طرق الفصل الكيميائي

الكروماتوجرافيا

الجدارة :

معرفة الأسس النظرية والتطبيقات المختلفة الخاصة بالطرق الكروماتوجرافية.

الأهداف:

عندما تكمل هذه الوحدة يكون لك القدرة على:

١. التمييز بين طرق الكروماتوجرافيا المختلفة.
٢. تحديد المزايا والعيوب لكل طريقة.
٣. تحديد الطريقة المناسبة لإجراء فصل وتحليل عينةٍ ما.
٤. تصميم وتحديد الظروف المناسبة لفصل خليط من المواد.

مستوى الأداء المطلوب :

أن يصل المتدرب الى اتقان هذه الجدارة بنسبة ٩٥٪ .

الوقت المتوقع:

٢٢ ساعة.

الوسائل المساعدة:

- عارض ضوئي.
- عارض بيانات.
- حاسب آلي.
- سبورة.
- قلم سبورة.

متطلبات الجدارة :

اجتياز الوحدة الثانية.

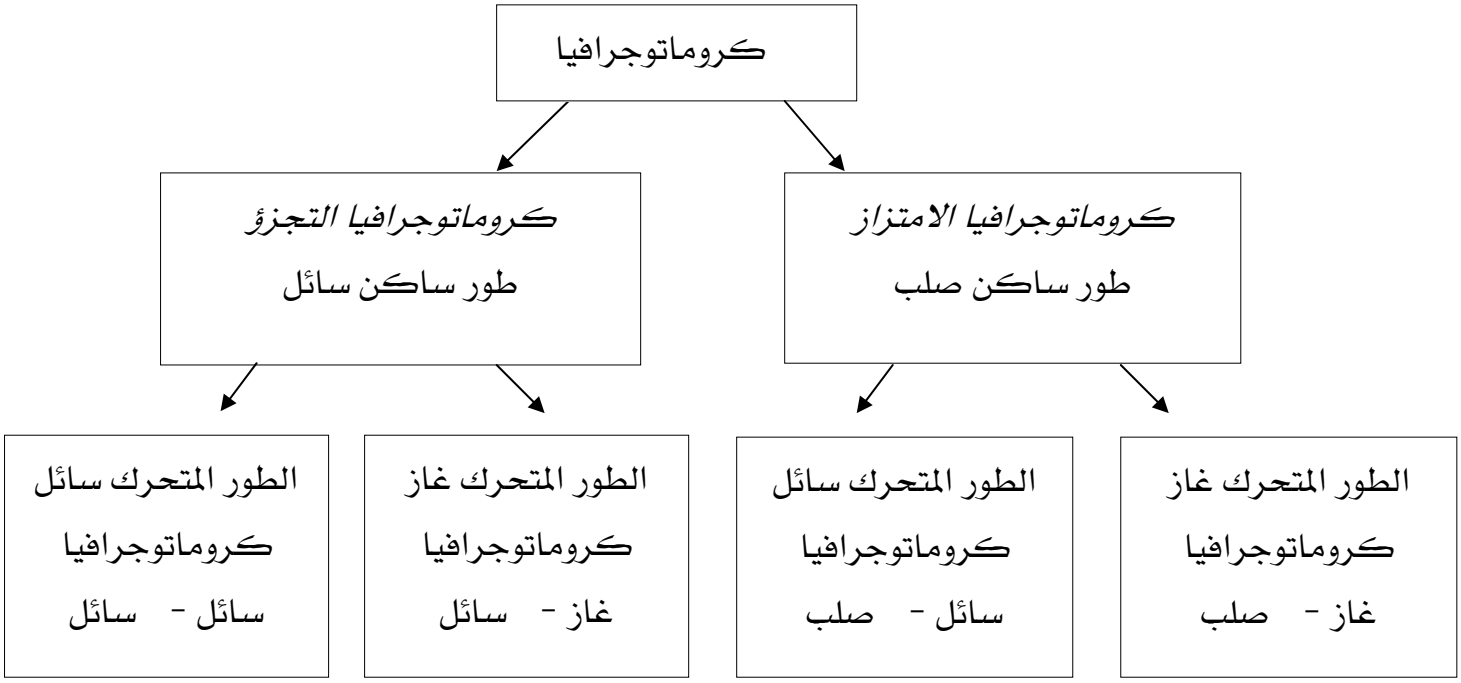
الفصل الأول: مدخل إلى الطرق الكروماتوجرافية

مقدمة :

في العام ١٩٠٦م تمكن العالم الروسي تسوت من اكتشاف الطرق الكروماتوجرافية عندما قام بفصل عصارة ورق النبات على عمود معبأ بمادة كربونات الكالسيوم، حيث مرر على هذا العمود محلولاً من الإيثر البترولي ولاحظ أن المواد قد انفصلت إلى طبقات لونية مختلفة. وقد أطلق هذا العالم اسم كروماتوجرافيا على هذا النوع من طرق الفصل. ويتركب هذا الاسم من عبارات يونانية تعني لون colour ويكتب to write. وفي بداية عام ١٩٤٠م تمكن العالم مارتن من وضع أسس نظرية كروماتوجرافيا السائل و كروماتوجرافيا الغاز وحصل على جائزة نوبل في الكيمياء عام ١٩٥٢م.
يمكن تشبيهه الكروماتوجرافيا بالتقطير التجزيئي الذي يعتمد على التحرك النسبي لطورين ولكن في الكروماتوجرافيا نجد أن أحد الطورين يكون ساكناً stationary phase وهذا إما أن يكون سائلاً أو صلباً ، في حالة السائل يكون مثبتاً على حبيبات صلبة مثل الزجاج والثاني يكون متحركاً mobile phase وهذا إما أن يكون سائلاً أو غازاً.وقد استمرت تسمية الكروماتوجرافيا إلى يومنا هذا بالرغم من أن أغلب استخداماتها ليست للمواد الملونة. عموماً يمكن القول أن الطرق الكروماتوجرافيه تتضمن توزع المادة المراد فصلها بين طورين أحدهما ثابت والآخر متحرك.

تصنيف الطرق الكروماتوجرافيه :

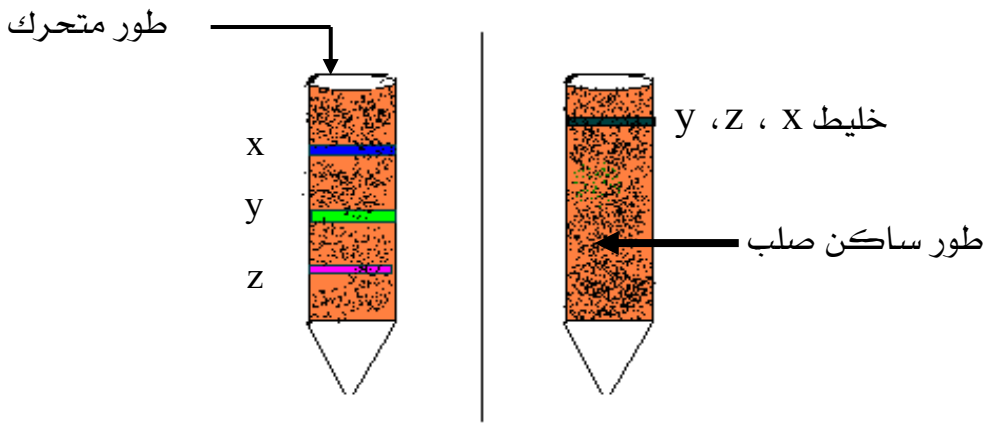
يمكن تصنيف الطرق الكروماتوجرافيه مبدئياً حسب طبيعة الطور الساكن ثم على حسب طبيعة الطور المتحرك كما يلي:



- كروماتوجرافيا غاز – سائل :
  - كروماتوجرافيا غاز –سائل Gas Liquid Chromatography (G.L.C)
- كروماتوجرافيا سائل – سائل :
  - كروماتوجرافيا التجزؤ الكلاسيكي في الأعمدة.
  - كروماتوجرافيا السائل ذو الكفاءة العالية. H.P.L.C
  - كروماتوجرافيا الورقة.
- كروماتوجرافيا غاز – صلب :
  - كروماتوجرافيا غاز – صلب Gas Solid Chromatography (G.S.C)
- كروماتوجرافيا سائل – صلب :
  - كروماتوجرافيا الامتزاز الكلاسيكي في الأعمدة.
  - كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة.
  - كروماتوجرافيا التبادل الأيوني.

كروماتوجرافيا الامتزاز (طور ساكن – صلب):

يمكن استخدام العمود الموضح فى الشكل رقم(١٤) لفصل مكونات خليطٍ ما.



قبل الفصل بعد فترة زمنية من تمرير الطور المتحرك

شكل رقم (١٤) يوضح الفصل بواسطة كروماتوجرافيا الامتزاز

يعبأ العمود بطور ساكن صلب مثل الألومينا ، وعند وضع الخليط في قمة العمود ويسمح للطور المتحرك بالسريان خلاله تتحرك معه مكونات الخليط.

يعتمد معدل التحرك لأحد مكونات الخليط على مدى الإعاقة بواسطة الامتزاز (الالتصاق) فوق سطح الطور الساكن الصلب، بحيث أن المادة التي تمتز بقوة (x مثلاً) تمكث (تتأخر) مدة أطول داخل العمود بينما المادة ذات الامتزاز الأقل تخرج في وقت مبكر (z مثلا) وهكذا يتم فصل المواد عن بعضها. إذاً العامل الرئيسي لإتمام الفصل في كروماتوجرافيا الامتزاز هو الفرق بين قوى الامتزاز للمواد. هذه القوى قد تكون قوى فاندرفالز كما في حالة استعمال الألومينا كطور ساكن أو قوى إلكتروستاتيكية كما في حالة كروماتوجرافيا التبادل الأيوني.

كروماتوجرافيا التجزؤ (طور ساكن – سائل) :

الفرق الوحيد بين هذا و كروماتوجرافيا الامتزاز هو طبيعة الطور الساكن. هنا يستخدم طور ساكن سائل مطلي أو مرتبط كيميائياً مع مادة مساندة مثل حبيبات الزجاج.

يعتمد معدل التحرك على الذوبانية للمادة المراد فصلها في الطور الساكن السائل. بحيث أن المادة التي تذوب بشكل أكبر تتأخر بينما التي لها ذوبانية أقل تخرج من العمود في وقت مبكر. لذايتم الفصل في هذاالنوع على أساس الاختلاف فى معامل التجزؤ للمادة المراد فصلها بين طور متحرك سائل وطور ساكن سائل.

مزايا الطرق الكروماتوجرافيه عامة على طرق الفصل الأخرى:

يمكن إنجاز الفصل بالطرق الكروماتوجرافية بكفاءة عالية عندما تعجزطرق الفصل الأخرى في فصل المواد المعقدة. وسبب ذلك أن أي فرق في قوى التجزؤ أو الامتزاز يتضاعف كثيراً عند مرور العينة داخل النظام الكروماتوجرافي. وكلما كانت المضاعفة عالية كانت كفاءة الفصل عالية.

- لا تتسبب الطرق الكروماتوجرافية في تفكك المواد المراد فصلها بمعنى أن المادة بعد فصلها يمكن الحصول عليها في حالتها الأصلية.
- استخدام كميات قليلة جداً من العينة لإنجاز الفصل (عدة مايكروليترات).
- التكلفة المنخفضة وبخاصة في حالة كروماتوجرافيا الورقة والطبقة الرقيقة.

اختيار الطريقه المناسبة لفصل مادةٍ ما :

حتى ولو كانت الطريقة التي سوف تستخدم منطقية (مثال فصل الغازات بكروماتوجرافيا الغاز)، يتم اختيار الطريقة المناسبة بطريقه تجريبية. الجدول رقم(٣) يوضح قائمة إرشادية تقريبية.

جدول رقم (٣) يوضح قائمة إرشادية تقريبية لاختيار الطريقة

م	طبيعة المواد المراد فصلها	الطريقة المناسبة
١	مواد متشابهة في الخواص الكيميائية	كروماتوجرافيا التجزؤ
٢	مواد مختلفة في الخواص الكيميائية	كروماتوجرافيا الامتزاز
٣	مواد متطايرة	كروماتوجرافيا الغاز
٤	مواد غير متطايرة	كروماتوجرافيا السائل ذو الكفاءة العالية
٥	مواد متأينة وغير عضوية	كروماتوجرافيا التبادل الأيوني أو الكروماتوجرافيا المستوية
٦	فصل المواد المتأينة من الغير متأينة	كروماتوجرافيا التبادل الأيوني
٧	المواد البيولوجية والمركبات ذات الأوزان الجزيئية العالية	كروماتوجرافيا الترشيح بالجل

ملاحظة :

ذكرنا من قبل أن الطرق الكروماتوجرافية يمكن تصنيفها حسب الطور الساكن أو المتحرك ولكن عموماً يمكن تقسيم الطرق الكروماتوجرافيه اعتماداً على تشابه التقنية. في هذه الوحدة سوف نقوم بدراسة الطرق الكروماتوجرافية تبعا للتصنيف التالي:

- الكروماتوجرافيا المستوية.
- كروماتوجرافيا الغاز على الأعمدة.
- كروماتوجرافيا السائل على الأعمدة.

الفصل الثانى : الكروماتوجرافيا المستوية Plane Chromatography

مقدمة :

يتحرك الطور المتحرك في هذا النوع على سطح مستوٍ بدلاً من العمود ، وتستخدم هذه الطرق غالباً للتحليل النوعي وهنالك نوعان وهما :

- **كروماتوجرافيا الورقة :**

الطور الساكن يكون عادةً من الماء المحيط بالسليلوز.

- **كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة :**

الطور الساكن يكون عبارة عن طبقة رقيقة من مادة امتزاز ناعمة مطلية ومثبتة على قطعة من الزجاج أو الألومنيوم أو شريحة بلاستيكية.

يعتمد معدل التحرك لمكونات الخليط على التجزؤ (في حالة كروماتوجرافيا الورقة) أو على الامتزاز (في حالة كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة).

تتوقف عملية التظهير في هذه الطرق قبل وصول المواد المراد فصلها والطور المتحرك إلى الحافة العلوية للسطح المستوي المستخدم. ويستخدم مصطلح R_f معامل الإعاقة retardation factor كوسيلة مهمة للتحليل النوعي qualitative analysis.

$$R_f = \frac{\text{المسافة التي تتحركها المادة المراد فصلها من نقطة البداية}}{\text{المسافة التي يتحركها الطور المتحرك من نقطة البداية}}$$

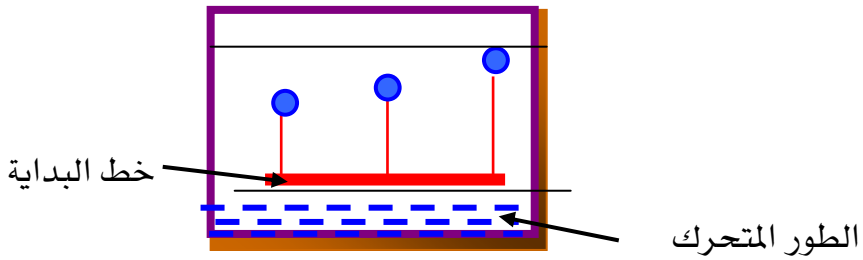
كروماتوجرافيا الورقة: Paper Chromatography

في هذا النوع يعمل الورق كساند (دعامة) للطور الساكن السائل (الماء) الموجود في مادة السليلوز. وبما أن الطور الساكن سائل يمكن تصنيف كروماتوجرافيا الورقه كأحد أنواع كروماتوجرافيا التجزؤ. عند وضع بقعة من محلول العينة (المادة المراد فصلها) على حافة هذه الورقة (على بعد ٢سم) وبعد جفاف العينة والسماح للطور المتحرك بالانتقال من خلال الورقة بالخاصية الشعرية ماراً بالعينة ، فإن العينة توزع نفسها بين الطورين اعتماداً على معامل التجزؤ وعلى هذا يتم الفصل.

يُغطي حوض التحليل للتأكد من ثباتية درجة حرارة الطور المتحرك وبالتالي حالة الاتزان..ويتم الفصل للعينات بعدة تقنيات نذكر منها :

١. **التقنية الصاعدة:** (يمكن تطبيقها لكروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة أيضاً)

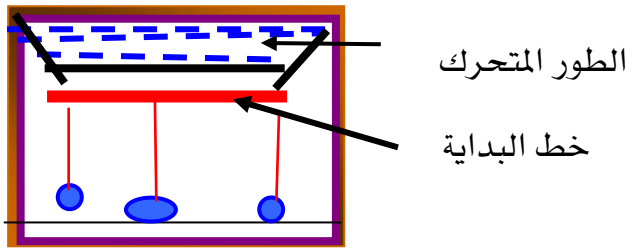
يُوضع الطور المتحرك في هذه التقنية في قاع حوض التحليل ويتحرك إلى أعلى الورقة بالخاصية الشعرية. كما فى الشكل رقم (١٥).



شكل رقم (١٥) يوضح التقنية الصاعدة

٢. **التقنية النازلة:** (تطبق في كروماتوجرافيا الورقة فقط)

يُوضع الطور المتحرك في حوض خاص في قمة حوض التحليل الأساسي. ويتحرك إلى أسفل الورقة بفعل الجاذبية كما فىالشكل رقم (١٦).

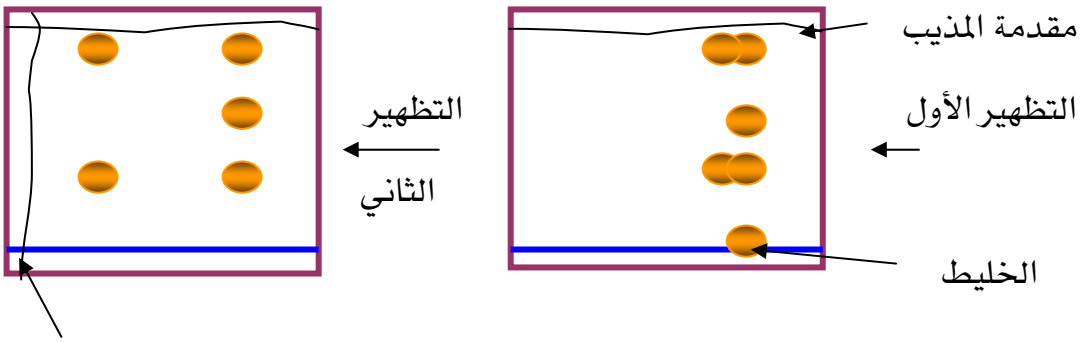


شكل رقم (١٦) يوضح التقنية النازلة

٣. **كروماتوجرافيا الورقة باتجاهين:** (يمكن تطبيقه على الطبقة الرقيقة أيضاً)

تستخدم هذه الطريقة عندما يكون الفصل جزئياً باستخدام التقنيات المذكورة أعلاها وخاصة عندما يكون الخليط المراد فصله معقداً. حيث يُوضع الخليط عند أحد أركان الورقة ويُوضع في المذيب (طور متحرك) A مثلاً. تجفف الورقة وتدار ٩٠ درجة ليوضع طرفها القريب من مكونات الخليط في المذيب (طور متحرك) B مثلاً كما فى الشكل رقم(١٧).

التظهير الأول يتم فيه فصل الخليط إلى مجموعات أما الثاني فيتم فيه فصل كل مجموعة إلى مكوناتها الأصلية.



شكل رقم(١٧) يوضح كروماتوجرافيا الورقة باتجاهين

كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography

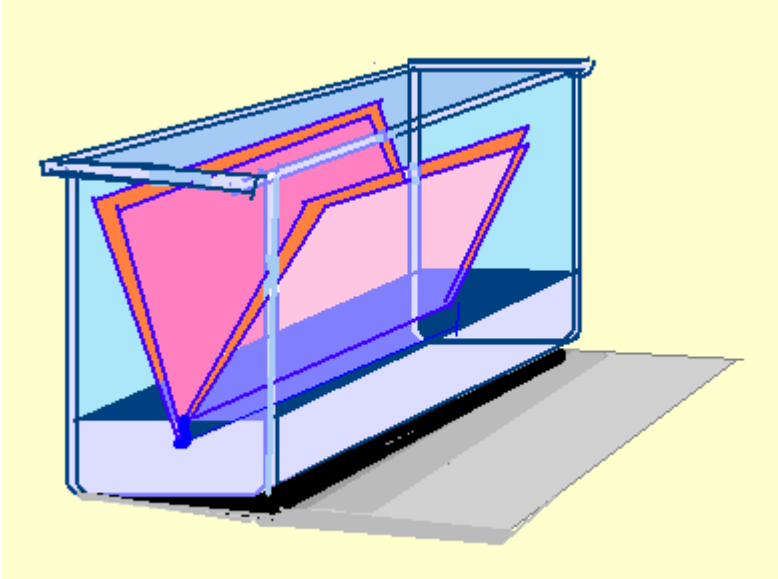
مقدمة :

هذه الطريقة تشبه كروماتوجرافيا الورقة سوى أن الطور الساكن يكون صلباً وهي عبارة عن طبقة رقيقة من مادة امتزاز ناعمة مطلية ومثبتة على صحيفة من الزجاج أو الألومنيوم كما فى الشكل رقم (١٨). تقنية التظهير هي نفسها كما في كروماتوجرافيا الورقة لكن كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة تتميز بالسرعة و التفريق الأفضل والحساسية العالية.

وهنالك العديد من المواد التي يمكن استخدامها كطبقة رقيقة منها :

- الألومينا .
- السليكا .
- مسحوق السليلوز .

ويمكن تحضير الطبقة الرقيقة بالمختبر وذلك بطلاء عجين أحد المواد المذكورة أعلاها بطريقة يدوية أو بواسطة آلة تطبيق خاصة. بعد الطلاء يتم تنشيط مادة الامتزاز بتجفيفها عند درجة حرارة ^{o}C 110 في فرن تجفيف لعدة ساعات. يتم التظهير بواسطة التقنية الصاعدة أما تشخيص العينات الغير ملونة فتتم بعدة طرق منها رش الطبقة بعد تجفيفها في دولاب الغازات بكواشف تعيين البقع locating reagent. هذه التقنية تستخدم بكثرة في مجال تحديد النقاوة والتحليل النوعي لمكونات الخليط.



شكل رقم (١٨) يوضح حوض التحليل وبه الطبقة الرقيقة

الكشف عن المواد المفصولة :

إذا كانت المادة المراد فصلها ملونة كما في حالة فصل الحبر التجاري فإنه يمكن ملاحظتها أثناء الفصل وبعده. أما إذا كانت المادة غير ملونة كما في حالة الأحماض الأمينية فإنه يمكن رشها بمادة النهيدرين مثلاً، (يستخدم في حالة الورقة والطبقة الرقيقة) كما ويمكن استخدام حمض الكبريت للمواد العضوية عموماً (يستخدم للطبقة الرقيقة فقط). ويمكن أيضاً استخدام الأشعة فوق البنفسجية.

ويجب الكشف عن المواد المفصولة داخل دولاب الغازات لخطورة المواد المذكورة في هذا المجال.

مقارنة بين كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة و كروماتوجرافيا الورقة:

المزايا الرئيسية لكروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة بالمقارنة مع كروماتوجرافيا الورقة تتلخص في الآتي:

١. سرعة الفصل والتفريق الأحسن، حيث نجد أن متوسط الوقت لتظهير كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة باستعمال السليكا حوالي 30-20 دقيقة، بينما نجد أن الفصل ربما يستغرق حوالي ساعتين في كروماتوجرافيا الورقة.

٢. كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة يمكن استخدامه لفصل المواد الغير آلفة للماء (hydrophobic) مثال الهيدروكربونات والليبيدات والتي من الصعب التعامل معها في كروماتوجرافيا الورقة.

٣. يمكن استخدام حمض الكبريت ككاشف تعيين في كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة بالطبع غير ممكن استخدامه مع كروماتوجرافيا الورقة.

من مساوىء كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة:

١. صعوبة التسجيل والاحتفاظ بالكروماتوجرام الناتج من كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة بالمقارنة بكروماتوجرافيا الورقة.
٢. صعوبة إمكانية استعادة نتائج متطابقة لقيم R_f.

تطبيقات الكروماتوجرافيا المستوية:

هنالك عدة تطبيقات مفيدة، من أبرزها:

- استخدامه في الكشف عن الشوائب التي قد تكون موجودة في بعض المركبات العضوية ، وذلك بوضع نقطة من محلول العينة على الورقة أو الطبقة الرقيقة والسماح للمذيب المناسب بالمرور خلالها ، فإذا تحركت العينة كبقعة واحدة فمعنى ذلك أنها عينة نقية أما إذا انفصلت في عدة بقع فهذا يعني وجود شوائب.
- كما تستخدم في التقدير النوعي للمواد المفصولة وذلك بمقارنة معامل الإعاقة R_f بمعاملات إعاقة لمواد قياسية معروفة تحت نفس الظروف العملية.
- وكذلك يمكن استخدامه في التحليل الكمي وذلك بقطع جزء الورقة الذي يشغله المكون المراد تقديره وإذابة هذا المكون في المذيب المناسب وتقديره بأي من الطرق المعروفة أو كشط جزء الطبقة الرقيقة الذي يحتله المكون المطلوب تقديره واستخلاص المذاب منه وتعيينه بطرق التحليل المناسبة كالتحليل الطيفي.

الفصل الثالث: كروماتوجرافيا الغاز Gas Chromatography (GC)

مقدمة عامة :

نشأ كروماتوجرافيا الغاز بواسطة العالمان مارتن وجيمس في عام ١٩٥٢م ومع بداية العام ١٩٥٥ تم تصنيع هذا الجهاز تجارياً.

يستخدم الغاز الخامل مثل النيتروجين أو الهيليوم كطور متحرك أما الطور الساكن فيكون إما:

- مادة امتزاز صلبة ويسمى في هذه الحالة كروماتوجرافيا غاز – صلب Gas Solid Chromatography (G.S.C).
- سائل غير متطاير مطلي على ساند صلب ويسمى في هذه الحالة كروماتوجرافيا غاز – سائل Gas Liquid Chromatography (G.L.C).

يتمتع كروماتوجرافيا الغاز السائل بتطبيقات واسعة جداً والتي يستخدم فيها الغاز كطور متحرك حيث يتم فصل المواد بخاصية الاختلاف في معامل التوزع بين الطورين الساكن والمتحرك. ويعتمد زمن المكوث للمادة على مدى قابليتها للتطاير ومدى تفاعلها مع الطور الساكن. ويمكن زيادة قابلية التطاير وتقليل مكوثها بواسطة تسخين العمود إلى درجات حرارة تتفاوت بين ^{o}C 50-350.

ويجب الاشارة إلى أن المواد يمكن فصلها بسهولة في كروماتوجرافيا الغاز عندما تكون لها:

- ضغط بخاري ملحوظ.
- ثابته حرارياً في درجة حرارة الفصل.
- لها وزن جزيئي أقل من 1000.

عموماً يستخدم كروماتوجرافياالغاز لفصل :

أ- الغازات. ب- السوائل غير المتأينة. ج- المواد العضوية الصلبة. د- وكثير من المواد العضو معدنية.

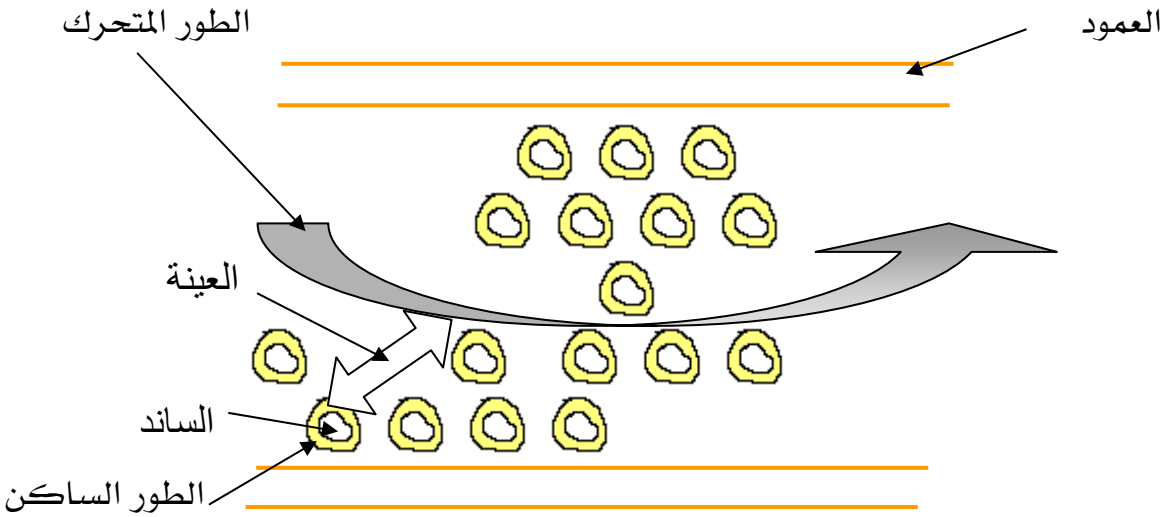
ولا يستخدم في فصل:

١. المواد ذات الجزيئات الكبيرة. ٢. أملاح المواد العضوية وغير العضوية.

يتميز كروماتوجرافيا الغاز بالكفاءة العالية والسرعة والانتقائية. كما لا يتم فيها تفكك (فقدان طبيعة) المادة ويتطلب كميات قليلة جداً (عدة مايكروليترات) من المادة.

مبدأ الكروماتوجرافيا الغازية:

عند مرور الطور المتحرك من اسطوانة مضغوطة خلال محطة الحقن ، والتي تحقن فيها كمية قليلة من العينة خلال قطعة مطاطية septum بواسطة إبرة الحقن إذا كانت سائلة أو صمام خاص إذا كانت العينة غازية ، تتحرك مكونات المادة عبر العمود حيث يتم الفصل بناءً على اختلاف معامل التوزع بين الطور المتحرك الغاز والطور الساكن السائل كما في الشكل رقم (١٩) (علماً بأن الطور المتحرك ليس له دور ملحوظ في عملية الفصل).



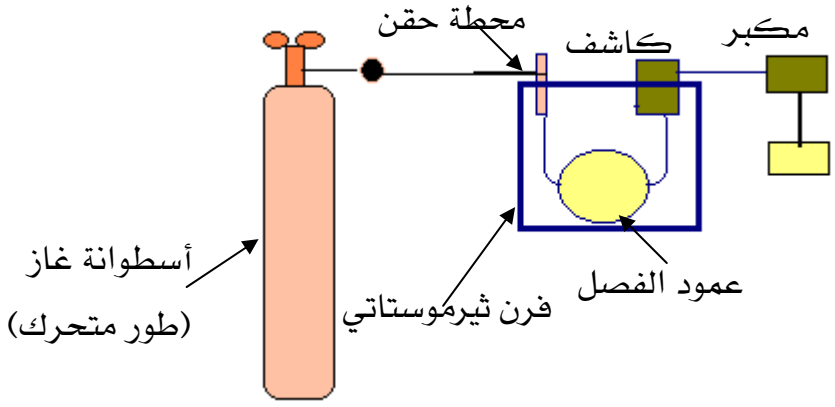
الشكل رقم (١٩) يوضح مبدأ الكروماتوجرافيا الغاز

عند خروج العينات من العمود تمر من خلال المقدر والذي يستجيب بدوره لكل مكون على هيئة سن peak.

المكونات الأساسية لنظام كروماتوجرافيا الغاز:

يتكون جهاز كروماتوجرافيا الغاز كما فيالشكل رقم (٢٠) من:

- الغاز الحامل (طور متحرك) carrier gas مع منظم سريان.
- محطة الحقن injection port .
- عمود الفصل (عمود معبأ packed column أو عمود شعري capillary column).
- مقدر Detector وأداة تسجيل.



الشكل رقم (٢٠) يوضح المكونات الأساسية لجهاز كروماتوجرافيا الغاز

الغاز الحامل (الطور المتحرك) Carrier Gas :

الغرض من الغاز الحامل هو نقل المواد خلال العمود دون أن يكون له أثر مباشر على الفصل.

ويجب أن يكون الغاز الحامل :

- عالي النقاوة وخالى من الأوكسجين.
- غير نشط كيميائياً.
- غير سام وغير قابل للاشتعال.

أكثر الغازات استخداماً النيتروجين والهيليوم والهيدروجين، ويعتمد اختيار الغاز الناقل على طبيعة المادة المراد فصلها وطبيعة المقدر المستخدم فمثلاً يفضل استخدام الهيدروجين والهيليوم مع مقدر التوصيل الحراري بسبب توصيلهما الحراري العالي.

تتم السيطرة على سرعة سريان الغاز الناقل بواسطة صمام خاص وتقاس سرعة السريان بواسطة مقياس السريان بفقاعة الصابون.

محطة حقن العينة Sample Injection Port :

الغرض الأساسي من محطة الحقن هو إدخال العينة إلى مسار الطور المتحرك. وقد تكون العينة صلبة أو سائلة أو غازية.

عموماً العينات الصلبة والسائلة (إن لم تكن متطايره) يتم تحويلها إلى محلول باستخدام مذيب متطاير ويحقن بواسطة محقنة مايكروليتريه تنتهي بإبرة مدببة خلال سدادة رقيقة من المطاط تلتئم تلقائياً عند سحب المحقنة (يجب تغيير هذه القطعة المطاطية من وقت الى آخر).

العينات الغازية تحقن بواسطة محقنة ولأنها ليست دقيقة يستخدم غالباً صمام خاص للغازات بدلاً من المحقنة .

الحقن خلال الأعمدة المعبأة Packed Column Injection

تحقن كميات تتراوح بين ٠,١ الى ١٠ مايكروليتر للعينة المخففة خلال السدادة المطاطية بطريقتين:

في الحالة الأولى يتم الحقن في منطقة فارغة فوق رأس العمود الساخن حرارياً لضمان تحول المادة الى حالة بخارية. أما في الحالة الثانية فيتم حقن العينة داخل سطح الطور الساكن مباشرة وتكون درجة حرارة هذه المنطقة مساوية لدرجة حرارة العمود (أقل درجةً من الحالة الأولى) وبهذا نضمن عدم تحلل المادة باستخدام درجة الحرارة العالية، وتعتبر الحالة الثانية هي المفضلة.

الحقن خلال عمود شعري Capillary Column Injection

بالرغم من أن الأعمدة الشعرية طويلة جداً إلا أن مساحة الطور الساكن فيها أقل لذا يجب حقن كمية قليلة جداً من العينة (٠,١ – ٢ مايكروليتر) حتى لا يتشبع العمود.

وهناك أربعة تقنيات مختلفة للحقن وهي الحقن المجزأ split والحقن غير المجزأ split less والتبخير الحرارى المبرمج والحقن على العمود مباشرةً.

فمثلاً في حالة الحقن المجزأ Split Injection :

يتم إدخال العينة (٠,١ – ٢ مايكروليتر) خلال قطعة مطاطية septum إلى منطقة التبخير ، وهذا الجزء يكون مبطناً بالزجاج أو الكوارتز لحماية العينة من التفاعل مع سطح المعدن الساخن وبها قطعة من الصوف الزجاجي لضمان تحول المادة كلياً إلى حالة متطايرة. بمجرد تحول العينة إلى حالة متطايرة تتم اختلاطها مع الطور المتحرك. تخرج معظم العينة من خلال فتحة المجزأ للخارج بينما تدخل ٠,١ – ١٠ ٪ من العينة إلى العمود الشعري مع الطور المتحرك.

العمود The Column :

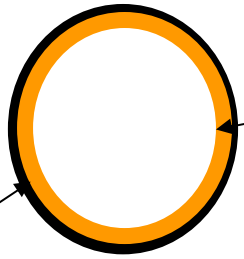
يصنع عمود الفصل عادةً من حديد غير قابل للصدأ أو من الزجاج، ويتم حفظ العمود في فرن ثيرموستاتي لأن الفصل يتم في درجات حرارة عالية. ويوجد نوعان من الأعمدة :

- **الأعمدة المعبأة** Packed Columns

يتراوح طول هذه الأعمدة ما بين ١ – ٣ متر وبقطر داخلي من ٢ – ٣ ملم. وتتم التعبئة بالطور الساكن الصلب أو بطور ساكن سائل مطلي على حبيبات من الزجاج.

- **الأعمدة الشعرية** Capillary Columns

يتم في هذا النوع طلاء الجدار الداخلي بواسطة الطور الساكن السائل كما فى الشكل رقم(٢١).



الشكل رقم (٢١) يوضح مقطع من عمود شعرى

ولا يمكن تعبئة هذه الأعمدة لأن القطر الداخلي لها في حدود 0.1-0.6 ملم وبطول من 15-60 متر. علماً بأن سمك الطبقة المطلية على الجدار في حدود 0.25-5 مايكرومتر.

تعبئة العمود بالطور الساكن :

- **أعمدة الامتزاز – طور ساكن صلب:**

تستخدم في هذا النوع العديد من مواد التعبئة منها:

- ألومينا - كربون - سليكا - مناخل جزيئية.

إذ تعمل الأعمدة التي تحتوي على هذه المواد بكفاءة عالية في درجة حرارة الغرفة.

- **أعمدة التجزؤ طور ساكن سائل:**

يثبت الطور الساكن السائل (طلاء) على حبيبات من الزجاج أو الجرافيت (تسمى بالدعامة الصلبة) على هيئة طبقة رقيقة، ويشترط قي الدعامة الصلبة أن تكون: - خاملة كيميائياً و ثابتة حرارياً.

أما السائل (الطور ساكن) المستخدم كطبقة رقيقة يجب أن يكون: غير متطاير وثابت حرارياً عند درجة الحرارة المستخدمة في الفصل.

هذه السوائل قد تكون :

i) سوائل قطبية Polar Liquids:

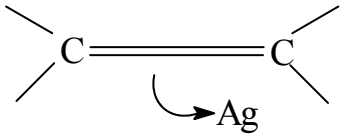
هنالك العديد من السوائل القطبية التي يمكن استخدامها، منها مبلمرات إيثيلين جليكول (ثابتة حرارياً من 60-250°C) وسكسنات ثنائي إيثيلين جليكول (ثابتة حتى 200 °C) ومن السوائل القطبية أيضاً عديدات الاسترات والأمينات وهذه تستبقي المواد القطبية عن طريق عدة قوى مثل الرابطة الهيدروجينية.

ii) سوائل غير قطبية Non-polar Liquids:

من أهم أنواع هذه الفئة مبلمرات السليكون (ثابتة حرارياً حتى درجة حرارة ٣٠٠ °C) ويعتمد الفصل هنا غالباً على اختلاف درجات غليان المادة.

iii) سوائل خاصة Special Liquids:

مثال لهذا النوع استخدام نترات الفضة / إيثيلين جلايكول كطور ساكن سائل. استبقاء وفصل المواد عن بعضها يعتمد على مدى ثبات المركب المعقد التي تكونها تلك المواد مع الفضة. فمثلا لفصل خليط من البرافينات و الأوليفينات نجد أن الأوليفينات تتأخر في العمود نظراً لتكون الرابطة التناسقية التالية:



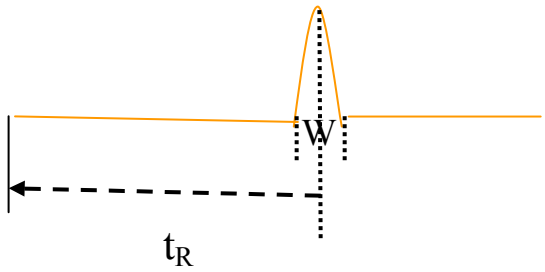
أداء العمود Column Performance :

يحدث فصل المواد داخل العمود نتيجة قوى التفاعل بين المادة المراد فصلها (المذاب) والطور الساكن السائل (المذيب). وبالرغم من أن المادة المراد فصلها تجزئ نفسها بين الطور المتحرك الغاز والطور الساكن السائل إلا أن قوى التفاعل تحدث فقط لحظة امتصاص المادة المراد فصلها في الطور الساكن السائل. ويجب ملاحظة أن كل مكونات الخليط تتحرك بسرعة واحدة داخل الطور المتحرك الغاز بالرغم من اختلاف زمن الاستبقاء داخل العمود.وهنالك عاملان يؤثران على أداء العمود وهما :

i) كفاءة العمود :

نجد أن هذا مفهوم ميكانيكي بحت ويتعلق بانتشار المادة المراد فصلها أسفل العمود كدالة للمادة المعبأة داخل العمود (الطور الساكن).

ويمكن التعبير عن الكفاءة بالرجوع إلى ما يعرف بعدد الطبقات النظرية number of theoretical plates (n) ويمكن تعيينه من الكروماتوجرام كما فى الشكل رقم (٢٢).



شكل رقم (٢٢) يوضح كيفية تعيين عدد الطبقات النظرية

$$n = 16\left(\frac{t_R}{w}\right)^2$$

ونلاحظ من المعادلة كلما زادت قيمة n كلما ضاقت الأسنان w بالنسبة لزمن استبقاء t_R معين. وبالرغم من أن عدد الطبقات النظرية n يعد مقياساً لكفاءة العمود إلا أنه لأغراض المقارنة يتم استخدام ما يعرف بالارتفاع المكافئ للطبقة نظرياً H

$$H = \frac{L}{n} = \frac{L}{16}\left(\frac{w}{t_R}\right)^2$$

حيث إن L : طول العمود.

ونلاحظ من المعادلة أعلاه أنه كلما قل ارتفاع الطبقة النظرية H كانت درجة الفصل أفضل.

وهنالك عدة عوامل تؤثر على قيمة H منها معدل السريان وهذا يمكن إيضاحه بمعادلة فان ديمتر Van Deemter Equation:

$$H = 2\lambda dp + \frac{2\nu D_G}{\bar{u}} + \cdot \frac{8}{\Pi^2} \frac{k}{(1+\acute{K})^2} \cdot \frac{d\, f^2\, \bar{u}}{D_L}$$

حيث إن :

H: الارتفاع المكافئ لطبقة نظرية واحدة. λ و ν : ثوابت.

dp: متوسط قطر الحبيبة.

$\bar{u}$: سرعة السريان الخطي للطور المتحرك الغاز.

D_G: معامل انتشار المادة المراد فصلها في الطور المتحرك.

D_L: معامل انتشار المادة المراد فصلها في الطور الساكن السائل.

df: متوسط سمك الطبقة الرقيقة للطور الساكن السائل على الحبيبات.

k: معامل التجزؤ.

ويمكن كتابة المعادلة بالصورة المبسطة التالية :

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\,\bar{u}$$

العامل A (مؤثرة الطرق غير المتساوية):

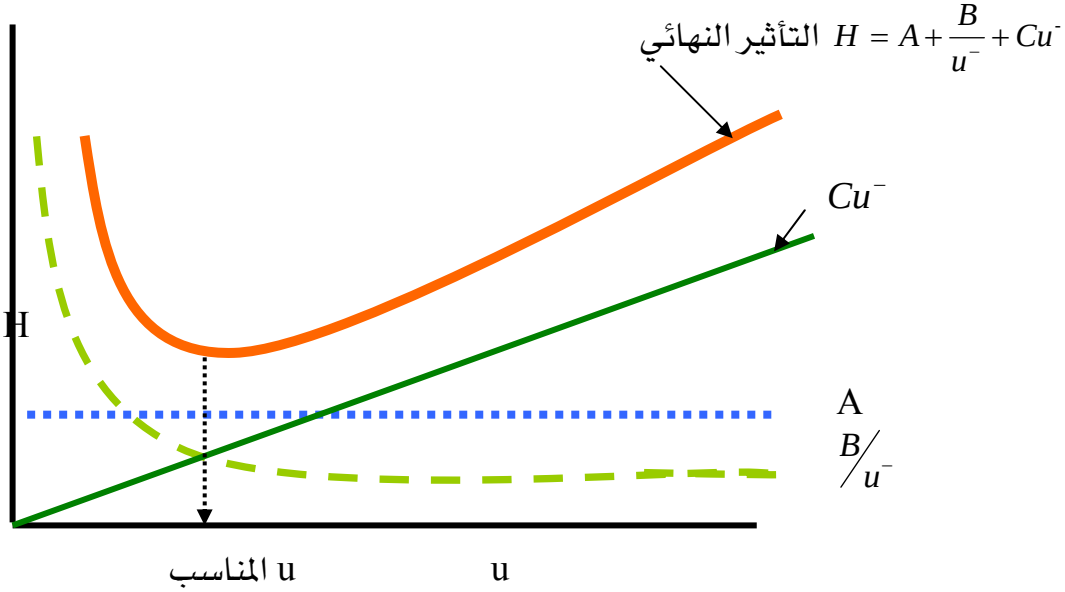
انتشار النطاق وعرض السن الناتج من أثر الطرق غير المتساوية يحدث نتيجة الطرق المختلفة التي يسلكها جزيء من نفس النوع. ويمكن تقليل تأثير A وبالتالي تصغير قيمة هذا العامل وذلك بتعبئة العمود بحبيبات صغيرة ومتماثلة في الشكل. وعليه نجد أن العامل A هو خاصية من خواص المادة المعبأة في العمود ويكون ثابتاً للعمود المعين.

العامل B (مؤثرة الانتشار الطولي):

ينتج هذا من ميل الجزيئات (المادة المراد فصلها) للانتشار من المنطقة ذات التركيز العالي الى المنطقة ذات التركيز المنخفض. هذا النوع من الانتشار والذي يمكن حدوثه في الطور لساكن والمتحرك يؤدي الى انتشار النطاق وزيادة في عرض السن. ويمكن تقليل هذه الظاهرة بتقليل درجة الحرارة وزيادة سرعة السريان للطور المتحرك.

العامل C (مؤثرة عدم الاتزان) :

انتشار النطاق والزيادة في عرض السن يمكن أن يحدث بسبب سرعة سريان الطور المتحرك مما يؤدي الى عدم الوصول الى حالة الاتزان بين الطورين المتحرك والساكن ويمكن تقليل هذه الظاهرة بتقليل سرعة سريان الطور المتحرك. ويمكن أيضاً الوصول الى حالة الاتزان بتضييق الطرق التي من خلالها يسري الطور المتحرك بحيث أن الجزيئات (المادة المراد فصلها) لا تنتشر بعيداً للوصول للطور الساكن، ولنفس السبب يجب أن يكون سمك الطور الساكن رقيقاً جداً ليتم الاتزان في وقت وجيز..وعند رسم العلاقة بين H وسرعة سريان الطور المتحرك u نحصل على الشكل رقم(٢٣).



الشكل رقم (٢٣) يوضح العلاقة بين H وسرعة سريان الطور المتحرك

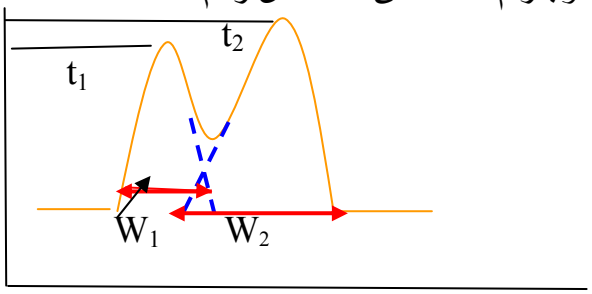
نلاحظ من الرسم أنه للوصول لأعلى كفاءة (أقل قيمة ممكنة H) الثوابت A, B, C يجب أن تكون ذات قيم صغيرة جداً. للوصول إلى ذلك يجب التحكم في سرعة سريان الطور المتحرك بحيث نتحصل على سرعة سريان مناسبة Uop. وذلك لأن u يتناسب طردياً مع العامل C وعكسياً مع العامل B بينما لا يعتمد العامل A على سرعة السريان.

ii) كفاءة المذيب (الطور الساكن) للفصل والتفريق الكامل:

يتعلق هذا بفصل قمم الأسنان لمكونات خليطٍ ما. ويعتمد على طبيعة المذيب (الطور الساكن) ودرجة الحرارة. ويمكن التعبير عن درجة الفصل R من معادلة برونيل كالآتي:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$$

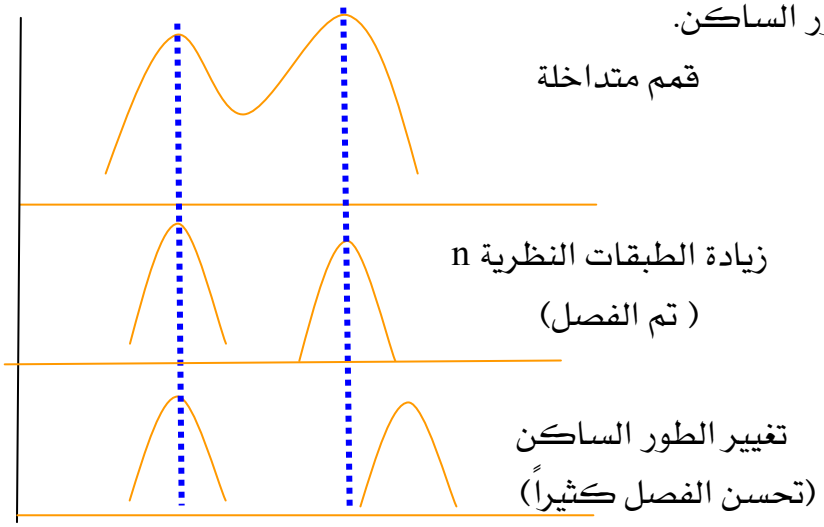
والذي يتم إيجاده من الكروماتوجرام كما فى الشكل رقم(٢٤).



شكل رقم (٢٤) يوضح كيفية إيجاد R

ويكون الفصل كاملاً عندما يكون قيمة $R \geq 1.5$

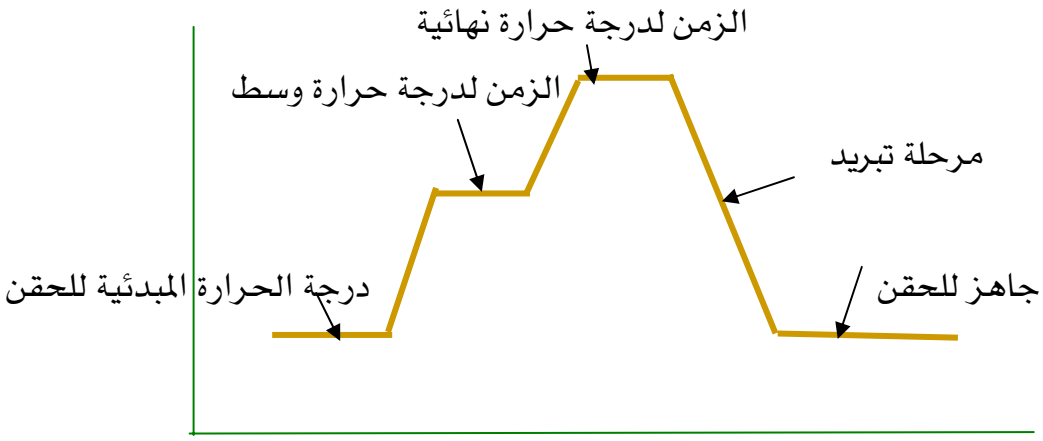
ونشاهد في الشكل رقم (٢٥) قمم متداخلة تم تحسين الفصل (i بزيادة الطبقات النظرية n. (ii بتغيير الطور الساكن.



شكل رقم(٢٥) يوضح كيفية تحسين الفصل

التحكم في درجة حرارة الجهاز:

يتم التحكم في درجة حرارة محطة الحقن والكاشف والعمود، فمثلاً درجة حرارة محطة الحقن يكون في حدود درجة غليان المادة ^{o}C 50+ تقريباً. ويتم ضبط درجة حرارة الكاشف في حدود ^{o}C 250 وذلك لمنع تكثف المواد المفصولة من العمود عند دخولها للكاشف. أما درجة حرارة العمود يمكن أن تتفاوت من 100- إلى ^{o}C 450 +. وعادةً ما يتم ضبط درجة حرارة العمود في درجة ثابتة لفصل المواد المتقاربة في درجة تطايرها. في حالة تفاوت درجة التطاير بين مكونات العينات المعقدة (يحدث تداخل في السن وتفاوت كبير في زمن الاستبقاء للمكونات المختلفة) يلجأ إلى طريقة برمجة درجة حرارة العمود بحيث تزداد بشكل خطي مع الزمن (هذه التقنية تشبه نظام التصفية التتابعية التدريجية في كروماتوجرافيا السائل ذو الكفاءة العالية والذي سوف يأتي ذكره لاحقاً) كما في الشكل رقم (٢٦).

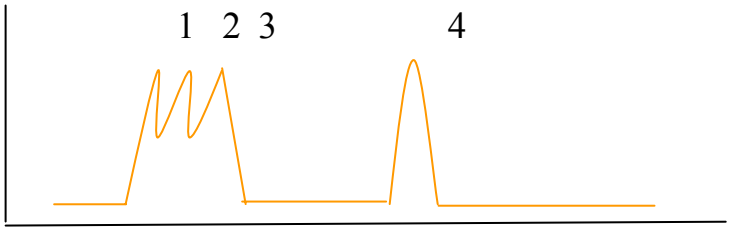


شكل رقم (٢٦) يوضح كيفية برمجة درجة حرارة العمود

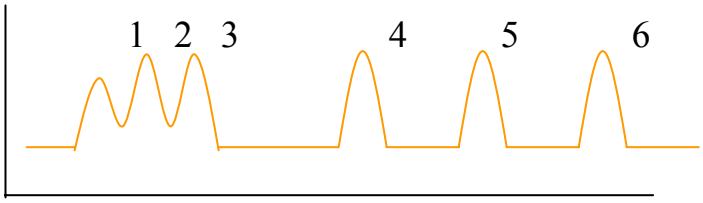
يوضح المثال التالي شكل رقم (٢٧) أهمية درجة الحرارة المبرمجة:

فمثلاً خليط يحتوي على 6 مكونات ومختلفة بدرجة كبيرة في درجة تطايرها نجد الآتي:

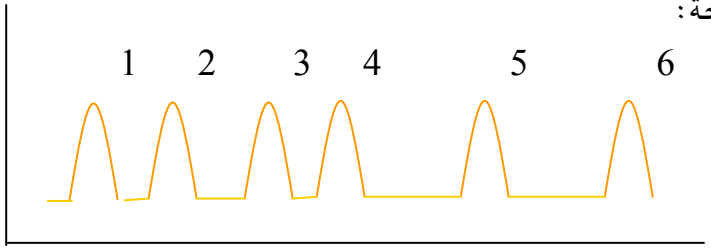
عند درجة حرارة 60 ^{o}C:



عند درجة حرارة 140 ^{o}C:



عند درجة حرارة مبرمجة:



شكل رقم (٢٧) يوضح أهمية درجة الحرارة المبرمجة

الكاشف (المقدر) Detector:

الغرض من الكاشف هو إعطاء استجابة تتناسب طردياً مع تركيز المادة المفصولة الخارجة من العمود والتي تمر من خلاله. هذه الاستجابة والتي تكون في صورة إشارة كهربائية تسجل مقابل الزمن في شكل كروماتوجرام. ويجب أن يتوفر في الكاشف المثالي:

- الانتقائية العالية .
- الاستجابة والثباتية العالية .
- غير حساس للتغيرات في ظروف التجربة مثل سريان الطور المتحرك ..... إلخ.

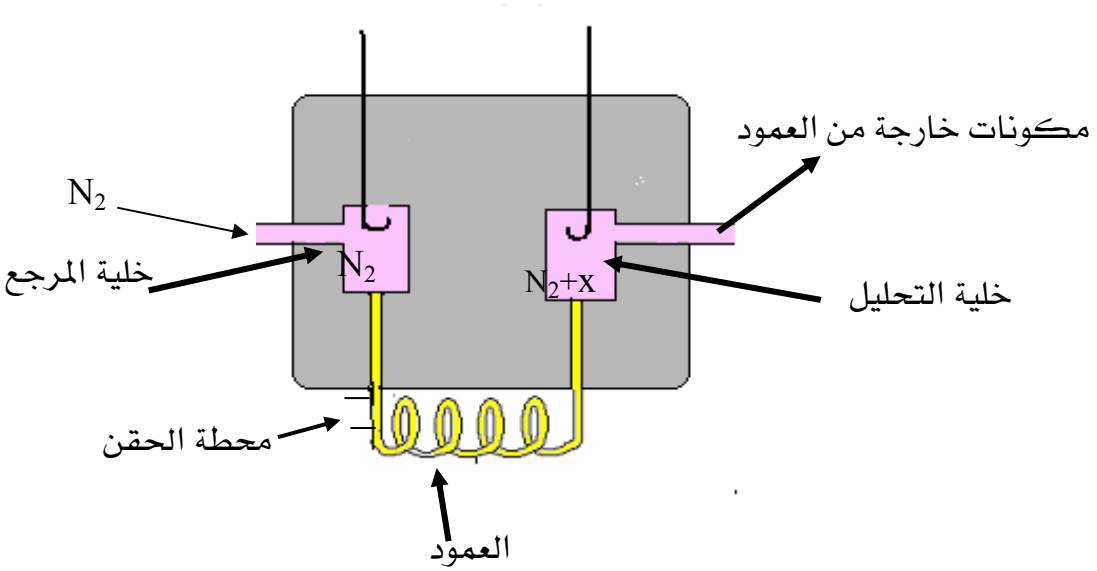
هنالك العديد من الكواشف والتي تختلف عن بعضها في التطبيق وطريقة العمل ومن هذه الكواشف التوصيل الحراري والتأين باللهب والأسر الإلكتروني ومطياف الكتلة.

i) كاشف التوصيل الحراري (كاثارومیتر) Katharometer:

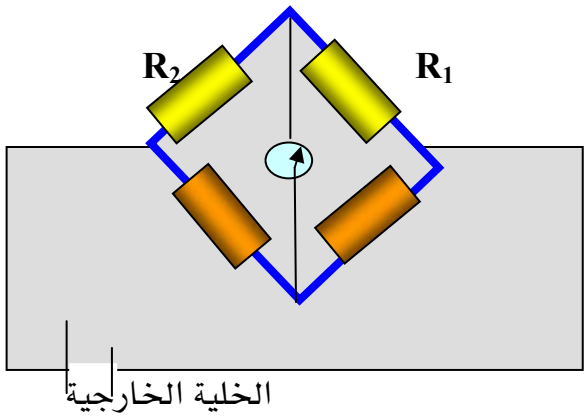
التكوين:

يتكون من ممرين يحتوي كلٍ منهما على سلك ملفوف من البلاتين يُسخنان كهربائياً ويُكونان جزءً من قنطرة ويستون. (R2, R1) .كما فى الشكلين رقم (٢٨) و (٢٩).

الى دائرة ويتستون



شكل رقم (٢٨) يوضح كاشف التوصيل الحراري



شكل رقم (٢٩) يوضح قنطرة ويتستون

المبدأ :

يعتمد فكرة هذا الكاشف على أن السلك الساخن يفقد حرارته بمعدل يعتمد على التوصيل الحراري للغاز المحيط به، ويعتمد التوصيل الحراري للغاز على تركيبه.

في هذا الكاشف يقاس مقاومة السلك والتي تتناسب طردياً مع درجة حرارته.

طريقة العمل:

تمر المادة المفصولة من خلال خلية التحليل فقط. بينما يمر الغاز الحامل خلال خليتي التحليل والمرجع. عندما يمر الغاز الحامل فقط خلال خليتي التحليل والمرجع نجد أن $Rf_1 = Rf_2$ وتكون قنطرة ويستون موزونة ولا يمر تيار في الدائرة الكهربائية.

و عند خروج المادة x من العمود والوصول إلى خلية التحليل (أي أن F_1 يحتوي على $(N_2 + x)$ و F_2 على N_2 فقط). نجد أن $Rf_1 \neq Rf_2$ ∴ الدائرة غير موزونة وينتج عن ذلك جهد يمكن قياسه وهذا يعمل على حركة القلم أعلى وأسفل ورق الرسم البياني.

من مزايا هذا الكاشف أن المادة المفصولة لا تفقد خواصها الفيزيائية أو الكيميائية.

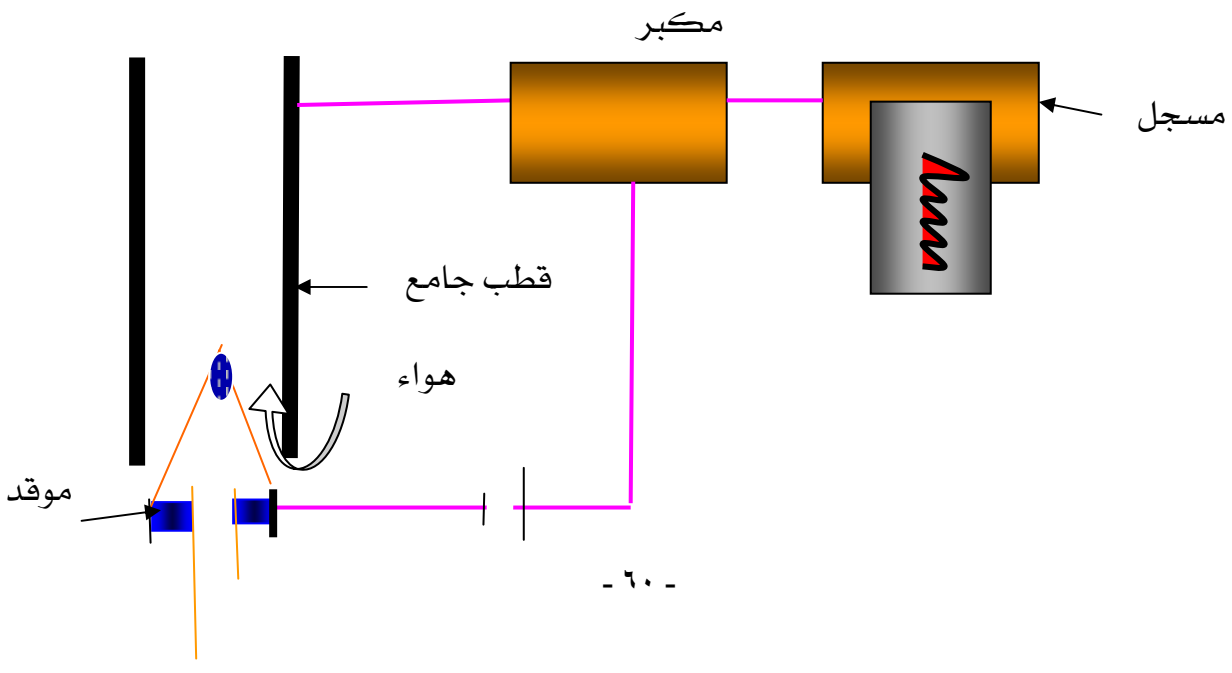
ii) كاشف التأين باللهب Flame Ionisation Detector:

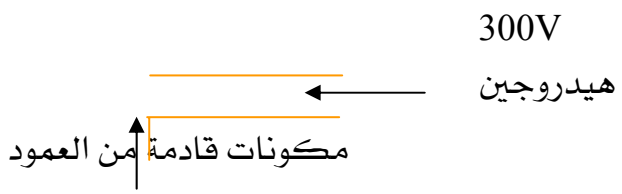
المبدأ:

يعتمد مبدأ عمل هذا الكاشف على أن المواد العضوية تنتج أيونات في لهب مكون من الهواء والهيدروجين.

التكوين:

يتكون من موقد صغير جداً ويُمد إليه غازي الهيدروجين والهواء ويحيط باللهب قطبان مختلفا الشحنة بجهد في حدود 200 فولت كما فى الشكل رقم(٣٠).





شكل رقم (٣٠) يوضح كاشف التأين باللهب

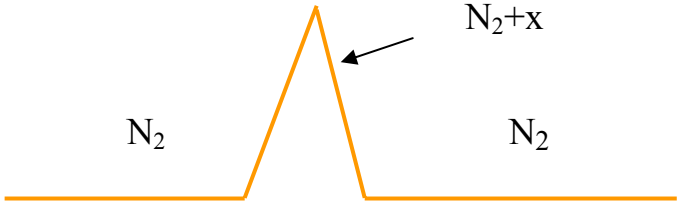
طريقة العمل:

عند مرور الطور المتحرك N_2 فقط داخل الكاشف لا يحدث تأين وبالتالي لا يمر تيار.

عند خروج المادة x مثلاً من العمود مع N_2 ودخوله للكاشف يحدث الآتي :

المادة العضوية (x) + هيدروجين + أكسجين ⇐ ثاني أكسيد الكربون + ماء + أيونات موجبة + أيونات سالبة + إلكترونات.

مجموعة الأيونات السالبة والإلكترونات تُحدث تياراً كهربائياً في الدائرة والذي يتناسب بدوره مع تركيز (كمية) المادة المفصولة (x) والذي يسجل في شكل الكروماتوجرام كما في الشكل رقم(٣١)



شكل رقم (٣١) يوضح الكروماتوجرام الناتج

من مزايا هذا الكاشف:

- الكاشف الأكثر استخداماً للمركبات العضوية.
- لا يُعطي إشارة كهربائية للماء لذلك يُمكن استخدام الماء لتخفيف المركبات العضوية قبل التحليل.

العيوب :

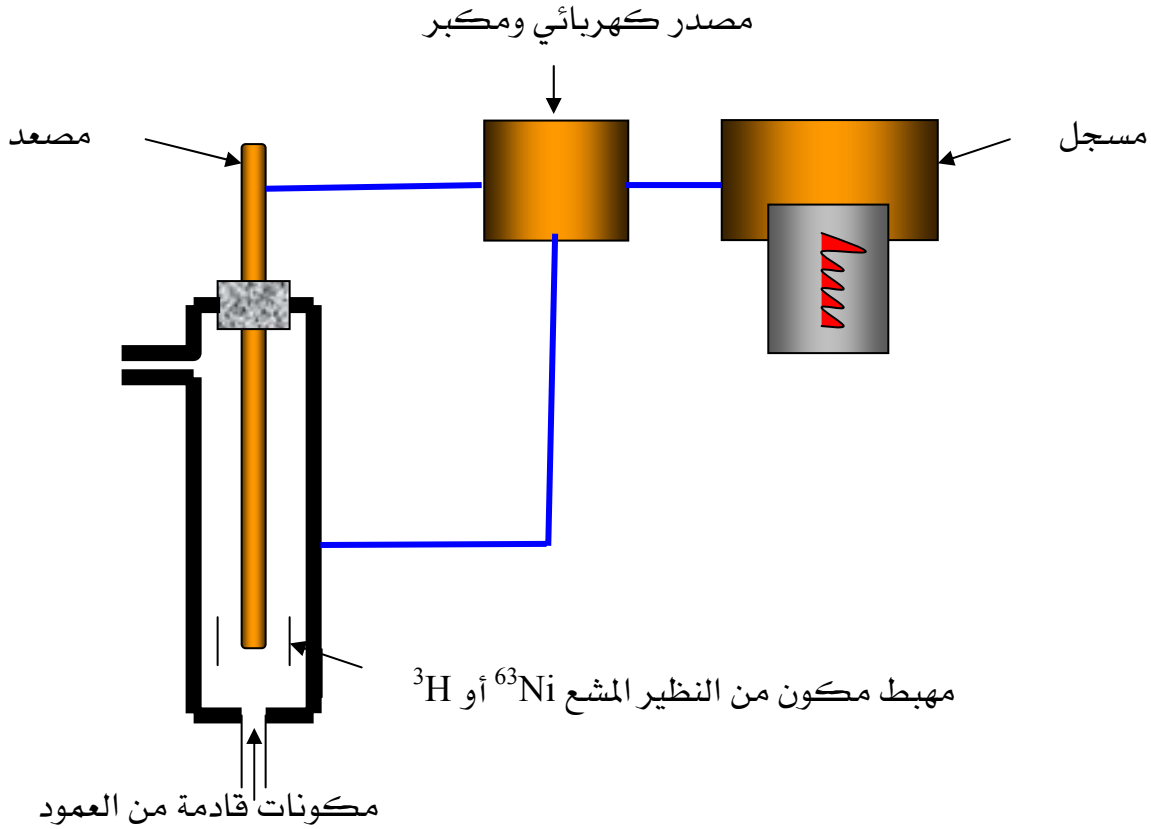
- المادة المفصولة تفقد جميع خواصها.
- استخدام ثلاثة غازات (الطور المتحرك والهواء و الهيدروجين).
- غير حساس للمركبات الغير عضوية.

iii) كاشف الأسر الإلكتروني Electron Capture Detector:

يعتبر هذا الكاشف من أكثر الكواشف حساسيةً في التحليل البيئي وبالأخص المركبات العضو هالوجينية Organo halogens.

التكوين:

يتكون المهبط من سلك فلزي به مصدر لأشعة β (إلكترونات) مثل النظير المشع ^{63}Ni أو ^{3}H كما فى الشكل رقم(٣٢).



شكل رقم (٣٢) يوضح كاشف الاسر الالكتروني

المبدأ:

هذا الكاشف والذي يكون في شكل غرفة تأين يعمل على مبدأ أن التوصيل للغازات في هذه الغرفة يتغير بشكل ملحوظ عند تلوث الغاز الذي بداخله.

طريقة العمل:

الخطوات التي تحدث داخل هذا الكاشف يمكن تلخيصه في الآتي :

- يتأين النيتروجين (طور متحرك) عند دخوله للكاشف بواسطة أشعة β ذات الطاقةالعالية :

$$N_2 + \beta \rightarrow N_2^+ + e^-$$

وبالتالي تتولد إلكترونات نتيجة الاصطدام.

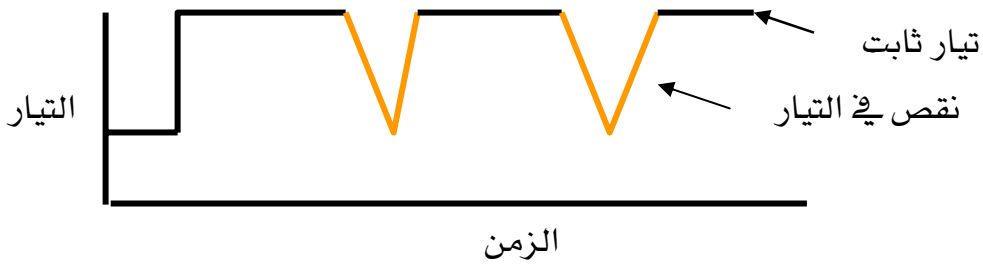
- بتطبيق فرق جهد في حدود 50-20 فولت بين المصدر (مهبط) والمصعد تنطلق هذه الإلكترونات نحو المصدر (جامع) وينتج عن هذا تياراً ثابتاً.

- عند دخول مادة لها ألفة إلكترونية (مركبات تحتوي على الكلور أو الفلور) داخل الكاشف يحدث تفاعل مع الإلكترونات حسب التفاعل أو التفاعلين التاليين وينتج عن ذلك أسر للإلكترونات

$$e^- + AB \rightleftharpoons AB^-$$

$$e^- + AB \rightleftharpoons A + B^-$$

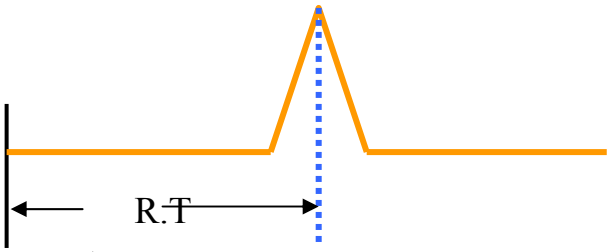
- الأيون السالب أعلاه ذو حركة أقل بحوالي 100,000مرة من الإلكترون (e^-) ولهذا ينتج نقص في التيار الكهربائي والذي يسجل في شكل كروماتوجرام كما فى الشكل رقم (٣٣).



شكل رقم(٣٣) يوضح الكروماتوجرام الناتج لكاشف الأسر الإلكتروني

التحليل النوعي :

بعد فصل مكونات خليطٍ ما يمكن التعرف على هذه المكونات وذلك بمقارنة زمن الاستبقاء R.T لكل مكون مع مواد قياسية معلومة كما فى الشكل رقم (٣٤). حيث تتم المقارنة تحت نفس ظروف التجربة.



شكل رقم (٣٤) كيفية إيجاد زمن الاستبقاء

RT كما ذُكر سابقاً يمثل الزمن المستغرق من لحظة الحقن حتى خروج قمة السن.

في الأجهزة المتقدمة يمكن توصيل جهاز كروماتوجرافيا الغاز بمطياف الكتلة (GC/MS interface).

حيث يتم الكشف للمكونات الخارجة من جهاز كروماتوجرافيا الغاز بواسطة جهاز مطياف الكتلة والحصول على معلومات كمية ونوعية لمخاليط العينات المعقدة.

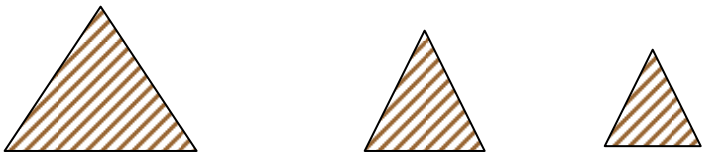
التحليل الكمي :

ذكرنا من قبل أيضاً أن مساحة السن تتناسب طردياً مع تركيز المادة.

وهناك عدة طرق لإيجاد المساحة نذكر منها :

i) عن طريق الوزن (في حالة المسجل فقط).

مثلاً يتم حقن عدة محاليل قياسية



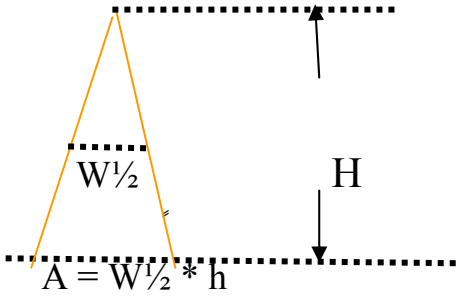
شكل رقم (٣٥) يوضح كيفية إيجاد المساحه عن طريق القص والوزن

ثم يقص كل سن كما فى الشكل رقم (٣٥) ويتم وزنه، علماً بأن وزن السن يتناسب طردياً مع التركيز.

ii) **عن طريق إيجاد مساحة السن في شكل مثلث (في حالة استخدام المسجل)**

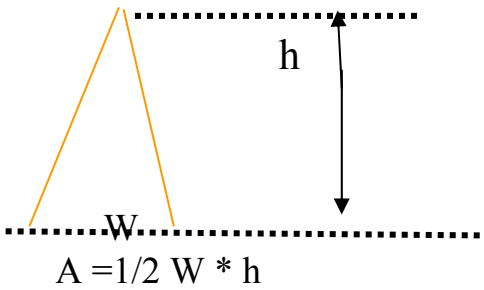
كما فى الشكل رقم(٣٦).

(أ)



المساحة = الارتفاع x العرض عند نصف الارتفاع

(ب)



المساحة = الارتفاع x نصف العرض (نصف القاعدة)

شكل رقم (٣٦، أ و ب). يوضح كيفية إيجاد المساحه عن طريق المثلث

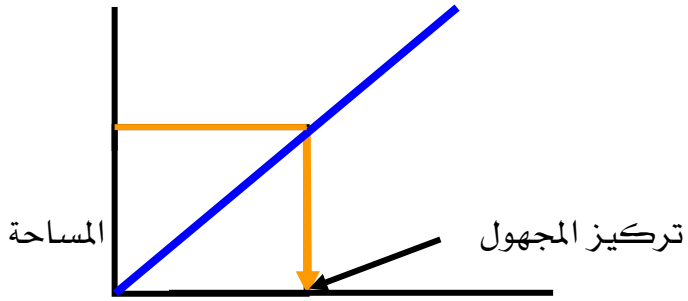
iii) استخدام الكمبيوتر أو الحاسب الآلي التكاملي:

في هذه الحالة يقوم الكمبيوتر مثلاً بطباعة المساحة لحظة رسم الكروماتوجرام (السن) ∴ لا حاجة للرجوع الى الخطوة (i) و (ii).

بعد إيجاد المساحة يمكن تعيين تركيز المجهول بإحدى الطرق التالية:

١. طريقة منحنى التدريج القياسي :

في هذه الطريقة بعد إيجاد مساحة 5 محاليل قياسية وكذلك مساحة المجهول يتم إيجاد التركيز من المنحنى كما فى الشكل رقم(٣٧).



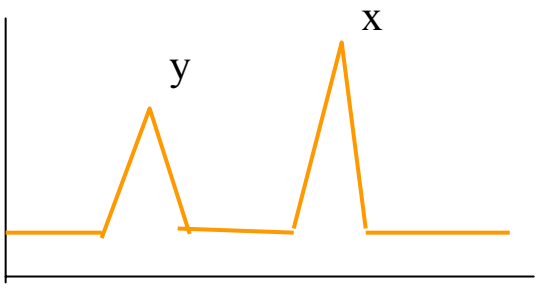
تركيز المحاليل القياسية

شكل رقم (٣٧) يوضح العلاقه بين المساحه والتركيز

٢. الإضافة الداخلية Internal addition:

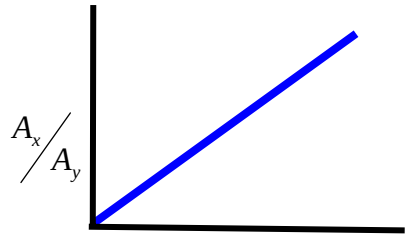
يمكن إجراء طريقة الإضافه الداخلية باستخدام عدة محاليل قياسية للمادة x مثلاً والمجهول ويضاف إلى كل محلول (القياسيه والمجهول) أحجام ثابتة وبتركيز معين من الماده y مثلاً.

ثم يتم حقن المحاليل ويتم الحصول على الكروماتوجرام الناتج كما فى الشكل رقم(٣٨) لكل محلول.



شكل رقم (٣٨) يوضح الكروماتوجرام الناتج لكل محلول

ثم يتم رسم العلاقة بين نسبة مساحة المادة x إلى مساحة المادة y (A_x/A_y) مقابل تركيز المادة x ومن ثم يتم إيجاد تركيز المجهول من المنحنى كما فى الشكل رقم(٣٩).



شكل رقم (٣٩) يوضح المنحنى الناتج من طريقة الإضافه الداخلية

تطبيقات كروماتوجرافيا الغاز:

- كروماتوجرافيا الغاز يمكن استخدامه لفصل المواد المتطايرة في درجة حرارة العمود.
- وبما أن درجة حرارة العمود تصل إلى حوالي 200 ^{o}C لذا نجد أن الكثير من المواد العضوية وغير العضوية يمكن فصلها بهذه التقنية.
- في حالة المواد غير المتطايرة يمكن تحويلها إلى مشتقات متطايرة.

وفيما يلي سوف نستعرض بعض التطبيقات المهمة في هذا المجال :

- تفصل الببيتيدات بواسطة طور ساكن سائل غير قطبي في عمود شعري ذات درجة حرارة مبرمجة، بعد تحويلها إلى مشتقات أستيريه.
- تفصل الاستيروئيدات باستخدام طور ساكن معبأ ذا درجة حرارة مبرمجة من 140-250^{o}C ويفضل استخدام كاشف التوصيل الحراري.
- المبيدات: يجب استخلاص المبيد من العينة وتنظيفه من المواد الدهنية والصبغات ثم فصله بأعمدة معبأة ويفضل استخدام كاشف الأسر الإلكتروني.

الفصل الرابع : كروماتوجرافيا السائل ذو الكفاءة العالية

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

مقدمة :

كان من أهم أحداث تقنيات الكروماتوجرافيا في العام 1966م تطور كروماتوجرافيا السائل إلى ما يعرف الآن بكروماتوجرافيا السائل ذو الكفاءة العالية. حيث كانت تستغرق عمليات الفصل والجمع والتحليل (راجع تجربة فصل البرمنجنات عن الدايكرومات) بواسطة كروماتوجرافيا السائل التقليدي عدة ساعات. لذا فكر الباحثون في تطويره وتوصلوا إلى الطريقة التي تسمى الكروماتوجرافيا السائلية ذوالضغط العالي high pressure أو الكفاءة العالية high performance. حيث تم التطوير بإدخال نظام جديد للحقن (الحقن بواسطة الصمام) وإدخال كواشف حديثة modern detectors للكشف عن المواد لحظة خروجها من العمود وعليه يتم الفصل والكشف في دقائق معدودة.

في هذا النوع يستخدم عمود من الحديد أو الزجاج المقاوم للضغط والذي يعبأ بحبيبات صغيرة تتراوح قطرها من5 إلى 50 مايكروميتر من السليكا النفاذ أو الألومينا أو الراتنجات بالنسبة للطريقة الامتزازية (طور ساكن صلب)، أو تكون هذه الحبيبات مغطاة (مطلية أو مرتبطة كيميائياً) بطبقة رقيقة من سائل بالنسبة للطريقة التجزيئية.

المبدأ :

تحقن مكونات العينة ثم يتم فصلها عن بعضها بناءً على اختلاف اتزان التوزع لكل مكون بين الطور الساكن السائل والطور المتحرك السائل. التركيز النسبي للمكون في الطور الساكن Cs إلى الطور المتحرك Cm يُعبر عنه بمعامل التجزؤ K

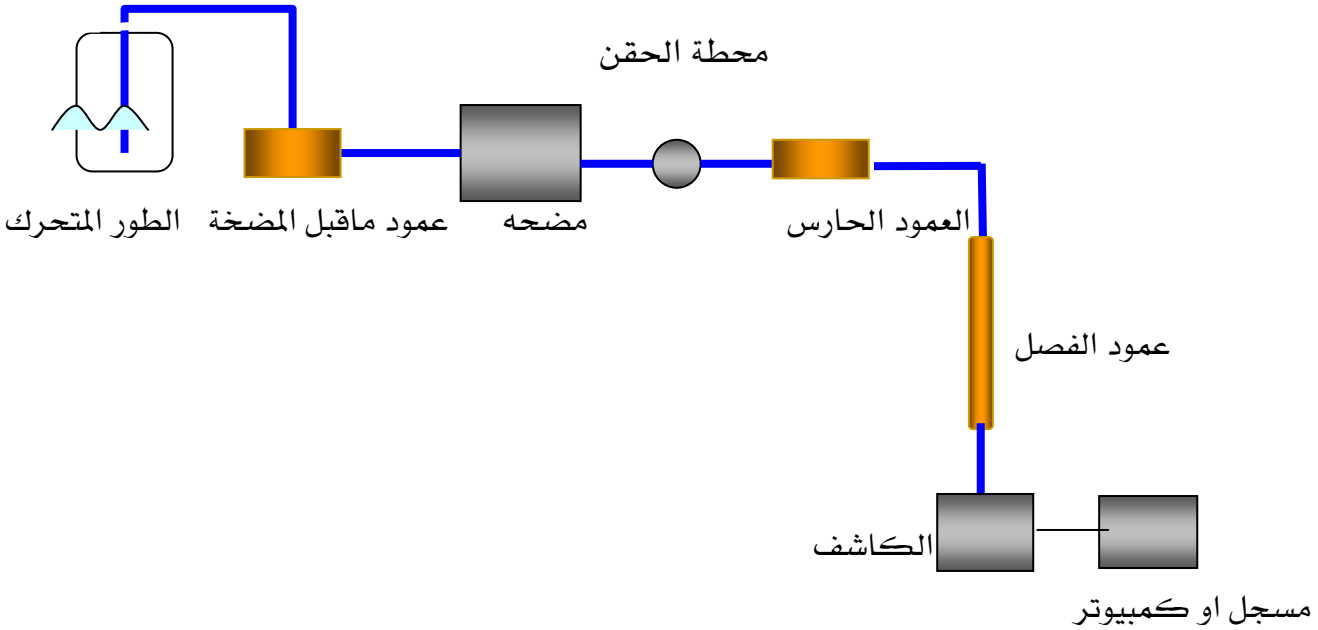
$$K = \frac{Cs}{Cm}$$

المعادلة أعلاه توضح أن حركة المكون تتناسب عكسياً مع معامل التجزؤ. أي أن المكون ذو معامل التجزؤ الأعلى يتحرك ببطء والعكس صحيح. ولا يمكن للفصل أن يتم إلا بوجود اختلاف ملحوظ في معامل التجزؤ لمكونات الخليط ويمكن الوصول إلى هذا بتغيير ظروف التجربة مثل تغيير تركيب الطور المتحرك وتغيير الطور الساكن ودرجة الحرارة.

مكونات الجهاز :

يتكون الجهاز كما في الشكل رقم (٤٠) من الأجزاء الرئيسية التالية :

- مستودع الطور المتحرك - المضخة - محطة الحقن - العمود - الكاشف - وسيلة لتسجيل الكروماتوجرام (مسجل أو كمبيوتر).



شكل رقم (٤٠) يوضح مكونات جهاز كروماتوجرافيا السائل

وفيما يلي نعطي فكرة مختصرة عن المكونات الرئيسية :

١. المضخات Pumps :

هنالك متطلبات رئيسية للمضخات نذكر منها :

i) خالية من الذبذبة. ii) سريان ثابت(iii معدل سريان من 0.1 إلى 10 مل / دقيقة.

iv) مقاومة للتآكل للمذيبات المختلفة.

النظام الحديث المستخدم في الأجهزة الحديثة ذات التكلفة العالية هو استعمال مضخه ذات رأس ترددي (مكبس للأمام وآخر للخلف) بحيث أن أحد المكبسين يُلغي ذبذبة الآخر وبالتالى يكون سريان الطور المتحرك خالياً من الذبذبة.

ويجب غسل المضخة دائماً قبل وبعد التجربة بالميثانول وذلك لمنع حدوث ظاهرة التآكل.

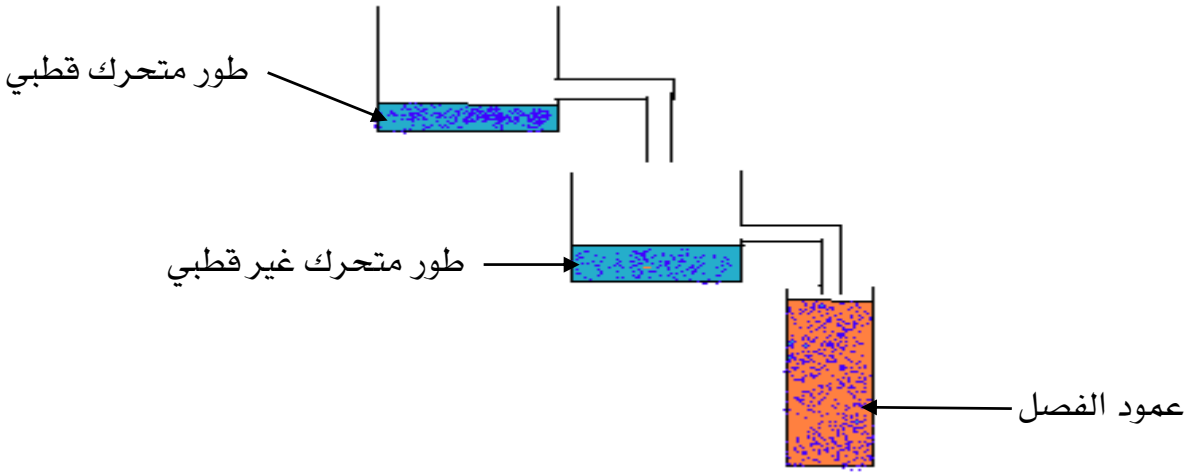
٢. نظام الطور المتحرك:

في معظم التحاليل طور واحد يكفي لإزاحة كل مكونات الخليط للفصل والتفريق الكامل separation and resolution ويسمى النظام في هذه الحالة الفصل بطور متحرك واحد isocratic

elution. ولكن عندما يكون هناك اختلافاً كبيراً في زمن الاستبقاء R.T يفضل استخدام طورين متحركين يغير أحدهما قطبية الآخر أثناء عمل الكروماتوجرام ويسمى النظام في هذه الحالة بالتصفية التتابعية التدريجية gradient elution.

التصفية التتابعية التدريجية gradient elution :

في هذا النظام يتغير نسب الطورين المتحركين باستمرار خلال عمل الكروماتوجرام أو في جزء منه كما فى الشكل رقم(٤١)، وفي بعض الأجهزة يتم هذا بواسطة برمجة مسبقة بواسطة الكمبيوتر.

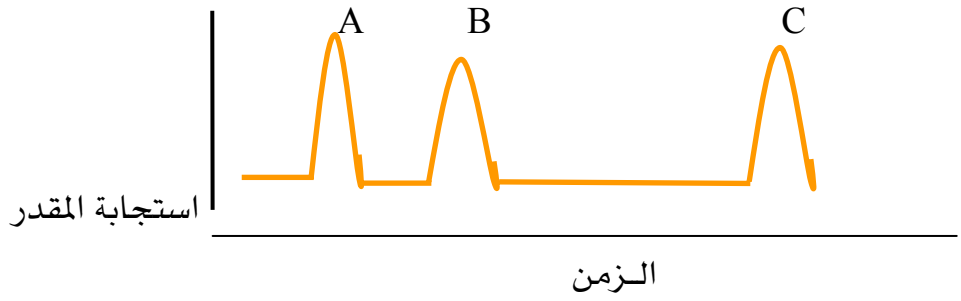


شكل رقم(٤١) يوضح نظام التصفية التتابعية التدريجية

- نفترض أن خليطاً ما يحتوي على المكونات التالية :

A	B C	D
غير قطبي	وسط في القطبية	قطبي

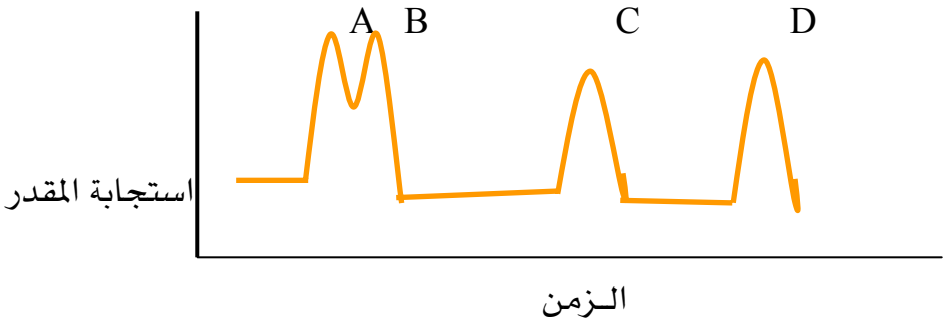
i) عند استخدام طور متحرك غير قطبي (هكسان مثلاً) نجد الآتي كما فىالشكل رقم (٤٢).



شكل رقم (٤٢) يوضح الفصل باستخدام طور متحرك غير قطبى

نلاحظ أن المكون D ربما لا يتم فصله أو يتأخر كثيراً نتيجة استخدام طور متحرك غير قطبي

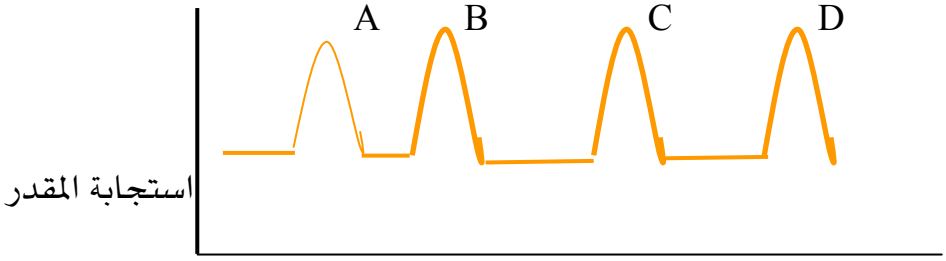
ii) عند استخدام طور متحرك قطبي (ثنائي كلوريد الميثان مثلاً) كما فى الشكل رقم(٤٣) نجد الآتي:



شكل رقم (٤٣) يوضح الفصل باستخدام طور متحرك قطبى

نلاحظ أن A, B يفصلان بسرعة بحيث لا يكون هنالك وقت للفصل والتفريق الكامل.

iii) حلاً لما ذكر أعلاه يُستخدم نظام التصفية التتابعية التدريجية وذلك بأن يتم الفصل بالهكسان (غير قطبي) أولاً ثم يزداد قطبيته تدريجياً بواسطة كلوريد الميثان (قطبي) ويكون الكروماتوجرام الناتج كما فى الشكل رقم (٤٤).



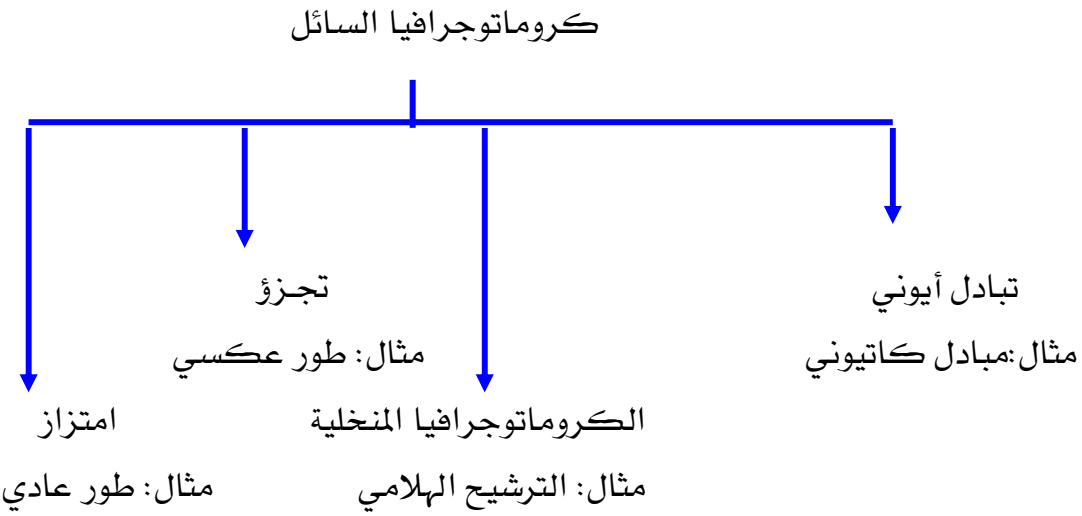
شكل رقم (٤٤)يوضح الفصل بنظام التصفية التتابعية التدريجية

٣. نظام الحقن Injection System:

نظام الحقن له دور كبير في كفاءة عمل كروماتوجرافيا السائل ذو الكفاءة العالية. النظام الحديث هو نظام الحقن بواسطة الصمام valve system في هذا النوع تملأ حلقة موجودة فوق العمود مباشرةً بواسطة محقنة غير مدببة (قارن بكروماتوجرافيا الغاز) ويكون الصمام في الوضع حمّل Load ، ثم يحول الصمام للوضع أحقن inject وبالتالي تسحب المادة المراد فصلها إلى داخل العمود بواسطة الطور المتحرك. ويجب ملاحظة أن الحقن غير مباشر.

٤. العمود والمواد المعبأة بداخلة (الطور الساكن) :

كروماتوجرافيا السائل يتضمن أنظمة مختلفة للفصل اعتماداً على حسب نوع الطور الساكن المعبأ في العمود.



i) أعمدة امتزاز (طور ساكن صلب): Adsorption Columns

في هذا النوع يعبأ العمود بحبيبات صلبة دائرية صغيرة من السليكا أو الألومينا. ولتنشيط السليكا يتم ذلك بتسخينه مع محلول هيدروكسيد الأمونيوم ثم يغسل بالحامض وبالتالي نحصل على سطح نشط من السليكا ذات كفاءة عالية. ويعتبر السليكا طور ساكن قطبي وتزداد خاصية الامتزاز تجاه المواد القطبية بواسطة مجموعة الهيدروكسيل SiOH.

ii) أعمدة تجزؤ (طور ساكن سائل): Partition Columns

في أعمدة التجزؤ نجد أن المادة المراد فصلها تجزئ نفسها بين طورين سائلين عديمي الامتزاج. ويكون ثابت التركيز للمادة بين الطورين ثابتاً كما يلي:

$$K = C_s / C_m$$

لذا نجد أن معدل التحرك للمادة خلال العمود يعتمد على معامل التجزؤ K. و لإتمام الفصل بين المواد يجب أن يكون هناك اختلاف ملحوظ في معامل التجزؤ. ويمكن الوصول لذلك بتغيير الطور المتحرك أو الطور الساكن أو درجة الحرارة.

وبما أن الطور الساكن السائل يمكن أن يزاح (يغسل) مع مرور الزمن بواسطة الطور المتحرك السائل يستخدم حالياً ما يُعرف بالطور الساكن السائل المرتبط كيميائياً مع الدعامة الصلبة chemicaly bonded stationary phases ولهذا الارتباط الكيميائي ميزة أخرى وهي إمكانية تغيير الطور الساكن القطبي إلى غير قطبي.

الأمثلة التالية توضح ربط الطور الساكن السائل المرتبط كيميائياً على الدعامة الصلبة وتحويل الطور الساكن من قطبي إلى غير قطبي.

مثال –١

$$Si-OH+C_nH_{2n+1}OH \rightarrow Si-OC_nH_{2n+1}+H_2O$$

مثال –٢

$$Si-OH+(CH_3)_2-Si(Cl)-C_{10}H_{21} \rightarrow Si\text{-}O\text{-}Si(CH_3)_2-C_{10}H_{21}+HCl$$

iii) **الأعمدة المنخلية** Size Exclusion Columns

تعبأ الأعمدة في هذه الحالة بمادة هلامية مسامية غير أيونية porous and non-ionic . ويعتمد الفصل بهذه التقنية على حجم المسام وحجم الجزيئات للمادة المراد فصلها. وعندما يحتوي الخليط على مكونات ذات أحجام جزيئيه مختلفة ، نجد أن الجزيئات الأكبر حجماً تمر خارج مسام المادة الهلامية دون إعاقة أما الجزيئات الأصغر حجماً تمر من خلال مسام الهلام فيحدث لها إعاقة وعلى هذا الأساس يتم الفصل. وتستخدم الأعمدة المنخلية في تحليل المواد البلاستيكية.

iv) **أعمدة التبادل الأيوني** Ion Exchange Columns:

تعبأ الأعمدة في هذه الحالة بمواد صلبة غير ذائبة تحتوي على مجاميع وظيفية موجبة $R\text{-}SO_3H^+$ أو مجاميع وظيفية سالبة $R\text{-}NH_2\text{-}(CH_3)_3\text{-}Cl^-$ (راجع كيفية تحضير الراتنجات في الوحدة الثانية) والتي تسمى بالمبادلات الراتنجية الكاتيونية أو الآنيونية ، لذا تستخدم لفصل المواد الأيونية. ويتم الفصل هنا نتيجةً لتوزع المادة بين الراتنج (طور ساكن) والطور المتحرك السائل اعتماداً على مدى ألفة أيونات المادة المراد فصلها تجاه المبادل.

ما ذُكر أعلاه يختص بأعمدة الفصل ولكن هناك أعمدة مساعدة تستخدم في كروماتوجرافيا السائل نذكر منها الأعمدة الحارسة guard columns حيث تُثبت قبل عمود الفصل وتعمل على حماية عمود الفصل بواسطة ترشيح وإزالة الأجزاء الصلبة (شوائب) والتي قد تكون بالطور المتحرك.وكذلك المركبات أو الأيونات التي قد تؤثر على خط القاعدة للكروماتوجرام الناتج.

اختيار عمود الفصل :

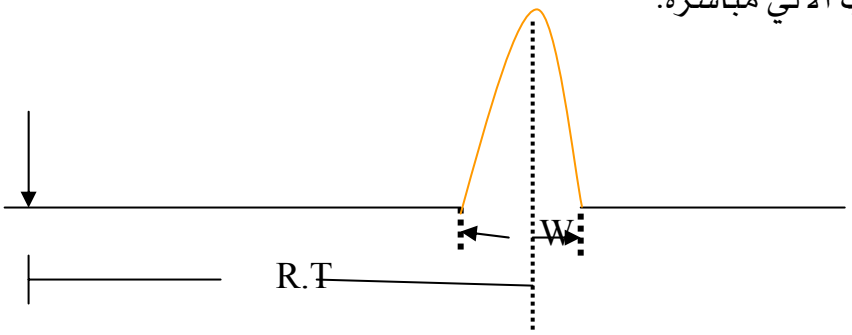
يعتمد اختيار العمود على نوع المادة المراد تحليلها وعلى خبرة المحلل الكيميائي. عموماً هنالك قاعدة عامه وهي أن الأعمدة القطبية تستخدم لفصل المواد القطبية ، بينما الأعمدة الغير قطبية تستخدم لفصل المواد الغير قطبية. أي أن الشبيه يفصل الشبيه like separates like.

كفاءة عمود الفصل :

تعتمد كفاءة التحليل الكروماتوجرافي بدرجة كبيرة على مقدرة العمود للفصل. ويعبر عن الكفاءة الكلية للعمود بعدد الطبقات النظرية number of theoretical plates والذي يعبر بدوره عن مراحل الاتزان داخل العمود. ويمكن قياس كفاءة العمود بمعرفة زمن الاستبقاء .

$$\text{زمن الاستبقاء} = \frac{\text{حجم الاستبقاء (مل) للطور المتحرك}}{\text{معدل سريان الطور المتحرك (مل / دقيقة)}}$$

ولكن عملياً يتم إيجاد زمن الاستبقاء من الكروماتوجرام الناتج من المسجل كما فى الشكل رقم(٤٥) أو من الحاسب الآلي مباشرةً.



شكل رقم(٤٥) يوضح كيفية إيجاد RT و n

لذا ومن معلومية RT وعرض السن (w) عند القاعدة نجد أن عدد الطبقات النظرية (n) يمكن إيجاده من المعادلة التالية ،

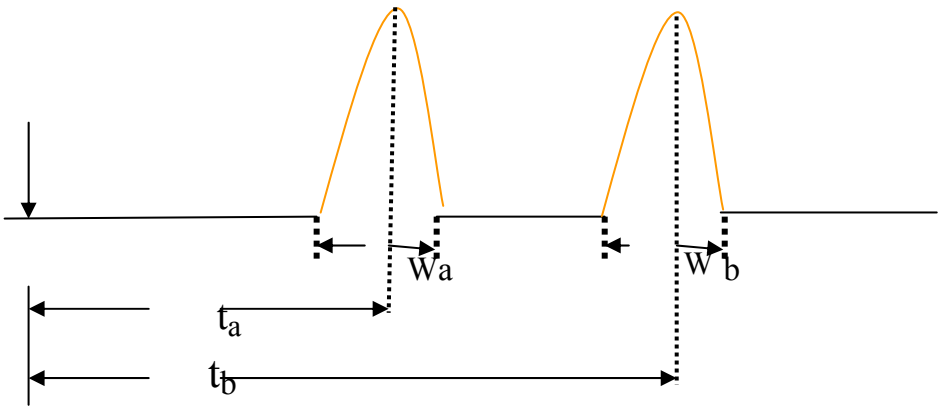
$$n = 16[\frac{(RT)^2}{w}]$$

ويمكن الاستنتاج من المعادلة أعلاه أنه كلما قل عرض السن زادت كفاءة العمود. وبما أن طول العمود يؤثر على عدد الطبقات النظرية الكلية ولغرض مقارنة كفاءة الأعمدة ببعضها يستخدم ما يعرف بالارتفاع المكافئ لطبقة نظرية h (H.E.T.P)

$$h = \frac{\text{طول العمود (L)}}{N}$$

وهناك مقياس آخر لكفاءة العمود وهو درجة الفصل بين سنين two peaks والذي يعرف بالتفريق R, resolution والذي يمكن إيجاده من الشكل رقم (٤٦) والمعادلة التالية.

$$R = \frac{2\,(t_b - t_a)}{(w_a + w_b)} = \frac{2\Delta t}{(w_a + w_b)}$$



شكل رقم (٤٦) يوضح كيفية إيجاد التفريق R

درجة الفصل وبالتالي تكون الكفاءة جيدة عندما تكون قيمة R=1.25

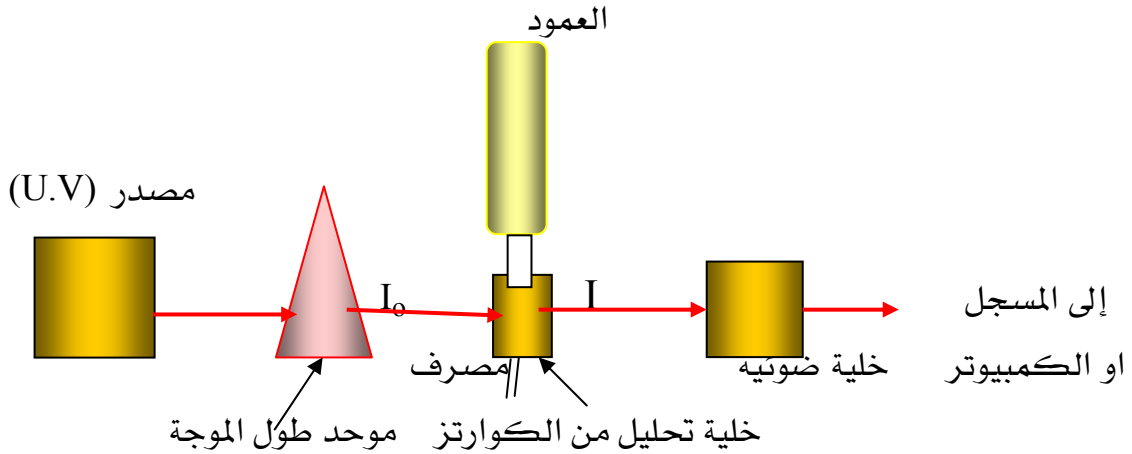
الكواشف :

هناك عدة كواشف يمكن استخدامها لكشف المواد المفصولة بجهاز كروماتوجرافيا السائل ومن هذه كاشف معامل الانكسار وكاشف التألق وكاشف مطياف الكتلة وكاشف الأشعة فوق البنفسجية وسوف نتناول كاشف الأشعة فوق البنفسجية بشيء من التفصيل.

كاشف الأشعة فوق البنفسجية :

يتكون هذا الكاشف كما فى الشكل رقم (٤٧) من :

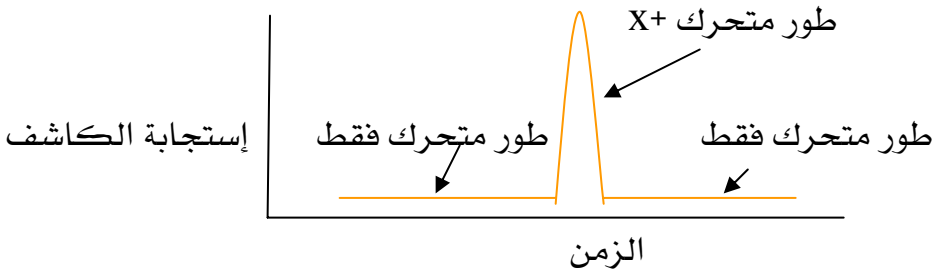
- مصدر أشعة فوق بنفسجية (طول موجة متغير في المدى 190–380 nm.
- موحد طول الموجة monochromator.
- خلية تحليل صغيرة جداً من الكوارتز.
- خلية ضوئية (لتحويل الطاقة الضوئية إلى طاقة كهربائية).



شكل (٤٧) يوضح مكونات كاشف الأشعة فوق البنفسجية

ويمكن توضيح طريقة عمل الكاشف بالخطوات التالية:

- عند مرور الطور المتحرك فقط داخل وعاء التحليل نجد أن الطاقة الكهربائية الناتجة في الخلية الضوئية تكون أعلى ما يمكن وذلك لأن الطور المتحرك لا يمتص الأشعة فوق البنفسجية أي أن كل الأشعة الساقطة تصل للخلية الضوئية.
- عند خروج المادة X مثلاً مع الطور المتحرك من العمود ودخوله لخلية الكوارتز نجد أن المادة X تمتص جزءاً من الأشعة الساقطة من المصدر، وعليه نجد أن الطاقة الكهربائية الناتجة في الخلية الضوئية أقل مما كانت عليه أولاً. إذاً الفرق بين الطاقتين يمثل الامتصاص A والذي يمكن قراءته على الكاشف. الاختلاف في الطاقة يُغذى إلى مسجل أو كمبيوتر لرسم الكروماتوجرام كما فى الشكل رقم(٤٨).



شكل رقم (٤٨) يوضح الكروماتوجرام الناتج

ملاحظات هامة :

- يجب إزاحة جميع الغازات (خاصة الأوكسجين) من الطور المتحرك حتى لا تتكون فقاعات هوائية داخل وعاء التحليل لأن ذلك يؤثر على مدى امتصاص مكونات الخليط المراد تحليله للأشعة فوق البنفسجية وتتم إزالة O_2 بواسطة غاز الهيليوم مثلاً.
- من عيوب هذا الكاشف محدودية أنواع الطور المتحرك المستخدم ، أي لا يمكن استخدام مذيبات مثل البنزين والتلوين كطور متحرك وذلك لأن هذه المذيبات تمتص الأشعة فوق البنفسجية. والمطلوب دائماً مذيبات شفافة (أي لا تمتص) للعمل مع هذا الكاشف.

أوجه الاختلاف بين كروماتوجرافيا الغاز و كروماتوجرافيا السائل ذي الكفاءة العالية :

١. الحقن غير مباشر في كروماتوجرافيا السائل (الحقن بواسطة الصمام) بينما يكون مباشراً في حالة كروماتوجرافيا الغاز.
٢. الطور المتحرك سائل في كروماتوجرافيا السائل و غاز في حالة كروماتوجرافيا الغاز.
٣. وجود مضخات في كروماتوجرافيا السائل بينما الغاز (الطور المتحرك) في كروماتوجرافيا الغاز يكون مضغوطاً في اسطوانات خاصة (لا يحتاج الى مضخات).

٤. الحقن في كروماتوجرافيا السائل دقيق جداً (لوجود الصمام) مما يزيد من كفاءته بينما في كروماتوجرافيا الغاز يحتاج الى خبرة المحلل الكيميائي.
٥. في كروماتوجرافيا السائل يتم فصل المواد غالباً في درجة حرارة الغرفة أما في كروماتوجرافيا الغاز يتم الفصل في درجات حرارة عالية وذلك بوضع العمود في فرن ثيرموستاتي.
٦. حالة المادة المفصولة أثناء الفصل يكون سائلاً في حالة كروماتوجرافيا السائل بينما يكون في حالة بخارية في كروماتوجرافيا الغاز.
٧. في حالة أن يكون هنالك اختلاف كبير في زمن الاستبقاء لمكونات خليطٍ ما يمكن استخدام نظام التصفية التتابعية التدريجية في كروماتوجرافيا السائل. في كروماتوجرافيا الغاز يتم برمجة درجة حرارة العمود لدرجات حرارة مختلفة programmed temperature .

التطبيقات:

يمكن الاستفادة من كروماتوجرافيا السائل لعزل وتنقية المواد عن طريق كروماتوجرافيا التحضيرية ، والذي يختلف تماماً عن كروماتوجرافيا التحليلية (يختص بالتحليل النوعي والكمي للمواد بعد فصلها).

التحليل النوعي يمكن الوصول اليه بمقارنة زمن الاستبقاء للمادة المراد تحليلها مع زمن الاستبقاء لعينات قياسية. كما يمكن الوصول لنوعية المادة عن طريق مكتبات بحث تزود بها ذاكرة الكمبيوتر للأجهزة الحديثة.

ويجب الاشارة الى أن إيجاد R.T للتحليل النوعي وإيجاد مساحة السن للتحليل الكمي يشابه ما تم ذكره في كروماتوجرافيا الغاز.

يعتمد نوع الأعمدة المستخدمة على طبيعة المواد التي يمكن تحليلها نوعياً وكمياً فمثلاً:

- يتم تحليل المركبات الأيونية باستخدام مبادلات أيونية كطور ساكن، حيث يمكن تقدير الفلزات بعد تحويلها في صورة متراكبات الهاليدات. كما يمكن تحليل الأحماض الأمينية.
- يتم تحليل البروتينات والأحماض النووية والمركبات الكربوهيدراتيه والأنزيمات والهرمونات باستخدام أعمدة المناخل الجزيئية كطور ساكن. كما ويمكن استخدام المناخل الجزيئية لتحليل البوليمرات.

امتحان ذاتي رقم (١)

١. اذكر اثنين من مزايا كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة على كروماتوجرافيا الورقة.
٢. اذكر اثنين من التطبيقات المهمة للكروماتوجرافيا المستوية؟
٣. على ماذا يعتمد زمن المكوث R.T للمادة في كروماتوجرافيا الغاز؟
٤. ما هي الشروط الواجب توفرها في الغاز الحامل (الطور المتحرك) في كروماتوجرافيا الغاز؟
٥. اذكر أنواع الأعمدة في كروماتوجرافيا الغاز؟
٦. اكتب عن كيفية فصل البرافينات عن الأولفينات بتقنية كروماتوجرافيا الغاز؟
٧. كيف يمكن التعبير عن الكفاءة بجهاز كروماتوجرافيا الغاز؟
٨. في أي حالة نلجأ الى طريقة برمجة حرارة العمود في كروماتوجرافيا الغاز؟
٩. اذكر الكواشف المستخدمة لجهاز كروماتوجرافيا الغاز؟
١٠. متى يكون ضرورياً استخدام طورين متحركين لفصل عينات خليط في كروماتوجرافيا السائل ذو الكفاءة العالية؟
١١. وضح كيفية تفادي غسل الطور الساكن السائل بواسطة الطور المتحرك السائل في كروماتوجرافيا السائل؟
١٢. اذكر أسماء الكواشف المستخدمة في جهاز كروماتوجرافيا السائل؟

امتحان ذاتي رقم (٢)

١. العامل الرئيس لإتمام الفصل في كروماتوجرافيا الامتزاز هو .....

٢. في كروماتوجرافيا التجزؤ معدل التحرك للمادة المراد فصلها يعتمد على

.....

٣. في كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة يكون الطور الساكن عبارة عن

.....

٤. في كروماتوجرافيا الورقة يكون الطور الساكن عبارة عن

.....

٥. يستخدم مصطلح Rf كوسيلة مهمة لِ .....

.....

٦. تستخدم كروماتوجرافيا الورقة باتجاهين عندما يكون

..... باستخدام تقنية الاتجاه الواحد.

٧. يستخدم كروماتوجرافيا الغاز لفصل .....

.....

٨. في كروماتوجرافيا الغاز تتحرك مكونات المادة عبر العمود حيث يتم الفصل بناءً على

.....

امتحان ذاتي رقم (٣)

اختر الإجابة الصحيحة فيما يلي:

١. في كروماتوجرافيا التجزؤ يكون الطور الساكن :

أ) سائل ب) صلب.

٢. يعتبر كروماتوجرافيا الورقة نوع خاص من أنواع كروماتوجرافيا :

أ) الامتزاز ب) التجزؤ.

٣. التقنية النازلة تصلح في حالة:

أ) كروماتوجرافيا الورقة ب) الطبقة الرقيقة ج) كروماتوجرافيا الورقة و الطبقة الرقيقة.

٤. يصلح استخدام كروماتوجرافيا ..... في فصل المواد الدهنية.

أ) الورق ب) الطبقة الرقيقة.

٥. يمكن استخدام H_2SO_4 ككاشف تعيين البقع في:

أ) كروماتوجرافيا الورقة ب) الطبقة الرقيقة .

٦. تعتبر كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة نوع خاص من أنواع كروماتوجرافيا :

أ) الامتزاز ب) التجزؤ.

٧. يستخدم تقنية التصفية التتابعية التدريجية في حالة:

أ) كروماتوجرافيا السائل. ب) كروماتوجرافيا الغاز.

٨. يستخدم كاشف معامل الانكسار في:

أ) كروماتوجرافيا السائل. ب) كروماتوجرافيا الغاز.

إجابة الامتحان الذاتي رقم (١)

١. (أ) سرعة الفصل والتفريق الأحسن.

(ب) يمكن استخدام حمض الكبريت ككاشف تعيين البقع في الطبقة الرقيقة ولا يمكن استخدامه مع كروماتوجرافيا الورقة.

٢. (أ) الكشف عن الشوائب.

(ب) التحليل النوعي باستخدام قيم Rf.

٣. يعتمد على مدى قابليتها للتطاير ومدى تفاعلها مع الطور الساكن.

٤. الشروط هي:

- عالي النقاوة وخالي من الأكسجين.
- غير نشط كيميائياً .
- غير سام وغير قابل للاشتعال.

٥. الأعمدة المعبأة والشعرية.

٦. نستخدم عمود معبأ بطور ساكن من مادة نترات الفضة / إيثيلين جلايكول. عند اجراء الفصل نجد أن الأوليفينات تتأخر في العمود نظراً لارتباطها مع الفضة بواسطة رابطة π. أما البرافينات فتخرج من العمود بسرعة لأنها لا تحتوي على هذه الرابطة.

٧. بالرجوع إلى ما يعرف بعدد الطبقات النظرية.

٨. في حالة وجود تفاوت كبير في زمن الاستبقاء للمكونات المختلفة.

٩. الكواشف هي التأين باللهب وكاشف التوصيل الحراري وكاشف الأسر الإلكتروني.

١٠. في حالة وجود تفاوت كبير في زمن الاستبقاء .

١١. بواسطة ربط الطور الساكن السائل كيميائياً على الدعامة الصلبة.

١٢. الكواشف هي: كاشف معامل الانكسار وكاشف التألق وكاشف مطياف الكتلة وكاشف الأشعة فوق البنفسجية.

إجابة الامتحان الذاتي رقم (٢)

١. العامل الرئيس لإتمام الفصل في كروماتوجرافيا الامتزاز هو الفرق بين قوى الامتزاز.

٢. في كروماتوجرافيا التجزؤ يعتمد معدل التحرك للمادة المراد فصلها على الذوبانية للمادة المراد فصلها في الطور الساكن السائل.

٣. في كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة يكون الطور الساكن عبارة عن طبقة رقيقة من مادة امتزاز ناعمة مطلية ومثبته على قطعة من الزجاج.

٤. في كروماتوجرافيا الورقة يكون الطور الساكن عبارة عن الماء المحيط بالسليلوز.

٥. يستخدم مصطلح Rf كوسيلة مهمة للتحليل النوعي في الكروماتوجرافيا المستوية.

٦. تستخدم كروماتوجرافيا الورقة باتجاهين عندما يكون الفصل جزئياً باستخدام تقنية الاتجاه الواحد.

٧. يستخدم كروماتوجرافيا الغاز لفصل الغازات والسوائل الغير متأينة والمواد العضوية الصلبة وكثير من المواد العضو معدنية.

٨. في كروماتوجرافيا الغاز تتحرك مكونات المادة عبر العمود حيث يتم الفصل بناءً على اختلاف معامل التوزع بين الطور المتحرك الغاز والطور الساكن السائل.

إجابة الإمتحان الذاتي رقم (٣)

١. في كروماتوجرافيا التجزؤ يكون الطور الساكن :

أ) سائل

٢. يعتبر كروماتوجرافيا الورقة نوع خاص من أنواع كروماتوجرافيا :

ب) التجزؤ.

٣. التقنية النازلة تصلح في حالة :

أ) كروماتوجرافيا الورقة.

٤. يصلح استخدام كروماتوجرافيا ..... في فصل المواد الدهنية.

ب) الطبقة الرقيقة.

٥. يمكن استخدام H_2SO_4 ككاشف تعيين البقع في:

ب) الطبقة الرقيقة .

٦. تعتبر كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة نوع خاص من أنواع كروماتوجرافيا :

أ) الامتزاز.

٧. يستخدم تقنية التصفية التتابعية التدريجية في حالة :

أ) كروماتوجرافيا السائل.

٨. يستخدم كاشف معامل الانكسار في:

ب) كروماتوجرافيا السائل.