

الفصل الأول الكروماتوغرافيا- مظاهر عامة

1-1-عموميات حول الطريقة الكروماتوغرافية:Generalities about chromatography

ان كلمة كروماتوغرافيا تعني مجموعة طرق الفصل التي اعتمدت في الأصل على سلسلة من التجارب التي قام بها العالم النباتي Tsweet حيث استطاع تحليل مادة الكلوروفيل وفصلها الى عدة مقاطع ملونة وذلك خلال ترشيحها خلال أعمدة مملوءة بمادة ممتزة (adsorbent) معينة واطهارها 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 phase والآخر هو الطور المتحرك mobile phase والذي يسير عبر الطور الثابت ويحوي عادة على النموذج المراد فصله ويتم توزيع المادة المراد تحليلها بين الطورين المتحرك والثابت اما باختلاف قابلية ذوبان المادة في كلا الطورين او باختلاف 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 الأطوار Classification by nature of phases

● الطور المتحرك :مائع فهو اذن اما سائل L أو غاز G أو مائع جد حرج FS

● الطور الثابت: اما سائل L أو صلب S

تركيب هذه الامكانيات يؤدي الى امكانيات مختلفة وهي :

- كروماتوغرافيا سائل – صلب LSC

- كروماتوغرافيا سائل – سائل LLC

- كروماتوغرافيا غاز – صلب GSC

- كروماتوغرافيا غاز – سائل GLC

- كروماتوغرافيا الجد حرجة – FSC

ملاحظة : FSC تعرض حالة وسطية بين LC وGC لأن الموانع الجد حرجة تملك خواص عند الحدين السائل والغاز

1-2-2- التصنيف حسب الظاهرة الكروماتوغرافية Classification by phenomenon Chromatography

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

1- كروماتوغرافيا الادمصاص (الامتزاز) (GSC-LSC):

هذا يعني PS صلب بتطوير هذا النوع نستطيع ربطها بكروماتوغرافيا الألفة (Affinity chromatography) التي توافق حالة تكون فيها خواص الادمصاص للطور الثابت نوعية اتجاه مركب واحد او عائلة مركبات

2- كروماتوغرافيا التوزيع (GLC-LLC):

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

3- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (IEC):

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

4- كروماتوغرافيا الاستثناء 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 عند الطور 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 تتركز مبادئ الفصل هي :

- قطبية الطور العادي أو المعاكس (المقلوب)

- الشحنة الكهربائية

- الطول أو الشكل (الحجم)

- وجود بنى خاصة والتي تسمح بتشكيل روابط نوعية

1-3 - أنواع الكروماتوغرافيا Type of Chromatography:

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

(Column) او يطلق على لوح من البلاستيك او الزجاج او قطعة من الورق والطور الثاني يسمى بالطور المتحرك (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:

① كروماتوغرافيا الامتزاز adsorption Chromatography

② كروماتوغرافيا التوزيع Partition Chromatography

③ كروماتوغرافيا التبادل الايوني Ion exchange chromatography

④ كروماتوغرافيا الاستثناء او الاستبعاد Size exclusion Chromatography

1-4- السلوك الكروماتوغرافي للمادة المذابة Chromatography behavior of solute 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 $K_d = \frac{C_s}{C_m}$.

حيث K_d معامل التوزيع Distribution coefficient و C_s , C_m هي تراكيز المكون في الطورين المتحرك والثابت على التوالي فإذا كان K_d كبير جدا فإن المكون يبقى في الطور الثابت لفترة أطول ويتحرك ببطء شديد اما اذا كان K_d صغير فإن المكون يكون في الطور المتحرك وسرعته نفس سرعة الطور المتحرك أي يتحرك بسرعة.

نرمز بـ t الى جزء من الزمن الكلي الذي يمضيه المكون في الطور المتحرك فيكون: $t = \frac{N_m}{N_s + N_m}$

حيث N_m : عدد جزيئات المكون في الطور المتحرك

N_s : عدد جزيئات المكون في الطور الثابت

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

$$t = \frac{C_m \times V_m}{C_s \times V_s + C_m \times V_m}$$

بقسمة كل من البسط والمقام على $C_m \times V_m$ نحصل على

$$t = \frac{1}{1 + \frac{C_s \times V_s}{C_m \times V_m}} = \frac{1}{1 + K_d \frac{V_s}{V_m}}$$

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: $t = \frac{1}{1 + K_d \frac{V_s}{V_m}}$

بوضع: $K = K_d \frac{V_s}{V_m}$

نجد: $t = \frac{1}{1 + K}$

نسمي K معامل السعة او معامل المكوث

1-5-2- زمن المكوث retention time :

نرمز لزمن المكوث بالرمز t_R وهو الزمن اللازم لمرور المكون عبر عمود طوله L، أي الزمن المستغرق من بدء مرور الطور المتحرك

$$t_R = \frac{L}{V} \quad \text{حتى خروج المكون من العمود الذي يعطى بالعلاقة}$$

حيث L: يمثل طول العمود

V: السرعة الخطية المتوسطة للمكون

$$V = F \times t \quad \text{لكن}$$

حيث F تمثل سرعة الطور المتحرك

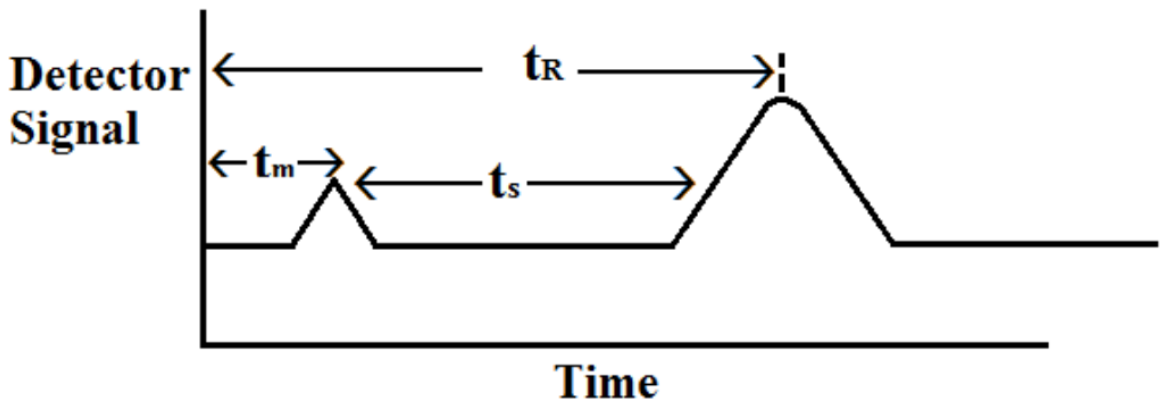
$$V = F \times \frac{1}{1+K} \quad \text{بالتعويض عن قيمة t نجد :}$$

$$t_R = \frac{L(1+K)}{F} \quad \text{ومنه :}$$

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

$$t_R = t_m (1+K) \quad \text{ومنه}$$

ويعبر عنه كذلك بالفترة الزمنية التي يحتاجها الطور المتحرك للمرور خلال الطور الثابت بدون اعاقه كما هو 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

العوامل المؤثرة على زمن الاحتجاز:

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

1-5-3- حجم المكوث retention volume:

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

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

حيث F سرعة الطور المتحرك (منسوب التدفق بالنسبة للطور المتحرك)

بالتعويض عن قيمة t_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 الانتقائية selectivity factor:

عامل الانتقائية α يصف وضعية القمتين المتجاورتين 1 و 2 الموجودتين على الكروماتوغرام والذي يتوافق مع نسبة معاملات المكوث لمركبين في العمود ، كما أنها تحدد امكانية الفصل الكيميائي وتعطى بالعلاقة

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_m}{t_{R1} - t_m} = \frac{K_2}{K_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

K_2 : معامل المكوث (معامل السعة) للمركب 2

حيث t'_{R2} : زمن الاحتجاز المختصر للمركب 2

K_1 : معامل المكوث (معامل السعة) للمركب 1

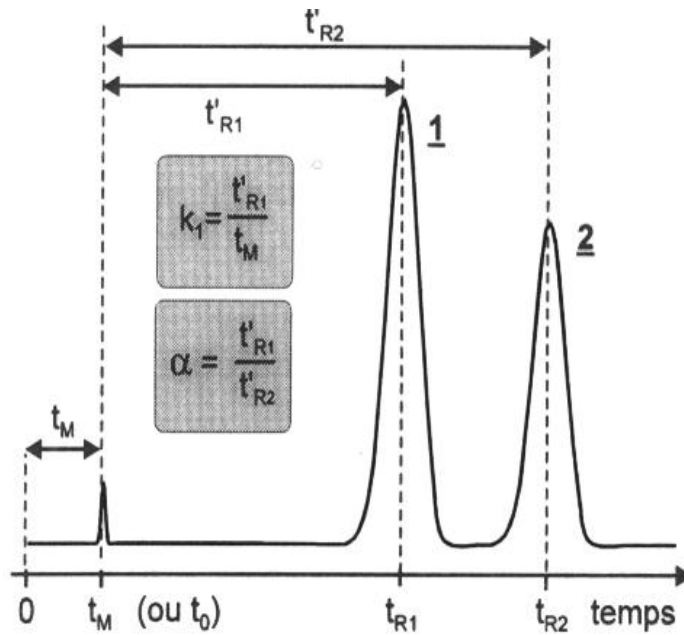
t'_{R1} : زمن الاحتجاز المختصر للمركب 1

t_m : الزمن الميت

t_{R2} : زمن الاحتجاز الكلي للمركب 2

t_{R1} : زمن الاحتجاز الكلي للمركب 1

كما هو موضح بالشكل التالي :



ملاحظة: قيمة عامل الانتقائية α دائما أكبر من 1

6-1- كفاءة الفصل الكروماتوغرافي Effectiveness of chromatographic separation:

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

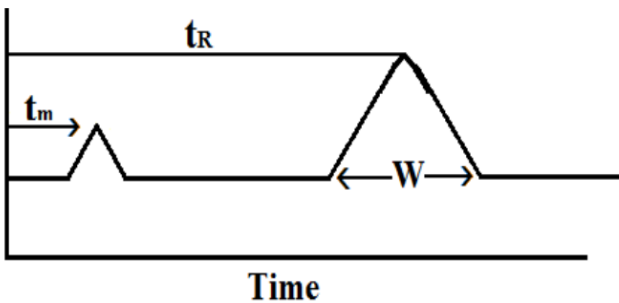
① نظرية الصفائح Plate theory

② نظرية السرعة Rate theory

① نظرية الصفائح:

تتضمن النظرية ان العمود الكروماتوغرافي يحتوي على عدد كبير من القطع المتشابهة او الصفائح النظرية وفي كل منها يتم 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:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$



حيث: N: 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 تمثل L: طول العمود ، N عدد الصفائح النظرية .

H: الارتفاع المكافئ للصفحة النظرية وهو اختصاراً (HETP) High equivalent theoretical plates

وهناك طريقتان لزيادة كفاءة الفصل من خلال

① زيادة طول العمود

② زيادة عدد الصفائح النظرية في وحدة واحدة من طول العمود

مثال : مخطط كروماتوغرام لمكونين A و B زمن الاحتجاز لـ A 250 دقيقة و لـ B 270 دقيقة وعرض القمة للمكون A 15 سم وللمكون B 17 سم . احسب عدد الصفائح النظرية لعمود الفصل واذا كان طول العمود 120 سم . احسب HETP .

الاجابة:

$$N_A = 16 \left(\frac{t_{RA}}{w_A} \right)^2 = 16 \left(\frac{250}{15} \right)^2 = 4440$$

$$N_B = 16 \left(\frac{t_{RB}}{w_B} \right)^2 = 16 \left(\frac{270}{17} \right)^2 = 4040$$

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

② نظرية السرعة Rate 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 ديمتر Van Demeter Equation وهي

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

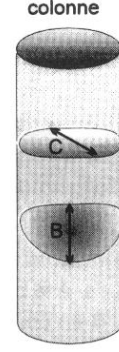
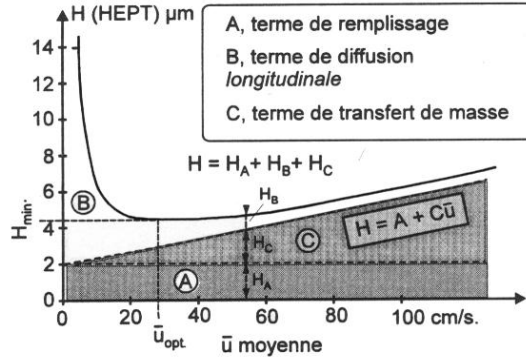
حيث A، B، C ثابت، μ سرعة الطور المتحرك

ويعبر A عن 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 حركة الانتشار اما الى الأعلى او الأسفل ويظهر هذا التأثير بشكل واضح في تقنية الـ GC عندما يكون الطور المتحرك غاز اما عندما يكون الطور المتحرك سائل (تقنية LC) تكون قيمة الانتشار صفراً أي ان B/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



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

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

$$f'(\mu) = 0 \quad \text{من أجل}$$

$$\mu_0 = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

وبذلك يمكن تحديد سرعة الطور المتحرك المثالية والمقدوة ب :

ويمكن ان تكون العلاقة عند استخدام السرعة المثالية كما يلي:

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

1-7 - درجة الفصل او قدرة الفصل (R_S): 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

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad \text{قدرة الفصل من خلال العلاقة التالية:}$$

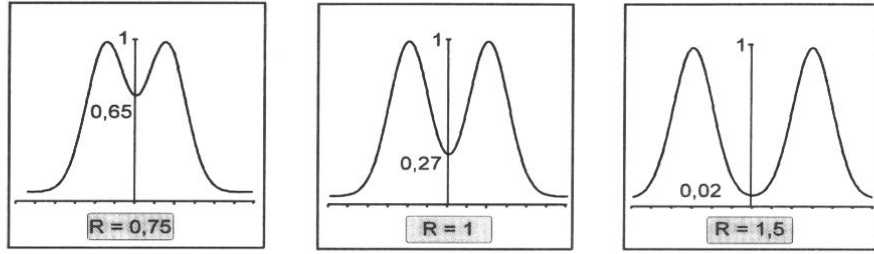
حيث R_S: قدرة الفصل

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 ≈ ΔtR) يحصل تطابق او تداخل Over lapping أي الفصل غير جيد



وان افضل قيمة لـ R_s نحاول الوصول اليها هي $R_s = 1.5$ للحصول على فصل جيد في هذه الحالة

أي ان $R_s > 1.5$ يعطي فصل جيد بشكل عام

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

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left(\frac{K_2}{1+K_2} \right)$$

حيث :

N : عدد الطبقات النظرية في العمود

α : عامل الانتقائية

K_2 : معامل السعة للمركب الذي زمن مكوته أطول

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

① حجم الدقائق للطور الثابت Particle size

② سمك طبقة الطور الثابت thickness

③ لزوجة الطور المتحرك viscosity

④ درجة حرارة العمود Temperature

⑤ السرعة الخطية للطور المتحرك Liner velocity

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

من الكروماتوغرام في الكروماتوغرافيا يمكن الحصول على ما يلي:

① معلومات نوعية qualitative information

② معلومات 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 T_R تكون المادة نفسها وهذه الطريقة تعطي نسبة تأكيد بمقدار 95% ولمزيد من التأكيد نغير ظروف التحليل مثل الطور الثابت وسرعة الطور المتحرك فاذا حصلنا أيضا على نفس T_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

A مساحة 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 القمة عبارة عن مثلث ويمكن ان ينجز التحليل الكمي أيضا من خلال طريقة عامل الاستجابة وطريقة المحلول القياسي الداخلي او طريقة الإضافات القياسية

Mohammed zidane