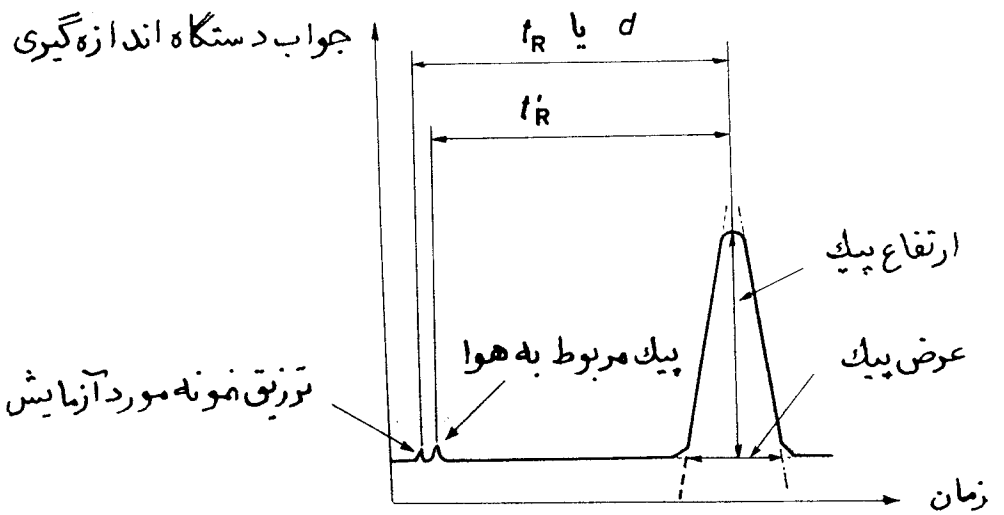
۱) James ۲) Martin ۳) Supporte ٤) Phase Stationnaire

آغشته شده‌اند. از درون ستون ولابلای اجسام محتوی آن که قبلاً در درجه حرارت ثابتی نگاه‌داشته‌شده‌اند گازی بنام گاز حامل[1] یا فاز متحرك[2] با دبی معین عبور مینماید (شکل ۱).

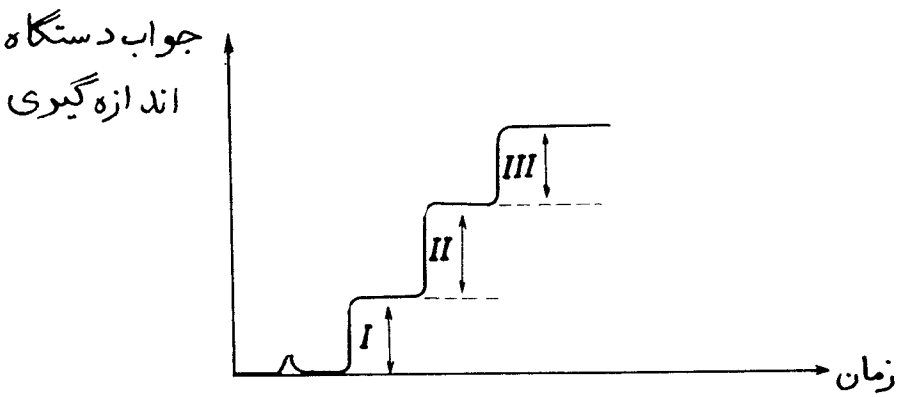


شکل ۱

اصول کروماتوگرافی درفاز گازی



شکل ۲ الف



شکل ۲ ب

---

۱) Gaz vecteur ۲) Phase Mobille

اگر مخلوطی از دو جسم A و B در دهانهٔ ستون وارد شود بعلت یکنواخت نبودن تمایل اقامت سازنده‌های آن در دو فاز متحرك وثابت در منتهی‌الیه ستون یکی پس از دیگری جدا از هم خارج‌میشوند. ما ذیلاً خواهیم دید چگونه میتوان دوجسم را که حتی‌دارای نقطهٔ جوش‌مساوی هستند توسط کروماتوگرافی در فاز گازی ازیکدیگرجدا ساخت. با قراردادن دستگاهی بنام‌دتکتور[۱] درمنتهی الیه ستون میتوان یاغلظت لحظه‌ای جسم حل شده را درفاز متحرك برحسب زمان اندازه گیری‌نمود دتکتوردیفرانسیل[۲] (شکل ۲ الف) ویا اینکه ارتفاع قله منحنی رسم‌شده توسط کلیهٔ جسم خارج شده ازستون‌را اندازه گرفت. دتکتورانتگرال[۳] (شکل ۲ ب).

مورداستعمال کروماتوگرافی درچربیها

چربیها اعم ازاینکه منبع نباتی ویا حیوانی داشته باشند چه ازنظر ساختمانی وچه از نظر ترکیب شیمیایی بسیار متفاوت هستند. بهمین علت آنها را بـه چربیهای ساده ـ مرکب یـاترکیبات کمپلکس[۴] تقسیم کرده‌اند.

کروماتوگرافی درفازگازی تاکنون مورداستعمال زیادی درتجزیه چربی‌های کمپلکس پیدا نکرده است ولی برعکس درسالهای اخیر مقالات زیادی‌درباره تجزیه چربیهای ساده وخصوصاً اسیدهای چرب‌منتشر شده است. اخیراً عده‌ای از محققین موفق شده‌اند با استفاده از کـروماتوگرافی درفاز گازی تعداد زیادی اسیدهای چرب باعده اتم کربن فرد درساختمان‌چربیهای طبیعی پیداکنند که مقدار آنها برحسب نوع ومورد ممکن است بسیار جزئی ویا قابل ملاحظه باشند علاوه براین اسیدهای چرب با زنجیر جانبی ایزو[۵] ـ آنته ایزو[۶] اسیدهای‌ترانس وحتی‌اسیدهای چرب با ساختمان پیچیده‌تری‌ازقبیل اسیدهای ستن‌دار و اپواکسید[۷] وغیره درمخلوط چربی‌های طبیعی یافت شده‌اند.

ازطرف دیگر تجزیه کامل اسیدهای موجود دریک چربی کار بسیار مشکلی است زیرا بعنوان مثال دریک نمونه کره ممکن است بیشتر از سی نوع اسید موجود باشد که مقدار درصد آنها متغیر است (۰.۳ـ۰.٤ درصد اسید اولئیک‌ویکصدم درصد اسید ستیل. ۱ـ دودکانوئیک[۸]) کروماتوگرافی درفازگازی وسیلهٔ بسیار دقیق ومطمئنی است که قادر است تمام سازنده‌های چنین جسمی را بسرعت ودقت زیاد اندازه گیری نماید.

میتوان مخلوطی از اسیدهای چرب را مستقیماً ویا پس ازتبدیل به‌استرمتیلیک‌توسط کروماتوگرافی تجزیه نمود. علاوه براین استرولهای مختلف را میتوان با استفاده از سیلیکون[۹] بعنوان فاز ثابت ازیکدیگر جداکرد. ترکیبات مختلفی که بتوان آنها را با اسیدهای چرب مربوط دانست از قبیل آلدئیدها ـ آمین ها ـ

---

۱) Detecteur ۲) Detecteur Differentiel ۳) Detecteur Integral
٤) Complexe ٥) Iso ٦) Anté Iso ۷) Epoxides
۸) Acide méthyle-۱۰ Dodécanoïque ۹) Silicon

الکلها ـ نیتریل ها وغیره توسط کروماتوگرافی درفاز گازی ازیکدیگر قابل تفکیک میباشند.

کروماتوگرافی اسیدهای چرب واسترمتیلیک آنها

بطوریکه گذشت میتوان اسیدهای چرب را چه بصورت اسید آزاد وچه بصورت استرمتیلیک با استفاده از کروماتوگرافی از یکدیگر جدا نمود معمولاً کروماتوگرافی اسیدهای چرب بیشتر برروی استرهای متیلیک آنها انجام میشود. اغلب اسیدهای چرب که اهمیت بیولوژیکی دارند اسیدهای با مولکول بزرگ هستند که تفکیک آنها بصورت استرمتیلیک بخوبی انجام میگیرد حال آنکه اسیدهای کوچک (استیک. پروپیونیک. بوتیریک) اگر بشکل اسید آزاد باشند ساده‌تر از استرمتیلیک خود از یکدیگر توسط کروماتوگرافی جدا می‌شوند ولی با استفاده ازاجسام معمول درکروماتوگرافی درفازگازی بعنوان فازثابت بعلت پدیده‌های اجتماع مولکولی[1] منحنی رسم شده (شکل ۲ الف) توسط دستگاه ثبات برای اسیدهای آزاد تقارن خود را ازدست می‌دهد البته این عیب را می‌توان با مخلوط نمودن مقدار خیلی جزئی ازیک اسید با فشاربخار کم درفاز ثابت ازبین برد مثلاً گرس سیلیکون[2] که باده درصد وزنی خود اسیداستاریک مخلوط شده باشد و همچنین دی‌اتیلن گلیکل سوکسینات[3] با دو درصد اسید فسفریک قادر است اسیدها را تا C_{22} ازیکدیگر تفکیک نماید.

برای جدا کردن اجسام موجود در یک مخلوط منجمله مجموعه‌ای از اسیدهای چرب توسط کروماتوگرافی درفازگازی فاکتورهای بسیارمتعددی مؤثر میباشد. عده‌ای ازآنها مربوط به‌جسم حل شده. مقدار وطرز تزریق آن دردستگاه بوده وعده‌ای دیگر با نوع اسباب جنس فازمتحرك ابعاد ستون، جنس وابعاد تکیه گاه[4] نوع ومقدار فازثابت، دبی گاز خروجی ازستون درجه حرارت ستون وغیره مربوط میباشد. ما ذیلاً باختصار مهمترین آنها را بررسی مینمائیم.

فاز ثابت[5]: درکروماتوگرافی درفازگازی انتخاب فاز ثابت اهمیت بسیار زیادی دارد. معمولاً جسمی که برای این منظور انتخاب میشود بایستی دارای خواص زیر باشد:

۱- فشار بخار آن کم وحلال خوبی برای اجسام مورد مطالعه باشد.

۲- با اجسامی که درستون جریان دارد هیچگونه فعل وانفعالی ایجاد ننماید.

۳- تئوریکمان میبایستی دردرجه حرارت عمل تجزیه نشود ودرچنین شرایطی ویسکوزیته آن ثابت بماند.

اگر فازثابت S طوری انتخاب شود که قوای عمل کننده بین مولکولهای دو جسم A و B موجود دریک مخلوط ومولکولهای S ازطرفی وقوای موجود بین A و B درمحلول خالصشان ازطرف دیگر متفاوت باشند سازنده‌های A و B به‌ترتیب نقطهٔ جوش خود از ستون خارج میشوند. در اینصورت میگویند فاز ثابت برای اجسام حل شده باپلاریته مساوی سلکتیو[6] نمیباشد. واگرقوای موجود بین A و S مشابه قوای عمل کننده بین ملکولهای A درمحلول خالصش باشد وبرعکس نیروی موجود بین ملکولهای B و S وقوای موجودبین

۱) Association Moléculaire ۲) Graisse de silicone ۳) Dietylène Glycol Succinate
۴) Supporte ۵) Phase Stationnaire ۶) Sélective

مولکولهای B در محلول خالصش متفاوت باشند سازنده های A وB میتوانند حتی اگر نقطهٔ جوش واحدی داشته باشند بخوبی ازیکدیگر تفکیک شوند. دراین صورت فازثابت سلکتیو نامیده میشود.

حال آنکه ازنظر مقدار تجربه نشان داده‌است که اگر ۱۰ یا ۲۰ قسمت وزنی ازفازثابت برای ۱۰۰ قسمت تکیه گاه انتخاب شود نتیجه تفکیک بسیارخوب خواهد بود.

اجسامی که بیشتر درکروماتوگرافی در فاز گازی مواد چرب بعنوان فاز ثابت بکار برده میشوند عبارتند از: آپی‌ازون[۱] گرس‌سیلیکون[۲] وپلی‌استرها.

پلی استرهااین مزیت را دارند که دارای سلکتیوتیه‌بسیار خوب درمقابل‌اجسام سیرنشده میباشند. درحقیقت مولکول پلی‌استر با فرمول :

$$-O-CH_2-CH_2-O-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-(CH_2)_n-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-O-CH_2-CH_2-O-$$

با اتصالهای مضاعف موجود دراسیدهای چرب‌غیرمشبع وارد درعمل شده وآنها را با خود نگاه‌داشته‌باعث میشوند که در زمان دیرتری به‌هومولوگهای اشباع شده خود ازستون خارج شوند.

مطالعات تجربی نشان داده است که طول زنجیر کربنه دی اسید و یا دی الکل بکار برده شده درساختمان پلی‌استراهمیت خاصی درتفکیک اجسام ازیکدیگر دارد. مثلاً بهترین تفکیک کوپل استئاریک‌ـ اولئیک[۳] برروی پلی‌استر اسید سوکسینیک واتیلن گلیکل بدست میآید.

آپی‌ازون‌ها[۱] که ساختمان پارافین دارند بمقدار زیادی بعنوان فازثابت در مورد کروماترگرافی مواد چرب بکاربرده شده‌اند.

اتصالهای موجود بین اتمهای چنین ملکولی بآسانی پلاریزه نمیشوند. نتیجةً قوای تفکیکی‌تنها با وزن مولکولی وشکل ساختمانی اجسام مورد آزمایش متناسب میباشد وتحت تأثیر آن سازنده‌های‌مخلوط از یکدیگر جدا میشوند. تابلوی صفحهٔبعد تعدادی از فاز های ثابت مورد استفاده را برای‌اسیدهای چرب نشان میدهد :

درجهٔ حرارت ستون : یکی‌دیگرازعوامل اساسی مؤثر درتفکیک اجسام‌موردآزمایش درجهٔحرارت ستون میباشد. مطالعات تئوری نشان داده است که حجم جزء جذب شده[۴] (V_R) با عکس درجهٔ حرارت مطلق ستون متناسب است.

$$\log V_R = a\frac{H}{RT_c} + b$$

H عبارت ازحرارت نهان تبخیر جسم‌مورد آزمایش بوده a و b ثابتهائی هستندکه با جنس جسم حل شده متناسب میباشند. با درنظرگرفتن قانون تروتن[۵]:

---

۱) Apiezon ۲) Graisse de Silicon ۳) Couple Stéarique – oléiqne

۴) Volume de Retention ۵) Trouton

فاز ثابت	ساختمان شیمیایی	حدود درجهٔ حرارت کار	حدود تفکیک اسیدهای چرب	ملاحظات
Silicone D C 550 که ده درصد اسید استئاریک بآن علاوه شده است	پلیمر Silicone با انشعابهای متیل و فنیل حاوی اسیدهای چرب با زنجیر طویل	100 — 140	C_1 — C_6	فقط برای تفکیک اسیدهای آزاد خوب است
دی‌اکتیل سباسات حاوی پانزده درصد اسید سباسیک	استر + اسید	تا 150	C_1 — C_6	برای اسیدهای آزاد
دی‌اکتیل یا دی نونیل فتالات	استر	80 — 150	C_1 — C_8	برای استرهای متیلیک
پارافین مایع	ئیدروکربور اشباع شده	60 — 150	C_1 — C_8	» » »
Apiezon N	» » »	تا 200	C_5 — C_{22}	» » »
Apiezon L	» » »	تا 300	C_5 — C_{30}	» » »
Graisse de Silicone	پلیمر Silicone حاوی چندشاخه آروماتیک	تا 250	تا C_{30}	تفکیک بد برای مخلوط اسیدهای مشبعه و غیر مشبعه
پلی اتیلن گلیکل آدیپات	پلی استر	تا 200	تا C_{26}	تفکیک خوب برای تمام اسیدها غیر از ایزومرها
Beoflex 400	»	تا 200	تا C_{26}	»
LAC-4-R-777	سوکسینات دی‌اتیان گلیکل	تا 200	تا C_{30}	»

$$H = KT_{eb}$$

رابطهٔ فوق بصورت زیر درمیآید.

$$log V_R = a\frac{KT_{eb}}{RT_c} + b$$

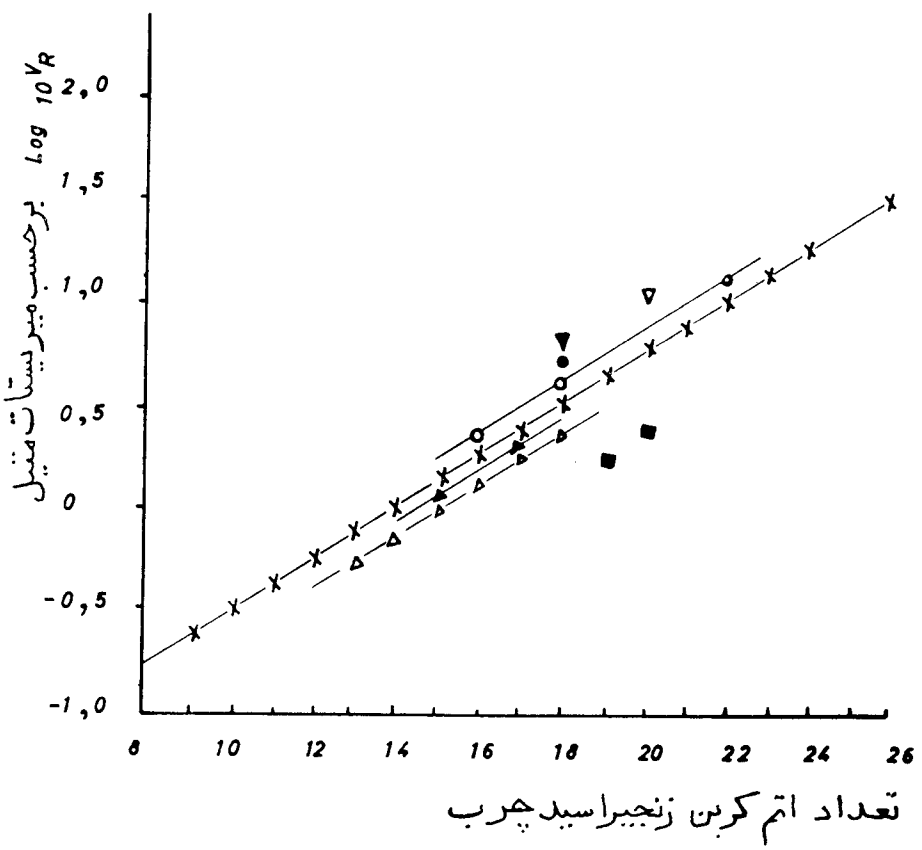
ازترسیم منحنی نمایش این معادله برای یک‌سری اجسام هومولوگ[1] خطوط مستقیم متقاربی بدست میآید. با مشاهدهٔ دیاگرام بدست آمده بسادگی استنباط میشود که برای تفکیک بهتر لازم است درجه حرارت پائین‌تری انتخاب شود. زیرا هرقدر درجهٔ حرارت ستون پائین‌تر انتخاب شود فاصلهٔ بین دو خط بیشتر شده بنابراین ضریب تفکیک بزرگتر میشود. ولی دراین صورت مقدار V_R افزایش یافته وطول زمان برای انجام تفکیک ممکن است فوق‌العاده زیاد شود. لذا اجباراً بایستی درشرایط مناسبی ازدرجه حرارت کار کرد.

---

۱) Homologue

تفکیک اسید های سیر شده - بطوری که گذشت برای تفکیک اسید های اشباع شده میتوان آپی‌ازون[۱] سیلیکون[۲] ویا پلی‌استر[۳] را بعنوان فازثابت بکاربرد. درهرحال با استفاده هریک ازاین‌اجسام اسیدهای اشباع شده که پلاریته مشابهی دارند برحسب نقطهٔ جوش‌خود ازستون خارج میشوند. باین‌ترتیب که ابتدا مولکولهای با شاخه جانبی وسپس ترکیبات نرمال خارج میشوند. مثلاً برروی آپی‌ازون مانند پلی‌استر ترتیب خروج ایزومرها عبارتست ازابتدا ایزو وسپس آنته‌ایزو وبالاخره نرمال.

بطوریکه قبلاً مشاهده شد برای یک جسم معین تغییرات $\log V_R$ برحسب درجهٔ حرارت‌خطی‌است مستقیم حال اگر درجهٔ حرارت‌ثابت $\log V_R$ را برای یک سری از اسیدهای پشت سرهم‌اندازه گرفته‌وتغییرات آنرا برحسب تعداد اتم کربن موجود درزنجیر رسم نماییم برای اسیدهای باشاخهٔ جانبی خطی مستقیم‌وبرای اسیدهای نرمال نیزخط مستقیم جداگانه‌ای بدست میآید (شکل ۳).



شکل ۳

باین ترتیب ملاحظه میشود برای هرسری ااسیدها خط مستقیم مستقلی وجود خواهد داشت که خود برای مشخص کردن سازنده‌های یک مخلوط اهمیت زیاد دارد.

تفکیک اسیدهای سیر نشده - کروماتوگرافی اسیدهای غیر مشبع بعلت اتصالهای دوتائی موجود در آنها برروی فازهای ثابت متفاوت نتایج مختلفی بدست میدهد زیرا اگر فاز ثابت پلی‌استر (فاز قطبی)[٤]

---

۱) Apiezon ۲) Silicone ۳) Polyester ٤) Polaire

انتخاب شود اتصالهای دوتائی با فاز ثابت متقابلاً برروی یکدیگراثر گذاشته ونتیجةً جسم غیرمشبع نسبت به اسید اشباع شده همانند خود دیرتر از ستون کروماتوگراف خارج میشود حال آنکه اگر فاز ثابت جسم غیرقطبی مانند آپی‌ازون باشد دراینصورت ترتیب خروج اجسام برحسب وزن مولکولی آنها بوده و بنابراین اسید غیرمشبع برعکس حالت پیش قبل ازاسید اشباع شده خارج میشود. علاوه براین با استفاده‌ازآپی‌ازون بنظر میرسد که هرقدر اتصال دوتایی ازعامل استردورتر باشد زمان‌لازم برای خروج جسم مورد نظرازستون بیشترمیشود. با استفاده ازهمین فازثابت میتوان ایزومرهای سیس وترانس را ازیکدیگر جدا ساخت (ایزومر سیس قبل ازنوع ترانس ازستون خارج میگردد).

در مورد تفکیک اسیدهای غیرمشبع که در ملکول آنها بیشتر از یک اتصال دوتایی موجود است با استفاده ازپلی‌استر بعنوان فازثابت میتوان آنها را بخوبی ازیکدیگر جدا نمود. زیرا هرقدرتعدادا تصالهای دوتایی بیشتر باشند خاصیت قطبی بودن مولکول افزایش یافته و بنابراین خروج ازستون زمان بیشتری‌لازم دارد. رسم‌منحنی تغییرات‌لگاریتم‌حجم‌جزء جذب‌شده[1] برحسب‌عدهٔ اتمهای کربن‌موجود درزنجیراسید چرب خطوط مستقیم‌مستقلی برای اسیدهای‌مونو- دی- تری‌وتترا اتیلینیک بدست‌میدهد بااستفاده ازکروماتوگرافی درفاز گازی‌علاوه براسیدهای فوق‌الذکر به‌سادگی میتوان‌دی‌اسیدها، اسید الکلها، اسیدهای‌ستونی،استیلنی، واپواکسی[2] را ازیکدیگر جدا نمود.

تشخیص اسیدهای چرب- اگردرجهٔ حرارت، جنس‌ومقدار فازثابت همچنین دبی‌فاز متحرك در یک ستون کروماتوگراف دقیقاً ثابت باشند یک اسید ویا استر همیشه درزمان معینی خارج میشود. بنابراین ابتدا کروماتوگرام[3] مخلوط مشخصی که حاوی چهار یا پنج اسید معین میباشد را تهیه نموده سپس تغییرات $\log V_R$ را برحسب عدهٔ اتمهای کربن زنجیرکربنه رسم مینمایند. از این منحنی برای تشخیص اسیدهای ناشناس موجود درمخلوط مورد آزمایش استفاده میشود.

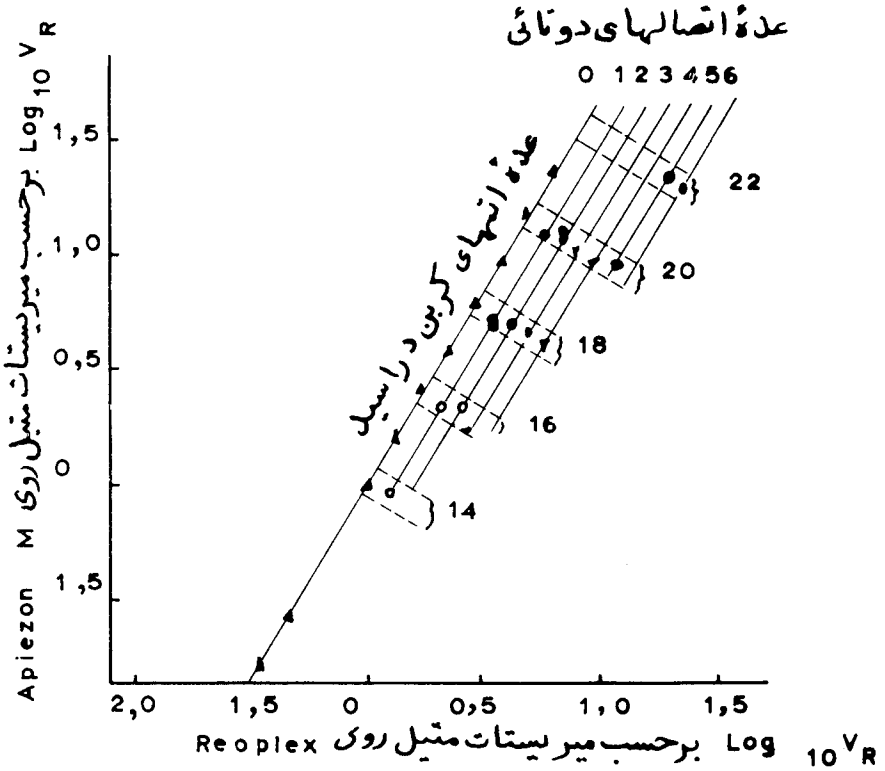
همچنین میتوان ازیک اسید شاهد مانند پالمیتات اتیل نیز استفاده نمود. محل پیک[4] (شکل ۲ الف) مربوط بآنرا برروی کروماتوگرام مشخص کرده وسپس مخلوط مورد آزمایش را ازکروماتوگراف عبور میدهند. ازمقایسه حجم‌های جزء جذب شده که باین‌ترتیب بدست میآیند با اعدادی که درکتابهاونشریات موجودات‌است‌میتوان‌اسیدهای موجود درمخلوط را مشخص‌ساخت‌قابل‌تذکراست که‌نسبت V_R اسیدناشناس به V_R اسید شاهد برای یک‌سری اسیدهای هومولوگ مستقل ازمقدار فاز ثابت ودبی فازمتحرك میباشد.

معهذا همیشه مقایسه ساده حجم جزء جذب شده با ارقامی که درکتابها موجوداست‌نمیتواندنتایج دقیق ومطمئنی بدست بدهد زیرا بندرت اتفاق میافتد که یک ستون با خصوصیات معین بتواند در طول کار مشخصات خود را بطورثابت حفظ نماید. روش‌های فوق ممکن است برای‌تشخیص دقیق یک یا چندپیک حاصل ازیک مخلوط کافی نباشد لذا به‌روشهای زیرمتوسل میشوند.

---

۱) Volume de retention ۲) Epoxy ۳) Chromatogramme ٤) Pic

۱- اخیراً معلوم شده است که رسم تغییرات $\log V_R$ حاصل بر روی فاز ثابت آپی‌ازون L برحسب ارقام بدست آمده روی پلی‌استر برای اسیدهایی که ساختمان مشابهی دارند خطوط مستقیم موازی بدست میدهد (شکل ٤) بنابراین ملاحظه میشود که برای تشخیص جسم مشکوک کافی است آنرا یک بار روی آپی‌ازون وبار دیگر برروی پلی‌استر عبور داد وبا استفاده ازمنحنی زیرمحل دقیق آنرا تعیین نمود .



شکل ۴

۲- میتوان بعضی‌ازاسیدهای سیرشده وسیرنشده راکه تشخیص آنها مشکل است با استفاده ازیک عمل بروموراسیون بآسانی بازشناخت . باین ترتیب اتصالهای دوتایی موجود در زنجیر کربنه اسید غیرمشبع سیرشده وسازنده‌های مخلوط هریک برحسب وزن مولکول خود ازستون خارج میشوند . بنابراین اسید برم‌دار که نسبتاً خیلی سنگین شده است نسبت به‌سایراجسام موجود درمخلوط خیلی دیرتر ازستون خارج میشود .

۳- ئیدروژناسیون کاتاتیک در فشار معمولی نیز میتواند وسیلهٔ خوبی برای تمیز اجسام غیرمشبع واسیدهای با زنجیرجانبی ازیکدیگرباشد .

٤- یک اسید سیرنشده نامعلوم را میتوان باین ترتیب تشخیص داد که آنرا در منتهی‌الیه خروجی ستون جمع‌آوری کرده سپس باروشهای کلاسیک (اوزن‌دادن[1]) ویا اکسیداسیون با مخلوط پرمنگنات پتاسیم وپریدات سدیم) اکسیده کرده مولکول را درمحل‌اتصالهای دوتایی موجود شکسته ودی‌اسیدهای‌حاصل را توسط کروماتوگرافی درفازگازی شناخت .

---

۱) Ozonolyse