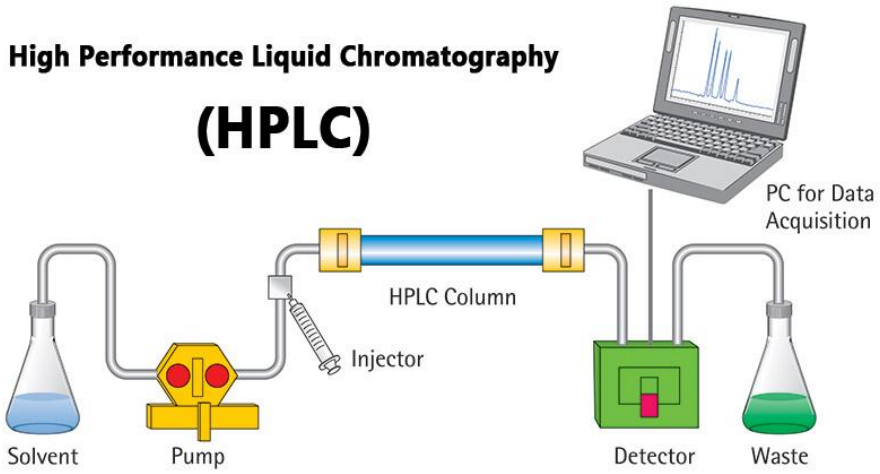
جامعة الشهيد حمة لخضر بالوادي
كلية العلوم الدقيقة
قسم الكيمياء

السنة الثانية ماستر: (علوم المادة)
اختصاص: كيمياء عضوية
مقياس: طرق الفصل

جامعة الشهيد حمّه لخضر - الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar - El-Oued

طرق الفصل الكروماتوغرافي



من إعداد الأستاذ: زيدان محمد

الفهرس

الفصل الأول الكروماتوغرافيا- مظاهر عامة 2

1-1-عموميات حول الطريقة الكروماتوغرافيا:..... 2

1-2-تصنيف التقنيات الكروماتوغرافية:..... 2

1-2-1-التصنيف حسب طبيعة الأطوار:.....2

1-2-2-التصنيف حسب الظاهرة الكروماتوغرافية:.....2

1-2-3-التصنيف حسب الطرق المستعملة:.....3

1-2-4-التصنيف حسب الوسائط المتدخلة في الفصل.....3

1-3- أنواع الكروماتوغرافيا:.....3

1-4-السلوك الكروماتوغرافيا للمادة المذابة:.....4

1-5-بعض المفاهيم الأساسية في الطرق الكروماتوغرافية:.....4

1-5-1-معامل السعة (معامل المكوث):.....4

1-5-2-زمن المكوث:.....4

1-5-3-حجم المكوث.....5

1-5-4-معامل الانتقائية:.....6

1-6-كفاءة الفصل الكروماتوغرافي:.....7

1-7-درجة الفصل أو قدرة:.....9

1-8-تغيير وتحليل الشكل الكروماتوغرافي:.....10

الفصل الثاني الكروماتوغرافيا المستوية:.....11

2-1-مقدمة:.....11

2-2-كروماتوغرافيا الورق:.....11

2-3-كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة:.....11

2-4-تطبيقات الكروماتوغرافيا المستوية:.....13

الفصل الثالث الكروماتوغرافيا الغازية:.....14

Mohammed zidane

3-2-الطور المتحرك:.....14
3-3-الأعمدة الكروماتوغرافية:.....15
3-3-1-الأعمدة المعبأة:.....15
3-3-2-الأعمدة الشعرية:.....16
3-4-الأطوار الساكنة:.....16
3-5-ادخال العينة:.....18
3-6-ضبط وبرمجة درجة الحرارة:.....22
3-7-كواشف الكروماتوغرافيا:.....22
3-7-1-كاشف الناقلية الحرارية:.....22
3-7-2-كاشف تأين اللهب:.....23
3-7-3-كاشف التقاط الالكترون:.....24
3-7-4-كواشف أخرى:.....25
3-8-التحليل الكيفي (الوصفي) بإستخدام لgc.....25
3-9-التحليل الكمي.....28
الفصل الرابع كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء.....31
4-1-المبدأ.....31
4-2-مكونات الجهاز.....31
4-2-1-المضخة عالية الضغط.....32
4-2-2-الحاقن.....36
4-2-3-العمود.....38
4-2-4-المكاشف.....45
الفصل الخامس كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي.....49
5-1-المبدأ.....49
5-2-خصائص الوسط الثابت.....50

Mohammed zidane

5-3-خصائص الوسط المتحرك.....50

الفصل السادس كروماتوغرافيا التبادل الآيوني.....53

6-1-مقدمة.....53

6-2مبدأ كروماتوغرافيا التبادل الآيوني.....53

Mohammed zidane

الفصل الأول الكروماتوغرافيا– مظاهر عامة

1-1-عموميات حول الطريقة الكروماتوغرافيةGeneralities about chromatography:

ان كلمة كروماتوغرافيا تعني مجموعة طرق الفصل التي اعتمدت في الأصل على سلسلة من التجارب التي قام بها العالم النباتي Tsweetحيث استطاع تحليل مادة الكلوروفيل وفصلها الى عدة مقاطع ملونة وذلك خلال ترشيحها خلال أعمدة مملوءة بمادة ممتزة (adsorbent)معينة واظهارها بمذيب معين لذلك اطلق عليها اسم كروماتوغرافي ومعناها في اليونانية كتابة الألوان واصبح هذا المصطلح يطلق على جميع الطرق الكروماتوغرافية المعروفة في الوقت الحاضر
وحتى على تلك التي لا تحلل مقاطع ملونة. وتأتي أهمية الكروماتوغرافيا بالدرجة الأولى في استخدامها لطرق تحليلية لتعيين المركبات الداخلة في مزيج ما من الناحية النوعية والكمية. وهي طريقة فيزيائية للتحليل والفصل باستخدام طورين احدهما الطور الثابت Stationary phaseوالآخر هو الطور المتحرك mobile phaseوالذي يسير عبر الطورالثابت ويحوي عادة على النموذج المراد فصله ويتم توزيع المادة المراد تحليلها بين الطورين المتحرك والثابت اما بإختلاف قابلية ذوبان المادة في كلا الطورين او بإختلاف الامتزاز للمادة في الطور الثابت الممتز وبذلك يتم فصل المواد اذا وجد اختلاف في معامل التوزيع لهذه المواد بين الطورين وعند حصول عملية الفصل فإن كل مكون يخرج من الطور الثابت بفترة زمنية مختلفة عن المكون الآخر.

1- 2- تصنيف التقنيات الكروماتوغرافية Classification of chromatographic techniques:

تصنف الى أربع أقسام وهي :

1-2-1-التصنيف حسب طبيعة الأطوارClassification by nature of phases:

- **الطور المتحرك :**مائع فهو اذن اما سائلL أو غاز G أو مائع جد حرج FS
- **الطور الثابت:** اما سائلL أو صلب S

تركيب هذه الامكانيات يؤدي الى امكانيات مختلفة وهي :

- **كرماتوغرافيا سائل – صلبLSC**
- **كرماتوغرافيا سائل – سائلLLC**
- **كرماتوغرافيا غـاز – صلبGSC**
- **كرماتوغرافيا غـاز – سائلGLC**
- **كرماتوغرافيا الجد حرجة – FSC**

ملاحظة : FSC تعرض حالة وسطية بين **LC**و**GC**لأن الموائع الجد حرجة تملك خواص عند الحدين السائل والغاز

1-2-2 - التصنيف حسب الظاهرةالكروماتوغرافيةClassification by phenomenon Chromatography:

هذه الأخيرة تتعلق بطبيعة الطور الثابت (PS) المستعمل لهذا نميز اذن :

1- كروماتوغرافياالادمصاص(الامتزاز) (GSC-LSC):

هذا يعني PS صلب بتطوير هذا النوع نستطيع ربطها بكروماتوغرافياالألفة (Affinitychromatography) التي توافق حالة تكون فيها خواص الادمصاص للطور الثابت نوعية اتجاه مركب واحد اوعائلة مركبات

Mohammed zidane

2- كروماتوغرافياالتوزيع (GLC-LLC):

عندما يكون PS سائل غير قابل للمزج مع الطور المتحرك (PM)

3- كروماتوغرافياالتبادل الأيوني (IEC):

في هذه الحالة يكون PS حامل لمجموعات وظيفية حمضية أوأساسية خاصة بفصل المركبات الأيونية

4- كروماتوغرافياالاستثناء أو الاستبعاد (EC):

PS في هذه الحالة مسامي(porous) يتصرف مثل الغربال (sieve) فيفصل المركبات على حسب حجمها

1-2- 3 التصنيف حسب الطرق المستعملة Classification by method:

- على حسب صنع الطور الثابت PS نميز مايلي :

- كروماتوغرافيا العمود

- كروماتوغرافيا الورق

- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

- على حسب كيفية هجرة الطور المتحرك PM نميز مايلي :

- كروماتوغرافيا التفرد

في هذا النوع مكونات العينة تبقى عندالطور الثابت PS

- كروماتوغرافيا التملص

في هذه الحالة مكونات العينة تسحب خارج الطور الثابت PS

1-2-4- التصنيف حسب الوسائط المتدخلة في الفصل classification according to the internet parameters in the separation

الوسائط الفيزيوكيميائية التي عليها ترتكز مبادئ الفصل هي :

- قطبية الطور العادي أو المعاكس (المقلوب)

- الشحنة الكهربائية

- الطول أوالشكل (الحجم)

- وجود بنى خاصة والتي تسمح بتشكيل روابط نوعية

1- 3 - أنواع الكروماتوغرافياType of Chromatography:

تتضمن الطرق الكروماتوغرافية العديد من العمليات التي تعتمد على إختلاف توزيع مكونات المادة المراد فصلها بين طورين احدهما ثابت ويسمى بالطور الثابت(Stationary phase) اما ان يكون صلب او سائل مثبت على دعامةصلبة ويوضع عادة في عمود

Mohammed zidane

(Column) او يطلى على لوح من البلاستيك او الزجاج او قطعة من الورق والطور الثاني يسمى بالطورالمتحرك(mobile phase)وهو اما سائل او غاز يمر خلال الطور الثابت وعادة ينقل مكونات المادة المراد تحليلها ويمكن تقسيم الكروماتوغرافيا حسب نوع القوى المسؤولة عن الفصل الى ما يلي:

①كروماتوغرافيا الامتزازadsorption Chromatography

②كروماتوغرافيا التوزيعPartition Chromatography

③كروماتوغرافيا التبادل الايونيIon exchange chromatography

④كروماتوغرافيا الاستثناء او الاستبعادSize exclusion Chromatography

1-4- السلوك الكروماتوغرافي للمادة المذابة Chromatography behavior ofsolute analytic:

عملية توزيع مكون من المكونات بين طورين هي عملية ديناميكية فكل جزيئة من جزيئات المكون تمر عادة بسرعة الى الخلف والى الامام بين الطورين وهذا الانتقال يصل بسرعة الى حالة التوازن ويحصل التوازن عند تساوي الطاقة الحرة لجزيئات المكون بين الطورين وان نشوء حالة التوازن تخضع لقانون نرنست $Kd = \frac{Cs}{Cm}$.

حيثK_dمعامل التوزيعDistribution coefficientو Cs , Cm هي تراكيز المكون في الطورين المتحرك والثابت على التوالي فإذا كانK_dكبير جدا فإن المكون يبقى في الطور الثابت لفترة أطول ويتحرك ببطء شديد اما اذا كانK_dصغير فإن المكون يكون في الطور المتحرك وسرعته نفس سرعة الطور المتحرك أي يتحرك بسرعة.

نرمزبt الى جزء من الزمن الكلي الذي يمضيه المكون في الطور المتحرك فيكون : $t=\frac{Nm}{Ns+Nm}$

حيثNm :عدد جزيئات المكون في الطور المتحرك

Ns:عدد جزيئات المكون في الطور الثابت

ويمكن التعبير عن عدد الجزيئات بالتركيز مضروبا في حجم الطور فتكون العلاقة

$$t=\frac{Cm\times Vm}{Cs\times Vs+Cm\times Vm}$$

بقسمة كل من البسط والمقام علىCm × Vmنحصل على

$$t=\frac{1}{1+\frac{Cs\times Vs}{Cm\times Vm}}=\frac{1}{1+Kd\frac{Vs}{Vm}}$$

1- 5- بعض المفاهيم الأساسية في الطرق الكروماتوغرافية Some basic concepts in chromatographic methods

1-5-1- معامل السعة (معامل المكوث)Capacity factor:

من العلاقة السابقة : $t=\frac{1}{1+Kd\frac{Vs}{Vm}}$

بوضع: $K= K_d \frac{Vs}{Vm}$

نجد: $t=\frac{1}{1+K}$

Mohammed Zidane

نسمي K معامل السعة اومعامل المكوث

1-5-2- زمن المكوث retention time :

نرمز لزمن المكوث بالرمز t_R وهوالزمن اللازم لمرور المكون عبرعمود طوله L،أي الزمن المستغرق من بدء مرور الطورالمتحرك حتى خروج المكون من العمودوالذي يعطى بالعلاقة $t_R = \frac{L}{V}$

حيث L:يمثل طول العمود

V:السرعة الخطية المتوسطة للمكون

لكن:V=F×t

حيثF تمثل سرعة الطور المتحرك

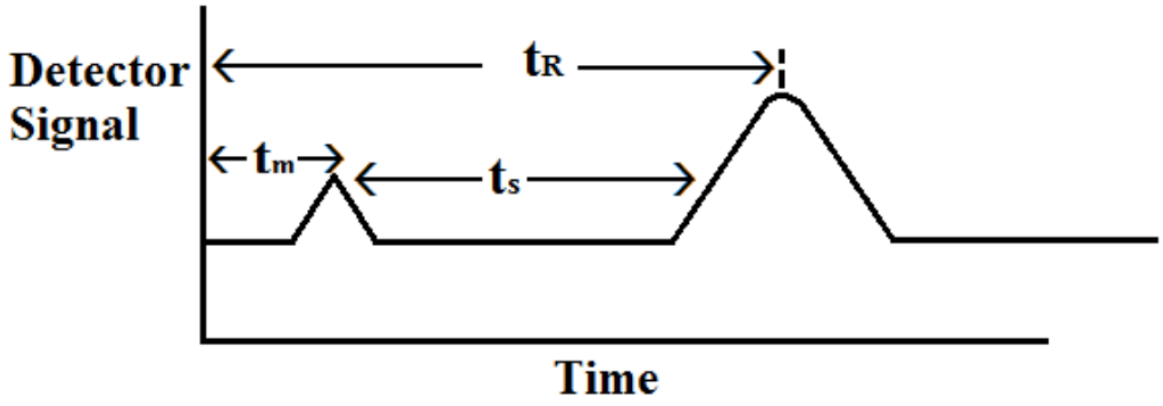
بالتعويض عن قيمة t نجد : $V=F\times\frac{1}{1+K}$

ومنه : $t_R=\frac{L(1+K)}{F}$

نسمي $\frac{L}{F}$ الزمن الميت(Dead time) وهو الزمن المستغرق لمرور الطور المتحرك دون وجود المكون ونرمز له بالرمز t_m

ومنه $t_R=t_m\ (1+K)$

ويعبر عنه كذالك بالفترة الزمنية التي يحتاجها الطور المتحرك للمرور خلال الطور الثابت بدون اعاقة كماهو موضح في الكروماتوغرام التالي



حيث ان t_R زمن الاحتجاز الكلي Retention time ويعرف زمن الاحتجاز هو دالة التشخيص النوعي في اغلب الطرق الكروماتوغرافية ويمثل الفترة الزمنية منذ حقن المادة في الجهاز وحتى وصولها الى الكاشف

Mohammed zidane

العوامل المؤثرة على زمن الاحتجاز:

①معدل جريان الطور المتحرك
②نوع الطور الثابت
③التداخلات بين الطور الثابت والمادة المراد فصلها
④درجة حرارة العمود
⑤طول العمود
⑥نوع الطور المتحرك

1-5-3- حجم المكوثretention volume:

وهو حجم الطور المتحرك اللازم لاخراج المكون (المادة) من العمود (الطور الثابت) والذي يرمز له بالرمز V_R

والذي يعطى بالعلاقة : $V_R = t_R \times F$

حيثF سرعة الطور المتحرك (منسوب التدفق بالنسبة للطور المتحرك)

بالتعويض عن قيمةt_R نجد : $V_R = t_m(1+k) \times F$

لكن : $t_m \times F = V_m$

ومنه تصبح العلاقة النهائية كالتالي :$V_R = V_m(1+k)$

نسمي V_m الحجم الميت وهو عبارة عن حجم الطور المتحرك الذي يعبر العمود(الطور الثابت) دون وجود المكون (المادة المراد فصلها)

1-5-4- معامل الانتقائيةselectivity factor :

عامل الانتقائية α يصف وضعية القمتين المتجاورتين 1و2 الموجودتين على الكروماتوغرام والذي يتوافق مع نسبة معاملات المكوث لمركبين في العمود ، كما أنها تحدِّد امكانية الفصل الكيميائي وتعطى بالعلاقة

$$\alpha = \frac{tR2 - tm}{tR1 - tm} = \frac{K2}{K1} = \frac{t'R2}{t'R1}$$

حيث$t'R2$:زمن الاحتجاز المختصر للمركب 2 K2:معامل المكوث (معامل السعة) للمركب 2

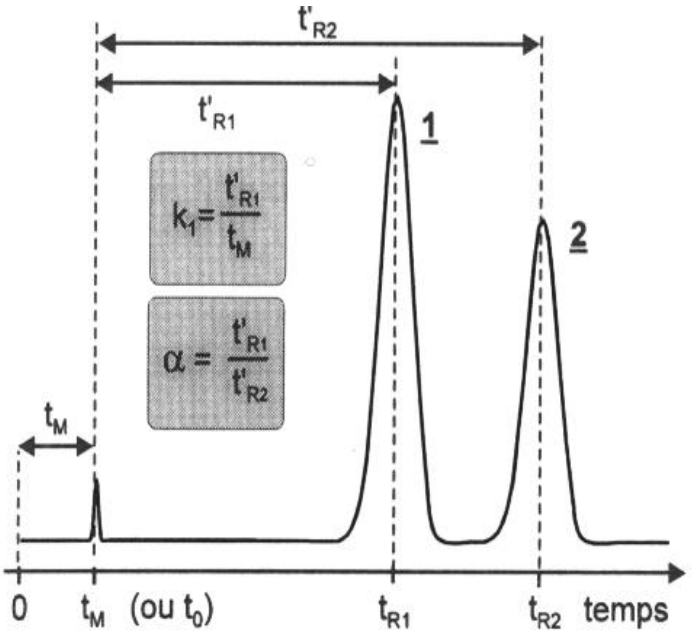
$t'R1$:زمن الاحتجاز المختصر للمركب 1 K1:معامل المكوث (معامل السعة) للمركب 1

t R2:زمن الاحتجاز الكلي للمركب 2 tm:الزمن الميت

t R1:زمن الاحتجاز الكلي للمركب 1

كما هو موضح بالشكل التالي :

Mohammed zidane



ملاحظة :قيمة عامل الانتقائيةα دائما أكبر من 1

6-1- كفاءة الفصل الكروماتوغرافيEffectiveness of chromatographicseparation:

هناك نظريتان تناولت تفسير اهم العوامل التي تزيد من كفاءة الفصل التحليلي وهي:

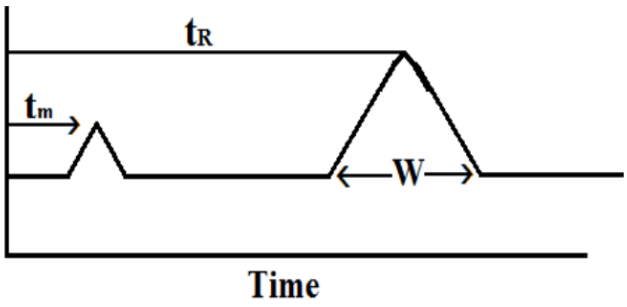
❶نظرية الصفائحPlate theory

❷نظرية السرعةRate theory

❶نظرية الصفائح:

تتضمن النظرية ان العمود الكروماتوغرافي يحتوي على عدد كبير من القطع المتشابهة او الصفائح النظرية وفي كل منهايتم التوازن وقد افترضت النظرية ان العملية الكروماتوغرافية هي عملية مستمرة وليست عمليات متقطعة فكلما زادت عدد الصفائح النظرية كانت الذروات اضيق وقريبة للوصول الى السلوك المثالي ،قد افترضت النظرية معادلات رياضية لحساب عدد الصفائح النظرية وتحسب عدد الصفائح النظرية بالعلاقة التالية:

$$N = 16 \left(\frac{tR}{w}\right)^2$$



حيثN :عدد الصفائح النظرية

t_R:زمن الاحتجاز

W :عرض القمة

ويمكن تحديد كفاءة الفصل (كفاءة العمود) من خلال العلاقة التالية

$$H = \frac{L}{N}$$

حيث تمثلL :طول العمود ، Nعدد الصفائح النظرية .

H :الارتفاع المكافئ للصفيحة النظرية وهو اختصارHigh equivalenttheatrical plates(HETP)

وهناك طريقتان لزيادة كفاءة الفصل من خلال
①زيادة طول العمود
②زيادة عدد الصفائح النظرية في وحدة واحدة من طول العمود

مثال : مخطط كروماتوغرام لمكونينA و Bزمن الاحتجاز لـA 250دقيقة و لـB 270دقيقة وعرض القمة للمكون A 15سم وللمكون B 17 سم . احسب عدد الصفائح النظرية لعمود الفصل واذا كان طول العمود120سم . احسبHETP .

الاجابة:

$$\mathbf{N_A} = 16\left(\frac{tRA}{wA}\right)^2 = 16\left(\frac{250}{15}\right)^2 = \mathbf{4440}$$

$$N_B = 16\left(\frac{tRB}{wB}\right)^2 = 16\left(\frac{270}{17}\right)^2 = \mathbf{4040}$$

$$HETP = \frac{L}{N(moy)} = \frac{120}{4240} = \mathbf{0.028\ cm}$$

❷نظرية السرعةRate Theory :
حيث توصل عدد من الباحثين البولنديين في حقل النفط الى اشتقاق معادلة تربط بين كفاءة الفصل وسرعة الطور المتحرك وتدعى هذه المعادلة بمعادلة فان ديمترVan Demeter Equationوهي

$$\mathbf{H = A + \frac{B}{\mu} + C\,\mu}$$

حيثA، B ،Cثوابت،μسرعة الطور المتحرك

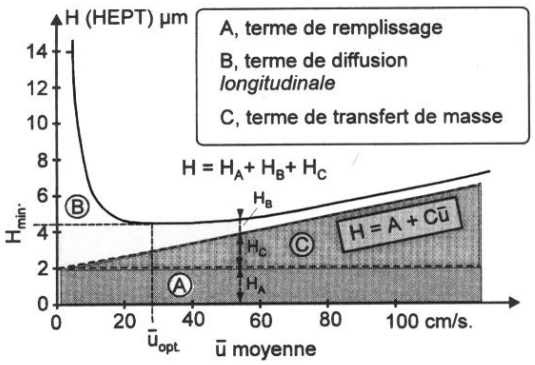
ويعبرAعن الانتشار المضطرب بسبب التدفق غير المنتظم للطور المتحرك أثناء مروره بالطور الثابت وكذلك يعبر عن العشوائية للجزيئات في العمود التي يمكن ان تشير الى ان الجزيئات بخط مستقيم او تسير بخط كثير التموج أي هناك حركة عشوائية تؤثر على H

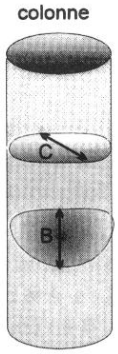
B : يفسر الانتشار الطولي او الانتشار الجزيئي (Molecular diffusion or Longitudinal diffusion) وتكون حركةالانتشار اما الى الأعلى او الأسفل ويظهر هذا التأثير بشكل واضح في تقنية الـ GCعندما يكون الطور المتحرك غاز اماعندما يكون الطور المتحرك سائل (تقنيةLC) تكون قيمة الانتشار صفرأي انB/μ المساهمة في الانتشار على امتداد العمود.

C: يمثل انتقال الكتلة في الطور المتحرك (mass transfer in mobile phase)ويعتمد على حجم الحبيبات ويتناسب مع مربع قطر الحبيبات

ويمكن ان يوضح الشكل ادناه علاقة العوامل هذه بالسرعة الخطية وكفاءة الفصل

Mohammed zidane





المنحنى الممثل لمعادلة فان ديمتر(Van Demeter) عبارة عن قطع زائد والذي يوضح تغيرHETP بدلالة سرعة التدفق التى تمر بقيمة حدية صغرى والتي تدعى السرعة المثالية ويمكن حسابها بانعدام المشتق الاول لهذه الدالة كما هو موضح بالاتي :

$$f'(\mu) = -\frac{B}{\mu 2} + C$$

من أجل $f'(\mu) = 0$

وبذلك يمكن تحديد سرعة الطور المتحرك المثالية والمقدوة ب : $\mu_0 = \sqrt{\frac{B}{C}}$

ويمكن ان تكون العلاقة عند استخدام السرعة المثالية كما يلي:

$$H(min) = A + 2.\sqrt{B.C}$$

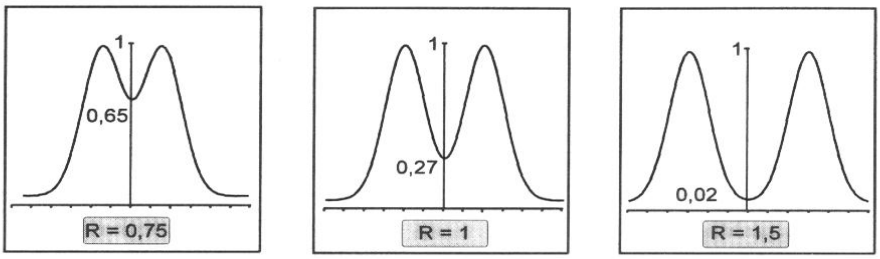
1- 7 - درجة الفصل او قدرة الفصل(Rs)Coefficient of separation:

ان اهم هدف من الناحية العملية في الفصل هو قدرة الفصل لمركبات ذات صفات متشابهة ويعني هذا المصطلح فصل مكونات النموذج بشكل ذروات (قمم) واضحة منفصلة عن بعضها البعض بفاصلة زمنية مناسبة يضاف الى ذلك شكل الذروة وتجانسها ويمكن حساب قدرة الفصل من خلال العلاقة التالية: $R_S = \frac{2(tR2 - tR1)}{W1 + W2}$

حيثR_S :قدرة الفصل
t_{R2} :زمن احتجاز المادة الثانية
t_{R1} :زمن احتجاز المادة الأولى
W1 , W2 :عرض القمتين للمادة الأولى والثانية

فإذا كان$R_S = 1$ ($WA = WB \approx \Delta tR$)يحصل تطابق او تداخلOver lappingأي الفصل غير جيد

Mohammed zidane



وان افضل قيمة لـR_S نحاول الوصول اليها هيR_S= 1.5 للحصول على فصل جيد في هذه الحالة

أي ان1.5 <Rsيعطي فصل جيد بشكل عام

يمكن كذالك تحديد وبسهولة المعادلة التي تربط بين درجة فصل العمود وعدد الطبقات النظرية وكذالك عامل الانتقائية ومعامل السعة لمكونين (مركبين) في العمود كما يلي :

$$Rs = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)\left(\frac{K2}{1+K2}\right)$$

حيث :

- N : عدد الطبقات النظرية في العمود
- α :عامل الانتقائية
- K_2: معامل السعة للمركب الذي زمن مكوثه أطول

ويمكن تحسين قدرة الفصل من خلال زيادة طول العمود لزيادة عدد الصفائح النظرية وتحسين عرض القمة ومن العوامل المؤثرة على عرض القمة :

①حجم الدقائق للطور الثابت Particle size
②سمك طبقة الطور الثابتthickness
③لزوجة الطور المتحركviscosity
④درجة حرارة العمودTemperature
⑤السرعة الخطية للطور المتحركLiner velocity

1-8- تغيير وتحليل الشكل الكروماتوغرافي Interpretation of Chromatograms:

من الكروماتوغرام في الكروماتوغرافيا يمكن الحصول على ما يلي:

①معلومات نوعيةqualitative information

②معلومات كمية quantitative information

من المعلومات النوعية يمكن التعرف على المادة المحللة من خلال معرفة زمن الاحتجاز لها حيث تحقن عينة من المجهول ثم تحقن عينة من المحلول القياسي (standard) فإذا ظهر الاثنان نفس الـT_Rتكون المادة نفسها وهذه الطريقة تعطي نسبة تأكد بمقدار 95%ولمزيد من التأكيد نغير ظروف التحليل مثل الطور الثابت وسرعة الطور المتحرك فاذا حصلنا أيضا على نفسT_R تكون نسبة التأكد 99 %.

اما المعلومات الكمية والتي تعني التحليل الكمي وهي طريقة تحديد كمية المادة من خلال مساحة القمة او ارتفاع القمة يمكن تحديد تركيز المادة او نسبتها المئوية حيث

Mohammed zidane

Aمساحة القمة (Area)

h :ارتفاع القمة(height)

W :عرض القمة()width

وهناك عدة طرق لحساب مساحة القمة من خلال الطرق التكاملية او طريقة حساب مساحة المثلث على اعتبار ان القمةعبارة عن مثلث ويمكن ان ينجز التحليل الكمي أيضا من خلال طريقة عامل الاستجابة وطريقة المحلول القياسي الداخلي او طريقة الإضافات القياسية

Mohammed zidane

الفصل الثاني الكروماتوغرافيا المستوية(Plane Chromatography)

2- 1 - مقدمة :

يتحرك الطور المتحرك في هذا النوع على سطح مستو بدلا من العمود. وفي هذه الطرق تستخدم غالبا للتحليل النوعي. وهنالك نوعان وهما :

- كروماتوجرافيا الورقة Paper Chromatography:

الطور الساكن يكون عادة من الماء المحيط بالسليلوز.

- كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة(TLC)Thin lyer Chromatography:

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

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

في هذه الطرق تتوقف عملية التظهير قبل وصول المواد المراد فصلها والطور المتحرك إلى الحافة العلوية للسطح المستوي المستخدم

يستخدم مصطلح Rf معامل الإعاقة Retardation factor كوسيلة مهمة للتحليل النوعيQualitative analysis.

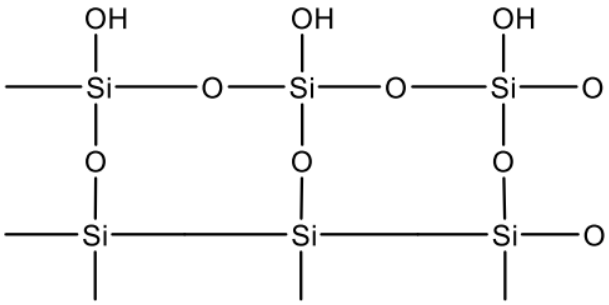
2 -2- كروماتوغرافيا الورقPaper chromatography :

وهي احد أنواع الكروماتوغرافيا السائل والذي يكون الطور الثابت عبارة عن غشاء رقيق ممتز من الورق (السليلوز) والطور المتحرك سائل وهي ابسط أنواع التقنيات الكروماتوغرافية حيث توضع قطرة على حافة الورقة وتغمس حافةالورقة في الطور المتحرك (مذيب) ويتم تشخيص المواد بعد فصلها على الورقة برشها بكواشف معينة. ومن العوامل المؤثرةعلى الفصل في هذه الطريقة هي
①القوى الدافعة والتي تتمثل في سريان المذيب والذوبانية (ذوبان المادة في المذيب)
②القوى المانعة وهي التي تعمل على إعاقة تحرك المواد وتتمثل في الامتزاز والتوزيع

2-3- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقةThin layer chromatography :

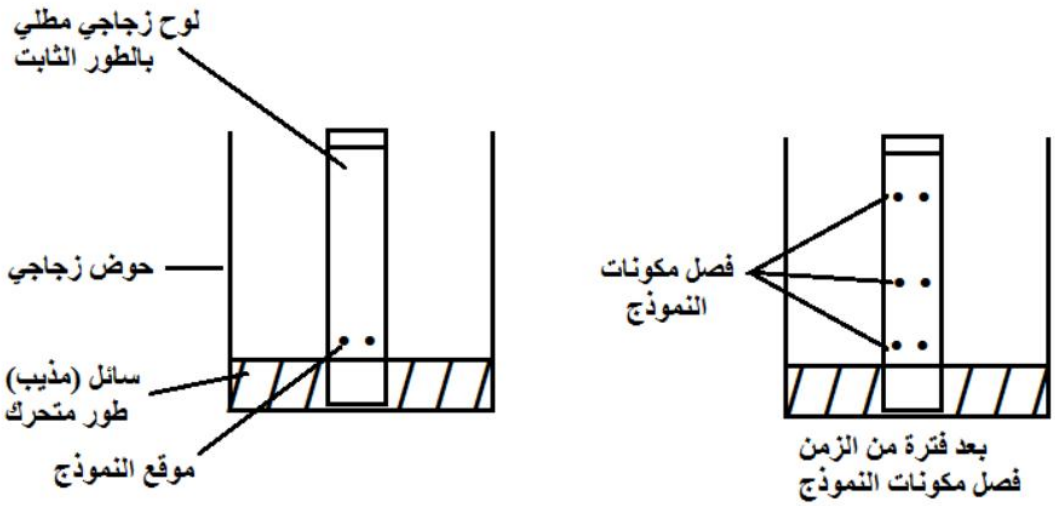
تتم عملية الفصل على طبقة رقيقة من مادة الوسط الثابت المطلية على الواح مصنوعة من الزجاج او البلاستك او الالمنيوم ويعتمد الفصل اما على ظاهرة الامتزاز او الاستبدال الايوني وان التطبيقات على ظاهرة الامتزاز هي الأكثر شيوعا. ويتم العمل بهذه التقنية يغمر الجزء الأسفل من الشريحة بمذيب مناسب اعتمادا على نوع النموذج ويترك لمدة معينة من الزمن حيث ينتقل المذيب عبر الشريحة اعتمادا على الخاصية الشعرية مرتفعا الى الأعلى حاملا معه النموذج واعتمادا على حجم الجزيئات او قطبيتها توزع المادة (النموذج) على الطبقة الرقيقة وبحسب قدرة المذيب. وفي الغالب يكون الطور الثابت عبارة عن بوليمر السليكا يطلى على لوح زجاجي او بلاستيكي او من الالمنيوم.

Mohammed zidane



شكل (بوليمر السليكا)

وتتم عملية التحليل بهذه الطريقة بوضع النموذج على شريط الـTLC(صفيحة زجاجة او الالمنيوم او بلاستك مطلية بطبقةرقيقة من الطور الثابت) على شكل قطرات على خط معين يبعد مسافة معينة من بداية الصفيحة ثم توضع الصفيحة في حوض زجاجي يحوي الطور المتحرك (مذيب او اكثر من مذيب) بحيث يكون مستوى السائل قريب من مستوى النموذج(يبعد مسافة معينة) ويترك فترة من الزمن ليصل ارتفاع مستوى المذيب (الطور المتحرك) خلال الصفيحة الى خط النهاية حاملا النموذج والذي سيكون على ارتفاعات مختلفة على طول الصفيحة ويمكن توضيح ذلك بالشكل التالي:



بعد فصل المواد خلال الصفيحة يمكن الكشف عن المواد من خلال عدة كواشف كيميائية او ضوئية وان الدالة النوعية في هذه التقنية هي عامل الإعاقة ويرمز لهR_f ويعبر عنه بالمسافة التي تقطعها المادة (النموذج) الى المسافة التي يقطعهاالمذيب (الطور المتحرك) ويعبر عنه رياضيا

$$R_f = \frac{di}{dm}$$

حيث :

- di المسافة التي تقطعها العينة (النموذج)
- dmالمسافة التي يقطعها المذيب (الطور المتحرك)

وبذلك فإن قيم الـR_fلا تتجاوز الواحد الصحيح وان قيمR_fتعتمد على معامل التوزيع(K_d) للمادة بين الطورين وطبيعة الطور المتحرك

- مميزات تقنية الـ TLC

①بساطة الطريقة وعدم الحاجة الى أجهزة معقدة
②إمكانية الوصول الى جودة الفصل نفسها التي تعطيها الطرق الكروماتوغرافية الأخرى
③إمكانية الوصول الى فصل انتقائي بإستخدام كواشف متخصصة
④تحاليل سريعة وتحتاج الى كميات قليلة من النموذج
⑤تطبيقات واسعة
⑥إمكانية الاستخدام في المجال التحضيري(Preparative)
أي الحصول على مواد بنقاوة عاليةhigh purity

4-2 - تطبيقات الكروماتوغرافيا 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 هذه في التقدير النوعي للمواد المفصولة وذلك بمقارنة معامل الإعاقة Rf بمعاملات إعاقة لمواد قياسية معروفة تحت نفس الظروف العملية.

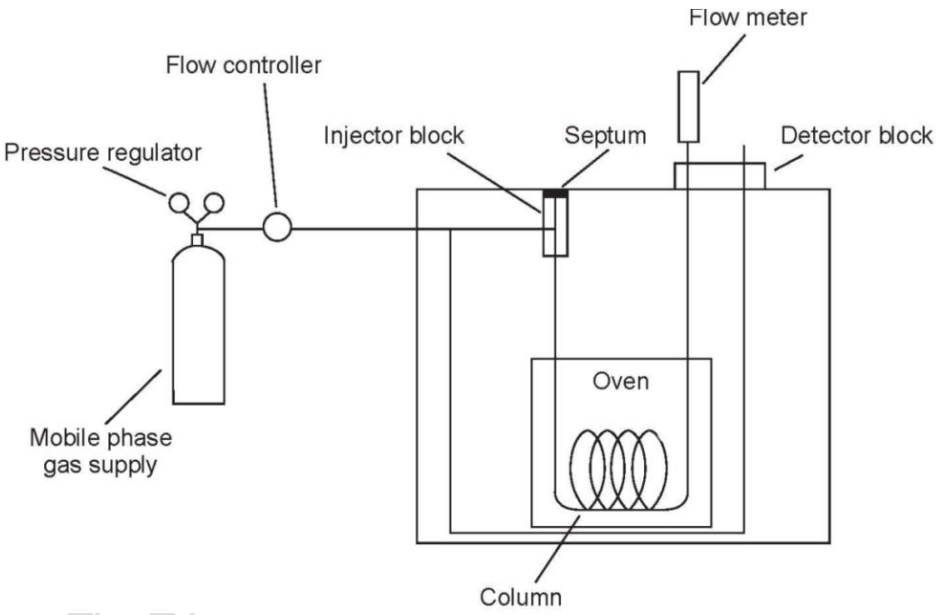
وكذلك يمكن استخدامه في التحليل الكمي وذلك بقطع جزء الورقة الذي يشغله المكون المراد تقديره وإذابة هذا المكون في المذيب المناسب وتقديره بأي من الطرق المعروفة أو كشط من الطبقة الرقيقة الذي يحتله المكون المطلوب تقديره واستخلاص المذاب منه وتعيينه بطرق التحليل المناسبة كالتحليل الطيفي.

Mohammed zidane

الفصل الثالث الكروماتوغرافيا الغازية(Gas Chromatography)

3-1-المبدأ : سنتعرف على مفهوم ومبدأ الكروماتوغرافيا(GC)حيث يتم التعرف على الطور المتحرك و الأعمدة الكروماتوغرافية: الأعمدة المعبأة والأعمدة الشعرية كما سنتعرف على الأطوار الساكنة وعلى المتطلبات التي تحدد كيفية إدخال العينة في الكروماتوغراف الغازي، وسنوضح كيفية ضبط وبرمجة درجة الحرارة وعلى أنواع كواشف الكروماتوغرافيا الغازية: كاشف الناقلية الحرارية(TCD) (وكاشف تأين اللهب(FID)و كاشف التقاط الإلكترون(ECD)وكواشف أخرى.

في الكروماتوغرافيا الغازية(GC)يمكن أن تكون العينة غازية أو سائلة والتي تحقن من خلال ابرة عبر واقية الحاقن في تيار من الطور المتحرك الذي يكون بدوره عبارة عن غاز خامل يدعى بالغازالحامل،(carrier gas) وهكذا تمرالعينة خلال حشوة العمود أو في عمود شعري حيث يتم فصلها بالاعتمادعلى قدرتها للتوزع بين الطور الساكن والطور المتحرك ويتضمن الشكل (3−1) صورة تخطيطية عن أهم مكونات جهازكروماتوغراف غازي نموذجي



شكل (3−1) مخطط جهاز كروماتوغراف غازي نموذجي

3-2 - الطور المتحركMobile phase :

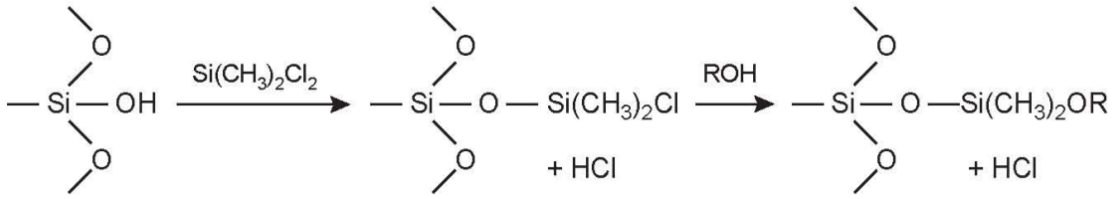
إن معظم الأطوار المتحركة الشائعة للـ GCهي: He،Arو N_2والتي تتميز بمحاسن تكمن في خمولها الكيميائي اتجاه كل من العينة والطور الساكن، وتحدد طبيعة الطور المتحرك المستخدم وفقا لنوع الكاشف المستخدم في الجهاز. يأخذ تدفق الطور المتحرك في الأعمدة المعبأة قيمة تقع في المجالmL/min (25−1) ويتم تعيين معدل التدفق الفعلي باستخدام **مقياس تدفق يوضع في مخرج العمود**

3-3- الأعمدة الكروماتوغرافية Chromatographic Columns :

3-3-1- الأعمدة المعبأة Packed Columns :

تصنع الأعمدة المعبأة من الزجاج، الفولاذ غير القابل للصدأ، النحاس والألمنيوم ويكون طولها النموذجي m(2-6) مع قطر داخلي ،mm(2-4) وتتم حشوة العمود بحبيبات جسم صلب ذات أبعاد تقع في المجال من 37-44µm الى 250-354 µm أما الجسم الصلب الحبيبي فيكون غالبا من التربة المشطوراتية (diatomaceous earth)التي تتألف من هياكل ثنائية الذرات، وتكون هذه الحبيبات جيدة المسامية مع سطوح نوعية $0.5\text{-}7.5 m^2/g$ التي تؤّمن اتصال العينة بين الطور المتحرك والطور الساكن. عند تميؤ سطح هذه التربة تبرز فيها مجموعات السيلانول(SiOH) التي تشكل المواقع الفعالة التي تد مص جزيئات المركب في الكروماتوغرافيا الغازية–الصلبة(GSC) يعتمد الفصل في الكروماتوغرافيا الغازية–السائلة (GLC)على تجزئة المركبات بين الطور المتحرك الغازي والطور الساكن السائل المشّرب عل مادة الحشوة الصلبة، ولتجنب ادمصاص جزيئات المركب المعّرض لمادة الحشوة يتم تخميل مجموعات السيلانول السطحية عن طريق سيلنتها مع ثنائي متيل ثنائي كلوروسيلان ثم غسل الناتج بالميتانول قبل تشربها بالطور الساكن السائل

وقد تم حديثا تصنيع أجسام صلبة حاملة من حبيبات زجاجية أو بوليمرات من الفليور وكاربون، وتتميز هذه الحوامل بمحسنة كونها أكثر من التربة المشطوراتية.



تعالج الأعمدة المعبأة مقادير كبيرة من العينات بالمقارنة مع الأعمدة الشعرية، فهي تقوم بتحليل مقادير من العينات تقع في المجال ،0.1-10µLأما كفاءتها النموذجية فتكون من عدة مئات إلى 2000 صفيحة نظرية لكل متر من طول العمود، وبفرض أنV_{min}/V_{max} حوالي 50فإن الأعمدة المعبأة ذات الكفاءة 10000 صفيحة نظرية تمتلك سعة قمة تعطى بالمعادلة :

$$n_c = 1 + \frac{\sqrt{10000}}{4} \ \mathrm{Ln}(50) = 100$$

3-3-2- الأعمدة الشعرية Capillary Columns:

تّصنع الأعمدة الشعرية أو المفتوحة Open tubular Columns من السيليكا المصهورة والتي تطلى جدرانها الداخلية بطبقة واقية من بوليمير، ويمكن أن يصل طول العمود الشعري إلى 100mمع قطر داخلي يقع في المجال من

300µm - 150 وهناك أعمدة ذات قطر أكبر يصل إلى530µm تدعى بالميغابور megabore.columns

هناك نوعان أساسيان للأعمدة الشعرية:

الأعمدة المفتوحة المطلية الجدران الداخلية (wall-coated open. tubularcolumnsWCOT) والتي تحوي طبقة رقيقة من الطور الساكن. أما النوع الثاني فهي الأعمدة المفتوحة المطلية من الداخل بطبقة من جسم حامل صلب مبلل بطور سائل ساكن(support-coated open. tubularcolumnsSCOT)

تقود الأعمدة الشعرية إلى تحسين ملحوظ بكفاءة الفصل، وعلى الرغم من أن معظم الأعمدة الشعرية تحوي عددا أكبر من الصفائح النظرية بالمتر الواحد عن الأعمدة المعبأة، إلا أن المساهمة الأكبر في تحسين كفاءتها يعودإلى استخدام أطوال ملحوظة فيها كما ذكرنا فيما سبق، من جهة أخرى فإنه بسبب أقطارها الداخلية الصغيرة تكون حمولتها من العينة منخفضة ومن مرتبة $10^{-2}\mu L$إذا ما قورنت بالحمولة الأكبر في الأعمدة المعبأة

3-4- الأطوار الساكنةStationary phases :

تتأثر الانتقائية في الكروماتوغرافيا الغازية باختيار الطور الساكن، إذ يحدد ترتيب خروج المركبات المفصولة بنقطة غليان المركب وبدرجة أقل بالتأثير المتبادل بين المركب والطور الساكن. فالمركبات ذات درجات الغليان المختلفة تكون سهلة الفصل، وإذا كان لمركبين نقطتي غليان متقاربة فيمكن فصلهما إذا كان الطور الساكن يؤثر بأحدهما بصورة انتقائية، وفي الحالة العامة يتم فصل المركبات غير القطبية بصورة أسهل مع طور ساكن غير قطبي، ويكون فصل المركبات القطبية أسهل باستخدام طور سائل قطبي.

يعتمد اختيار الطور الساكن على معايير يجب أخذها بالحسبان وهي: أن يكون خاملا كيميائيا وثابت حراريا مع تطايرية منخفضة وقطبية مناسبة للمركبات المراد فصلها، وعلى الرغم من وجود مئات الأطوار الساكنة المتوفرة بالأسواق التجارية إلا أن معظم عمليات الفصل بالـ GCتتم على عدد من الأطوار الساكنة تتراوح بين خمسة إلى عشر أطوار ساكنة، والجدول (1−3)يتضمن بعضا من هذه الأطوار مرتبة وفقا لازدياد قطبيتها مع بعض خصائصها الفيزيائية وتطبيقات نموذجية لها

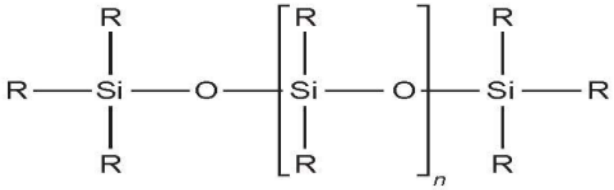
Mohammed zidane

جدول (3–1) أطوار ساكنة مختارة في الكروماتوغرافيا الغازية – السائلة

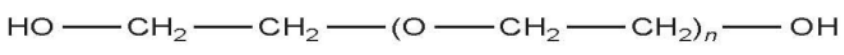
Stationary Phase	Polarity	Trade Names	Temperature Limit (°C)	Applications
squalane	nonpolar	squalane	150	low-boiling aliphatic hydrocarbons
Apezion L	nonpolar	Apezion L	300	amides fatty acid methyl esters high-boiling aliphatic hydrocarbons terpenoids
polydimethyl siloxane	slightly polar	SE-30	300–350	alkaloids amino acid derivatives drugs pesticides phenols steroids
50% methyl-50% phenyl polysiloxane	moderately polar	OV-17	375	alkaloids drugs pesticides polyaromatic hydrocarbons polychlorinated biphenyls
50% trifluoropropyl-50% methyl polysiloxane	moderately polar	OV-210	275	alkaloids amino acid derivatives drugs halogenated compounds ketones phenols
50% cyanopropyl-50% phenylmethyl polysiloxane	polar	OV-225	275	nitriles pesticides steroids
polyethylene glycol	polar	Carbowax 20M	225	aldehydes esters ethers phenols

هناك العديد من الأطوار الساكنة التي تتميز ببنية عامة مبينة في الشكل(a) حيث نجد في الشكل طورا ساكنا يتكون من متعدد ثنائي متيل سيلوكسان إذ تكون فيه جميع المجموعات Rعبارة عن مجموعات متيل ($-CH_3$)غير قطبية وتمثل عادة الخيار الأول لعمليات فصل جديدة، وتعتمد رتبة التمليص عند استخدام هذه الأطوار على نقاط غليان مركبات المزيج المدروس، حيث تخرج أولا المركبات ذات نقاط الغليان المنخفضة

Mona



(a)



(b)

عند استبدال بعض مجموعات المتيل بمستبدلات تزيد قطبية الطور الساكن فإن ذلك يقود على زيادة انتقائية الطور الساكن، وهكذا نجد أنه عند استخدام % 50متيل و %50فنيل سيلوكسان ينتج طورا ساكنا خفيف القطبية، ويمكن زيادة القطبية عن طريق الاستبدال بثلاثي فلوروبروبيل($C_3H_6CF_3$-) والسيانوبروبيل (C_3H_6CN -) أو باستخدام طور ساكن بقاعدة من البولي اتيلين غليكول الشكل(b).

إن أهم مشكلة تواجه جميع الأطوار السائلة الساكنة هي مشكلة النزف من العمود(bleeding)لكن الانتباه لدرجات الحرارة الحدية لاستخدام الطور الساكن المدونة في الجدول (3–1) تحدّمن عملية النزف، بينما عند العمل في درجات حرارة أعلى من تلك المدونة في الجدول المذكور فإن فترة حياة الطور الساكن تتناقص نتيجة عملية النزف. وفي حالة الأعمدة الشعرية فإن الأطوار الساكنة المرتبطة أو ذات الربط التشابكي تقدم ثباتا أعلى في العمود، حيث يتم طلي الطور المرتبط على الجدران الداخلية لعمود السيليكا الشعري، أما الطور ذي الربط التشابكي فنحصل عليه بعد وضع الطور الساكن في العمود الشعري ومعالجته حراريا بالقرب من درجة حرارة استخدامه الحدية.

3 -5 - ادخال العينة:

هناك ثلاثة متطلبات تحدد كيفية إدخال العينة في الكروماتوغراف الغازي:

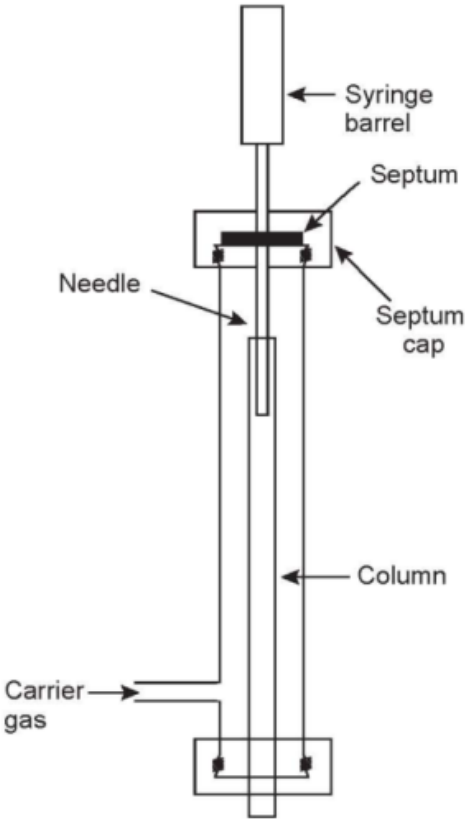
1- يجب أن تكون جميع المكونات المحقونة في جهاز الGC طيارة

2- أن تكون تراكيز المركبات مناسبة

3- أن لا يقود حقن العينة إلى تخريب عملية الفصل

ومن أجل تجنب أي خسارة بتباين العمود المنسوب إلى تعريض الشريط الكروماتوغرافي، يجب أن يكون قياس العينة اللازم إدخاله في العمود كافيا وفي حجم صغير من الطور المتحرك، والشكل (3–3) يبين صورة تخطيطية عن حاقن بسيط يستخدم مع الأعمدة المعبأة

Mohammed zidane



شكل (3−3) صورة تخطيطية عن حاقن للأعمدة المعبأة

Mohammed Ridane

تتم عملية الحقن خلال واقية مطاطية(septum) باستخدام محقنة ميكرولترية ، ويتم تسخين قالب الحاقن إلى درجة حرارة تقدر بـ 50 °C على الأقل فوق أعلى نقطة غليان لمركب من مركبات المزيج المحقون حيث يتم في هذه الطريقة التأكد من التبخر السريع لكامل العينة.

تتطلب الأعمدة الشعرية استخدام حاقن خاص يجنب الحمولة الزائدة للعمود بالعينة، وهناك عدة أنواع من الحواقن التي تلبي هذا المتطلب والأكثرها شيوعا يقوم على تقنية تجزئة دفق الحقن فعند استخدام تقنية التجزئة يتم إدخال % 1−0.1 من العينة داخل العمود وتجرَ البقية بالفيض الهارب من الحاقن. وتفيد تقنية عدم التجزئة(Splitless injection) في تحليل الأثر(trace analysis) حيث تثبّت درجة حرارة العمود على درجة 25-20 °C تحت نقطة غليان المذيب، فعند دخول المذيب إلى العمود يتكاثف مشكلا حاجزا يقوم باصطياد مكونات المزيج، وبعد فترة زمنية قصيرة تترك خلالها لتركيز المكونات ترفع درجة حرارة العمود وتبدأ عملية الفصل، وهكذا تعمل تقنية عدم التجزئة على إدخال نسبة أعلى من المكونات داخل العمود.

هناك تقنية حقن تدعى" داخل العمود"(On-column injection) ضرورية لاستخدامها في حالة المركبات السهلة التفكك، وفي هذه التقنية يتم حقن العينة داخل العمود بدون تسخين ويتم بعد ذلك رفع درجة حرارة العمود.

3-6- ضبط وبرمجة درجة الحرارة Temperature Control:

تلعب درجة حرارة العمود دورا مهما في عملية فصل المزائج المعقدة في الكروماتوغرافيا الغازية، لهذا يتم تركيب العمود بالجهاز ضمن فرن ينظم درجة الحرارة الذي يمكن أن يعمل في درجة حرارة ثابتة يتم اختيارها وفقا لما تتطلبه مركبات المزيج، فعند العمل في درجة حرارة ثابتة يتم تثبيت درجة حرارة الفرن على الدرجة المطلوبة التي يتم اختيارها بشكل تقع حول أخفض نقطة غليان مركب من مركبات المزيج من أجل تفعيل التأثير المتبادل مع الطور الساكن.

تكمن إحدى صعوبات الفصل في درجة حرارة ثابتة في أن هذه الدرجة تكون لصالح فصل المركبات ذات نقاط الغليان المنخفضة، وتقود إلى أزمنة احتفاظ مرتفعة من أجل المركبات ذات نقاط الغليان المرتفعة ضمن المزيج المحقون وهذا ما يجعل زمن التحليل أكبر. لكن من حسن الحظ أن فرن العمود قادر على برمجة درجة الحرارة من أجل تجاوز هذه المشكلة حيث تستخدم درجة الحرارة ببطء وبصورة تدريجية وفق برنامج زمني يتم اختياره بصورة مناسبة، أي بمعدل مناسب لفصل المركبات ذات نقاط الغليان المرتفعة.

3- 7- كواشف الكروماتوغرافيا الغازية:

يمثل الكاشف الجزء الأخير من أي كروماتوغراف غازي، ويتمتع الكاشف المثالي بعدة خصائص تتضمن:

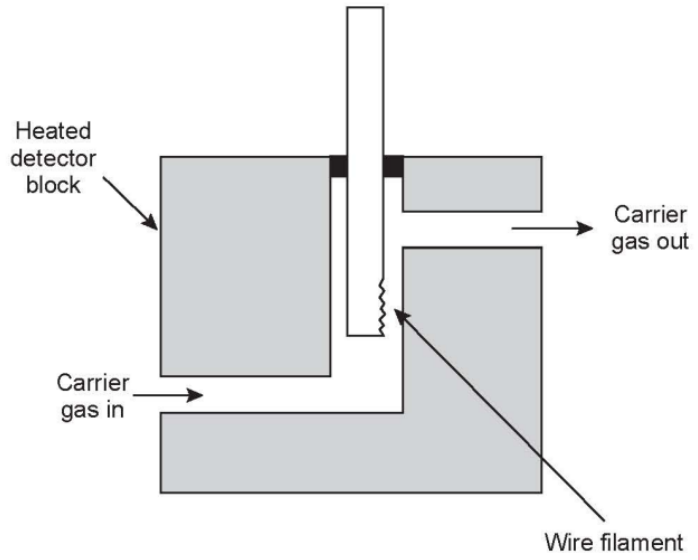
- حدود كشف منخفضة
- استجابة خطية فوق مجال واسع من تراكيز المركب تسمح بإجراء تحليل كمي ميسور
- استجابة لجميع مكونات المزيج أو انتقائية لصف معين من المركبات
- عدم التأثر بالتغيرات التي قد تحصل بتدفق الطور المتحرك أو درجة الحرارة

ونعالج فيما يلي أهم هذه الكواشف وآليات عملها بصورة موجزة:

3-7-1- كاشف الناقلية الحرارية Thermal Conductivity Detector (TCD):

يعدّ كاشف الناقلية الحرارية واحدا من أقدم كواشف الكروماتوغرافيا الغازية والذي لا يزال مستخدما حتى اليوم ويعتمد على الناقلية الحرارية للطور المتحرك (شكل3-4)

Mohammed zidane



شكل (3−4) صورة تخطيطية عن خلية لكاشف ناقليه حرارية للـGC

طالما كان الطور المتحرك متواجدا في العمود فإنه يّمر فوق سلك مسّخن مصنوع من خليط من(تنغستن- رينيوم) تعتمد مقاومته الكهربائية على درجة حرارته والتي تعتمد بدورها على الناقلية الحرارية للطور المتحرك، وبسبب الناقلية الحرارية المرتفعة لغاز الهليوم فإنه يمثل الخيار المفضل كطور متحرك عند استخدام كاشف الناقلية الحرارية.

عند تمليص المركبات من العمود تنخفض الناقلية الحرارية للطور المتحرك وكذلك درجة حرارة السلك لهذا تزداد مقاومته وبوجود خلية ناقليه مقارنة التي يعبرها الطور المتحرك فقط فإنها تصحح تغيرات التدفق والضغط أو القدرة الكهربائية من أجل أي زمن تخضع له هذه التغيرات إذ يمكن لكل هذه العوامل أن تقود إلى تغير في مقاومة السلك.

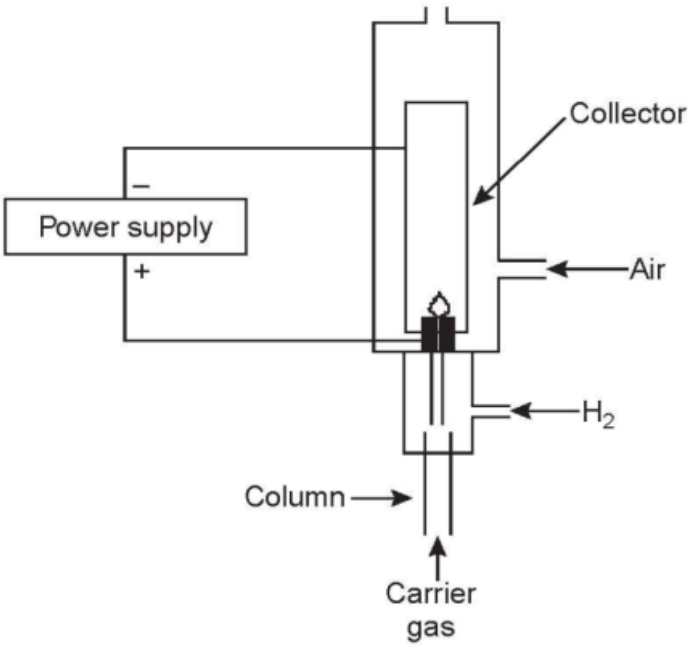
يتمتع كاشف TCDبميزة كونه كاشفا عاما لجميع أنواع المركبات ويعطي إشارة لأي مركب تختلف ناقليته الحرارية عن الهليوم كطور متحرك، كما أن هذا الكاشف لا يخرب المركبات المارة خلاله وهذا ما يسمح بعزلها خلال مصيدة توضع بعد الكاشف، ومن محاسنه أيضا أنه يعطي استجابة خطية من تراكيز المركب فوق مجال بقيمة تقدّر بـ 10^{5}-10^{4}من مقدار العينة المحقونة، لكن هذا الكاشف يمتلك حدّ كشف ضعيف بالمقارنة مع كواشف أخرى أكثر ترددا بالاستخدام.

3-7-2- كاشف تأين ا للَهب(Flameionization Detector(FID:

إن احتراق أي مركب عضوي في لهب H_2/airيُنتج لهبا غنيا بالالكترونات والأيونات، فإذا كان الكمون المطبق عبر اللهب يساوي تقريبا 300Vفإن تيارا صغيرا ينشأ من مرتبة$10^{-9}-10^{-12}$

وعند تضخيم هذا التيار فإنه يقدم إشارة تحليلية مفيدة، وهذا هو أساس عمل الكاشف الأكثر استخداما في الكروماتوغرافيا الغازية الممثل بالشكل (3−5)

Mohammed Ziane



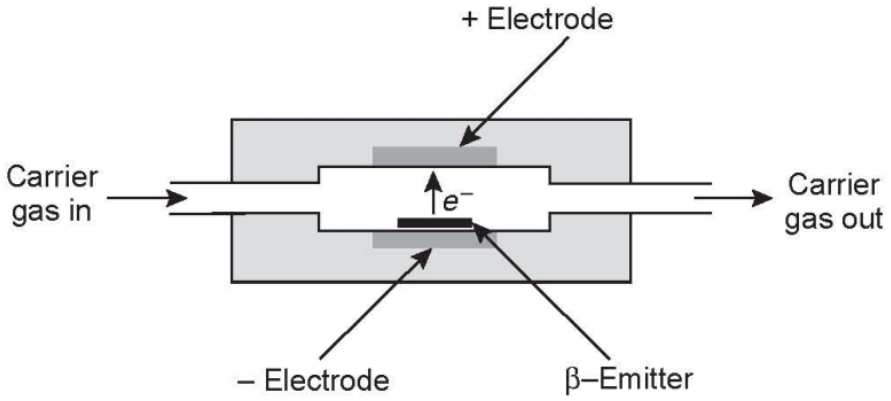
شكل (3–5) صورة تخطيطية عن كاشف تأين لهب للـGC

إن معظم ذرات الكربون في المركبات العضوية ما عدا تلك العائدة لمجموعات الكربونيل والكربوكسيل تولد إشارة تجعل من كاشف FID كاشفا عاما للمركبات العضوية، لكن لا يستجيب الكاشف لمعظم المركبات غير العضوية والعديد من الغازات مثلH_2Oو CO_2. أما محاسن هذا الكاشف فتتضمن حدود الكشف التي تكون أقل بحوالي ثلاث مرات عنها في حالة كاشف TCDوتقع الاستجابة الخطية لهذا الكاشف ضمن مجال10^{-7} – 10^{-6} من مقدار العينة المحقونة. ولابد من الإشارة أخيرا إلى أن هذا الكاشف يخرّب المركبات المارة فيه لأنها تحترق في اللهب

3-7-3 - كاشف التقاط الإلكترون Electron Capture Detector(ECD):

يعدّ هذا الكاشف نموذجا عن الكواشف الانتقائية(Selective) يتألف هذا الكاشف من مصدر لأشعة β (الالكترونات) مثل$^{63}_{28}Ni$وتقوم الإلكترونات المنبعثة عنه في تأين الطور المتحرك (غاز N_2عادة) الذي يقود إلى إنتاج إلكترونات إضافية ينشأ عنها تيارا كهربائيا بين زوج من الإلكترودات كما هو موضح بالشكل (3– 6)

Mohammed Z...ane



شكل (3–6) صورة تخطيطية عن كاشف التقاط الالكترون للـGC

فعندما يتم تمليص مركب من العمود ينخفض التيار الكهربائي نتيجة التقاطه للالكترونات ويستخدم الهبوط بالتيار بعد تضخيمه كإشارة عن مرور المركب في الكاشف. يعدّ كاشف ECDمن الكواشف العالية الانتقائية نحو المركبات الحاوية على مجموعات وظيفية ذات سالبيه كهربائية مثل: الهالوجينات والنترو بينما يكون الكاشف ضعيف الحساسية نسبيا للأمينات والكحولات والهيدروكاربونات. وعلى الرغم من حدود الكشف الممتازة لهذا الكاشف إلا أن مجال خطيته منخفضة إلى حد ما وهي من مرتبة 10^2مقارنة بالكواشف السابقة.

3-7- 4- كواشف أخرى:

هناك كاشفان إضافيان شبيهة في بنائها لكاشف تأين اللهب ويدعى بكاشف الإصدار الضوئي لمطيافية اللهب الناجم عن الفسفور والكبريت إذ تكون هذه الكواشف انتقائية للمركبات الحاوية على الفسفور والكبريت، وهناك كاشف التأين الحراري الذي يستجيب لكل من النتروجين والفسفور.

يوجد أيضا كواشف أخرى تستخدم تقنية التزاوج(الربط) مع الكروماتوغراف الغازي مثل ربط تقنية مطيافية تحت الحمراء (FT-IR) مع الـ GC، وتقنية مطيافية الكتلة(MS) مع الـ GCحيث نحصل على تقنيةGC-MS .

3-8- التحليل الكيفي (الوصفي) باستخدام ال GC :

الطريقة الأولى:

يعتبر زمن المكوث في العمود عند ظروف معينة وبالمقارنة مع المواد القياسية، دالا على ماهية المواد المكونة للعينة، اذ تمكث كل مادة زمنا معينا في العمود. نعلم مما سبق انه من الممكن أن تشترك أكثر من مادة في زمن المكوث داخل العمود، وبالتالي لا يمكن الجزم يقينا بوجود مادة ما في عينة معينة باعتبار زمن مكوثها في العمود ،بالرغم من تشابه ذلك مع زمن مكوث المادة القياسية عند نفس الظروف. من أجل ذلك يمكن القول انه في غياب كاشف قادر على التعرف على ماهية المادة، الكروماتوغرافيا الغاز هي تقنية نافية أكثر منها مثبتة، اذ يمكن القول أن مادة غير موجودة في العينة بمجرد عدم رؤية منحنى اشارتها عند زمن المكوث المفترض.

Mohammed zidane

الطريقة الثانية:

باستخدام مؤشر Kovat للمكوث (Kovat ' s retention index , RI)

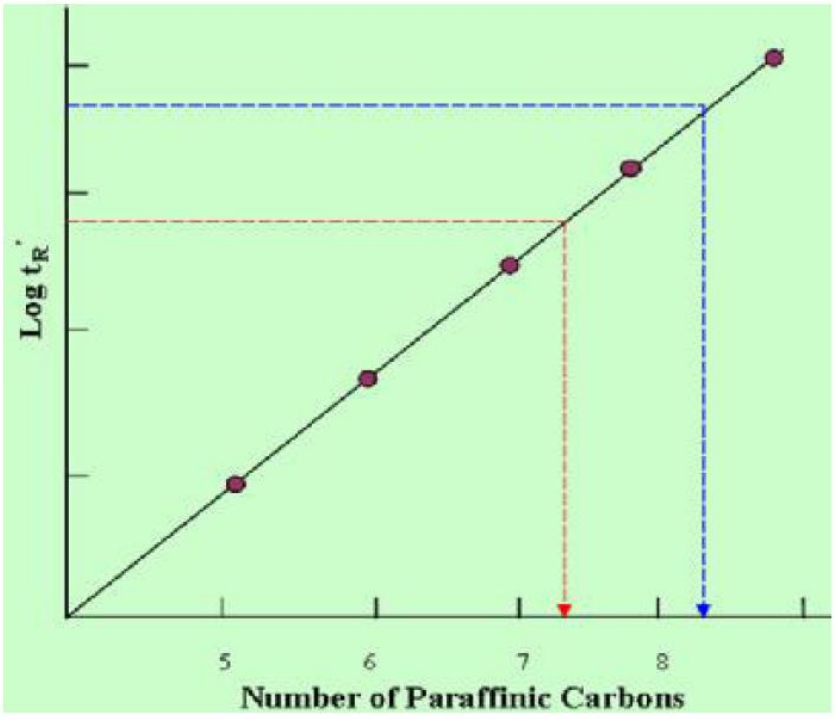
نظرا لأن المكاشيف الدارجة في كروماتوجرافيا الغاز لا تسمح بتأكيد وجود المادة (جميع المكاشيف المذكورة سابقا عدا مكشاف طيف الكتلة) ، فإنه بلا شك تواجهنا مشكلة في تأكيد التعرف على المادة عموما ، ويزداد الأمر سوءا في حالة عدم وجود مادة قياسية ، يمكن حقنها تحت نفس الظروف ، لمقارنة زمن مكوثها مع تلك الموجودة في العينة ، على أقل تقدير. لكن ، ليس من السهل أن يمتلك كل مختبر من المختبرات جميع أنواع المواد القياسية ، وبالتالي ليس من الممكن التعرف على تلك المواد حين وجودها في العينات المختلفة.

لقد استطاع السيد Kovat إيجاد وسيلة عبقرية بسيطة للغاية وناجحة، يمكن من خلالها معرفة ماهية المواد المختلفة، دون الحاجة إلى وجود المادة القياسية. وتعتمد طريقة السيد Kovat على استخدام مواد قياسية متوفرة في كل المختبرات (ولا تمت بصلة للمادة المراد تحديد وجودها) ، حيث استخدم البارافينات العادية (normal alkanes) كمواد قياسية ، وأعطى لكل مادة قيمة مؤشرة تساوي عدد الكربونات مضروبا في مائة:

N-pentane retention index (RI) = No. of Carbons × 100 = 5×100 = 500

وعليه فإن قيمة مؤشر Kovat للـ600= n- hexane ، وللـ800 = n-octaneوهكذا ، علما بأن ال n - alkanes القياسية التي استخدمها كانت تلك التي تحتوي على عدد ذرات كربون أكبر من 4.

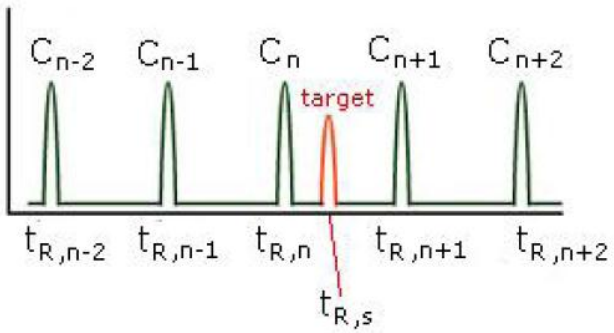
وقد وجد السيد Kovat أنه عند ظروف معينة (من الحرارة وسرعة الغاز الحامل واستخدام وسط ثابت معين) ، أن لوغاريتم تعديل زمن الاحتباسlog adjusted retention time مع عدد ذرات الكربون في المادة القياسية ، يعطي خط مستقيمة ، كما في الشكل :



Mohamed Zidane

وقد قام السيد Kovat وآخرون بإجراء تحاليل للكثير من المواد القياسية الموجودة ، وقاموا بحساب قيمة مؤشر Kovat لكل مادة من تلك المواد ، باعتبار ما تقدم ، وقاموا برصد كل ذلك في جداول خاصة. والآن في أي مختبر في العالم ، إذا تم تحليل خليط من ال n - alkanes مضافا إليه العينة التي تحتوي على المادة ، فإنه يمكن حساب ال RI للمادة أو المواد المجهولة ، ومقارنتها بالقيم في الجداول لمعرفة ماهيتها.

ومن الممكن إجراء نفس العمليات للوصول إلى نفس النتائج ، وذلك عن طريق تحليل خليط من المواد القياسية مع العينة:



ومن ثم رسم ال RI على محور التراتيب ، وزمن المكوث المضبوط على محور الفواصل ، للحصول على الخط المستقيم الناتج عن المواد القياسية (ال alkanes-n).

والآن بمعلومية زمن المكوث المضبوط(المختصر) للمادة المجهولة ، يمكن حساب قيمة مؤشر Kovat لها ، من العلاقة:

$$Kovat(RI) = 100\left(\frac{Log t'R,s - Log t'R,n}{Log t'R,(n+1) - Log' tR,n} + n\right)$$

علما بأن n تمثل عدد ذرات الكربون في ال n- alkane في المركب القياسي الأقل في عدد ذرات الكربون. وبالتالي ، يتم التعرف على المادة المجهولة من الجداول الخاصة بذلك ، بالرغم من عدم وجود مادة قياسية في المختبر الذي أنجز التحليل.

وفي حالة استخدام ال TPGC ، يتم استخدام العلاقة التالية لحساب(Kovat(RI

$$Kovat(RI) = 100\left(\frac{tR,s - tR,n}{tR,(n+1) - tR,n} + n\right)$$

ملاحظة: في حالة الفرق بين هيدروكربونين متتالين هو 2C كما هو الحال في الأحماض الدهنية فان العلاقة السابقة تصبح :

$$Kovat(RI) = 200\left(\frac{tR,s - tR,n}{tR,(n+2) - tR,n} + n\right)$$

وبالرغم من أهمية الطريقة ، إلا أن استخدامها هذه الأيام يكاد يكون معدوما ، نظرا لتوفر أجهزة ال GC / MS القادرة على تحديد ماهية المادة بدرجة تأكد عالية للغاية.

3-9- التحليل الكمي:

تعتبركروماتوجرافيا الغاز تقنية ممتازة للتعرف على تراكيز المواد المختلفة في العينات ، حيث يمكن كالمعتاد استخدام ارتفاع منحنى الإشارة (ال peak height) للدلالة على التركيز ، حيث يتم قياس الارتفاع لمجموعة من المحاليل القياسية ، ومن ثم بناء المنحنى الخطي، ومن قيمة ارتفاع منحنى إشارة المادة يتم إيجاد تركيزها.

كما يمكن استخدام المساحة تحت منحنى الإشارة للدلالة على التركيز ، وربما كان استخدام المساحة اكثر واقعية ، بالذات عندما تكون ال peaks عريضة ، كما بينا سابقا ، إذ يكون الفرق في الارتفاع قليلا. وعلى أي حال ، فإن أجهزة كروماتوجرافيا الغاز المتواجدة في الأسواق حاليا لديها القدرة على قياس الارتفاعات والمساحات بصورة متناهية في الدقة ، مع عمل التصحيح المناسب في حالة التداخل وانحدار خط الأساس ، إضافة إلى امتلاكها العديد من الدوال القادرة على حساب الكفاءة ، وعرض ال peak عند خط الأساس وعرضها عند منتصف الارتفاع ، وغير ذلك كثير ، لكن من المؤكد ضرورة معرفة معامل استجابة المكشاف (response factor) بالذات في حالة المكاشيف التي تعتمد على عدد الذرات(mass sensitive detector) ، أو تلك التي تتأثر بسرعة سريان الغاز الحامل.

الطرق المستعملة في التحليل الكمي :

1 - طريقة المقارنة :comparison method

نحقن في جهاز GC حجم معين من المركب المرجعي (القياسي) فيكون لدينا :

$$m_e = K_e \times A_e$$

حيث: m_e : كتلة المركب المرجعي

K_e : معامل الاستجابة

A_e: مساحة القمة للمركب المرجعي

نحقن بعد ذالك في الجهاز، وفي نفس الشروط السابقة الحجم نفسه من العينة المراد تحليلها، ثم نحدد من خلال قراءة الكروماتوغرام المساحة A_iللمركب المدروس فيكون :

$$m_i = K_i \times A_i$$

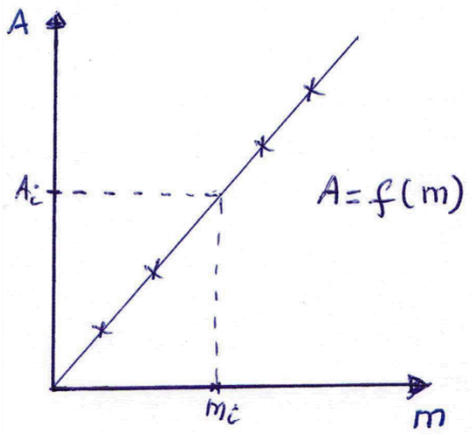
لمعرفة m_i لدينا $K_i=K_e$ ومنه : $\frac{mi}{Ai} = \frac{me}{Ae}$ اذن : $m_i = \frac{me \times Ai}{Ae}$

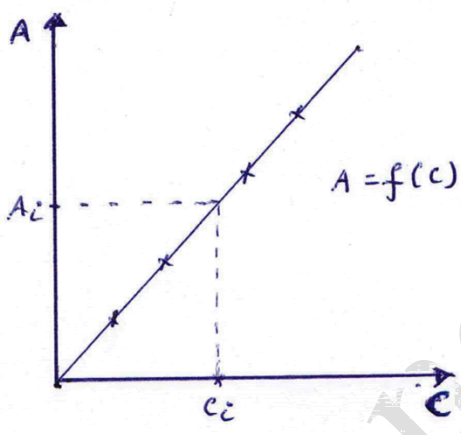
2- طريقة المعايرة الخارجية :external calibration method

وهي تعميم لطريقة المقارنة .وتتم بحقن عينات للمركب القياسي بتراكيز مختلفة معلومة ،ثم نرسم العلاقة بين التركيز ومساحة القمة

$$A=f(c) \quad \text{أو} \quad A = f(m)$$

Mohammed zidane





ثم نحقن بعد ذالك العينة المراد تحليلها في نفس شروط المركب القياسي وبنفس الحجم ،ثم نقرأ على الكروماتوغرام مساحة القمة Ai للعينة وباسقاط على محور c أو محور m نحصل على c_i أو m_i

3 – طريقة المعيار الداخلي: internal standard method

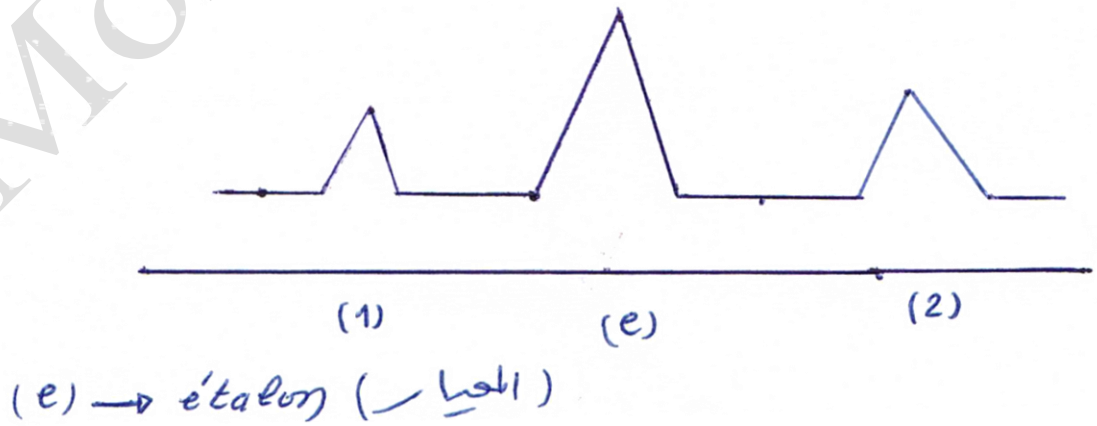
المعيار الداخلي هو مركب كيميائي يتميز لكونه لا يوجد أصلا في العينة المراد تحليلها ، كما أنه :

- خامل (لايتفاعل) مع المركبات
- غير سام
- زمن مكوثه يتوسط الكروماتوغرام (له قمة واضحة)

مثال توضيحي :

نريد تحديد كمية مركبين (1) و(2) في عينة ما

في تجربة أولى نحقن العينة مع معرفتنا لتراكيز المركبين (1) و(2) بوجود المعيار الداخلي المعلوم التركيز . فنحصل على الكروماتوغرام التالي :



Mohammed Zidane

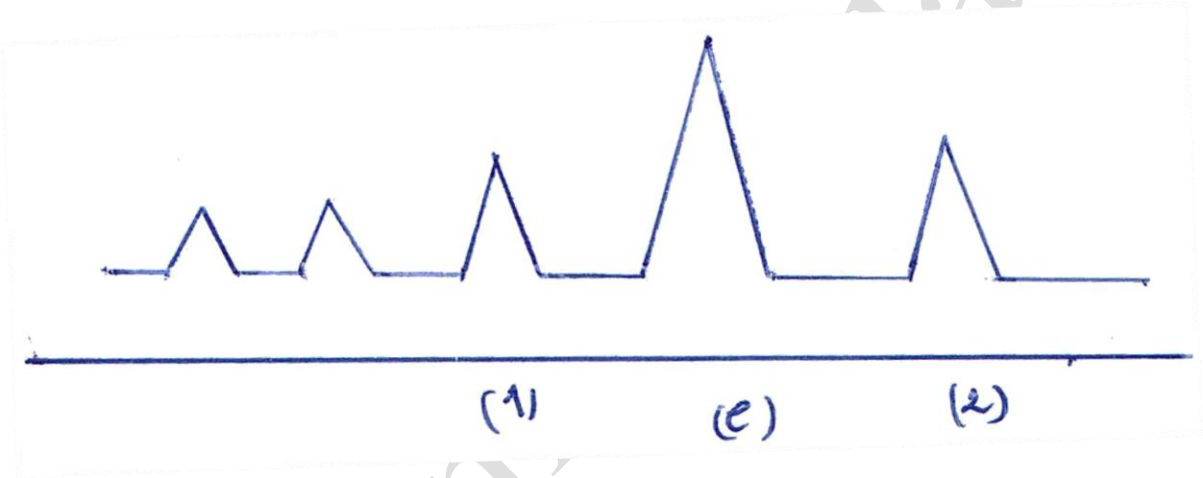
لدينا : $m_1=K_1A_1$ ، $m_2=K_2A_2$ ، $m_e=K_eA_e$

$$\frac{m1}{me} = \frac{K1A1}{KeAe} \Rightarrow \frac{K1}{Ke} = \frac{m1Ae}{meA1}$$

نسمي النسبة $\frac{K1}{Ke}$ب $K^1/_e$بمعامل الاستجابة النسبي

بالمثل نجد $K^2/_e=\frac{m2Ae}{meA2}$

في تجربة أخرى نحقن العينة لكن بتراكيز مجهولة للمركبين (1) و (2) ،نحقنها بوجود المعيار الداخلي والمعلوم التركيز فنجد :



في هذه الحالة لدينا :

$m'_2 = K_2A'_2$ ، $m'_1 = K_1A'_1$ ، $m'_e = K_eA'_e$

ومنه :

$$\frac{m'1}{m'e} = \frac{K1A'1}{KeA'e} \Rightarrow m'_1 = \frac{K1A'1}{KeA'e}\, m'_e = K^1/_e \frac{A'1}{A'e}\, m'e$$

بمأن $K^1/_e$ معلومة (من التجربة الأولى) كما أن A'_1 ، A'_e ، m'_e معلومة اذن :

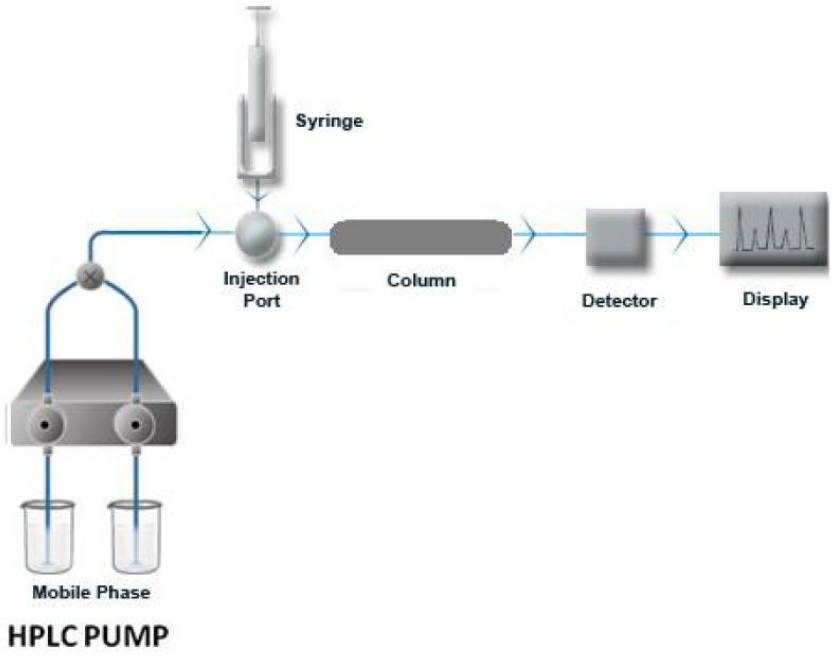
$$m'_1 = K^1/_e \frac{A'1}{A'e}\, m'e$$

وبالطريقة نفسها نجد :

$$m'_2 = K^2/_e \frac{A'2}{A'e}\, m'e$$

الفصل الرابع كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

4-1- المبدأ :في هذا الفصل ، نتحدث عن كروماتوغرافيا السائل الموصوفة بعالية الأداء ، والتي هي أيضا عالية الضغط ، والتي تعتبر الأكثر انتشارا واستخدام هذه الأيام ، لما لها من تطبيقات متنوعة ، وأدوات لتحسين عملية الفصل ، وصولا إلى المطلوب. ولعله من المفيد أن نستخدم نفس الأسلوب الذي استخدمناه في كروماتوغرافيا الغاز ، لشرح وتفصيل كروماتوغرافيا السائل ، وما يتعلق بها وهذا الأسلوب يتطلب بداية الحديث عن الجهاز المستخدم كوحدة واحدة ، ومن ثم يمكن التفصيل في أجزائه ومكوناته ، واحدة تلو الآخر ، مع التركيز على المكونات التي يمكن التحكم بها ، وتلك التي يعتبر فهمها جوهريا لاستيعاب عملية الفصل ومن الممكن النظر في الشكل التالي ، لتوضيح المكونات الأساسية في جهاز ال HPLC:



حيث يتم بداية ضخ الوسط المتحرك داخل العمود باستخدام مضخة تستطيع تحمل ضغوط عالية ، تتجاوز 5000 psi ، ومن ثم يتم حقن العينة المراد فصلها من خلال حاقن ، لتنتقل العينة إلى العمود، حيث تتم عملية الفصل ، ويقوم المكشاف بإعطاء إشارة لكل مكون من مكونات العينة ، لتظهر النتيجة على هيئة كروماتوجرام ، يبين العلاقة بين زمن المكوث وشدة الإشارة.

وعليه ، لا بد من فهم آلية عمل وأدوار كل مكون من تلك المكونات الأساسية ، التي يمكن تلخيصها بما يلي:

4-2- مكونات الجهاز :

1. المضخة عالية الضغط (high pressure pump).
2. الحاقن (injector).
3. العمود (chromatographic column).
4. المكشاف (detector)

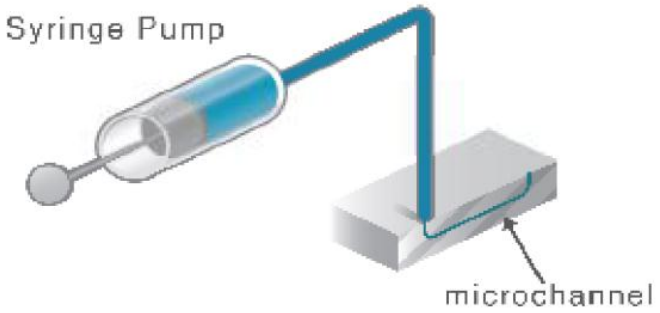
والآن لنتحدث عن كل مكون من هذه المكونات:

4-2-1- المضخة عالية الضغط: (high pressure pump)

هناك نوعان من المضخات عالية الضغط ، التي قد تصادفنا في أجهزة ال HPLC ، هما:

1- مضخة الحقنة: (syringe pump)

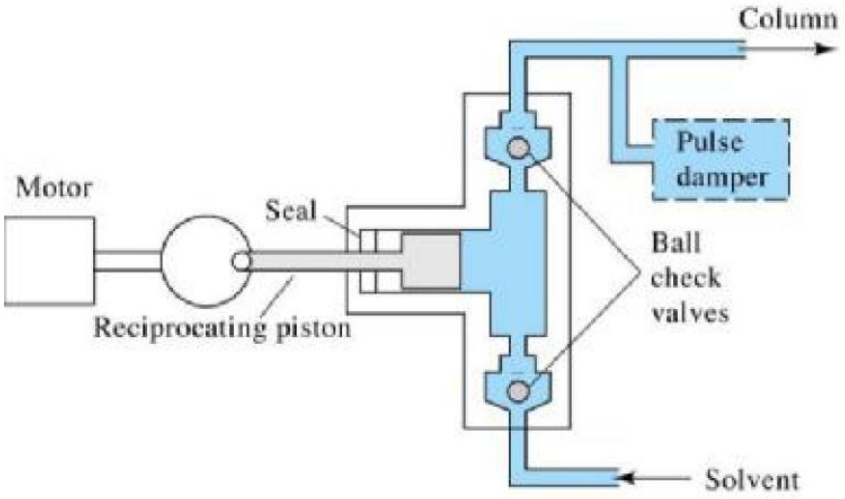
وهذا النوع من المضخات يستخدم بشكل هامشي في أجهزة ال HPLC العادية ، لكنه يجد بعض التطبيقات في الأجهزة المؤتمنة (autoanalyzers). ومن الإسم ، يمكن تخيل أن تلك المضخة تشبه الحقنة ، إلا أنها مصنوعة من الفولاذ الصلب المقاوم للصدأ (stainless steel) ، بينما يتم التحكم بالحاقن عن طريق موتور قوي:



والشكل التالي يوضح صورة لبعض مضخات الحقنة المتفاوتة في الحجم ، وأحد أشكال الموتور الذي يتحكم فيها:

2- المضخة الترددية: (reciprocatingpump)

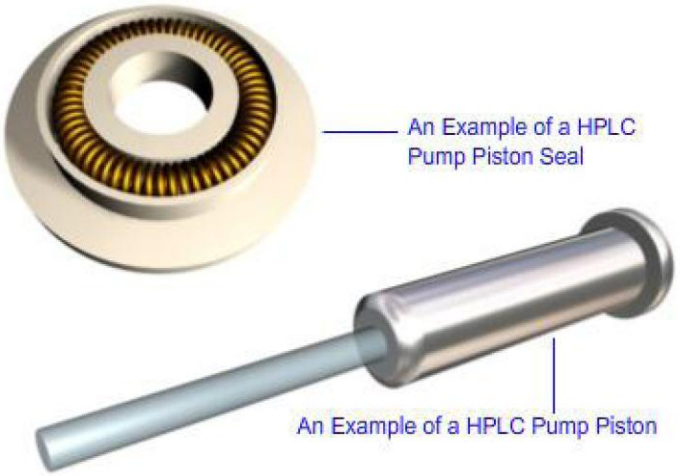
وهي المضخة المستخدمة تقريباً بشكل تام في أجهزة الHPLC والشكل التالي يوضح تركيبها:



حيث تتكون المضخة من المكونات التالية:

1 - الموتور الذي يقوم بتحريك المكبس الترددي:

2 - المكبس الترددي (piston):



الذي يقوم بدفع الوسط المتحرك تباعا ، ويحيط به خاتم لمنع التسرب (seal)

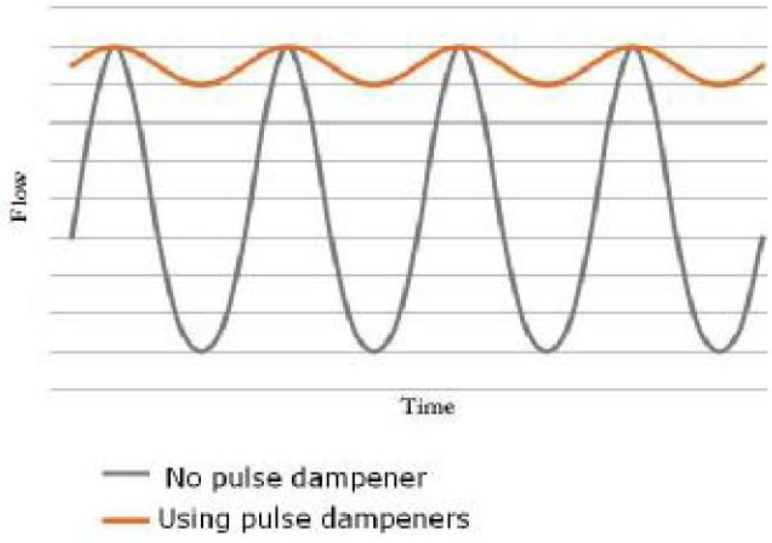
3 - صمامان: (two check valves)

عندما يعود المكبس إلى الخلف فإن الصمام المتواجد على خط الوسط المتحرك يسمح بمرور الوسط المتحرك ، بينما يغلق الصمام الآخر المؤدي إلى الحاقن والعمود خطوة ضغط منخفض ، أما عملية الضغط (تحرك المكبس إلى قلب المضخة) فينشأ عنها إغلاق الصمام ناحية الوسط المتحرك ، وفتح الآخر كي ينتقل الوسط المتحرك إلى الحاقن والعمود ، وهكذا. وعادة ما يكون الصمامان مصنوعان من مادة مقاومة للتأكل مثل الياقوت (sapphire) ، ويحتاج الصمامان إلى تغيير كل عدة أشهر أو سنوات ، تعتمد على درجة الاستخدام ، ونوع الوسط المتحرك ، ومدى قدرته على إحداث تأكل.

4- مخمد (مثبط) النبضات: (pulse dampers)

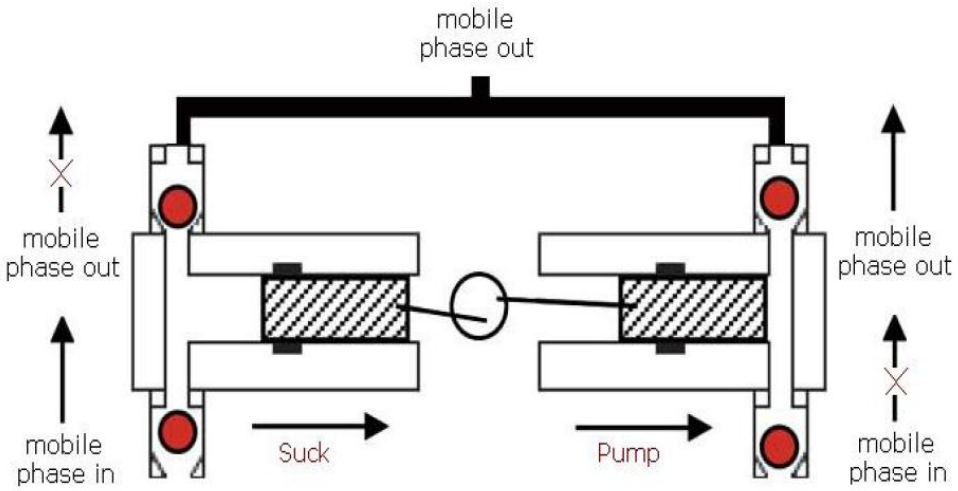
ما دام ضخ الوسط المتحرك يتطلب دورتين (دورة ضغط منخفض لسحب الوسط المتحرك ، ودورة ضغط عالي لدفعه جهة الحاقن والعمود) ، فإن الناتج يكون عبارة عن موجات دفع متتالية ، وليس سريانا ثابتا. لهذا يتم استخدام مخمد نبضات ، عبارة عن أنبوبة لولبية من الفولاذ:

أن استخدام مخمد النبضات يعتبر مفيد جدا في تخفيف حدة تغير معدل سريان الوسط المتحرك أثناء عملية الضخ ، وذلك لاختلاف المعدل أثناء عملية سحب الوسط المتحرك ، وعملية ضخه ، والشكل التالي يوضح المقصود:

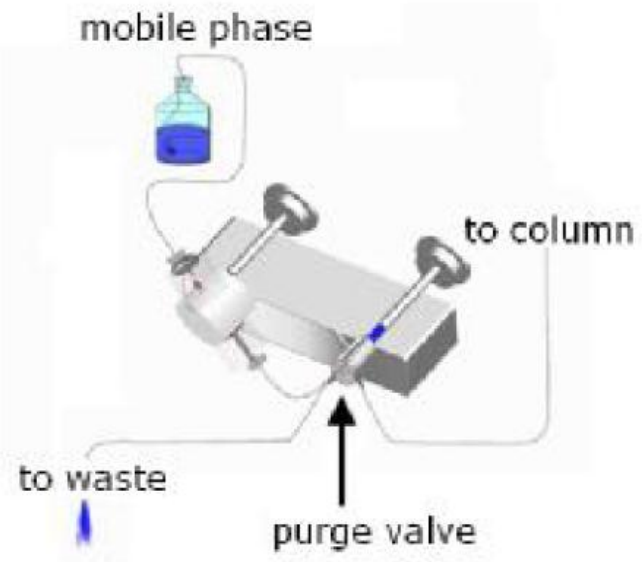


ويسمى هذا الشكل الذي يحتوي على مكبس واحد وصمامان، مضخة ذات رأس واحد (single headpump). وبالرغم من وجود مخمد النبضات إلا أن النبضات تكون واضحة إلى حد ما ، مما يجعل معدل سريان الوسط المتحرك غير مستمر مع الوقت. لذلك فإن أغلب المضخات من هذا النوع تكون مزدوجة الرأس ، أي تتميز بوجود مكبسين ، ومجموعتين من الصمامات ، كما في الشكل :

Moha



حيث أنه في الوقت الذي يسحب فيه المكبس إلى اليسار الوسط المتحرك (أي لا يضخ)، فإن المكبس الآخر إلى اليمين يكون في موضع الضخ ، وليس السحب ، والعكس صحيح. ويتناوب المكبسان العمل بانتظام، مما يقلل التغير في معدل سريان الوسط المتحرك. ومن الجدير بالذكر أن حجم الوسط المتحرك داخل المضخة صغير للغاية (في حدود 100-200 µl). لذلك عند ترك المضخة فترة من الزمن فإن المحلول الموجود داخلها يتطاير، وعليه عند تشغيل المضخة نجد أنها تدور، لكنها لا تضخ أي وسط متحرك. إن السبب الرئيس لهذا التصرف إنما يرجع لخاصية انضغاط وتمدد الهواء، حيث أن المكبس في دورة السحب يجبر الهواء على التمدد، وهي عملية أسهل من سحب الوسط المتحرك، أما في دورة الضخ فإن الهواء ينضغط، فتبدو المضخة أنها تعمل، لكنها لا تضخ أي محلول (ويمكن معرفة ذلك من الضغط المنخفض الذي تعانيه المضخة أثناء عملية الضخ).



لذلك وجب أن نتخلص من الهواء الموجود داخل المضخة ، ويتم ذلك عبر عملية تسمى priming ، حيث يوضع في طريق خط الوسط المتحرك صمام يمكن فتحه وشفط الهواء والوسط المتحرك من خلاله ، ومن ثم تعمل المضخة ، ونتأكد من ذلك من خلال تشغيلها لضخ معدلات عالية من الوسط المتحرك والمقدرة بحوالي : (5ml / min) مع ترك الصمام المذكور مفتوحا ،وأخيرا يتم تخفيض معدل الضخ واغلاق الصمام ، فتعمل المضخة بشكل عادي .

كما أنه من الضروري أن ننتبه إلى عدم استخدام أوساط متحركة حمضية أو قاعدية بشكل واضح ، أو تحتوي على كميات كبيرة من الأملاح ، لأن ذلك يؤدي إلى تأكل مكونات المضخة الداخلية وصماماتها. كما يجب تنظيف المضخة بعد انتهاء العمل عن طريق ضخ

Mohar

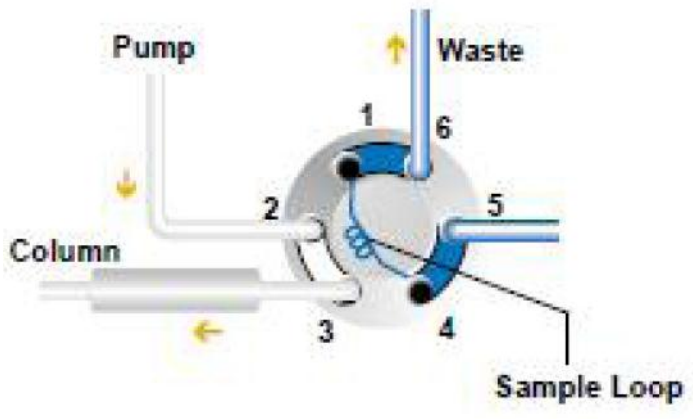
كميات وافرة من خليط 50% ماء و 50 %ميثانول ، على سبيل المثال. إن ترك الوسط المتحرك الذي يحتوي على أملاح أو أي مواد مسببة للتأكل داخل جسم المضخة يؤدي إلى تقصير عمرها بشكل كبير.

ولعل عدم توفر تكنولوجيا مناسبة لتصنيع مضخات جيدة يمكن استخدامها عند ضغوط عالية ، ربما كان السبب الرئيس في تأخر تقنية ال HPLC لعقود من الزمن.

2-2-4 - الحاقن: (injector)

الحاقن هو الجزء من الجهاز الذي يستخدم في تقديم العينة (بحجم معين) ليتم فصلها في العمود. ومن أشهر الحواقن المستخدمة لهذا الغرض ، ذلك الحاقن المعروف ب injector Rheodyne، والذي يظهر في الشكل التالي:

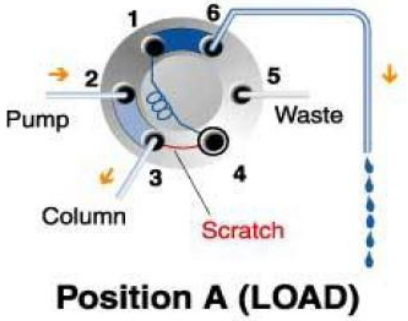
ويتميز هذا الحاقن بوجود ستة فتحات ، واحدة لحقن العينة ، والثانية للمضخة ، والثالثة للعينة الزائدة ، والرابعة موصولة بالعمود ، أما الخامسة والسادسة فيجمع بينهما أنبوبة ملف العينة (sample loop) ، كما في الشكل:



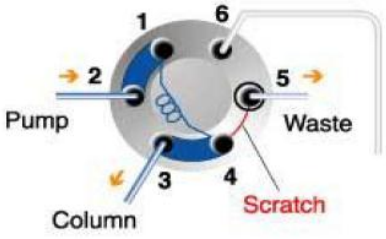
كما أن هناك موضعان ، لا بد من فهمهما جيدا ، حيث أنه في الوضع الأول يتم تحميل العينة في ملف العينة (أنبوبة رفيعة لها حجم ثابت معروف هو حجم العينة) ، كما في الأشكال التالية:

Mohamme

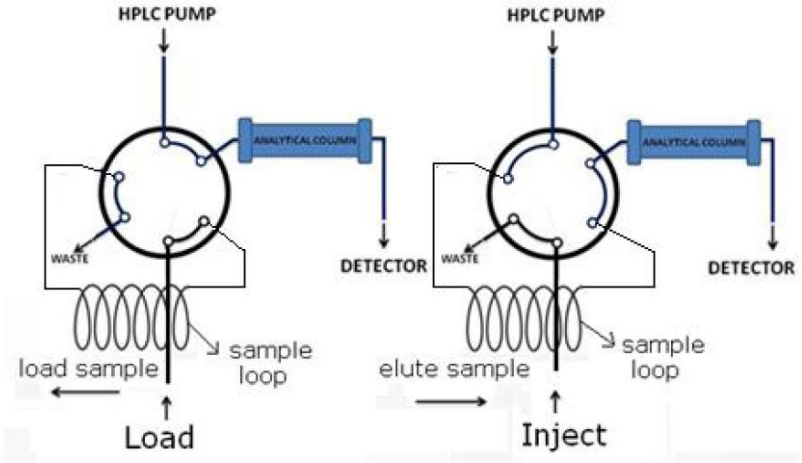
وهذ الوضع يظهر على الحاقن بإسم Load ، حيث تمتلئ أنبوبة العينة (sample loop) بالعينة ، بينما تتوجه الزيادة إلى ال waste ويكون ضخ الوسط المتحرك في هذه الحالة من المضخة إلى العمود دون المرور بالعينة. أما الوضع الآخر فهو وضع الحقن (Inject) وفيه يتم ضخ العينة إلى داخل العمود ليتم فصلها ، وذلك عبر تغيير مسار الضخ ليتم من المضخة إلى العينة ومن ثم العمود بحسب الشكل التالي:



Position A (LOAD)



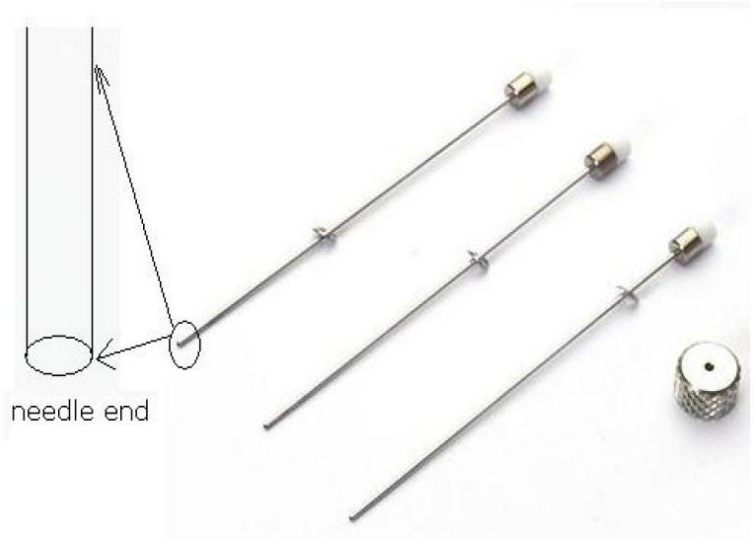
Position B (INJECT)



ويستطيع الحاقن التغيير بين الوضعين لاحتوائه على أسطوانة (تسمى rotor disc) ، فيها قنوات دقيقة يتغير موضعها بتغيير الوضع من Load إلى Inject ، كما في الشكل :

ويمكن ملاحظة تغير موضع القنوات في الوضعين بالنظر إلى الشكل أعلاه. كما أنه من الجدير بالذكر أن هذا ال rotor يكون مصنوع من مادة لها درجة من المرونة تسمى(vespel) كي تمنع أي تدفق للمحلول خارج الحاقن ، ولذلك ربما كانت من المكونات التي يجب تغييرها كل فترة ، عند ملاحظة تنقيط المحلول من جسم الحاقن. ويحدث ذلك بشكل واضح عند تكون قنوات جديدة ، نتيجة سوء الاستخدام ، أو استخدام إبرة مدببة ، بدلا من الإبرة الاسطوانية الخاصة بحاقن ال HPLC ويمكن ملاحظة تكون قنوات جديدة بالنظر إلى الشكل التالي ، حيث من الأسهل للمحلول الانتقال من خلالها ، وهو ما نلاحظه على صورة تسريب:

كما يبين الشكل التالي طبيعة إبرة الحقن ، حيث نلاحظ أنها ليست مدببة ، بل أسطوانية عند نهايتها:



ولا بد من تنظيف الحاقن ، عن طريق تفكيكه ، كل فترة ، إذ من الممكن تكون بعض الرواسب من العينات المختلفة ، وبالتالي التأثير على النتائج ، خاصة إذا لم يتم التنظيف لفترة طويلة ، بالذات عند استخدام عينات من مصادر شديدة التلوث.

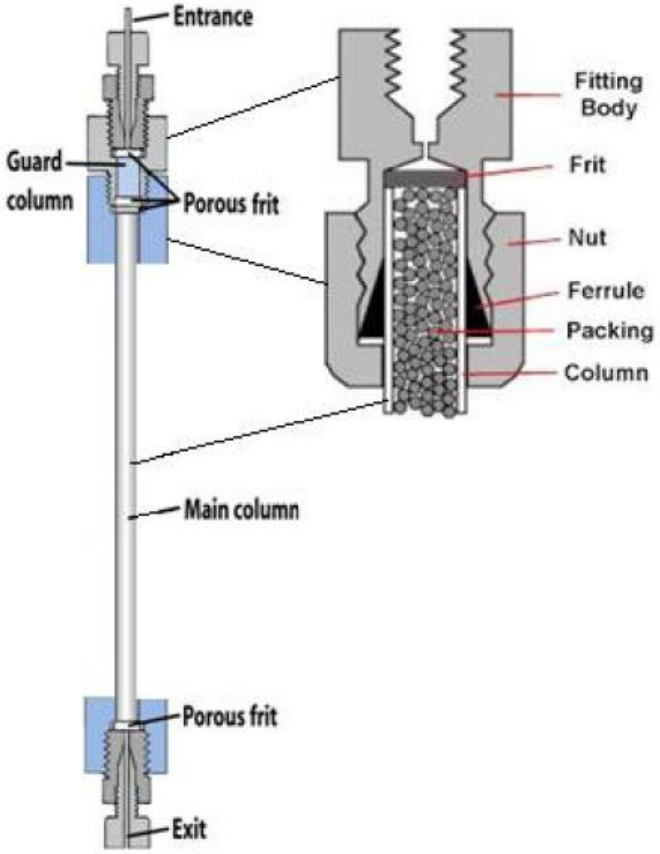
4- 2-3- العمود: (chromatographiccolumn)

تتميز الأعمدة المستخدمة في ال HPLC بأنها تكون مصنوعة دائما من الفولاذ غير القابل للصدأ ، وتكون سماكة جدرانه مناسبة لتحمل ضغوط تزيد عن 30 KPSI ، وهو ضغط أعلى من الضغط المستخدم ليس فقط في التحليل ، ولكن في تعبئة العمود أيضا. وفي حالة الأعمدة المستخدمة في التحليل الكيميائي ، فإن القطر الدارج هو 4.6mm ، بينما طول العمود يتراوح بين(5-25 cm) في العادة بينما قد يصل طول العمود إلى 40 cm ، وقطره إلى أكثر من 1 cm، لكن مثل هذه الأعمدة لا تستخدم لأغراض التحليل.

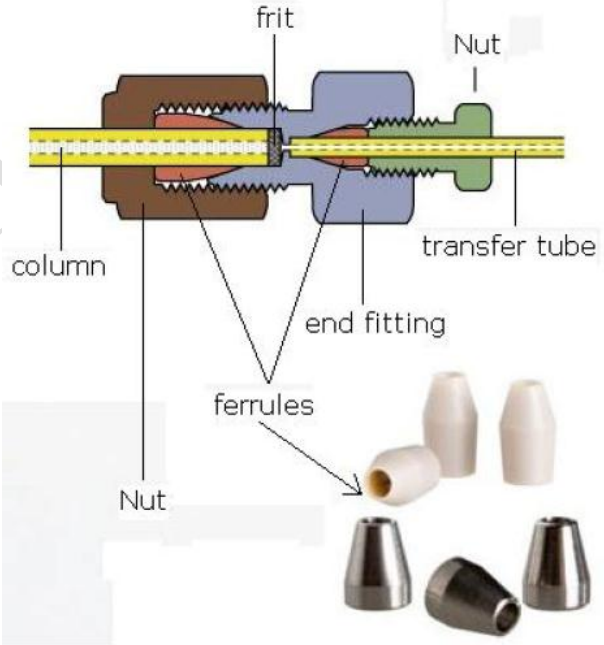
ويتوقف طول العمود على حجم حبيبات التعبئة ، إذ كلما قل قطر حبيبات التعبئة كلما كان طول العمود أقل ، وذلك بسبب زيادة الضغط المعاكس ، المصاحب لنقص حجم الحبيبات. والصورة التالية توضح هذا النوع من الأعمدة:

ويتكون العمود من الأنبوبة الرئيسية التي تحتوي على الوسط الثابت ، المثبت على حبيبات التعبئة ، ويستخدم مصفاتين مساميتين على طرفي الأنبوبة ، لمنع خروج الوسط الثابت والحبيبات الحاملة له ، عند ضخ الوسط المتحرك. أما الباقي فهي أدوات تثبيت من الفولاذ غير القابل للصدأ أيضاً ، والشكل التالي يوضح تفاصيل ذلك :

Mohammed Z



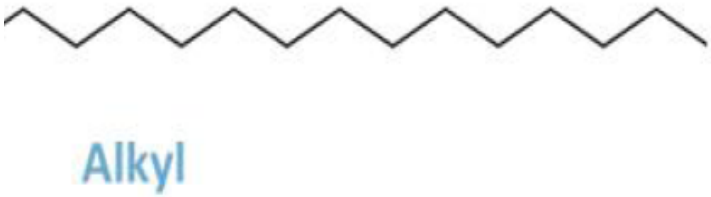
والأشكال التالية توضح تفاصيل التوصيلات الأساسية للعمود، حيث يجب عدم السماح بوجود أية فراغات، نتيجة التوصيل :

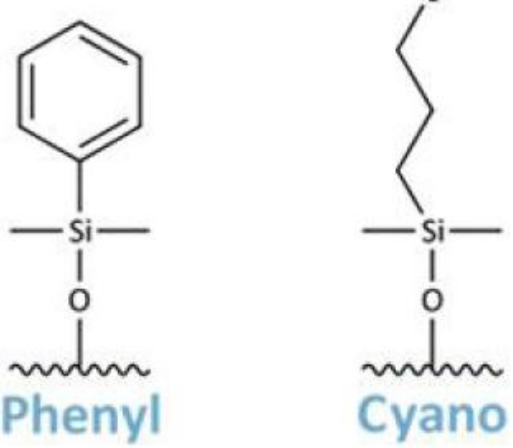


● **الوسط الثابت وأنواعه:**

1. **وسط ثابت قطبي (polar stationary phase):** وفي هذه الحالة نسمي هذا النوع من عملية الفصل كروماتوغرافيا السائلة ذي الطور العادي (NPLC) ، حيث يكون الوسط المتحرك بالضرورة سائلا غير قطبي. ومن الجدير بالذكر أن استخدام هذا النوع من الكروماتوجرافيا قليل نسبيا ، ولذلك لن نستفيض في شرح تفاصيله. ومن أمثلة الأوساط الثابتة التي تتبع هذا الصنف ، تلك التي تنتهي بمجموعات قطبية ، مثل:CN , OH , - NH2 , phenyl- وغيرها.

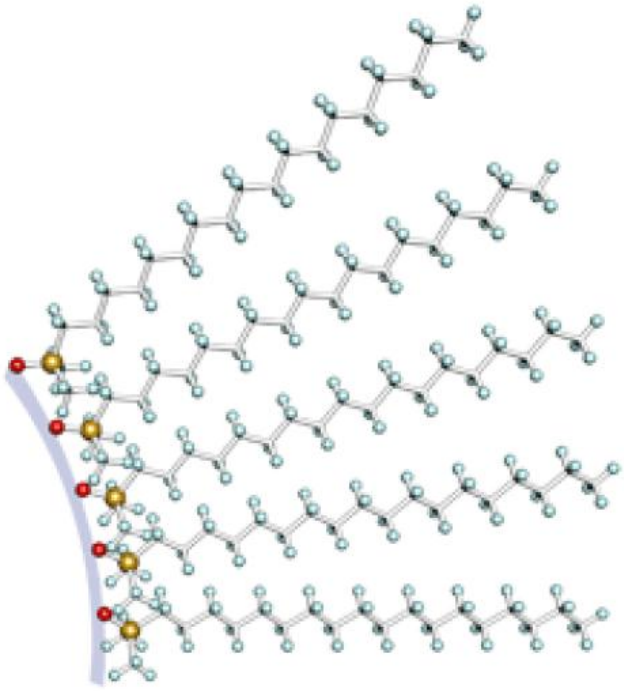
2. **وسط ثابت غير قطبي (non polar stationary phase) :**
وعادة ما يكون هذا النوع عبارة عن هيدروكربون سائل ومشبع عادي (غير متفرع) أي n-alkane ، مثل : C_3 ،C_8 أو C_{18} مع أن أغلب الأعمدة تستخدم ال C_{18} كوسط ثابت:



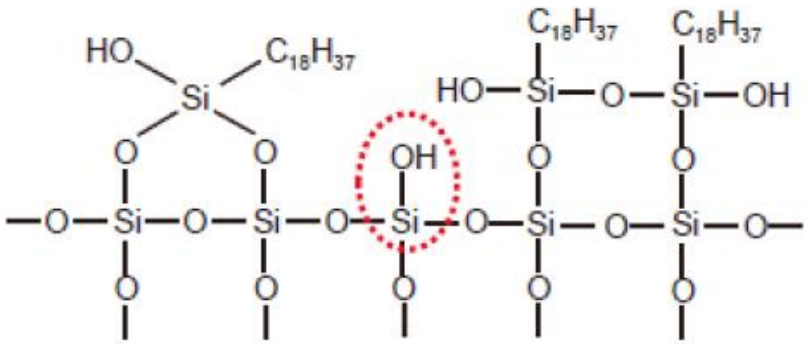


ومن الجدير بالذكر أن الوسط المتحرك في هذه الحالة يجب أن يكون قطبياً ، ذلك لأن الوسط الثابت والمتحرك يجب ألا يمتزجان. وتسمى الكروماتوجرافيا في هذه الحالة كروماتوغرافيا السائلة ذي الطور المعاكس (RPLC) ، وهو النوع السائد من عمليات الفصل باستخدام ال HPLC.

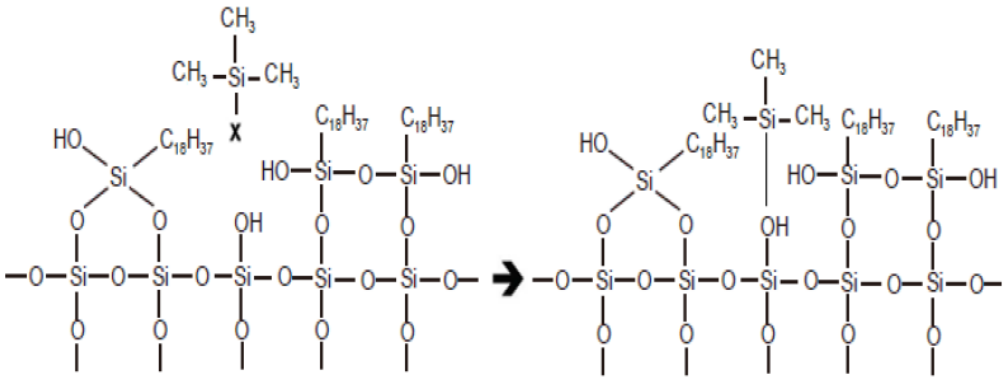
كما تجدر الإشارة إلى أن الوسط الثابت يجب أن يتصل كيميائيا بالحبيبات الحاملة له ، عن طريق روابط تساهمية حقيقية ، وذلك لمنع نزف الوسط الثابت أثناء ضخ الوسط المتحرك:



ويطلق على الكروماتوغرافي الذي يكون الوسط الثابت مرتبطاً بالحبيبات الصلبة مصطلح كروماتوغرافيا الوسط المرتبط (bonded phase chromatography) ، وهو السائد من الناحية العملية. كما يجب التأكد من عدم ترك أية مجموعات سيلانول (silanolgroupsSi - OH, -) غير مرتبطة ، لأن ذلك يؤدي إلى إمتصاص المواد المختلفة عليها ، مما يعقد ميكانزمات عملية الفصل (التجزئة) ، وقد ينشأ عنه اتساع غير مبرر في منحنى الإشارة ، أو حتى انقسام المنحنى ليعطي منحنيان (two peaks)بدلا من واحدة للمركب الواحد.



ويتم التخلص من مجموعات ال silanol المتبقية بقدر الإمكان عن طريق تفاعلها مع ال trimethylchlorosilane ، وهي عملية تسمى عملية التغطية ، أو capping -end :



وفي الحقيقة تزداد جودة العمود ، وتتحسن كفاءته ، كلما تخلصنا من عدد أكبر من مجموعات الهيدروكسيل ، لكن للأسف فإن سعر العمود يزداد أيضاً ، وبشكل كبير.

إن طول السلسلة الهيدروكربونية للوسط الثابت لها انعكاسات هامة على أداء العمود ، منها:

a) يزداد زمن المكوث بزيادة طول السلسلة الهيدروكربونية للوسط الثابت

b) تزداد كمية العينة التي يمكن فصلها باستخدام العمود بزيادة طول السلسلة الهيدروكربونية للوسط الثابت

c) تقل الكفاءة بزيادة طول السلسلة الهيدروكربونية للوسط الثابت ، وذلك لزيادة H_s نظرالزيادة d_s

وعليه يجب مراعاة ما سبق ، إذا كان لدينا الخيار في اختيار طول السلسلة الهيدروكربونية للوسط الثابت.

●اختيار نوع وتركيبة الوسط المتحرك:

بديهي أن اختيار الوسط المتحرك المناسب لعملية الفصل يعتبر الخطوة الجوهرية ، التي من المفترض أن تؤدي إلى النتيجة المطلوبة. وفي الحقيقة لا توجد طريقة علمية معتمدة ومباشرة لمعرفة ماهية الوسط المتحرك المناسب ، إلا أن هناك خطوات يمكن اتباعها للوصول إلى نوع وتركيبة هذا الوسط ولنبدأ بداية بالتعرف على كيفية حساب قطبية أي وسط متحرك يتكون من مادتين أو أكثر ، حيث يمكن القول أن:

$$P'_{AB} = \phi_A P'_A + \phi_B P'_B$$

حيث أن: P'_{AB} يعبر عن قطبية الوسط المتحرك الناشئ عن الخليط من A و B ، أما ϕ_A فتعبر عن النسبة المئوية للمذيب A و P'_A تعبر عن معامل قطبية المذيب النقي A ، أما ϕ_B فتعبر عن النسبة المئوية للمذيب B ، و P'_B تعبر عن معامل قطبية المذيب النقي B.

والآن بمعلومية معاملات القطبية للمذيبات المكونة للوسط المتحرك والنسبة المئوية لكل مذيب ، فإنه يمكن حساب معامل قطبية الوسط المتحرك للخليط.

فمثلا ، إذا تم تكوين وسط متحرك ، عن طريق خلط 40% من الميثانول (معامل القطبية للميثانول النقي هو 5.1) مع 60% من الماء (معامل القطبية للماء النقي هو 10.2) ، فإن معامل القطبية للخليط الناتج يكون:

$$P' (mixture) = 0.40\times 5.1 + 0.60\times 10.2 = 8.16$$

وهكذا يمكن حساب معامل القطبية لأي وسط يتكون من مادتين أو أكثر. ويبين الجدول التالي معامل القطبية لبعض المذيبات المشهورة وإن كنا سنركز في دراستنا على المذيبات ذات الطبيعة القطبية (أي المحبة للماء والتي تختلط معه) ، ويحتوي الجدول على عمود يظهر قوة المذيب (strength eluent) ، وهي قيمة مفيدة عند استخدامها في كروماتوغرافيا ال LSC ، التي لن ندرسها في هذا الفصل:

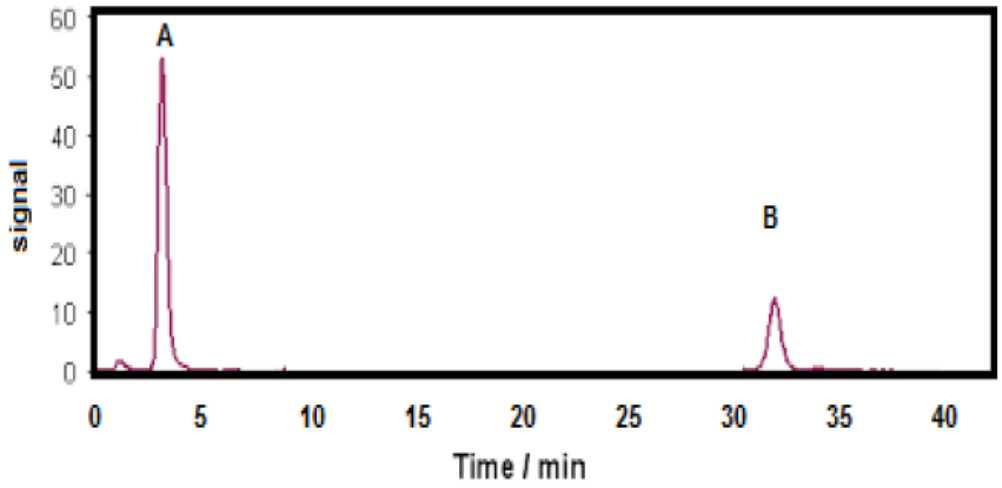
Mohammed zidane

Solvent	Polarity Index, P'	Eluent Strength,[c] ϵ^0
Cyclohexane	0.04	−0.2
n-Hexane	0.1	0.01
Toluene	2.4	0.29
Diethyl ether	2.8	0.38
Tetrahydrofuran	4.0	0.57
Chloroform	4.1	0.40
Ethanol	4.3	0.88
Methanol	5.1	0.95
Acetonitrile	5.8	0.65
Ethylene glycol	6.9	1.11
Water	10.2	Large

إن اختيار تركيبة الوسط المتحرك التي تعطي معامل قطبية مناسبة يعتبر جوهرية لإتمام عملية الفصل بصورة ناجحة ، حيث قام السيد Knox ببناء المعادلة التالية التي يمكن استخدامها في عمليات الفصل التي تستخدم ال RPLC. حيث وجد أن:

$$\text{Log}\,\frac{\text{K'2}}{\text{K'1}} = \frac{(P'2-P'1)}{2}$$

وتشير هذه المعادلة إلى نتيجة هامة للغاية ، حيث يمكن بداية حقن المواد القياسية واحدة تلو الأخرى ، وفصلها باستخدام وسط متحرك معين (يتم حساب معامل قطبيته) ، وبالتالي معرفة موضع زمن مكوث كل منها عن طريق معرفة K' الخاص بكل منها ، بعد ذلك يتم ترتيبها ، وبناء برنامج الفصل المناسب ، أو ببساطة عن طريق تغيير قطبية الوسط المتحرك بالطريقة المذكورة. فمثلا ، المطلوب فصل المركبين AوB من بعضهما البعض باستخدام وسط متحرك ، يتكون من خلط 40% من الميثانول (معامل القطبية للميثانول النقي هو 5.1) مع 60% من الماء (معامل القطبية للماء النقي هو 10.2) ، أي أن قطبية الوسط المتحرك هي 8.16 ، كما تم ايجادها مسبقا. وقد حصلنا على الكروماتوجرام التالي:



والآن لنفترض أننا نرغب في تحريك المركب B ، ليخرج عند زمن مكوث يساوي 6 دقائق ، فما العمل؟ بداية نحسب قيمة ال K' لB عند زمن مكوث المركب (32min في الشكل) من العلاقة ، على فرض أن (t_m=1min):

$$K'_{B,1} = \frac{tR1-tm}{tm} = \frac{32-1}{1} = 31 \quad min$$

كما نستخدم نفس العلاقة لحساب قيمة $K'_{B,2}$ ، عند الزمن المرغوب (6 min)

$$K'_{B,2} = \frac{tR2-tm}{tm} = \frac{6-1}{1} = 5 \quad min$$

ومن ثم نستخدم معادلة السيد Knox لمعرفة تركيبة الوسط المتحرك اللازمة،بمعلومية التركيبة الأصلية:

$$\text{Log}\,\frac{K'2}{K'1} = \frac{(P'2-P'1)}{2}$$

$$\text{Log}\,\frac{5}{31} = \frac{(P'2-8.16)}{2}$$

ومنها نجد أن:

$$P'_2 = 6.58$$

أي أن قطبية الوسط المتحرك اللازمة لإجبار المركب B على الخروج من العمود عند زمن مكوث يساوي ستة دقائق هي 6.58،في هذه الحالة نحاول ايجاد تركيبة الوسط المتحرك الذي قطبيته هي 6.58؟ وذالك باستخدام المعادلة السابقة لحساب ذلك:

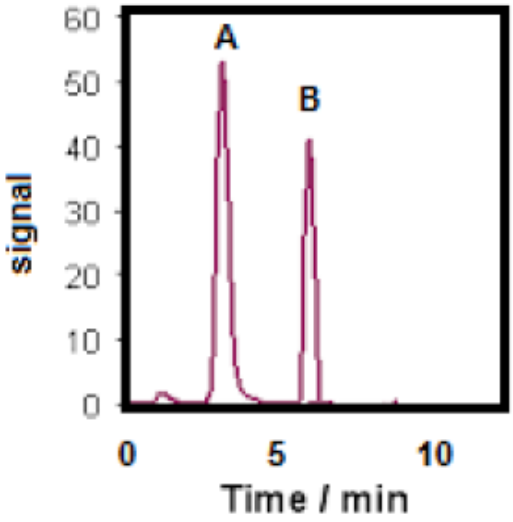
$$P'AB = \phi methP'meth + \phi watP'wat$$

$$6.58 = x\times5.1+(1-x)\times10.2$$

ومنها يمكن حساب قيمة x:

$$X = 0.71$$

أي أن نسبة الميثانول أصبحت 71%، وعليه تكون نسبة الماء 29% ، أي أن تركيبة الوسط المتحرك اللازمة لتحريك المركب B من زمن مكوث 32min ، إلى زمن مكوث 6min هي :71 % methanol / 29 % water، و باستخدام الوسط المتحرك الجديد نحصل على الكروماتوجرام التالي:



وهي نتيجة ممتازة بالمقارنة مع عملية الفصل الأولى. وفي المحصلة ، من الواضح أنه يمكننا تحريك منحنى الإشارة أو زمن المكوث لأي مادة ، بشكل علمي ، بمجرد تغيير تركيبة الوسط المتحرك. لكن تجدر الإشارة إلى أنه في بعض الأحيان يمكن أن نحصل على قيم غير معقولة لقطبية الوسط المتحرك اللازمة، كأن نحصل على قطبية أقل من 5.1 ، أو أكثر من 10.2، وهذا يدل على أنه لا يمكن استخدام هذا الوسط المتحرك بأي نسبة كانت للحصول على عملية الفصل المطلوبة، أو بمعنى آخر يجب تغيير نوع الوسط المتحرك ذاته. ودائما يمكن استخدام الوسط المتحرك لإحداث التغيير المطلوب إذا كانت تركيبته اللازمة تقع بين معاملي القطبية لمكوناته النقية وفي حالتنا هذه بين ال 5.1 وال 10.2 .

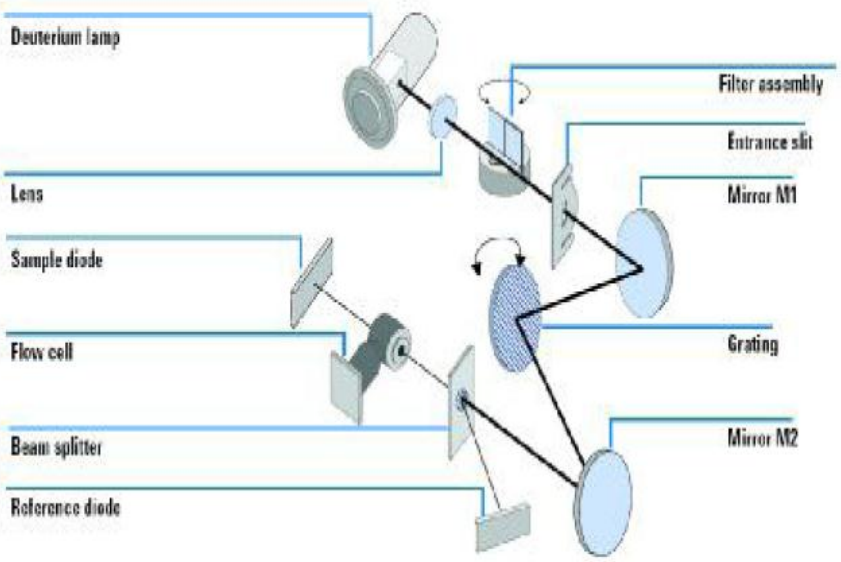
4-2-4- المكاشف: detectors

هناك عدة أنواع من المكاشيف المستخدمة في ال HPLC ، منها ما هو قائم على أساس الأطياف ، أو معامل الانكسار ، أو طيف الكتلة وغير ذلك. ويعتمد نوع المكشاف الناجح على طبيعة المكونات المراد فصلها ، حيث نستخدم الامتصاص إذا كانت الجزيئات تمتص والانبعاث إذا كانت تعطي وميضا ، وهكذا. وفيما يلي بعض أشهر أنواع المكاشيف المستخدمة:

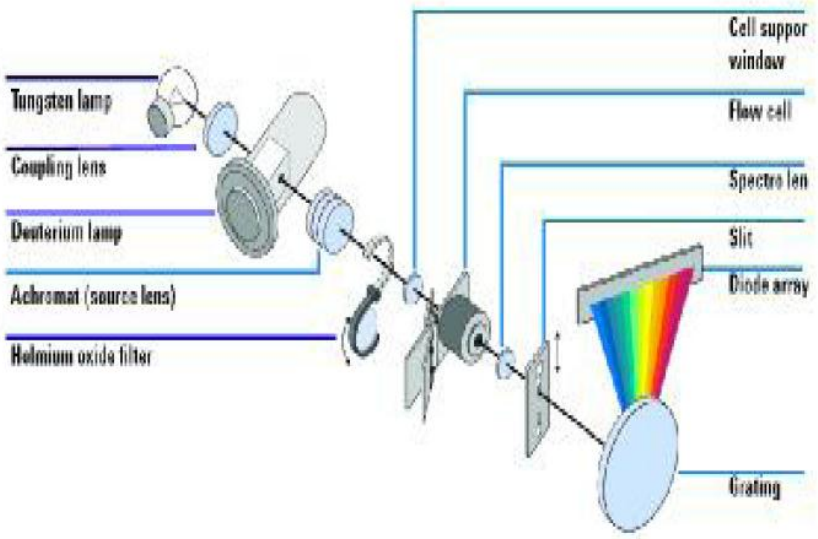
1- **مكشاف الامتصاص في منطقتي الأشعة المرئية وفوق البنفسجية:**

والممثل بالشكل التالي :

Mohammed Zidane



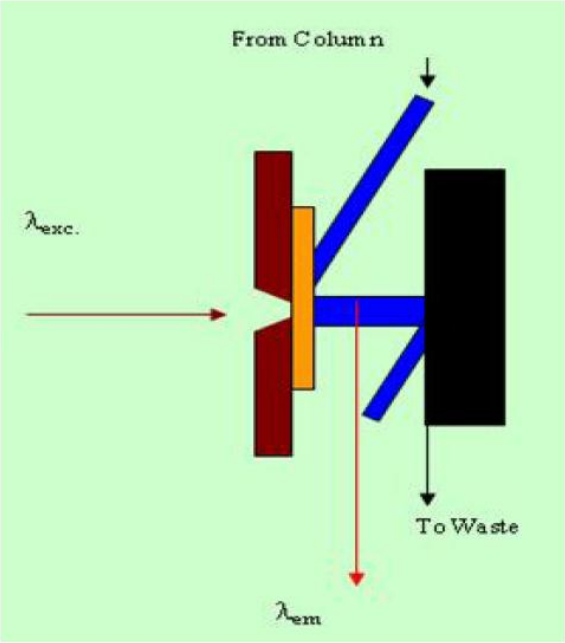
ومن الممكن أن يحتوي الجهاز على مكشاف متعدد القنوات مثل ال Photodiode array وذلك كما يلي:



ومن الجدير بالذكر أن هذه الأنواع من المكاشيف تعتبر الأكثر شيوعاً.

2- مكشاف الفلورة:

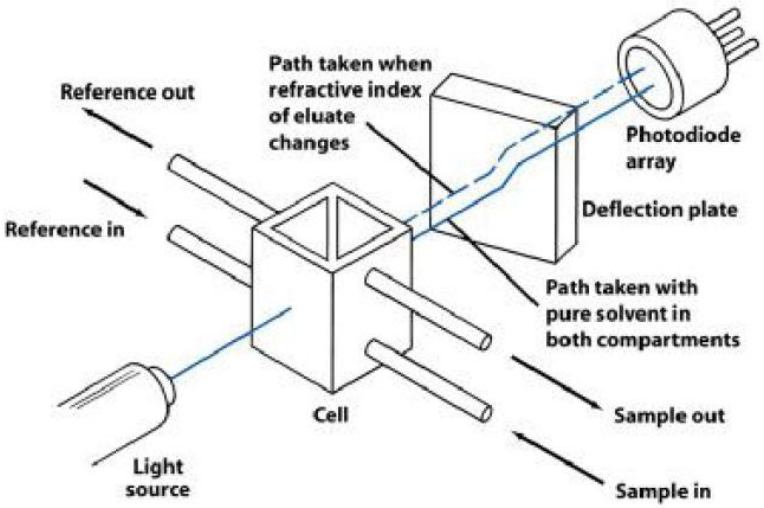
ويستخدم عادة للمركبات التي تعطي فلورة ، وهو حساس للغاية:



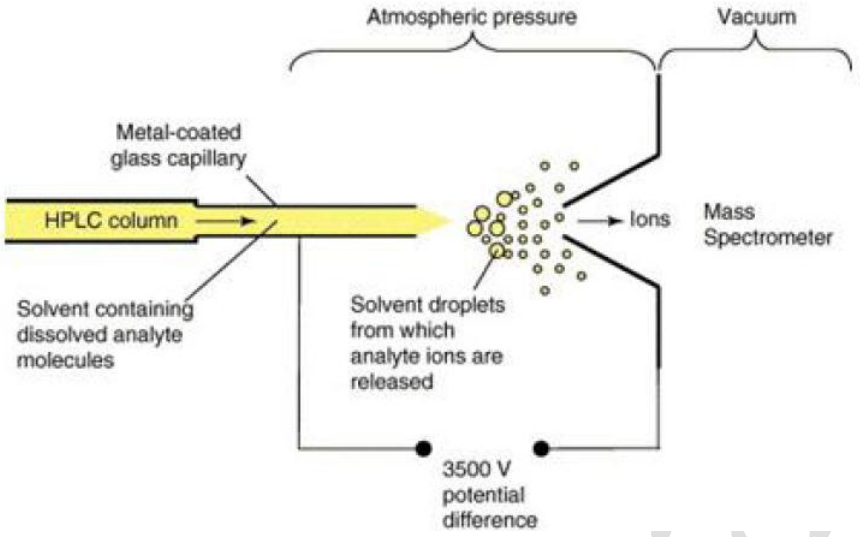
3- مكشاف معامل الانكسار:

وهو مكشاف ممتاز إذ يتوقف عمله على التغير في معامل الانكسار في وجود المادة المفصولة بالمقارنة مع محلول الوسط المتحرك النقي. ويعتبر هذا المكشاف واسع التطبيق نظرا لأن وجود أي مادة مع الوسط المتحرك ، يغير من معامل انكسار الوسط المتحرك وبالتالي يعطي إشارة لوجود المادة وتركيزها. إلا أنه للأسف ، فإن حساسية هذا النوع من المكاشيف قليلة نسبيا

4- مكشاف طيف الكتلة:

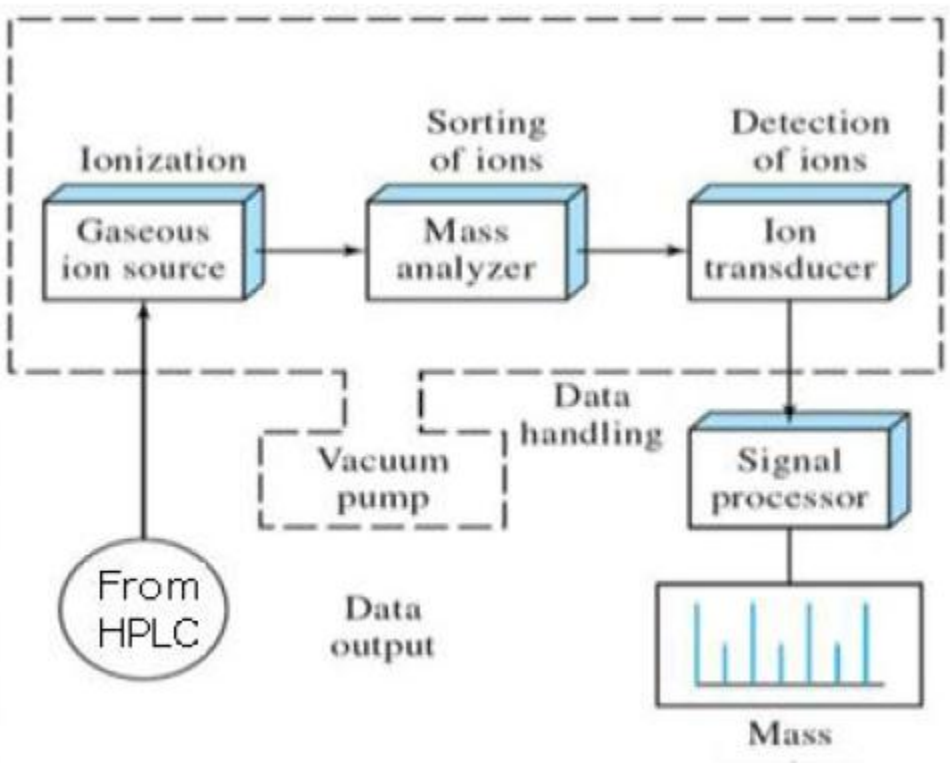


وهو من أفضل أنواع المكاشيف ، إذ يعتبر من المكاشيف المميزة التي نستطيع باستخدامها التأكد من ماهية المركب ، وبدرجة شبه يقينية، إلا أنه للأسف غالي الثمن ، ويحتاج لخبرة في التشغيل والتفسير ، وكذالك يحتاج أيضا إلى صيانة بشكل مستمر.



من الجدير بالذكر أن المحلول الخارج من عمود الفصل يتم تحويله - عادة - إلى رذاذ كهربية (electrospray) ، ليتحول إلى قطرات صغيرة جدا ، يتطاير المحلول المكون لها بفعل الضغط المنخفض للغاية ، ومن بعدها يبدأ عمل مطياف الكتلة كالمعتاد: تأيين ، تسريع فصل ، ومن ثم كشف وتقدير:

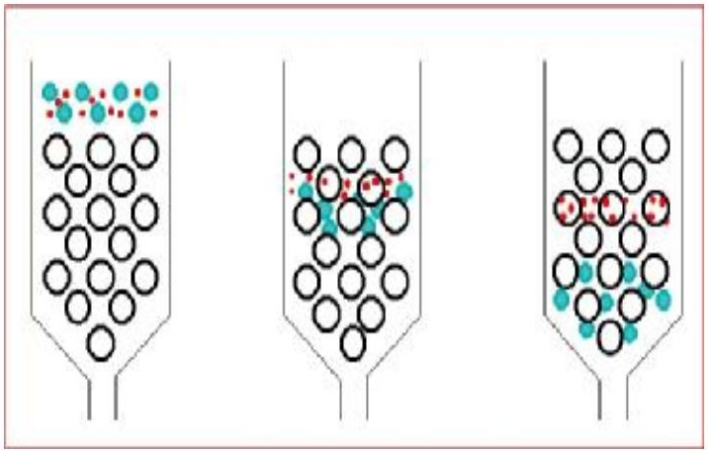
أما مكشاف مطياف الكتلة ، فيشمل - كما هو معلوم - المكونات التالية:



كما توجد أيضا مكاشيف أخرى تستخدم في HPLC ، مثل المكاشيف الكهروكيميائية (الأمبيرومترية تحديدا) وغيرها.

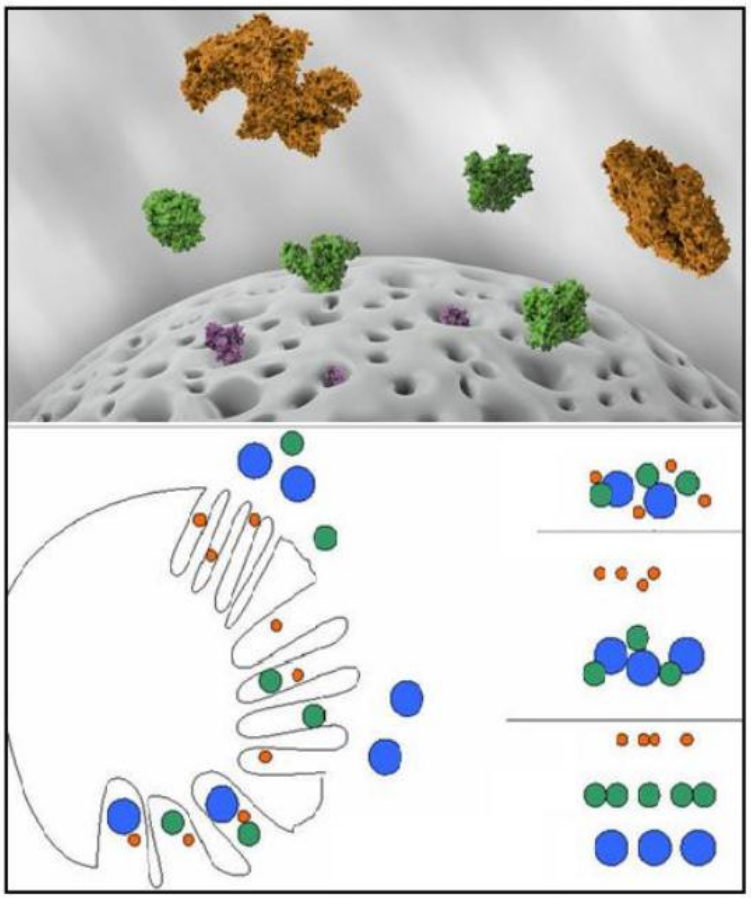
الفصل الخامس كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي (SEC ,size exclusion chromatography)

1-5 - المبدأ: في هذا النوع من كروماتوغرافيا السائل ، تتم عملية فصل مكونات العينة بناء على حجم الجزيئات ، وليس قطبيتها أو أي خاصية أخرى. ولذلك يمكن تسميتها أيضا بكروماتوغرافيا التخلل (GPC,gel permeation chromatography) ، وأيضا يطلق عليها اسم كروماتوغرافيا الترشيح (GFC ,gel filtration chromatography) ، وذلك نظرا لتشابهها مع عملية الترشيح المعروفة والتي تفصل المكونات بناء على حجومها. وتستخدم هذه التقنية بشكل واسع لفصل المركبات كبيرة الحجم (أي التي لها كتلة مولية كبيرة قد تصل من عدة آلاف إلى الملايين من وحدات الكتلة الذرية). والشكل التالي يوضح مفهوم عملية الفصل المذكورة:



ومن الجدير بالذكر أن الجزيئات الأكبر تغادر عمود الفصل بشكل أسرع ، بينما تقضي الجزيئات الأصغر وقتا أطول في العمود. ذلك ببساطة لأن الوسط الثابت المستخدم مسامي ، ويتميز بمدى معين من المسامية ، وعليه فإن المركبات التي تكون أكبر من المسامات ، لا تستطيع الانتقال عبرها ، وبالتالي تنتقل مباشرة مع الوسط المتحرك ، ولا تقضي أي وقت في الوسط الثابت. أما الجزيئات الصغيرة التي هي أصغر من المسامات، فإن جميع المسامات في حبيبات الوسط الثابت متاحة لها، وبالتالي تسير من خلال الوسط الثابت ببطء شديد. وتتفاوت بعد ذلك الجزيئات في حجومها وبالتالي عدد أو نسبة مسامات الوسط الثابت المتاحة لها ، بحيث انه كلما زادت تلك النسبة كلما زاد زمن مكوثها ، والشكل التالي يوضح ذلك:

Mohammed Ouane



2-5 خصائص الوسط الثابت:

يختلف الوسط الثابت في هذا النوع من الكروماتوجرافيا عن الأوساط الثابتة في التقنيات الأخرى ، من ناحية الشكل والمضمون ، حيث يتميز بما يلي:

1- يتكون من حبيبات صلبة لها مدى معين من المسامية ، فيمكن الحصول عليها مثلا بمدى°50-100A ، أو من°100-200A، أو غير ذلك ، حيث أن كل درجة أو مدى مسامية يكون قادرا على فصل مدى من حجوم الجزيئات (أو مدى من الكتل المولية).

2- يشبه الهلام ، ولهذا يطلق عليه لفظ هلام أو gel .

3- لا يحدث أي نوع من التفاعل مع مكونات العينة أو الوسط المتحرك.

4- خامل.

5- الحبيبات هي نفسها الوسط الثابت ، أي أنها ليست مغطاة بأي مادة أخرى

3-5 خصائص الوسط المتحرك:

1- يجب أن يكون قادرا على إذابة مكونات العينة .

2- يجب أن يكون قادرا على تبليل (ترطيب) (wetting) الوسط الثابت ، وذلك كي لا تكون هناك

أية معيقات لانتقال مكونات العينة بينهما.

3- يجب أن يكون متوافقا مع المكشاف، بمعنى أنه لو كان المكشاف يقيس الامتصاص مثلا في منطقة الأشعة المرئية ، فيجب ألا يمتص الوسط المتحرك في هذه المنطقة وعادة ما يتم رسم حجم الوسط المتحرك (وليس زمن المكوث) اللازم لمغادرة مكونات العينة مع الإشارة.

فإذا كان الحجم الكلي للعمود يساوي Vt فإنه:

$$Vt = Vg + Vi + Vo$$

حيث أن Vg هو حجم الحبيبات الصلبة ، و Vi هو حجم المسامات داخل الحبيبات الصلبة، و Vo هو الحجم الموجود بين الحبيبات المختلفة.

ومن ذلك يمكن تبين الحالات التالية ، على اعتبار أن Ve هو حجم الوسط المتحرك اللازم لمغادرة مكون ما لعمود الفصل :

1- إذا كان حجم الجزيئات أكبر من حجم أكبر مسام ، فإن الجزيئات لا تقضي أي وقت

في الوسط الثابت وبالتالي يكون

$$Ve = Vo$$

2- إذا كان حجم الجزيئات أصغر من حجم أصغر مسام ، فإن الجزيئات تقضي وقت

طويل في الوسط الثابت وبالتالي يكون:

$$Ve = Vi + Vo$$

3- الجزيئات التي لها حجوم بين الحالتين المذكورتين أعلاه ، يتاح لها نسبة من مسامات

الوسط الثابت تتناسب مع حجومها ، وبالتالي يمكن القول:

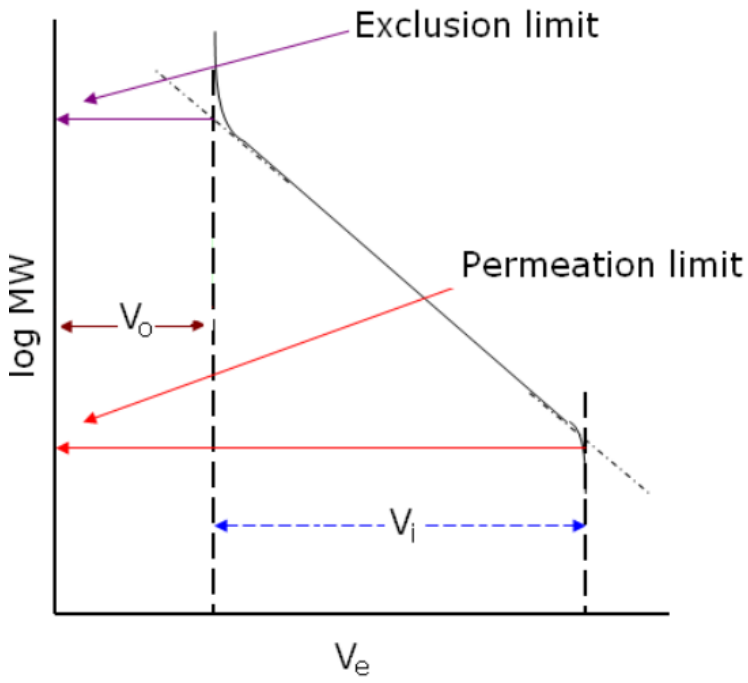
$$Ve = KVi + Vo$$

حيث أن K تتوقف على توزيعة المسامات داخل الوسط الثابت ، وبالتالي يمكن أيضا القول أن:

- عندما $K = 0 \leftarrow$ يكون هناك استبعاد تام
- عندما $K = 1 \leftarrow$ يكون هناك استبقاء تام
- عندما $0 < K <> 1 \leftarrow$ يمكن فصل المركبات بعضها من بعض بحسب توزيعة المسامات في الوسط الثابت

والشكل التالي يوضح الكروماتوجرام الذي يمكن الحصول عليه

Mohammed zidane



أما حد الاستبعاد (exclusion limit) فهو الكتلة المولية التي بعدها (أكبر منها)لا يكون هناك أي مكوث في العمود ، بينما حد التخلل (permeation limit) فيشير إلى الكتلة المولية التي تكون جميع المكونات التي كتلتها المولية أقل منها ، لها نفس زمن المكوث وبالتالي تحتاج لنفس الحجم من الوسط المتحرك. وفي الحالتين (الاستبعاد والتخلل) يكون هناك منحنى إشارة واحد لجميع المكونات التي تكون كتلتها المولية أكبر من حد الاستبعاد ، ومنحني إشارة واحد لجميع المواد التي كتلتها المولية أصغر من حد التخلل. بينما المواد التي بين الحدين ، يتم فصلها ، وتعطي كل مادة منحني إشارة خاص بها.

وعادة ما يتم تحديد مسامية الوسط الثابت اللازمة لعملية الفصل ، وبالتالي عمود الفصل ، ومن ثم يتم حقن مواد قياسية معلومة الكتل المولية (ومناسبة للمسامية والعمود المختار) ، وتكون المواد القياسية عادة بوليمرات بولي ستايرين سالبة الشحنة

(polystyrene , anionic form polimeric) ، حيث يتم بناء المنحنى الخطي ، كما في الشكل أعلاه. بعدها يتم حقن العينة وبالتالي تحديد الكتل المولية لمكوناتها من الشكل الناتج.

ومن أهم التطبيقات لهذا النوع من الكروماتوغرافيا ، فصل وتحديد الكتل المولية للبوليمرات الصناعية المختلفة ، وكذلك الجزيئات الحيوية كالبروتينات بأنواعها ، وال DNA ، وغير ذلك من المركبات ذات الكتل المولية الكبيرة.

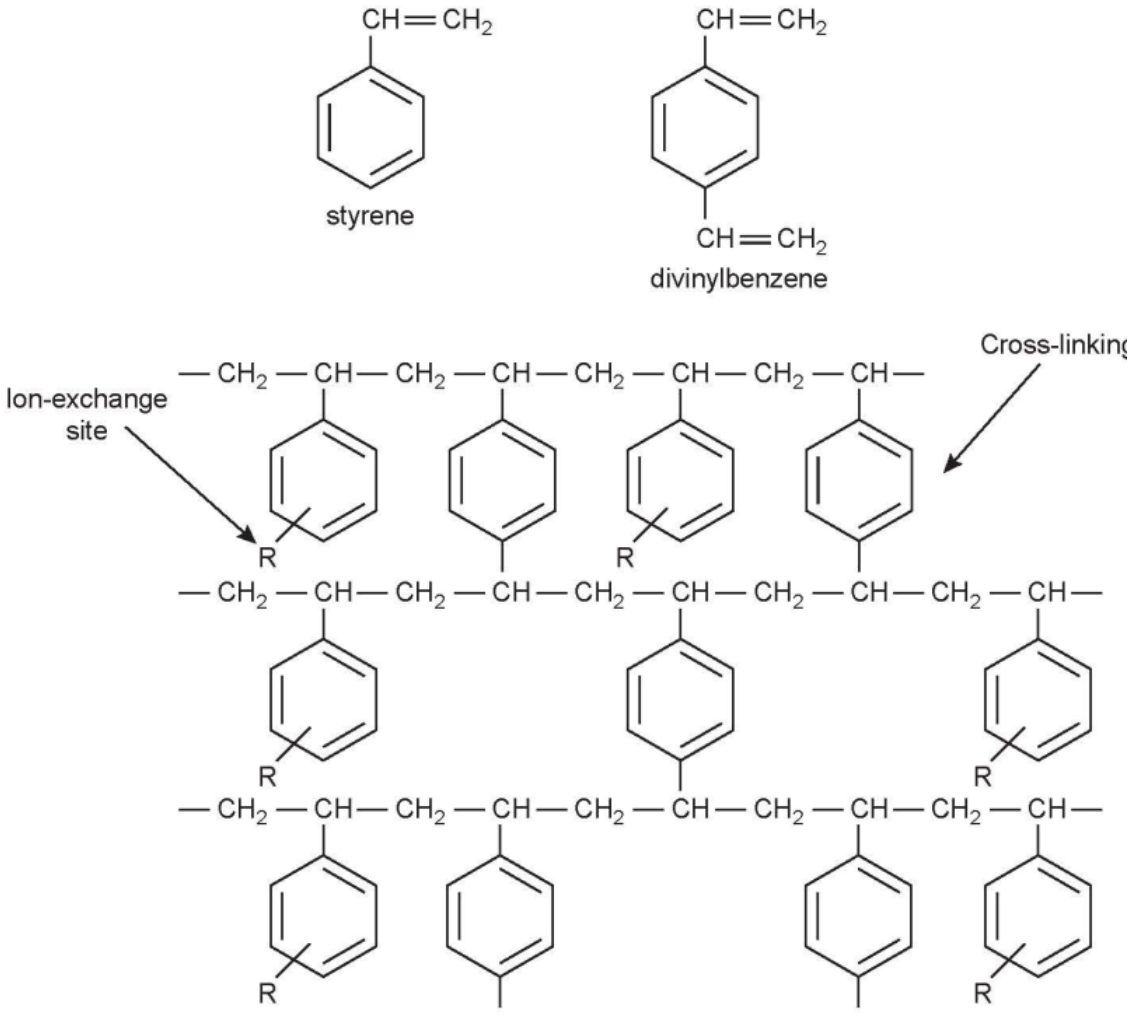
الفصل السادس كروماتوغرافيا التبادل الأيوني : Ion exchange chromatography

6-1- مقدمة :

إن كروماتوغرافيا التبادل الأيوني شكلا من أشكال الكروماتوغرافيا (سائل –صلب) التي تسمح بفصل الكاتيونات والأنيونات الموجودة في المحلول (الطور المتحرك)، وذلك عن طريق مبادلتها بأيونات أخرى مرتبطة بطور ثابت (طور المبادل الأيوني)، وهناك العديد من المبادلات الأيونية الطبيعية والصناعية.

6-2- مبدأ كروماتوغرافيا التبادل الأيوني :

تعتمد هذه التقنية من الكروماتوغرافيا على الطور الساكن الذي يتألف من راتنج(رزين)بوليميري ذي ربط تشابكي (تصالبي) ويكون عادة ثنائي فنيل بنزن ذي ربط تشابكي من البولي ستيرين مع مجموعات وظيفية أيونية معلقة تساهميا كما في الشكل (6-1)



الشكل (6-1)

تكون الأيونات المضادة لهذه الشحن المثبتة متحركة ويمكن أن تستبدل بأيونات أكثر ألفة لمواقع التبدل. وتقع راتنجات (رزينات) التبادل الأيوني في أربعة صفوف :

1. مبادلات كاتيون حمض قوي
2. مبادلات كاتيون حمض ضعيف
3. مبادلات آنيون أساس قوي
4. مبادلات آنيون أساس ضعيف

ويتضمن الجدول (6-1) قائمة بعدة راتنجات (رزينات) تبادل آيوني شائعة.

جدول (6-1) راتنجات (رزينات) تبادل آيوني شائعة

Type	Functional Group	Examples
strong acid cation exchanger	sulfonic acid	$-SO_3^-$ $-CH_2CH_2SO_3^-$
weak acid cation exchanger	carboxylic acid	$-COO^-$ $-CH_2COO^-$
strong base anion exchanger	quaternary amine	$-CH_2N(CH_3)_3^+$ $-CH_2CH_2N(CH_2CH_3)_3^+$
weak base anion exchanger	amine	$-NH_3^+$ $-CH_2CH_2NH(CH_2CH_3)_2^+$

تتضمن رزينات التبادل الكاتيوني حمض – قوي مجموعة وظيفية من حمض السلفونيك التي تحتفظ بشكلها الآنيوني، وبالتالي فإن سعتها للتبادل الآيوني تكون في محلول حمضي قوي. أما المجموعة الوظيفية لمبادل كاتيون حمض- ضعيف فيكون مبرتن كليا في سويات من ال pH أقل من 4، لهذا فإنه يخسر سعته التبادلية. وتصنع المبادلات الآنيونية أساس قوي باستخدام أمين رباعي، لهذا فهي تحتفظ بشحنة موجبة حتى في المحاليل القلوية القوية، بينما تبقى مبادلات آنيون أساس ضعيف مبرتنة في سويات من ال pH المتوسط القلوية فقط. وتحت شروط أكثر قلوية يفقد المبادل الأنيوني لأساس ضعيف شحنته الموجبة ويغير سعته التبادلية.

يأخذ تفاعل التبادل الأيوني والذي أحادي التكافؤ M^+ على موقع تبادل حمض قوي الشكل التالي :

$$-SO_3^- - H^+_{(S)} + M^+_{(aq)} \rightleftharpoons -SO_3^- - M^+_{(S)} + H^+_{(aq)}$$

ويعطي ثابت توازن التبادل الأيوني والذي يدعى أيضا "معامل الإنتقائية" بالعلاقة :

$$K = \frac{\{-SO_3^- - M^+\}[H^+]}{\{-SO_3^- - H^+\}[M^+]}$$

حيث تشير الأقواس { } إلى التركيز السطحي، وبإعادة ترتيب العلاقة يتبين أن نسبة التوزع لتفاعل التبادل هي من الشكل :

Mohammed...ne

$$D = \frac{\text{كمية } M^+ \text{ في الطور الثابت}}{\text{كمية } M^+ \text{ في الطور المتحرك}}$$

$$D = \frac{\{-SO_3^- - M^+\}}{[M^+]} = K\frac{\{-SO_3^- - H^+\}}{[H^+]}$$

التي تكون تابعة لتركيز H^+ وبالتالي ل pH الطور المتحرك.

تعبأ مبادلات التبادل الأيوني في أعمدة ال HPLC إما على شكل بوليمير حبيبي مسامي أو يبلل على حبيبات مسامية من السيليكا وتعتمد الإنتقائية في بعض الأحيان على تضمن المبادل موقع تبادل قوي وضعيف على طول الربط التشابكي. وتعد هذه الميزة الأخيرة هامة بصورة خاصة لأنها تضبط سماحية الرزين وقابليته لمواقع التبادل. وتعطى الرتبة التقريبية للأنتقائية من اجل رزين تبادل كاتيوني حمض قوي بمرتبة تناقص D وفق التالي :

$$Al^{3+} > Ba^{2+} > Pb^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+} > Mg^{2+} > Ag^{+} > K^{+} > NH_4^{+} > Na^{+} > H^{+} > Li^{+}$$

لاحظ أن الأيونات العالية الشحنة ترتبط بقوة اكبر من الأيونات المنخفضة الشحنة، كما أن الأيونات ذوات أقطار التميؤ الأصغر ترتبط بقوة أكبر. ومن اجل مبادل أنيوني اساس قوي تكون المرتبة العامة من الشكل :

$$SO_4^{2-} > I^- > HSO_4^- > NO_3^- > Br^- > NO_2^- > Cl^- > HCO_3^- > CH_3COO^- > OH^- > F^-$$

كذلك نجد ان الأيونات ذوات الشحن الأعلى وأقطار التميؤ الأصغر ترتبط بقوة أكبر من الأيونات ذوات الشحن الأقل وأقطار التميؤ الأكبر.

إن الطور المتحرك في ال IEC عبارة عن محلول واق مائي. ويحدد pH المحلول وتركيبه الأيوني زمن احتفاظ المركب، ويمكن استخدام تقنية تدرج التمليص وفيها يتم تغيير القوة الأيونية أو pH الطور المتحرك مع الزمن، فمثلا يمكن أن تستخدم عملية فصل IEC لكاتيونات محلول ممدد من HCL كطور متحرك وبزيادة تركيز HCL يتسرع معدل التمليص من أجل الكاتيونات ذات الاحتفاظ القوي لأن التركيز المرتفع ل H^+ الأيوني.

إن الكاشف الأكثر استخداما في تقنية التبادل الأيوني هو كاشف الناقلية الكهربائية الذي يقيس ناقلية الطور المتحرك عند خروجه من العمود، لكن تركيز الإلكتروليت المرتفع في الطور المتحرك يخلق مشكلة، لان أيونات الطور المتحرك تهيمن على الناقلية، فمثلا عند استخدام محلول ممدد من HCL كطور متحرك، فإن وجود تركيز من H_3O^+ و Cl^-يحدث ناقلية تخلفيه (تشويش) يمكن أن تعيق كشف المركب الخارج من العمود.

من أجل تخفيض مساهمة الطور المتحرك بالناقلية إلى حدها الأدنى يوضع عمود مخمد أيون- ion suppressorcolumn بين مخرج العمود التحليلي ومدخل الكاشف، حيث تعمل انتقائية هذا العمود على عزل أيونات إلكتروليت الطور المتحرك بدون عزل أيونات المركب،فمثلا في كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لكاتيون التي تستخدم محلول ممدد من HCL كطور متحرك، يستخدم عمود مخمد يحوي راتنج(رزين) تبادل آنيون حيث يحدث تفاعل التبادل التالي :

$$H^+_{(aq)} + Cl^-_{(aq)} + Resin^+ - OH^- \rightleftharpoons Resin^+ - Cl^- + H_2O_{(l)}$$

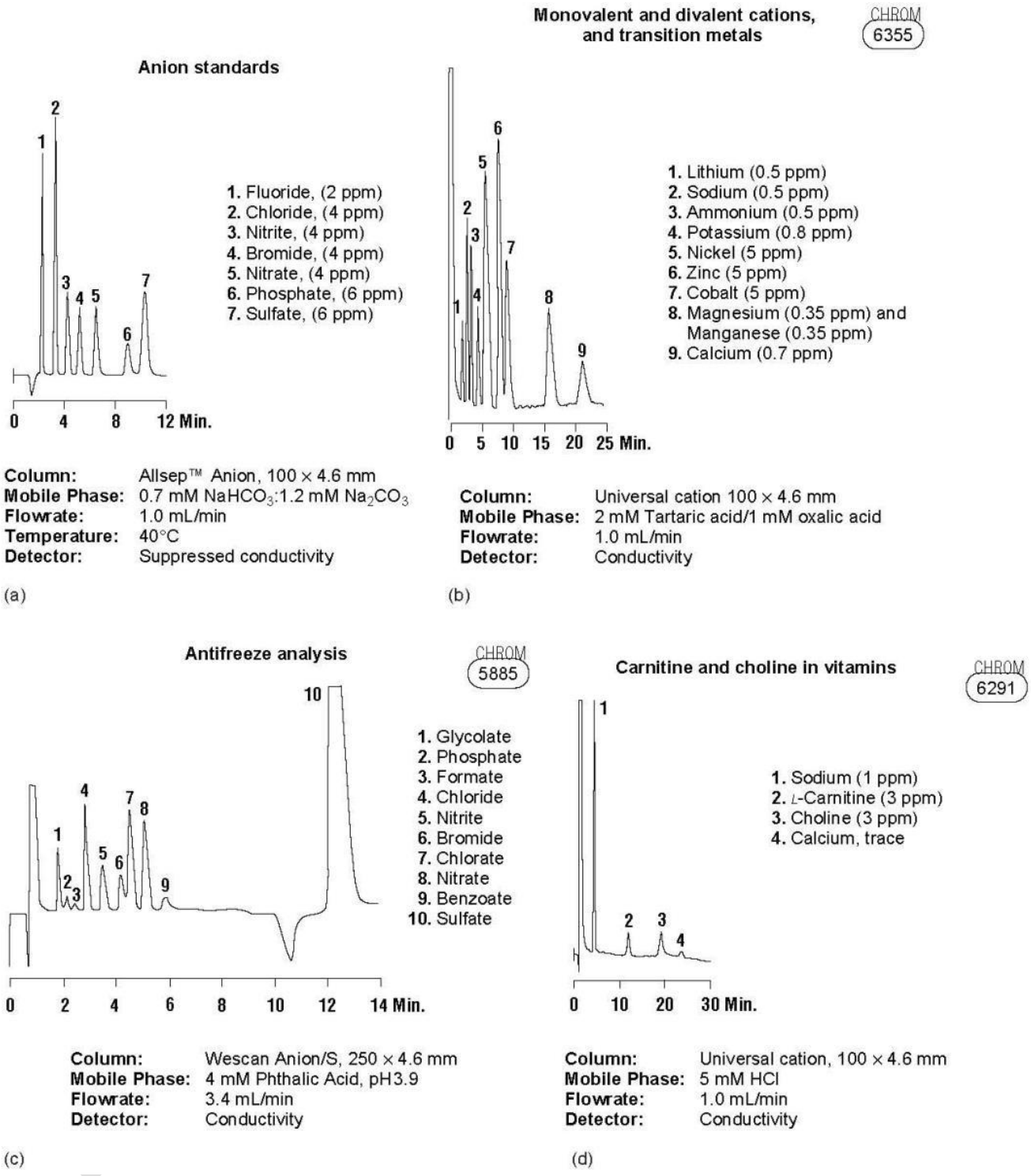
الذي يستبدل HCL الأيوني ب H_2O، وتخرج الكاتيونات على شكل أملاح هيدروكسيدية عوضا عن أملاح كلوردية. وتستخدم عملية مماثلة في كروماتوغرافيا التبادل الآيوني لآنيون وفيها يوضع راتنج(رزين) تبادل كاتيون في عمود التخميد، فإذا احتوى الطور المتحرك Na_2CO_3 فإن تفاعل التبادل التالي :

$$2Na^+_{(aq)} + CO^{2-}_{3(aq)} + 2Resin - H^+ \rightleftharpoons 2Resin - Na^+ + H_2CO_3$$

يستبدل الإلكتروليت القوي Na_2CO_3بالإلكتروليت الضعيف H_2CO_3، وهكذا نجد أن تخميد الأيون ضروري عند استخدام طور متحرك يحوي تركيزا مرتفعا من الأيونات.

إن كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لاقت تطبيقات هامة في تحليل المياه وفي الكيمياء الحيوية، فمثلا يوضح الشكل (6-2) إمكانية استخدام هذه التقنية لتحليل سبع أنيونات مألوفة معا لمدة 12 دقيقة تقريبا، وكان مثل هذا التحليل يتطلب يومين على الأقل قبل هذه التقنية. ويمكن استخدام هذه التقنية أيضا لتحليل : البروتينات، الحموض الأمينية، السكريات، النكليوتيدات والمركبات الصيدلانية ويتضمن الشكل (6-2) عدة أمثلة.

Mohammed zidane



الشكل(6-2)أمثلة متنوعة عن تطبيق كروماتوغرافيا التبادل الأيوني