الكروموتوغرافيا Chromatography

الكروموتوغرافيا هو علم قديم يعنى باللغة العربية علم الألوان وهو علم بسيط نظرياً إلى أن له استخدامات كثيرة في فصل وتحليل المخاليط المعقدة .

ونظرية الفصل تعتمد على توزيع الخليط المراد فصلة بين سطحين مختلفين أحدهما يسمى السطح الثابت (Stationary Phase) والآخر يسمى السطح المتحرك (Mobile Phase) .

في علم الكروموتوغرافيا تمر المركبات المختلفة بالخليط مع السطح المتحرك على السطح الثابت وحيث أن لكل مركب قدرة على الاحتكاك مع السطح الثابت تختلف عن المركب الآخر، لذا يتم فصل المركبات على السطح الثابت وبالتدريج تتحرك مع السطح المتحرك بعد أن يتم فصلها وهذه الظاهرة تسمى الادمصاص (adsorption) ، ويعتمد الفصل على قابلية ورغبة المركب في التفاعل مع السطح الثابت فكلما كانت هذه الرغبة أقوى كلما تعطل المركب عن الحركة وكلما كانت الرغبة أقل بذلك تسرع المركبات في الحركة وبذلك يتم الفصل.

مثال :

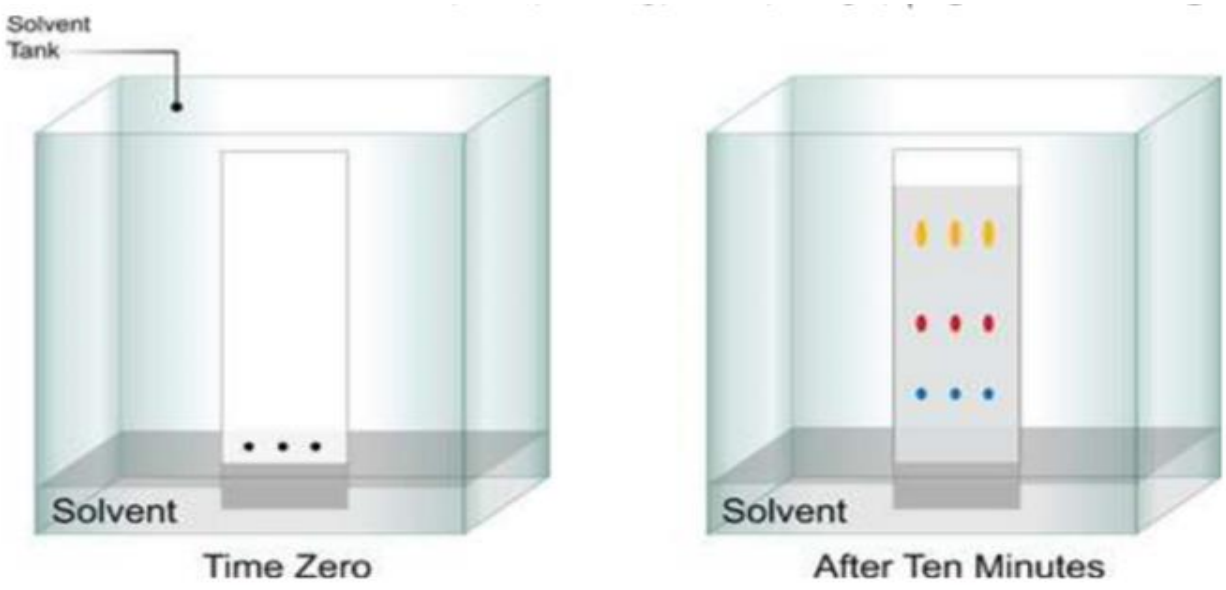
لو أن عندنا خليط من ثلاث مركبات (أ ، ب ، ج) تم تمريرها على سطح ثابت بواسطة السطح المتحرك ولو افترضنا أن (أ) شديد التماسك مع السطح الثابت في حين (ب) متوسط التماسك مع السطح الثابت وفي حين (ج) ضعيف التماسك جداً مع السطح الثابت ، لذا سنجد أنه عند تمرير هذه المركبات في سطح متحرك على ذلك السطح الثابت فأن (ج) سيكون خروجه سريع جداً ثم يتبعه (ب) ثم يتبعه (أ) .

ومن الملاحظ في الشروحات أعلاه أن الكروموتوغرافيا ليس له فقط القدرة على فصل المواد ولكن أيضا على تنقيتها (purification) ، وقد استخدمت هذه الطريقة لتنقية الكثير من المركبات .

أنواع الكروموتوغرافيا

توجد أنواع كثيرة من الكروموتوغرافيا مثل :

١. **كروموتوغرافيا الورقة** : وهذا أول وأقدم طريقة للكروموتوغرافيا حيث تستخدم الورقية كسطح ثابت وتغمس هذه الورقة في محلول فيه مركبات مختلفة وعند مرور هذا السائل في الورقة من خلال الظاهرة الأسموزيه ، يتم فصل المركبات باستخدام هذه الورقة .



هذا النظام من التحليل الكروماتوجرافى تابع لتحليل الكروماتوجرافيا الادمصاص ويعتبر النظام الثابت Stationary phase عبارة عن مادة إدمصاص مثل ثاني أكسيد الألومونيوم أو السليكاجيل مخلوط بمادة لاصقة يتم فرد مادة الادمصاص على طبقة رقيقة على شريحة زجاجية مقاس 20× 25 سم.

أما النظام المتحرك mobile phase عبارة عن مذيب مناسب أو مخلوط من المذيبات المناسبة قبل استعمال الشرائح يتم وضعها فى فرن للتخلص من الرطوبة ولتنشيط مادة الادمصاص . ثم يتم وضع العينة المراد فصلها بواسطة أنبوبة شعرية دقيقة على هيئة بقع وعلى أحد أطراف الشريحة يوضع خط ويسمى بنقطة البداية على بعد 2 سم وقبل انتهاء الشريحة بمسافة 2 سم يوضع خط يسمى بخط النهاية.

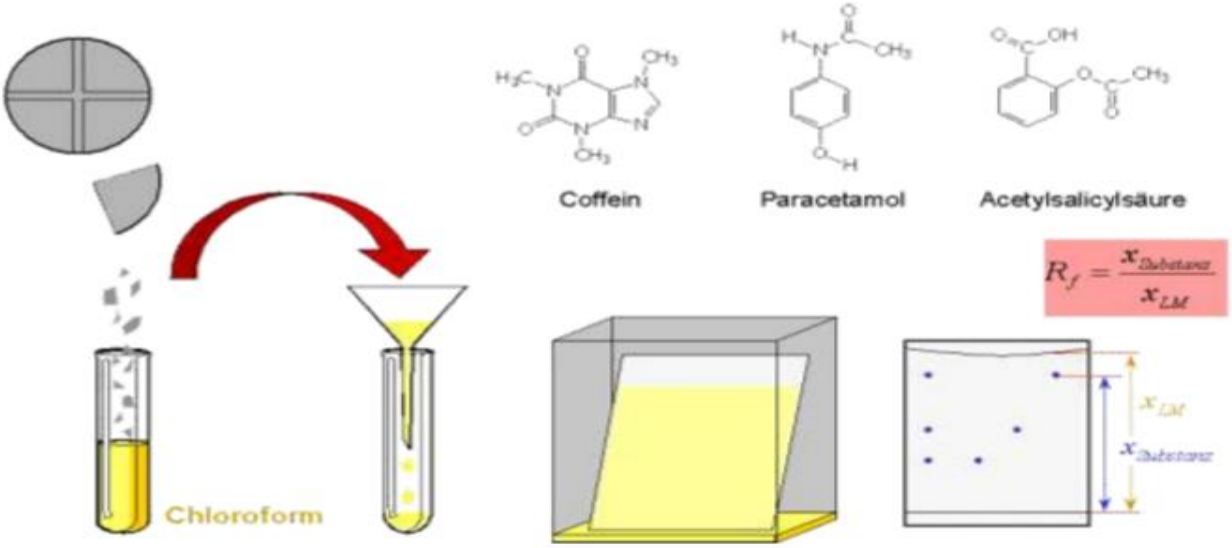
تغمس الشرائح الزجاجية فى حوض يحتوى على المذيب أو مخلوط من المذيبات ويقفل الحوض جيدا وبعد سريان المذيب حتى خط النهاية تخرج الشرائح وتجفف

التعرف أو الكشف على أماكن الفصل.

ترش الشرائح بجواهر كشافة لظهور مواضع المركبات المختلفة وبقياس المسافة التى سارها المذيب والمسافة التى سارها مكونات العينة يمكن حساب RF .

*** التقدير الكمى بعد الاستخلاص :**

نقشط كل منطقة Zone وتوضع فى أنبوبة زجاجية وتذاب فى مذيب مناسب وترشح للتخلص من مادة الادمصاص ثم يجرى عليها التقديرات الكمية الاتية .



*** التقدير الكمى على الورق أو اللوح :**

توجد عدة طرق وهى

1)المقارنة البصرية

2) التقدير بواسطة حساب مساحة البقع

3) تقدير النفاذية للبقع الملونة أو المكربنة أو التى تمتص الأشعة الفوق البنفسجية.

*** مميزات TLC عن Paper Chromatography**

1) الوقت الذى يأخذة الفصل بواسطة TLC قصير جدا حيث لا يحتاج أكثر من نصف ساعة وبسيطة فى حين أن الوقت الذى يأخذة Paper طويل يتراوح من 16 – 24 ساعة .

2) تكون البقع مندمجة Compact والفصل ممتاز .

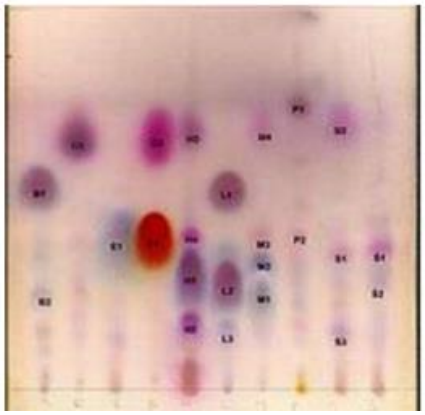
3) تستعمل مواد ادمصاصية كثيرة منها مواد عضوية مثل السيليلوز أو السيليلوز المحور أو غير عضوية مثل السليكاجيل أو الالومنيا . فى حيث أن Paper يكون يعتمد فقط على الطبقة الرقيقة من السيليوز.

4) تستعمل كميات قليلة من المواد المراد تحليلها كما إنها تستخلص كل مكونات العينة .

5) تستعمل مواد لتعيين موضع المركبات المفصولة مثل حمض الكبريتيك وترش على السيلكاجيل أو الومنيوم دون أن تتأثر على العكس من التحليل الكروماتوجرافى الورقى .

* النسبة بين الماء والسليكاجيل = 2 : 1

* السليكاجيل تحتوى على كبريتات كالسيوم بنسبة 10% من وزنها.



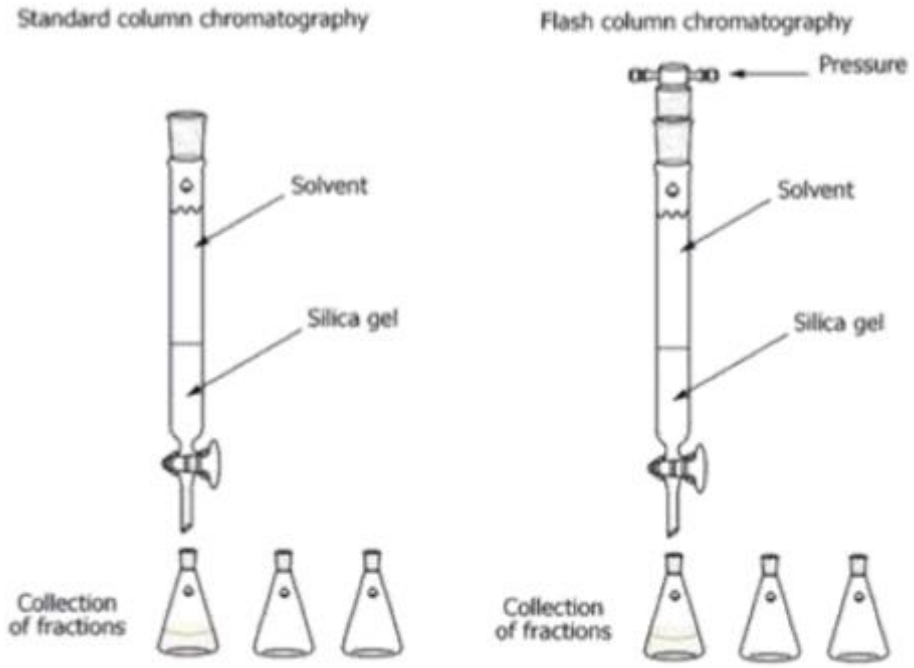
٢. كروموتوغرافيا العامود :

فى هذا النوع النظام الثابت عبارة عن مادة صلبة داخل عامود زجاجى لها القدرة على الامصاص ويقوم النظام المتحرك بحمل هذه المركبات وإمرارها على سطح الادمصاص وتتحرك وتتوزع هذه المركبات على طور سطح الادمصاص تبعا لقابليتها للادمصاص على سطح الادمصاص. والمركبات الأكثر مقدرة على الادمصاص أقلها تحركا.

والنظام الثابت عبارة عن مادة الادمصاص وهى قد تكون ألمونيوم – سليكا جيل – كربون – سيليلوز وغيرها.

وتعبأ مادة الادمصاص فى عامود زجاجى ويوضع أسفله وأعلاه طبقة من الصوف الزجاجى.

– كما موضح بالرسم :



ويتم الفصل فى العمود الكروماتوجرافى كما يلى :-

1- يتم التنظيف جيدا للعامود الكروماتوجرافى ويوضع أسفله طبقة من الصوف الزجاجى وتعبأ مادة الادمصاص

2- يذاب مخلوط المركبات المراد فصلها وتقديرها فى مذيب وينقل إلى العامود الكروماتوجرافى بواسطة قمع فيحدث إدمصاص للمركبات المختلفة كل على حسب قدرته على الادمصاص وبالتالى تتحرك المركبات على مسافات مختلفة على هيئة مناطق Zones وتظهر المناطق بوضوح إذا كان المادة المراد فصلها لها لون مميز.

3- إذا كان المطلوب هو الحصول على المركبات كل حدة فأنة يتبع أحد الطريقتين.

أ) تقطع المناطق بعد إخراج محتويات العامود الكروماتوجرافى وتذوب كل منطقة وترشح للتخلص من مادة الادمصاص .

ب) يتم عمل غسيل وإزالة وذلك بإختيار مذيب مناسب يوضع أعلى العامود الزجاجى فيحدث سريان للمناطق المختلفة حيث تتحرك إلى أسفل العامود خارجة منطقتة تلو الأخرى وتستقبل فى دوراق مخروطية وفى هذه الحالة تخرج المواد ضعيفة الادمصاص أولا يليها المواد الأكثر إدمصاص.

<u>- كما موضح بالرسم :</u>

Load Sample
("Black")
Step
Elute 1
Step
Elute 2
Step
Elute 3
Note: Blue can
be eluted with
IPA/water
One cartridge can separate all three dyes

وبعد الحصول على كل مركب على حدة **يتم تقديرة كميا**

أ) بالوزن بعد تبخير المذيب من كل دورق.

ب) أو بإضافة جواهر كشافة تعطى لون معين ويقياس الكثافة الضوئية باستخدام جهاز Spectrophotometer يمكن معرفة تركيز كل مركب على حدة .

جـ) أو بإستخدام الأشعة الفوق البنفسجية وذلك فى حالة المركبات التى تعطى وميض مثل الفيتامينات الذائبة فى الدهون A, D, E,K .

العوامل التى تحدد مكان المادة المراد فصلها على العامود الكروماتوجرافى:-

1) طبيعة مادة الادمصاص.

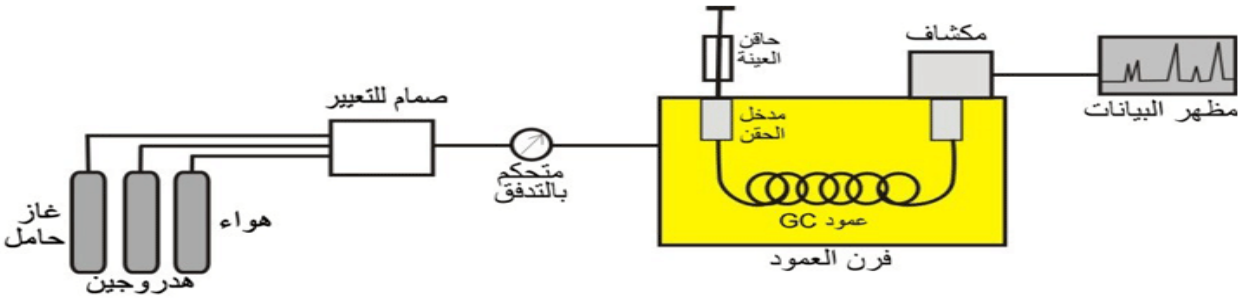
2) طبيعة المذيب المستخدم.

3) طبيعة المادة المراد فصلها .

4) عوامل أخرى مثل التركيز ودرجة الحرارة .

٣. *كروموتوغرافيا الغاز* : وأيضاً تستخدم نفس الفكرة حيث يكون هناك سطح ثابت ويكون السطح المتحرك عبارة عن غازات مثل الهيليوم وهذا النوع من الكروموتوغرافيا هو الأكثر شيوعاً على الإطلاق وقد طورت له أنواع كثيرة جداً من السطوح الثابتة والكواشف وذلك لاستخدمها حسب نوع الفصل المرغوب فيه .

www.arabian-chemistry.com



الكروماتوغرافيا الغازية

٤. *كروموتوغرافيا السائل* : وهذا النوع يستخدم نفس الفكرة حيث يكون الوسط الحامل للمركبات هو السائل وهناك أكثر من نوع منها :

- كروموتوغرافيا السطح المقلوب
Reverse Phase Chromatography
- كروموتوغرافيا السائل ذو الأداء العالي
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

يعتبر الـ HPLC أحد الطرق الأساسية لتحليل المواد العضوية وهو يمتاز مثل طرق التحليل الكروماتوجرافي الأخرى بالدقة والحساسية العالية كما أن مدى استخداماته لاتعتمد على تطاير العينة أو تأثرها بالحرارة كما هو الحال فى الـ GLC ويمتاز جهاز الـ HPLC بكفاءته العالية جداً على الفصل بالإضافة إلى استخدامه فى فصل العديد من المركبات المختلفة مثل الفينولات ، الفيتامينات والسكريات.

أساسيات جهاز الـ Principles of HPLC

يقوم جهاز HPLC بفصل مكونات العينة ثم التعرف عليها وتقديرها كمياً. ويتم الفصل عن طريق توزيع العينة مابين طورين أحدهما الطور المتحرك (سائل) والآخر طور ثابت (

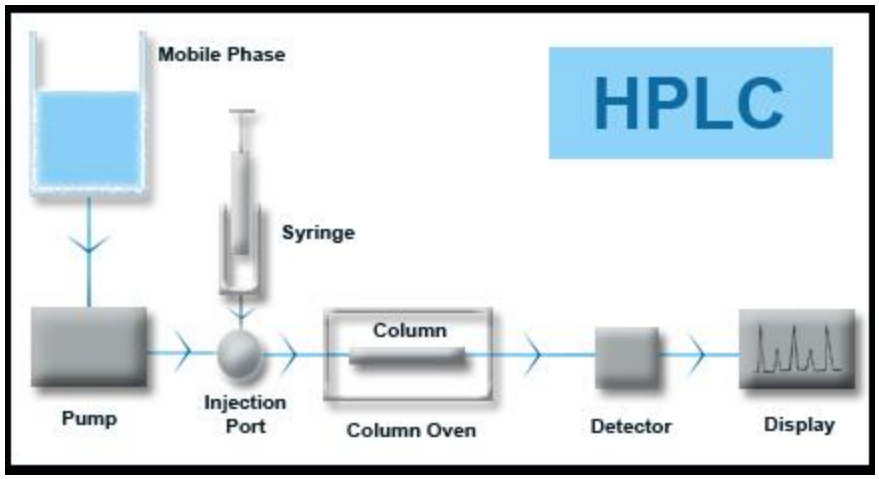
سائل أو صلب) وعادة بكون الطور الثابت فى عمود طوله حوالي 25 سم وقطره 4 مم . وتعتمد كفاءة الفصل على مواصفات العمود وبصفة خاصة قطر جزيئات المادة المعبأة ويلاحظ أن خفض قطر الجزيئات يؤدي إلى تحسين أداء العمود بالإضافة إلى أنه يرفع الضغط بالتالي نحصل على معدل سريان مناسب للطور المتحرك خلال العمود ولهذا السبب فإن أجهزة HPLC الحديثة يطلق عليها أجهزة الضغط العالي الكروماتوجرافي السائل حيث تدفع المضخة الطور المتحرك داخل عمود الفصل والذي بدوره يفصل العينة لمكوناتها والتي تمر خلال الـ Detector حيث عندما يمر كل مكون من مكونات العينة خلال الـ Detector فإنه يحدث تغير فى الإشارات الكهربائية يتم تسجيلها على خريطة متحركة لتعطي كروماتوجرام .

<u>ويمتاز الكروماتوجرام بالآتي :</u>

1- المركب الذي يمر خلال العمود يكون تحت ظروف موحدة كما يكون ثابتاً ويسمى Retention time كما أن مقارنة الأرقام Retention مع المواد القياسية يعطي وسيلة للتحليل الوصفى .

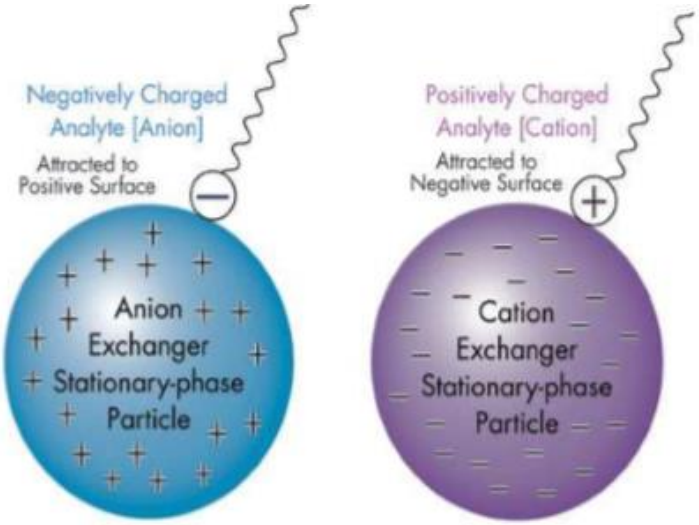
2- المساحة تحت الـ Peak فى الكروماتوجرام تتناسب طردياً مع تركيز المكون فى العينة وبالتالي فإن التحليل الكروماتوجرافي السائل يمكن استخدامه فى التقدير الكمي .

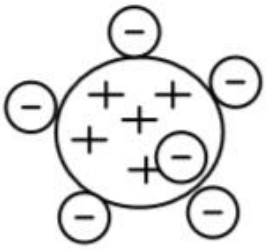
<u>تركيب جهاز التحليل الكروماتوجرافي السائل</u>



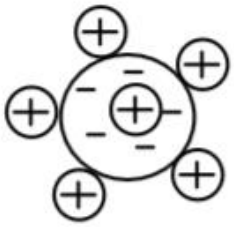
5- التبادل الأيوني Ion exchange chromatography

حيث يعتمد فصل وتحليل المركبات علي إمكانية تبادلها مع الأيونات الموجودة علي سطح مواد خاصة تعرف بمواد التبادل الأيونى Ion exchanger وهي عبارة عن مادة غير ذائبة تحتوي علي بعض المجموعات التي تحمل شحنات ويحيط بها أيونات ذات شحنات مضادة وهذه الأيونات حرة الحركة بعكس المجموعات المشحونة التي تكون مرتبطة كيميائيا بجزئيات مادة التبادل الأيونى. ويمكن استبدال الأيونات بأيونات أخرى تحمل نفس الشحنة دون أن تتأثر المادة الأصلية تسمي matrix. فإذا كانت المادة matrix تحمل شحنات موجبة فإن الأيونات المحيطة بها تكون سالبة وبالتالي فإن المادة يمكن أن يتم عليها تبادل أيونات سالبة الشحنة ولذلك يطلق عليها اسم Anion exchanger والعكس إذا كانت المادة الأصلية matrix تحمل شحنات سالبة فإن الأيونات المحيطة بها تكون موجبة الشحنة وبالتالي يمكنها التبادل مع أيونات موجبة مع أيونات موجبة ولذلك تسمي Cation exchanger كما في الشكل:





Anion exchanger with exchangeable counter-ions



Cation exchanger with exchangeable counter-ions

6-Gel filtration –Size exclusion chromatography

حيث يعتمد فصل المركبات المختلفة على اختلاف حجمها الجزئيى molecular size ممايسبب اختلافها فى النفاذية permeability بين حبيات مواد فى صورة جيل واشهرها مادة Sephadex فجزئيات المركبات الكبيرة الحجم لايمكنها النفاذ داخل فرغات الجيل لذلك فهى تمر اسرع مع المذيب بعكس الجزيئات الاخرى الصغيرة الحجم التي يمكنها النفاذ فى الفرغات الموجودة بين حبيبات الجيل لذلك تخرج المركبات بالتتابع على حسب تناقص حجمها الجزئيى وتعرف ميكانيكية الفصل هذة بال Molecular exolusion.