تقنيات الفصل الكيميائي

تعتبر تقنيات الفصل الكيميائي من الطرائق التحليلية الهامة، والتي تستخدم للحصول على المواد المختلفة بصورة نقية، دون وجود الشوائب العالقة بها، والتعرف على ماهية تلك المواد وفي كثير من الأحيان تعتبر عملية الفصل جوهرية عند الحاجة إلى عمل اختبارات أخرى على المادة النقية مثل الاختبارات الطيفية (IR, NMR and mass spectrometry). كما أن الحصول على المادة النقية يجعل من السهل إجراء التحاليل الكمية عليها لمعرفة تركيزها. أي أن طرق الفصل الكيميائي مهمة للغاية سواء في التحليل الوصفي أو الكمي على حد سواء. أي تستخدم لمنع التداخل أثناء التحليل الكيميائي.

تعتمد تقنيات الفصل على وجود اختلاف في خاصية واحدة على الأقل من الخصائص الفيزيائية والكيميائية للمواد المراد فصلها مثل الانحلالية والانحلال المجزأ والامتزاز ودرجات العليان والانصهار والتبادل الأيوني وحجم الجزئيات وكلما زاد الاختلاف في خاصية من هذه الخصائص كلما كانت عملية الفصل أسهل.

يتضمن الجدول الآتي تصنيف تقنيات الفصل وفقاً للخصائص الفيزيائية والكيميائية

أساس الفصل	تقنية الفصل
الحجم	الترشيح الديلزة كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي
الكتلة والكثافة	الطرد المركزي (التثفيل)
تشكل معقدات	الحجب
تغير الحالة الفيزيائية	التقطير إعادة البلورة
تغير الحالة الكيميائية	الترسيب والتبادل الأيوني
التجزئة بين الطورين	الاستخلاص الكروماتوغرافيا

استخدام تقنيات الفصل السابقة في تحليل المواد:

1- الفصل المعتمد على الاختلاف في الانحلالية:

عند إجراء تحاليل كيميائية لمزيج من مواد صلبة نلجأ إلى استخدام مبدأ الانحلال المجزأ حيث يعامل هذه المزيج بعدد من المحلات يقوم كل محل منها بحل أحد مكونات العينة الأساسية.

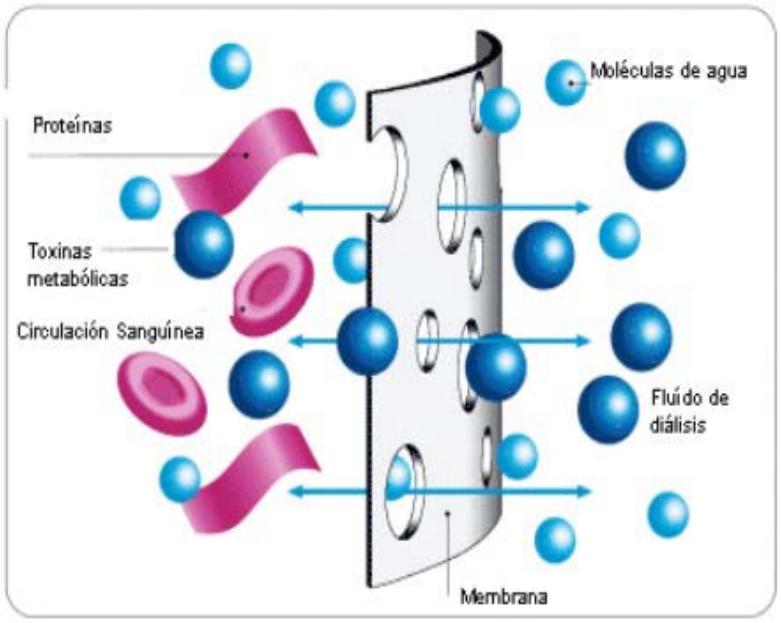
مثال: إذا احتوى مزيج على مادتي الديجتالين واللاكتوز يتم استخدام مزيج من محلين غير قابلين للامتزاج. يستخدم الكلوروفورم لحل الديجتالين والماء يحل اللاكتوز وبالتالي نحصل على طورين منفصلين يحتويان على مادتين تم فصلهما من العينة الأساسية مباشرة. ولكي تكون عملية الفصل المجزأ ناجحة لا بد من اختيار المذيب المناسب لحل مكونات العينة بشكل تام.

2- الفصل المعتمد على الحجم:

1- عملية الترشيح: تتم عملية الفصل باستخدام غشاء مسامي يمكن أن يمر عبره المذاب أو المتداخل فقط. وتعّد هذه التقنية هامة في تحليل المياه الطبيعية التي توجد فيها أجسام صلبة معلّقة يمكن أن تتداخل في التحليل. كما يمكن استخدام تقنية الترشيح لعزل مادة تتواجد على شكل حبيبات صلبة غير منحلة، وقد كانت هذه العملية إحدى مراحل التحليل الوزني الضرورية لعزل الراسب.

2- الديلزة: طريقة لفصل المواد الكيميائية بالاعتماد على مبدأ ظاهرة الانتشار وهو عملية انتقال الجزئيات من المحلول الأعلى تركيز إلى المحلول الأقل تركيز باستخدام غشاء نصف نفوذي مصنوع من السيليلوز ذي مسامات تتراوح ما بين 1-5nm حيث توضع العينة ضمن أنبوب مصنوع من مادة الغشاء. يوضع غشاء الديلزة الحاوي على العينة في وعاء حاوي على محلول الديلزة (محلول التنقية).

تستخدم عملية الديلزة في تنقية الدم حيث يمنع الغشاء مرور خلايا الدم والبروتين والعناصر الأخرى المهمة بينما يسمح بمرور اليوريا والكرياتينين والسوائل الزائدة وبالتالي يتم التخلص منها.

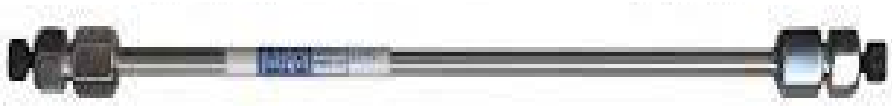


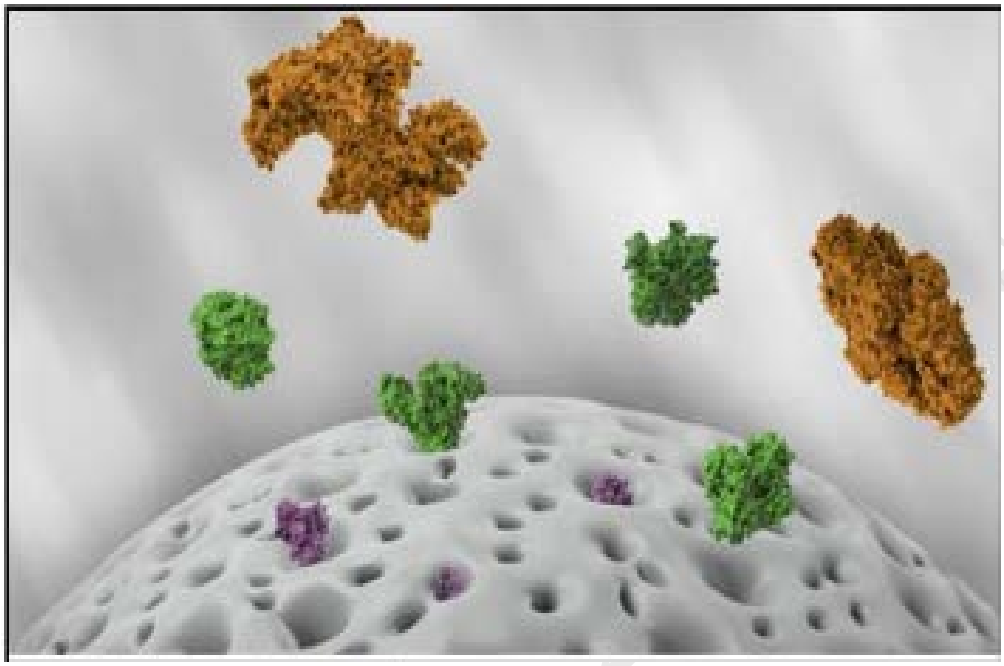
3- كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي (كروماتوغرافيا المنخلية):

تدعى هذه الطريقة أيضا كروماتوغرافيا الهلامية أو الاستبعاد الجزيئي في هذه التقنية يعبأ العمود بمادة هلامية على شكل حبيبات مسامية صغيرة $10\mu m$ تقريبا(مناخل).

والمواد الهلامية عبارة عن بولي إكريل أميد أو الكربوهيدرات البوليميرية التي تتمتع ببنية شبكية أغلب هذه المواد تكون محبة للماء hydrophilic وهي قابلة لامتزاز الماء أو أي مذيب قطبي آخر وقليل منها يميل للامتزاز المذيبات غير القطبية وفي كلا الحالتين لذلك يتم نقع المادة الهلامية في المذيب وبالتالي يحدث انتفاخ لجزيء الهلام الذي يسبب فتح البنية.

توضع العينة المراد فصلها في تيار مذيب يضخ عبر العمود بمعدل تدفق ثابت وهكذا تبدأ عملية الفصل، فالمواد التي حجم جزيئاتها كبير لا تمر عبر المسامات ولا تخضع للاحتفاظ من قبل حشوة العمود وتمر خلاله بالسرعة نفسها التي يتدفق معها المذيب(الطور المتحرك)، أما الجسيمات القادرة على دخول بنية المسامات فتأخذ زمنا أطول للمرور خلال العمود، كما أن الجسيمات الأكثر صغراً التي تخترق عمقا أكبر في بنية المسامات تأخذ زمنا أطول وهكذا .تستخدم كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي في تحليل البوليميرات وفي فصل البروتينات وعدد من السكريات والأنزيمات.

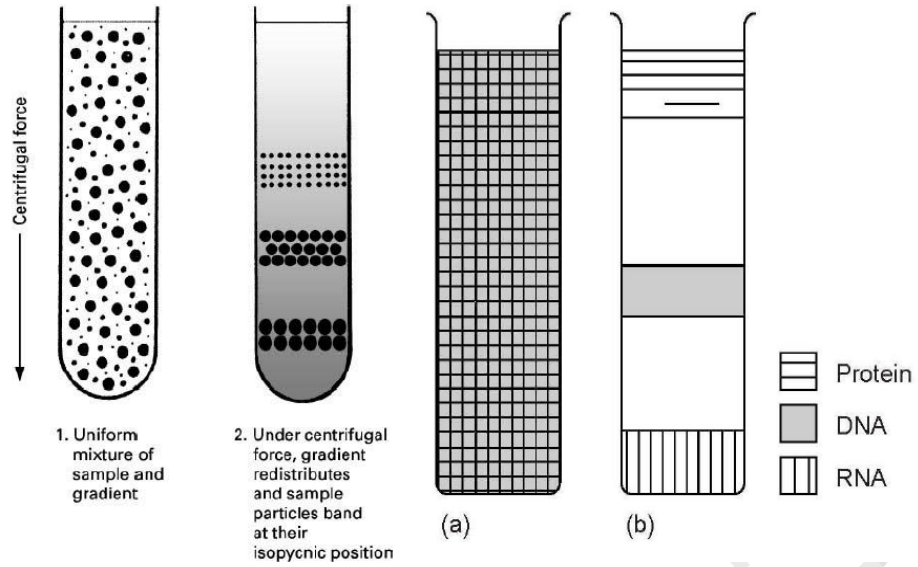




3- الفصل المعتمد على الكتلة أو الكثافة:

عند وجود اختلاف بالكتلة أو الكثافة بين مذاب ومتداخل يمكن عندئذ استخدام التثفيل (الطرد المركزي) لفصلهما عن بعضهما البعض، حيث توضع العينة على شكل معلق في أنبوب تثفيل ويتم تسريع السرعة الزاوية زيادة عدد الدورات بالدقيقة rpm) فالجسيمات الخاضعة لقوة تثفيل أكبر تكون أسرع في ترسبها وتهبط إلى أسفل الأنبوب. فمن أجل الجسيمات متساوية الكثافة يتم الفصل بالاعتماد على الكتلة فالجسيمات الأثقل تمتلك سرع ترسيب اكبر، أما الجسيمات متساوية الكتلة فإن الترسيب الأسرع يحدث مع الجسيمات ذات الكثافة الأعلى. يأخذ التثفيل أهمية خاصة كتقنية فصل في الكيمياء الحيوية، إذ يمكن استخدامه لفصل المكونات الخلوية.

مثلاً يمكن فصل مزيج من البروتين، DNA وRNA باستخدام تثفيل بالاعتماد على الاختلاف في كثافتها. يكون تدرج الكثافة من $1.35g/cm^3$ إلى $1.8g/cm^3$ فالبروتين ذي الكثافة أقل من $1.3g/cm^3$ لا يترسب بينما RNA ذي الكثافة أكبر من $1.8g/cm^3$ يترسب أسفل الأبنوب، أما DNA ذي الكثافة $1.7g/cm^3$ تقريباً ينفصل على شكل عصابة قرب منتصف الأنبوب.



4- الفصل المعتمد على الحجب Masking:

تضاف العوامل الحاجبة masking agent للتخلص من تأثير بعض الشوارد المشوشة على عملية التحديد والتي تتفاعل مع الكاشف المستخدم في الدراسة مما يسبب بخطأ في عملية التحليل. حيث يشكل العامل الحاجب مع الشاردة المتداخلة معقد منحل (تشكل معقدات) وأيضاً تستخدم لزيادة انتقائية الطريقة.

الانتقائية: هي قدرة الطريقة التحليلية على تعيين الشاردة المدروسة بوجود خلفية مشوشة ومعقدة.

أمثلة:

1- يستخدم كاشف سيانيد البوتاسيوم KCN لحجب تأثير بعض العناصر المعدنية أثناء تعيين عناصر معدنية أخرى. من أجل تحديد شوارد الكالسيوم في محلول يحوي شوارد الكادميوم (شاردة معيقة) باستخدام كاشف EDTA يضاف كمية مناسبة من KCN لحجب تأثير شوارد الكادميوم.

2- تستخدم شاردة الفلوريد لحجب ومنع تأثير شاردة الحديد الثلاثي من التداخل مع شوارد النحاس.

طريقة التحليل: (المطلوب إيجاد تركيز شوارد النحاس بوجود شوارد الحديد الثلاثي Fe^{3+} بالطريقة اليوديمترية (معايرات الإزاحة أو معايرة غير المباشرة) يتم إضافة فائض من شوارد اليوديد I^- التي تتأكسد بشوارد النحاس إلى اليود الحر ثم يعاير اليود المتحرر بثيوكبريتات

الصوديوم، لكن وجود شوارد Fe^{3+} يسبب إعاقة في التحليل لأنه أيضاً يقوم بأكسدة I^-. ولحل هذا التداخل يتم إضافة كمية مناسبة من شوارد الفلوريد التي تشكل مع شوارد Fe^{3+} معقداً ثابت من $[FeF_6]^{3-}$.

$$2Cu^{2+} + 4I^- \leftrightarrow 2CuI + I_2$$

$$I_2 + 2S_2O_3^{2-} \rightarrow 2I^- + S_4O_6^{2-}$$

لكن بوجود Fe^{3+} يحدث التفاعل التالي:

$$2Fe^{3+} + 2I^- \leftrightarrow 2Fe^{2+} + I_2$$

ولتجنب حدوث التفاعل تضاف شوارد الفلور.

5- الفصل المعتمد على الترسيب:

في هذه الطريقة يتم التخلص من المادة المتداخلة عن طريق ترسيبها (تشكل راسب) باستخدام كاشف انتقائي (عامل مرسب). والعوامل المرسبة إما تكون مرسبات عضوية أو لاعضوية.

1- المرسبات اللاعضوية: نذكر منها:

- شاردة الهيدروكسيل OH^- حيث ترسب عدد من الأيونات المعدنية مثل الحديد والألمنيوم ولتجنب التداخل بينهما يتم ضبط pH المناسبة لترسيب كل شاردة.
- شاردة الفضة Ag^+ التي تستخدم لترسيب شوارد الهالوجينات وشاردة السيانيد والتيوسيانات.
- النشادر يستخدم لترسيب شوارد الحديد والبلاديوم.
- حمض الآزوت يستخدم لترسيب القصدير.

نورد في الجدول الآتي بعض عوامل الحجب:

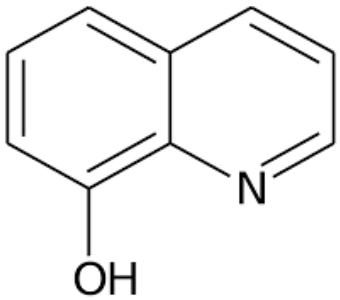
Masking Agent	Species Which Can Be Masked
CN^-	Ag, Au, Cd, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pd, Pt, Zn
SCN^-	Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Pd, Pt, Zn
NH_3	Ag, Co, Cu, Fe, Pd, Pt
F^-	Al, Co, Cr, Mg, Mn, Sn, Zn
$S_2O_3^{2-}$	Au, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Pd, Pt, Sb
tartrate	Al, Ba, Bi, Ca, Ce, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Pd, Pt, Sb, Sn, Zn
oxalate	Al, Fe, Mg, Mn, Sn
thioglycolic acid	Cu, Fe, Sn

2- المرسبات العضوية: نذكر منها:

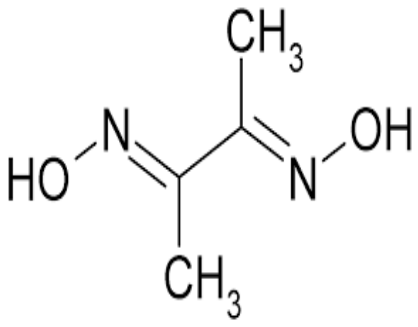
- ✓ **8- هيدروكسي الكينولين** يشكل مع العديد من الشوارد المعدنية معقدات (على شكل راسب). حيث تتحقق الانتقائية بضبط pH المحلول.

معقدات هذا المركب وكذلك الحلقة المتغايرة بحد ذاتها تبدي خواص مطهرة، معقمة ومبيدة للحشرات حيث تعمل مثبطات للانتساخ ومضاد للبكتريا.

يستخدم محلوله الكحولي كضمادات سائلة. كان سابقاً ذو أهمية كبيرة كعقار مضاد للسرطان.

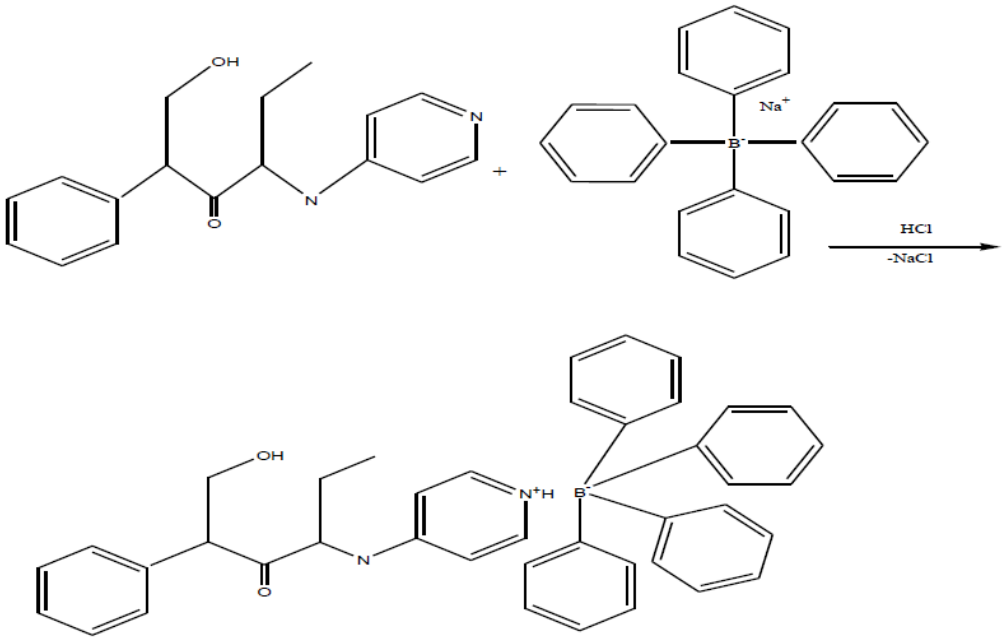


- ✓ **ثنائي متيل الغليوكسيم:** يعتبر عامل مرسب عضوي انتقائي لشاردة النيكل الثنائي في وسط قلوي ضعيف (يعطي راسب أحمر).



✓ **رباعي فينيل بورات الصوديوم:** $(C_6H_5)_4B^-Na^+$ يشكل رواسب في وسط حمضي وهو عامل انتقائي لأيونات البوتاسيوم، الأمونيوم، الروبيديوم والسيزيوم.

يستخدم هذا الكاشف لتحديد بعض المركبات الدوائية حيث يشكل معها معقدات الزوج الأيوني تكون على شكل رواسب مثل تحديد التروبيكاميد في وسط حمضي من حمض كلور الماء:



الخطوات الأساسية التي يجب القيام بها قبل إجراء عمليات التحليل:

1- اعتيان العينة: يعبر مصطلح الاعتيان عن الطريقة المقترحة لجمع العينة المطلوب تحليلها حيث تجمع عدة أخيذات من أمكنة مختلفة من مزيج المادة المحللة وتنقل للمجانسة.

2- مجانسة العينة: يتم بخلطها بشكل جيد ومناسب باستخدام محرك كهربائي أو هاون من البورسلان.

3- وزن العينة: باستخدام ميزان تحليلي دقيق.

4- تحضير العينة للحل: ذلك باختيار المذيب المناسب الذي يحقق نسبة انحلال تامة 100%.

5- إلغاء العوامل المشوشة: حيث تضاف حواجب كيميائية ترسب أو تشكل معقدات ثابتة مع الشوارد أو المركبات المشوشة والتي تؤثر سلباً على عملية التحديد أو يتم ذلك بإلغاء التداخلات الطيفية أثناء إجراء التحليل بالطرائق الآلية.

6- الفصل المعتمد على تجزئة الطورين:

- الاستخلاص
- الكروماتوغرافيا

الاستخلاص:

تختلف مكونات العينة سواء كانت عضوية أو لا عضوية اختلافاً كبيراً في توزعها بين طورين غير قابلين للامتزاج ونستفيد من هذا الاختلاف في التوزع في فصل المكونات الكيميائية. وهي عبارة عن عملية فصل انتقائية لمكون أو أكثر ضمن المزيج

مبدأ الاستخلاص:

تعبر عملية الاستخلاص عن توزع المادة A بين طورين غير قابلين للامتزاج وعند حدوث أي تماس بين الطورين يلاحظ انتقال المادة وتوزعها بين طورين خلال زمن محدد يتعلق هذا الزمن بطبيعة المادة المستخلصة.

$$A_{phase\ 1} \rightleftharpoons A_{phase2}$$

يدعى ثابت توازن العلاقة السابقة:

$$\mathbf{K_D = \frac{[Aphase\ 2]}{[Aphase\ 1]}}$$

بثابت التوزع (معامل التوزع) أو ثابت التجزئة.

كلما كانت قيمة K_D فإن المادة المستخلصة A تتحرك من الطور 1 إلى الطور 2 لكن تبقى المادة A في الطور الأول عندما تكون قيمة معامل التوزع صغير جداً.

أنواع الاستخلاص:

- الاستخلاص البسيط
- الاستخلاص المستمر (المتكرر)

1- الاستخلاص البسيط: يكون الاستخلاص بسيط عندما يكون معامل التوزع K_D لأحد المكونات $K_D \geq 10$ بينما للمكونات الأخرى بشكل قليل$K_D \leq (0.001\text{-}0.1)$ عندها يجرى الفصل في قمع الفصل بمرات متعاقبة لغاية 6-5 مرات باستخدام مذيب جديد في كل مرة.

ويمكن تعريف الحالة الفيزيائية للأطوار عند وصف عملية الفصل مع الطور الحاوي على العينة أولا، فمثلاً عندما تكون العينة في طور سائل والطور الثاني عبارة عن جسم صلب فإن الفصل الحاصل هو تجزئة سائل – صلب.

وهناك عدة تقنيات فصل هامة تعتمد على الاستخلاص البسيط وتتضمن

- الاستخلاص سائل – سائل
- الاستخلاص سائل – صلب
- الاستخلاص صلب – سائل
- الاستخلاص غاز – صلب

أولاً: الاستخلاص سائل – سائل Liquid-Liquid Extractions:

يتم الاستخلاص سائل–سائل بين طورين غير قابلين للمزج يكون أحداهما طور مائي والآخر طور عضوي مثل رابع كلور الكربون أو كلوروفورم ويتم الاستخلاص باستخدام قمع الفصل حيث يرج القمع لزيادة سطح التماس بين الطورين، وعندما يصبح الاستخلاص كاملاً يترك السائلان لينفصلان حيث يستقر الطور الأثقل في قاع قمع الفصل.

يعّد الاستخلاص سائل – سائل واحدا من أكثر تقنيات الفصل المستخدمة في المختبرات البيئية، السريرية والصناعية.

أمثلة توضح أهمية طريقة الاستخلاص في التحاليل السريرية والبيئية:

1- فصل وتعيين الرصاص في الدم، فبعد تخريب المادة العضوية يشكل الرصاص معقداً مخلبياً مع كاشف دي ثيزون والذي يستخلص بمذيب كلور المتيلين عند (pH:8-10) ثم يعين بطريقة التحليل الطيفي.

2- المراقبة الدورية لمياه الشرب للتأكد من نسبة مركبات تري هالو الميتان التي تنتج عن تعقيم المياه باستخدام الكلور والمركبات الناتجة ($CHCl_3$، $CHClBr_2$، $CHBrCl_2$، $CHBr_3$) حيث وجد أن بعض هذه المركبات كانت مسببة للسرطان ومن أجل تحديد تراكيز هذه المواد يتم أولاً استخلاصها من الطور المائي باستخدام مذيب البنتان ثم إيجاد تركيزها باستخدام طريقة الكروموتوغرافيا الغازية.

3- يتم فحص عصير البرتقال بالنسبة لوجود المبيدات(البستيسيد)الفسفورية العضوية، حيث يتم مزج عينة من عصير البرتقال مع الأسيتونتريل ويرشح، ويتم استخلاص أي مبيدات عضوية فسفورية بالرشاحة مع ايتر البترول قبل تحليلها بالكروماتوغرافيا الغازية.

مبادئ الاستخلاص بالمذيبات:

يشترط في المذيب العضوي المستعمل في الاستخلاص أن يكون مذيباً جيداً للمادة المذابة المراد استخلاصها. كما يجب أن ينفصل عن الماء بسرعة وبشكل كامل إذا ترك المخلوط ليستقر. ويعتمد الشرط الأخير على الوزن النوعي للمذيب العضوي والذي يساوي حاصل قسمة كثافة المذيب العضوي على كثافة الماء وكلما كان الوزن النوعي أكبر بكثير من الواحد أو أصغر بكثير من الواحد كلما كان انفصال الطبقتين المائية والعضوية عن بعضهما سريعاً وكاملاً.

يعتبر الكلوروفورم (الوزن النوعي = 1.49) مذيب ثقيل نسبياً، الوزن النوعي لمذيب رابع كلور الكربون = 1.59. ويعتبر البنزن (الوزن النوعي = 0.88) وايتيل الايتر (الوزن النوعي = 0.71) مذيبات أخف من الماء.

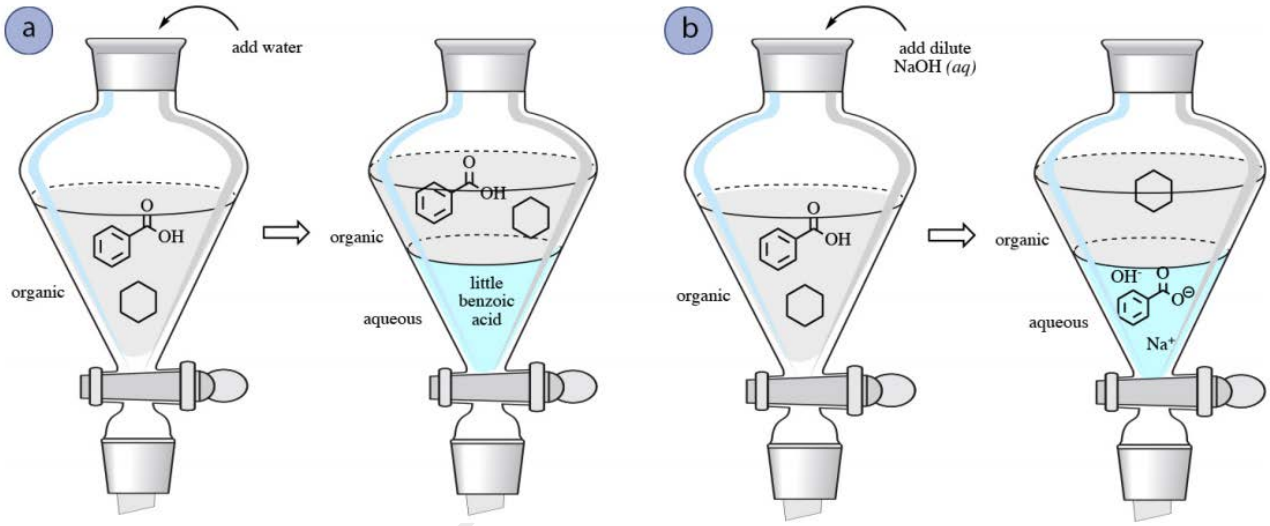
مثال: لدينا محلول عضوي يحوي على حمض البنزوئيك وحلقي الهكسان منحلان في مذيب أسيتات الايتيل والمطلوب استخلاص حمض البنزوئيك من الطور العضوي.

عند إضافة الطور المائي إلى المحلول تنفصل كمية صغيرة جداً من حمض البنزوئيك إلى الطور المائي لأنه حمض ضعيف ينحل بشكل جزئي في الماء ومن أجل زيادة الانتقائية وتحسين عملية الاستخلاص يتم إضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم إلى الطور العضوي ويحدث التفاعل الآتي:

$$C_6H_5COOH + NaOH \rightarrow C_6H_5COONa + H2O$$

Benzoic acid Sodium benzoate

حيث يتشكل ملح بنزوات الصوديوم الذي ينحل في الطور المائي وبالتالي نحصل على طورين الطور العضوي يحوي حلقي الهكسان والطور المائي يحوي الملح الصوديومي لحمض البنزوئيك.



معامل التوزع:

تتوزع المادة بين طورين غير متجانسين بعد عملية الخلط والرج خلال زمن محدد ومدروس ويعبر عن عملية التوزع بمعامل يسمى معامل التوزع K_D ويدل على تركيز المادة A المنتقل إلى الطور العضوي بالنسبة لتركيزها المتبقي في الطور المائي:

$$\mathbf{K_D} = \frac{[\mathbf{A}_{or}]}{[\mathbf{A}_{w}]}$$

إذا كانت قيمة ثابت التوزع كبيرة هذا يعني أن نسبة المادة في الطور العضوي كبيرة.

نسبة التوزع:

تتأين بعض المواد جزئياً في الطبقة المائية كأنها حموض ضعيفة وبالتالي يدخل تأثير pH في عملية الفصل. **مثلاً** استخلاص حمض البنزوئيك وهو حمض ضعيف HD_Z وبالتالي سيتواجد في الماء بشكله الجزيئي والمتشرد ومن أجل الدلالة على نجاح عملية الاستخلاص أدخل مفهوم آخر وهو **نسبة التوزع وهو عبارة عن حاصل قسمة تركيز المادة في الطور العضوي على مجموع تراكيز أشكال المادة في الطور المائي.**

$$HD_Z \rightleftharpoons H^+ + D_Z^-$$

تعطى نسبة التوزع للمركب HD_Z بين الطورين بالعلاقة:

$$D = \frac{[HD_Z]_{or}}{[HD_Z]_w + [D_Z^-]_w} \qquad (1)$$

للحصول على علاقة رياضية تربط بين نسبة التوزع ومعامل التوزع ندخل قيمة ثابت تشرد الحمض الضعيف K_a في الطور المائي:

$$K_a = \frac{[H^+]_w \cdot [D_Z^-]_w}{[HD_Z]_w} \qquad (2)$$

وبالتالي:

$$[D_Z^-]_w = \frac{Ka \cdot [HD_Z]_w}{[H^+]_w} \qquad (3)$$

ومعامل توزع المادة يعطى بالعلاقة:

$$K_D = \frac{[HD_Z]_{or}}{[HD_Z]_w} \qquad (4)$$

وبالتالي:

$$[HD_Z]_{or} = K_D \cdot [HD_Z]_w \qquad (5)$$

بتعويض المعادلتين 3 و5 في المعادلة 1 ينتج:

$$D = \frac{K_D \cdot [HD_Z]_w}{[HD_Z]_w + K_a \frac{[HD_Z]_w}{[H^+]_w}}$$

$$\mathbf{D} = \frac{\mathbf{K_D}}{\mathbf{1} + \boldsymbol{K_a} \ / \ [\boldsymbol{H^+}]_{\boldsymbol{w}}}$$

وهي العلاقة التي تربط بين نسبة التوزع وpH المحلول المائي.

- إذا كان $K_a << [H^+]_w$ هذا يعني أن $D= K_D$ وتكون نسبة الاستخلاص (التوزع) مرتفعة جداً (انتقال حمض البنزوئيك إلى الطور العضوي كبير).
- أما إذا كانت $K_a >> [H^+]_w$ عندها تكون قيمة نسبة التوزع D صغيرة جداً أي يبقى حمض البنزوئيك في الطور المائي فقط.

مردود الاستخلاص (كفاءة الاستخلاص):

وهو نسبة المادة المنتقلة إلى الطور العضوي من الطور المائي تحت تأثير خاصة الانحلال في كلا الطورين أي هو **عبارة عن (حاصل قسمة عدد ميلي مولات n (عدد الجزئيات الغرامية) من المادة المنحلة في الطور العضوي على عدد ميلي مولات المادة المنحلة الكلية) مضروباً بـ 100**. ويعتبر مردود الاستخلاص من أهم البارامترات المعبرة عن نجاح عملية الاستخلاص.

$$\mathbf{R\%} = \frac{[\boldsymbol{A}]_{\boldsymbol{or}} . \boldsymbol{V_{or}}}{[\boldsymbol{A}]_{\boldsymbol{or}} . \boldsymbol{V_{or}} + [\boldsymbol{A}]_{\boldsymbol{w}} . \boldsymbol{V_w}} \times \mathbf{100}$$

حيث V_{or} وV_w حجم كل من الطور العضوي والمائي.

بتقسيم المقام والبسط على الجداء $[\boldsymbol{A}]_{\boldsymbol{w}} . \boldsymbol{V_{or}}$

تصبح العلاقة كما يلي:

$$\mathbf{R\%} = \frac{\frac{[\boldsymbol{A}]_{\boldsymbol{or}} . \boldsymbol{V_{or}}}{[\boldsymbol{A}]_{\boldsymbol{w}} . \boldsymbol{V_{or}}}}{\frac{[\boldsymbol{A}]_{\boldsymbol{or}} . \boldsymbol{V_{or}}}{[\boldsymbol{A}]_{\boldsymbol{w}} . \boldsymbol{V_{or}}} + \frac{[\boldsymbol{A}]_{\boldsymbol{w}} . \boldsymbol{V_w}}{[\boldsymbol{A}]_{\boldsymbol{w}} . \boldsymbol{V_{or}}}} \times \mathbf{100}$$

بعد الاختصار تصبح علاقة مردود الاستخلاص:

$$\mathbf{R\%} = \frac{\frac{[\boldsymbol{A}]_{\boldsymbol{or}}}{[\boldsymbol{A}]_{\boldsymbol{w}}}}{\frac{[\boldsymbol{A}]_{\boldsymbol{or}}}{[\boldsymbol{A}]_{\boldsymbol{w}}} + \frac{\boldsymbol{V_w}}{\boldsymbol{V_{or}}}} \times \mathbf{100}$$

وبالتالي العلاقة التي تربط بين مردود الاستخلاص ونسبة التوزع تكون:

$$\mathbf{R\%} = \frac{\boldsymbol{D}}{\boldsymbol{D} + \frac{\boldsymbol{V_w}}{\boldsymbol{V_{or}}}} \times \mathbf{100}$$

مسألة:

إذا أخذ 20ml من محلول مائي من حمض البنزوئيك HD_z تركيزه 0.1M وخلط مع 10ml من الايتر بعد الرج ترك المخلوط ليستقر وفصلت الطبقتين ووجد أن مقدار الجزء المتبقي من الحمض في الطبقة المائية يساوي 0.5mM والمطلوب:

- احسب قيمة معامل التوزع؟ وما هي قيمة مردود الاستخلاص؟

الحل:

$$D = \frac{[A_{or}]}{[A_w]}$$

أولاً نحسب عدد ميلي مولات من حمض البنزوئيك قبل الاستخلاص والموجود في 20ml من الماء:

$$(mM)\ n_w = 0.1 \times 20 = 2mM$$

ومن نص المسألة إن الجزء المتبقي في الطبقة المائية يساوي 0.5mM عندها يكون عدد ميلي مولات من الجزء المستخلص (في الطبقة العضوية) يساوي:

$$(mM)\ n_{or} = 2 - 0.5 = 1.5mM$$

تركيز الحمض في الطبقة العضوية:

$$[HD_Z]_{or} = \frac{1.5}{10} = 0.15M$$

تركيز الحمض المتبقي في الطبقة المائية:

$$[HD_Z]_w = \frac{0.5}{20} = 0.025M$$

وبالتالي قيمة معامل التوزع:

$$D = \frac{[HD_Z]_{or}}{[HD_Z]_w}$$

$$D = \frac{0.15}{0.025} = 6$$

أما قيمة مردود الاستخلاص:

$$R\% = \frac{D}{D+\frac{V_w}{V_{or}}} \times 100$$

$$R\% = \frac{6}{6+\frac{20}{10}} \times 100$$

$$R\% = 75\%$$

حساب كمية المادة A المتبقية في الطور المائي بعد عمليات الاستخلاص:

إن معرفة التركيز المتبقي من المادة المستخلصة بعد عملية الاستخلاص يساهم إلى حد بعيد في معرفة جدوى استخدام المحل المناسب، وحجوم الأطوار المأخوذة كما يدل إلى الحاجة لعمليات استخلاص لاحقة.

إذا فرضنا أن تركيز المادة الكلي في الطور المائي قبل الاستخلاص هو $[A_0]$ فبعد الاستخلاص لمرة واحدة يلاحظ توزع المادة بين الطورين ويعطى التوزع بالعلاقة الآتية:

$$\mathbf{[A_0]_w\ V_w = [A_w]_1\ .\ V_w + [A_{or}]_1\ .\ V_{or}} \qquad (1)$$

حيث تشير الأدلة خارج القوسين إلى عدد مرات الاستخلاص.

في هذه الحالة يكون معامل التوزع يساوي نسبة التوزع.

$$D = \frac{[A_1]_{or}}{[A_1]_w}$$

بالتعويض في العلاقة 1:

$$\mathbf{[A_0]_w\ V_w = [A_w]_1\ .\ V_w + [A_w]_1\ .\ D.\ V_{or}}$$

$$\mathbf{[A_0]_w\ V_w = [A_w]_1\ (\ V_w + \ D.\ V_{or}\ )}$$

تصبح قيمة $\mathbf{[A_w]_1}$:

$$\mathbf{[A_w]_1 = \frac{[A_0]_w\ .\ V_w}{V_w + D.V_{or}}}$$

نقسم البسط والمقام على V_w:

$$\mathbf{[A_w]_1 = \frac{[A_0]_w}{1 + D.\frac{V_{or}}{V_w}}}$$

تعبر العلاقة السابقة عن تركيز أو كمية المادة المتبقية في الطور المائي بعد عملية استخلاص واحدة.

ويمكن بالاعتماد عليها التوصل إلى علاقات أخرى تعبر عن أكثر من عملية استخلاص:

$[A_w]_2 = \frac{[A_0]_w}{(1+D.\frac{V_{or}}{V_w})^2}$ بعد عمليتي الاستخلاص

$[A_w]_n = \frac{[A_0]_w}{(1+D.\frac{V_{or}}{V_w})^n}$ بعد n عملية الاستخلاص

ويحسب مردود الاستخلاص في حالة تكرار الاستخلاص بعدد n مرات من العلاقة:

$$R\% = [1 - \frac{1}{(1+D.\frac{V_{or}}{V_w})^n}] \times 100$$

مسألة 1:

لدينا مادة مذابة A في محلول مائي حجمه 50ml وتركيز المادة المذابة فيه 0.05M استخلصت المادة المذابة من المحلول المائي باستخدام 15ml من الكلوروفورم وكانت قيمة معامل توزع المادة بين الطورين $K_D = 5$ والمطلوب:

1- احسب كفاءة الاستخلاص لعملية الفصل.

2- احسب التركيز النهائي للمادة المذابة A في كل طور.

3- احسب حجم الكلوروفورم اللازم لاستخلاص 99.9% من المادة المذابة A. وناقش النتيجة.

4- احسب عدد مرات الاستخلاص اللازمة للحصول على 99.9% من المادة المذابة A.

الحل:

1- تحسب كفاءة الاستخلاص من العلاقة:

$$R\% = \frac{D}{D+\frac{V_w}{V_{or}}} \times 100$$

$$R\% = \frac{5}{5+\frac{50}{15}} \times 100$$

$$R\% = 60\%$$

2- يحسب التركيز النهائي للمادة في الطور المائي من العلاقة:

$$[A_w]_1 = \frac{[A_0]_w}{1+D.\frac{V_{or}}{V_w}}$$

بالتعويض:

$$[A_w]_1 = \frac{0.05}{1+5.\frac{15}{50}}$$

$$[A_w]_1 = 0.02M$$

أما تركيز المادة المنتقل إلى الطور العضوي يحسب كما يلي:

إن عدد مولات من المادة المذابة في الطور المائي قبل الاستخلاص تساوي:

$$(n_o)_w = [A_o]_w \times V_w$$

$$n = 0.05 \times \frac{50}{1000}$$

$$n = 0.0025 \text{ mol}$$

وعدد مولات من المادة المذابة المتبقية في الطور المائي بعد الاستخلاص تساوي:

$$(n_1)_w = [A_1]_w \times V_w$$

$$(n_1)_w = 0.02 \times \frac{50}{1000}$$

$$(n_1)_w = 0.001mol$$

وبالتالي عدد مولات المادة المنتقلة إلى الطور العضوي (المستخلصة) تساوي:

$$(n_1)_{or} = (n_o)_w - (n_1)_w$$

$$(n_1)_{or} = 0.0025 - 0.001 = 0.0015mol$$

ويكون تركيز المادة المذابة النهائي في الطور العضوي يساوي:

$$[A_1]_{or} = \frac{(n_1)_{or}}{V_{or}}$$

$$[A_1]_{or} = \frac{0.0015}{0.015}$$

$$[A_1]_{or} = 0.1M$$

3- يحسب حجم الكلوروفورم اللازم لاستخلاص 99.9% من المادة المذابة A من علاقة مردود الاستخلاص:

$$R\% = \frac{D}{D+\frac{V_w}{V_{or}}} \times 100$$

$$99.9 = \frac{5}{5+\frac{50}{V_{or}}} \times 100$$

$$V_{or} = 9990ml$$

4- تحسب عدد مرات الاستخلاص اللازمة للحصول على كفاءة استخلاص 99.9% من العلاقة:

$$R\% = [1- \frac{1}{(1+D.\frac{V_{or}}{V_w})^n}] \times 100$$

$$99.9 = 100 - \frac{100}{(1+5.\frac{15}{50})^n}$$

$$100 - 99.9 = \frac{100}{(1+5.\frac{15}{50})^n}$$

$$0.1 = \frac{100}{(2.5)^n}$$

$$(2.5)^n = \frac{100}{0.1}$$

$$(2.5)^n = 1000$$

وبأخذ لوغاريتم الطرفين نجد:

$$n \log(2.5) = \log(1000)$$

$$0.3979\ n = 3$$

وبالتالي **n= 7.53** وبالتالي عدد مرات الاستخلاص اللازمة للحصول على كفاءة استخلاص 99.9% يساوي **8**.

مسألة 2:

لدينا مادة مذابة في محلول مائي حجمه 10ml وثابت توزع المادة يساوي 20. بين بالحساب أيهما أفضل من حيث كفاءة الاستخلاص:

1- الاستخلاص بواسطة 20ml من المذيب العضوي لمرة واحدة.

2- الاستخلاص بواسطة 10ml من المذيب العضوي مرتين متتاليتين.

استخلاص المعادن بالمذيبات:

يعتبر فصل الأيونات المعدنية من أهم تطبيقات الاستخلاص بالمذيبات، إن جزئيات المركبات العضوية المتعادلة تميل إلى الذوبان في المذيبات العضوية المتعادلة ولا تذوب في الماء القطبي، بينما الأيونات المعدنية تبقى في الماء ولهذا لا يمكن استخلاص الأيونات المعدنية من الطور المائي إلى الطور العضوي لأنها لا تذوب فيه إلا إذا تم معادلة شحنتها عن طريق إضافة مادة ما (لاقط) تتفاعل مع الأيون المعدني وينتج عن ذلك مركب متعادل شبه عضوي إما أن يكون معقد معدني مخلبي متعادل أو معقد معدني مشترك.

أولاً: الاستخلاص بتشكل معقدات عضوية معدنية مخلبية:

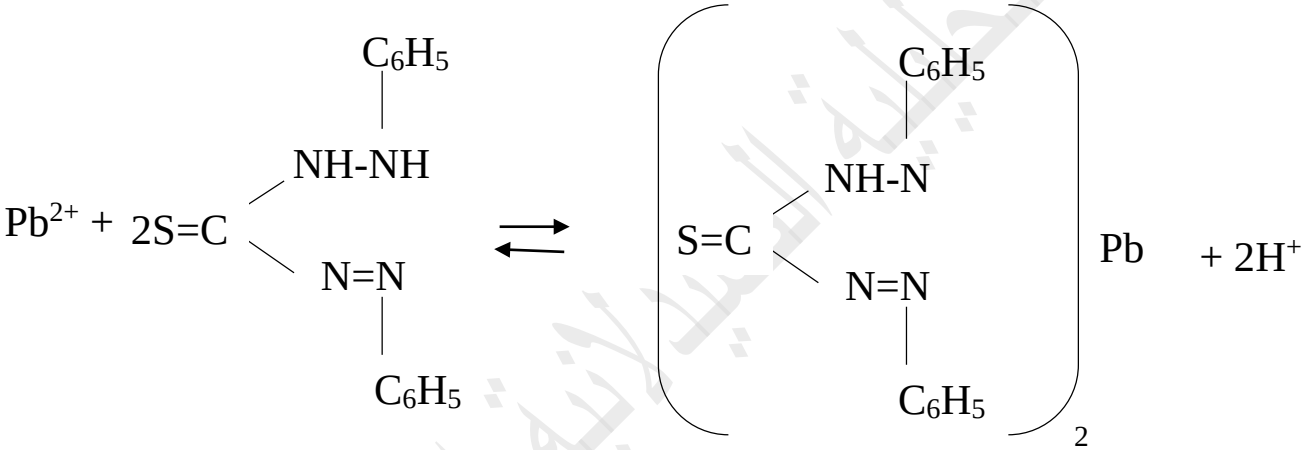
تشكل معظم المعادن معقدات ثابتة مع بعض الكواشف (اللواقط) العضوية حيث تستخدم هذه الظاهرة تحليلياً لتحديد تركيز العديد من الشوارد المعدنية أو لحجب بعضها الآخر الذي يؤثر أحياناً بشكل سلبي على نتائج التحليل. تشكل الشوارد المعدنية في المحاليل المائية روابط كهربائية تمنعها من الانتقال إلى الطور العضوي إلا بعد فقدان شحنتها الكهربائية عن طريق استخدام مركبات عضوية (لواقط) تشكل معقدات ثابتة في الطور المائي مع الشوارد المعدنية المطلوب دراستها. لذلك ينصح عند نقل شاردة مشحونة إلى الطور العضوي باستخدام الاستخلاص البحث عن مركب عديم الشحنة ويحمل مجموعات غير قطبية تشكل مع الشاردة المعدنية معقداً غير متشرد في الماء يمكن نقله لاحقاً إلى الطور العضوي باستخدام المذيب المناسب. لا تصلح جميع اللواقط العضوية القادرة على تشكيل معقدات ثابتة مع الشوارد المعدنية لعمليات الاستخلاص الكيميائي مثلاً يشكل مركب EDTA مع الشوارد المعدنية معقدات ثابتة كيميائياً في الطور المائي وتحمل شحنة كهربائية ولا تستخلص بالمذيبات العضوية.

آلية تشكل المعقدات:

تعتبر معظم عوامل التعقيد المخلبية حموض ضعيفة تتشرد في الوسط المائي وعند تفاعلها مع الأيون المعدني يحل الأيون المعدني محل أيون الهيدروجين في الحمض الضعيف وبذلك يتكون معقد مخلبي متعادل.

مثال عن آلية تشكل المعقدات ندرس مراحل استخلاص الرصاص الثنائي باستخدام كاشف ديتيزون (Dithizone) حيث يستخلص المعقد المتشكل بمذيب كلوروفورم.

تكتب معادلة تفاعل الرصاص مع كاشف ديتيزون بالشكل الآتي:



ديتيزون **معقد الرصاص مع ديتيزون**

ويجري الاستخلاص إما عن طريق إضافة محلول العامل المخلبي المائي إلى المحلول المائي للأيون المعدني المراد استخلاصه ثم يستخلص المعقد المخلبي الراسب والناتج عن التفاعل بواسطة مذيب عضوي مناسب، أو يجرى الاستخلاص عن طريق إذابة العامل المخلبي في المذيب العضوي ثم إضافة ذلك المحلول المائي للأيون المعدني حيث يتفاعل مع العامل المخلبي في المنطقة الواقعة بين الطبقتين المائية والعضوية ثم ينتقل المعقد المخلبي الناتج إلى الطبقة العضوية.

ويتضمن استخلاص أيون المعدني M^{n+} بواسطة العامل المخلبي Hz (Dithizone) وتتم عملية الاستخلاص وفق أربع مراحل:

<u>المرحلة الأولى:</u>

يتوزع اللاقط Hz بين الطورين العضوي والمائي:

$$n\,(Hz)_w \rightleftharpoons n\,(Hz)_{or}$$

ويعطى معامل التوزع للديتيزون بين الطورين:

$$K_{D_{Hz}}^{n} = \frac{[Hz]_{or}}{[Hz]_w} \qquad (1)$$

المرحلة الثانية:

يتشرد الديتيزون في الطور المائي:

$$n\,Hz \rightleftharpoons n\,H^+ + n\,z^-$$

ويكتب ثابت تشرد الحمض الضعيف في الطور المائي بالشكل الآتي:

$$K_a^n = \frac{[H^+]^n \,.\, [z^-]^n}{[Hz]_w^n} \qquad (2)$$

المرحلة الثالثة:

يرتبط الأيون المعدني الموجود في الطور المائي مع أيون العامل المخلبي ليتشكل معقد مخلبي معتدل ثابت مع الزمن يمكن استخلاصه كمياً في المرحلة الرابعة:

$$M^{n+} + n\,z^- \rightleftharpoons Mz_n$$

$$K_f = \frac{[Mz_n]_w}{[M^{n+}] \,.\, [z^-]^n} \qquad (3)$$

المرحلة الرابعة:

يتوزع المعقد المخلبي المتشكل بين الطورين المائي والعضوي:

$$(Mz_n)_w \rightleftharpoons (Mz_n)_{or}$$

تعطى معادلة معامل التوزع للمعقد بين الطورين بالشكل:

$$K_{D_{Mz_n}} = \frac{[Mz_n]_{or}}{[Mz_n]_w} \qquad (4)$$

حيث أن:

$K_{D_{Hz}}$: معامل التوزع للعامل المخلبي (ديتيزون).

$K_{D_{Mz_n}}$: معامل التوزع للمعقد المخلبي المتشكل.

K_a: ثابت تشرد العامل المخلبي.

K_f: ثابت تشكل المعقد المخلبي.

إذا فرضنا أن المعقد المخلبي يوجد بشكل رئيسي في الطور العضوي أي أن قيمة $K_{D_{Mz_n}}$ كبيرة جداً (أي النسبة المنتقلة إلى الطور العضوي من المعقد المعتدل المتشكل في الطور المائي كبيرة جداً) وأنه لا يتفكك في الطور العضوي غير القطبي وبالتالي يمكن كتابة نسبة التوزع للأيون المعدني كما يلي:

$$D = \frac{[Mz_n]_{or}}{[M^{n+}]_w} \qquad (5)$$

من المعادلة (4) نجد أن:

$$[Mz_n]_{or} = K_{D_{Mz_n}} . [Mz_n]_w$$

بالتعويض في المعادلة (5):

$$D = \frac{K_{D_{Mz_n}} . [Mz_n]_w}{[M^{n+}]_w} \qquad (6)$$

نعوض قيمة $[Mz_n]_w$ من العلاقة (3) في العلاقة (6):

$$D = \frac{K_{D_{Mz_n}} . K_f . [M^{n+}] . [z^-]^n}{[M^{n+}]_w}$$

وتصبح العلاقة:

$$D = K_{D_{Mz_n}} . K_f . [z^-]^n \qquad (7)$$

نعوض عن قيمة $[z^-]^n$ من العلاقة (2) في العلاقة (7):

$$D = \frac{K_{D_{Mz_n}} . K_f . K_a^n . [Hz]_w^n}{[H^+]^n} \qquad (8)$$

وبالتعويض عن قيمة $[Hz]_w^n$ من المعادلة (1) في العلاقة (8):

$$D = \frac{K_{D_{Mz_n}} . K_f . K_a^n . [Hz]_{or}^n}{K_{D_{Hz}}^n . [H^+]^n} \qquad (9)$$

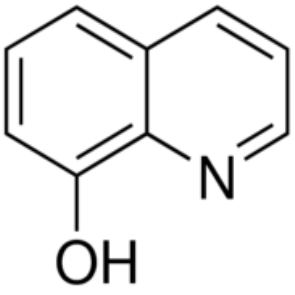
وبالتالي تعطى نسبة التوزع (الاستخلاص) بالعلاقة الآتية:

$$D = K \cdot \frac{[Hz]_{or}^{n}}{[H^{+}]^{n}}$$

حيث الثابت K يمثل جميع القيم الثابتة في العلاقة الأخيرة:

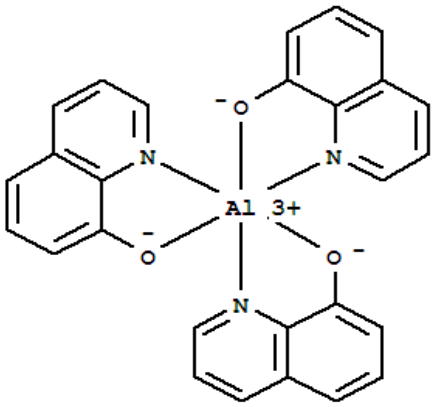
$$K = \frac{K_{D_{Mz_n}} \cdot K_f \cdot K_a^n}{K_{D_{Hz}}^n} \qquad (9)$$

- ❖ نلاحظ أن نسبة توزع أيون المعدن تعتمد علةى تركيز العامل المخلبي وعلى درجة حموضة الوسط pH في الطبقة المائية. وعند مضاعفة تركيز العامل المخلبي عشر أضعاف سوف تزداد كفاءة الاستخلاص بنفس الدرجة بينما يزداد الرقم الهيدروجيني pH بمقدار وحدة واحدة لذلك عند استخدام تركيز عالي من العامل المخلبي فإنه يمكن إجراء الاستخلاص بنجاح.
- ❖ كلما كان المعقد المخلبي الناتج أكثر ثبات (K_f كبيرة) كلما كان الاستخلاص أقرب للتمام.
- ❖ كلما كانت K_a كبير للعامل المخلبي وبالتالي تزداد ذوبانه في الماء أي $K_{D_{Hz}}$ صغيرة وينتج عن ذلك زيادة في قيمة D وهذا يعني أن الاستخلاص أقرب للتمام.
- ❖ يمكن زيادة انتقائية العامل المخلبي في بعض الحالات عن طريق تغيير في تركيبه وكمثال عن ذلك يشكل كاشف 8- هيدروكسي الكينولين معقدات ثابتة مع العديد من الأيونات المعدنية ومنها الألمنيوم:



كاشف 8- هيدروكسي الكينولين

تتفاعل ثلاث جزئيات من الكاشف مع جزئية من الألمنيوم معقداً مخلبياً صيغته:



أما مشتق الأوكسين (2- ميتيل-8- هيدروكسي الكينولين) لا يشكل معقد مع الألمنيوم لأن وجود زمرة الميتيل يسبب إعاقة فراغية لن تسمح بتجمع ثلاث جزئيات من الكاشف حول ذرة الألمنيوم.

الاستخلاص بتشكيل مزدوجات الشوارد:

يعتمد هذا المبدأ على استخلاص الشوارد العضوية من المركبات الدوائية وغير الدوائية عبر ارتباطها مع شاردة أخرى كبيرة الحجم ولها شحنة معاكسة لتعطي معقدات ثابتة معتدلة كهربائياً يمكن نقلها بسهولة إلى الطور العضوي عبر الاستخلاص. تسمح هذه الطريقة بالعمل على الشكل الصيدلاني للمادة الفعالة ثم تعيينها بالمعايرات الحجمية اللونية أو بالطريقة الطيفية إذا كانت المعقدات المتشكلة ملونة ومن المركبات الدوائية التي تعين بهذه الطريقة (المورفين، الايفيدرين، البنز الكزنيوم، الكوكائيين والكودائيين).

- ❖ إذا كانت الطريقة المستخدمة للمعايرة تستخدم المشعرات للكشف عن نقطة نهاية المعايرة عندها يجب أن يكون المعقد المتشكل بين المشعر والمادة الدوائية أقل ثباتاً من المعقد المتشكل بين الكاشف (العامل المخلبي) والمادة الدوائية نفسها.

أهم العوامل المخلبية المستخدمة في استخلاص الأيونات المعدنية:

- ✓ **8- هيدروكسي الكينولين (الأوكسين):**

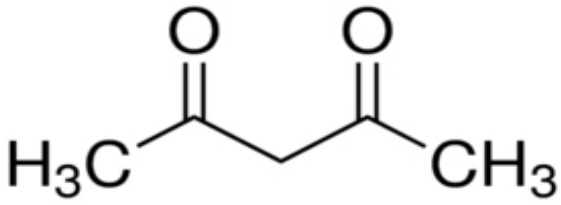
يتميز بانحلالية منخفضة في الماء ولكنه ينحل بشكل جيد في الكحول والكلوروفورم ويبلغ معامل توزع الأوكسين بين الطور المائي والكلوروفورم D=500.

يعتبر الأوكسين من العوامل المخلبية الهامة المستخدمة في الاستخلاص كونه يشكل مع العديد من الأيونات المعدنية (Mo, V, Fe, Cu, Bi, Ni….) معقدات مخلبية ثابتة ومن أجل تحسين انتقائية الأوكسين نستخدم عوامل حجب عند قيم pH محددة بدقة.

مثلاً: تحجب أيونات (Fe^{3+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}) باستخدام شوارد السيانيد CN^-. وتحجب شوارد الألمنيوم عند pH<8 باستخدام كاشف EDTA.

يمكن تحديد تراكيز تصل إلى $10^{-7}M$ من الأيونات المعدنية باستخدام كاشف الأوكسين.

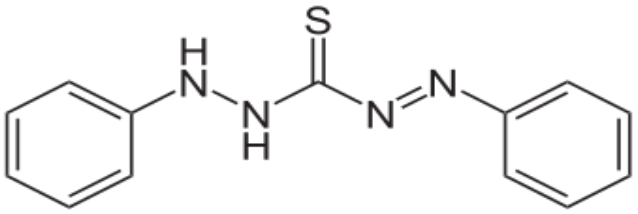
- ✓ **أسيتيل أسيتون:**



ينحل بشكل جيد في الماء وينحل في المذيبات العضوية البنزول والكلوروفورم، إذا استخدم البنزول طور عضوي عندها يبلغ معامل التوزع D=58 أما إذا استخدم الكلوروفورم فيبلغ قيمة معامل التوزع D=250.

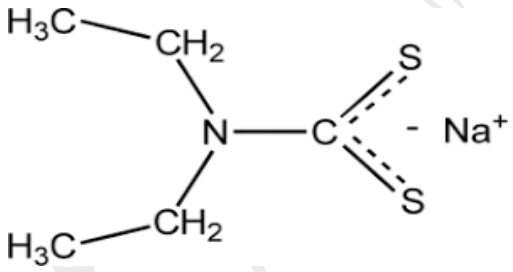
يشكل أسيتيل أسيتون مع العديد من الأيونات المعدنية (Al, pb, Fe, Cu, La, Ni….) معقدات ثابتة. يمكن تحديد تراكيز تصل إلى $10^{-5}M$ من الأيونات المعدنية باستخدام هذا الكاشف.

✓ **الديتيزون (ثنائي فينيل ثيو كاربازون):**



لا ينحل الديتيزون في الماء لكنه ينحل بشكل جيد في الكلوروفورم ورابع كلور الكربون. يبلغ معامل توزعه بين الطورين المائي ورابع كلور الكربون $D=1\times10^4$ أما مع الكلوروفورم فيبلغ معامل توزعه $D=2\times10^5$. يستخدم الديتيزون للكشف وتحديد عدد من الأيونات المعدنية مثل (pb, Ag, Hg, Cu, Cd, Co….). يمكن تسحين انتقائية عملية الاستخلاص بالديتيزون باعتماد قيم pH مختلفة.

✓ **ثنائي ايتيل ثنائي ثيوكاربامات الصوديوم:**



ينحل بشكل جيد في الماء وبشكل أقل في الكحول يبلغ معامل توزعه مع الكلوروفورم D=340 ويرتفع مع رابع كلور الكربون إلى D=2360.

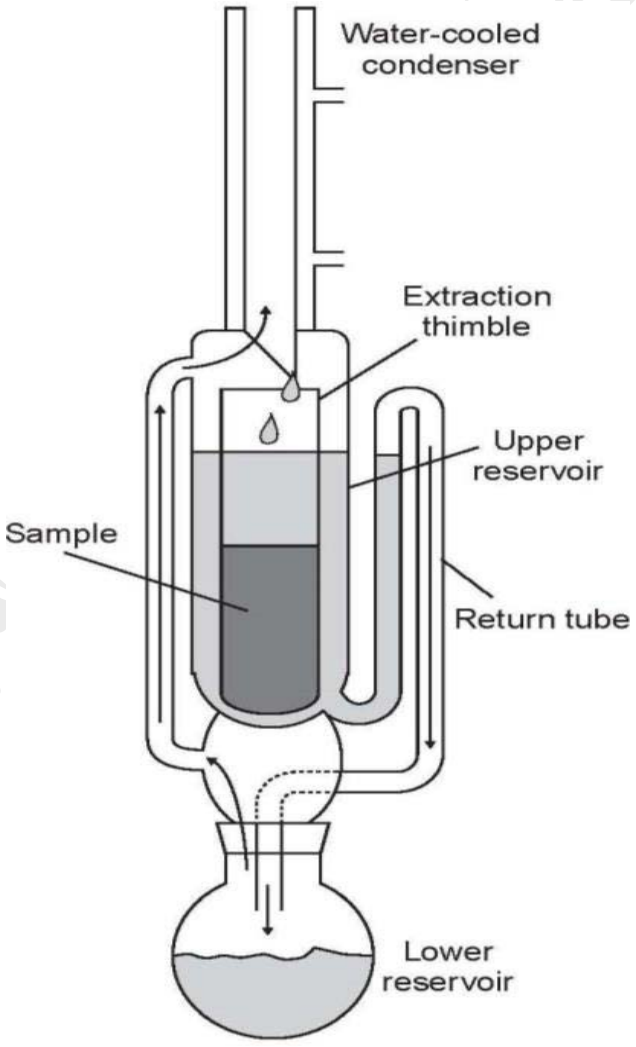
يستخدم لتعيين العناصر (Ni, Ag, Hg, Bi, pb, Cd…) وبعض المعقدات الناتجة عن الاستخلاص ملونة وبالتالي يسمح بتعيينها بالطريقة الطيفية.

استخلاص سوكسيليه:

يعتمد مبدأ هذه الطريقة على استخدام الاستخلاص المتكرر لليبيدات (وهي المواد الدهنية والتي تكون صلبة أو سائلة أي زيوت) والموجودة في المواد الغذائية بمذيب عضوي لاقطبي مثل ايتر البترول. حيث توزن العينة وتوضع في كتشبان نفوذي مصنوع من السيليلوز، يثبت في أعلى دورق التقطير الحاوي على المذيب العضوي المناسب المتعمد في استخلاص المادة الدهنية. يسخن المذيب إما عن طريق التسخين المباشر أو باستخدام حمام زيتي.

طريقة العمل:

يسخن المذيب حتى درجة الغليان عندها يتبخر المذيب بهدوء ويتصاعد البخار ضمن الدورق الحجمي ليتكاثف بعدها نتيجة تبريده، بعد تقطر المذيب يختلط مع العينة الغذائية ليستخلص جزءاً من المادة الدهنية المنحلة بالمذيب المستخدم. ينساب بعدها المذيب المحمل بالمادة الدهنية إلى أسفل الدورق التسخين الزجاجي. تتكرر العملية عدة مرات وتستغرق مدة زمنية طويلة (4-6) ساعات حيث يفترض خلال هذا الوقت استخلاص المادة الدهنية من العينة بشكل كامل. يفصل المذيب عن الدهن باستخدام المبخر الدوراني أو بالتقطير العادي ثم توزن المادة الدهنية المتبقية داخل الدورق بدقة.



جهاز الاستخلاص سوكسيليه

بعض الاستخدامات التطبيقية للاستخلاص بالمذيبات:

- يستخدم الاستخلاص لفصل المواد المراد تحليلها عن الشوائب المحتمل تداخلها وذلك قبل التحليل حيث نجد الكثير من الأيونات المعدنية وخاصة التي توجد بتراكيز ضئيلة جداً يتم استخلاصها قبل تحليلها عن طريق مفاعلتها مع العامل المخلبي المناسب.
- يستخدم الاستخلاص لتركيز كمية الأيون المعدني في حجم صغير وهذا مفيد عندما تكون حساسية طريقة التحليل المستخدمة ليست جيدة.
- إن عملية استخلاص المركبات العضوية أقل انتقائية من عملية استخلاص الأيونات المعدنية وذلك لأن استخلاص المركبات العضوية لا تتضمن تكوين مركبات معقدة أو تفاعلات حجب.
- يستخدم الاستخلاص لفصل المواد الدهنية من المواد الغذائية كمياً باستعمال المذيبات المناسبة. تعزل المذيبات بعد الاستخلاص حرارياً ويوزن الوزن المتبقي من الدهون. وبالتالي تقدر كفاءة الاستخلاص بناءاً على العوامل التالية:

1- قطبية المذيب العضوي المستخدم وقدرته الاستخلاصية.

2- مقدار المادة الدهنية الموجودة في المادة الغذائية.

3- طبيعة الوسط المناسب للاستخلاص بحيث يكون المردود أكبر ما يمكن.

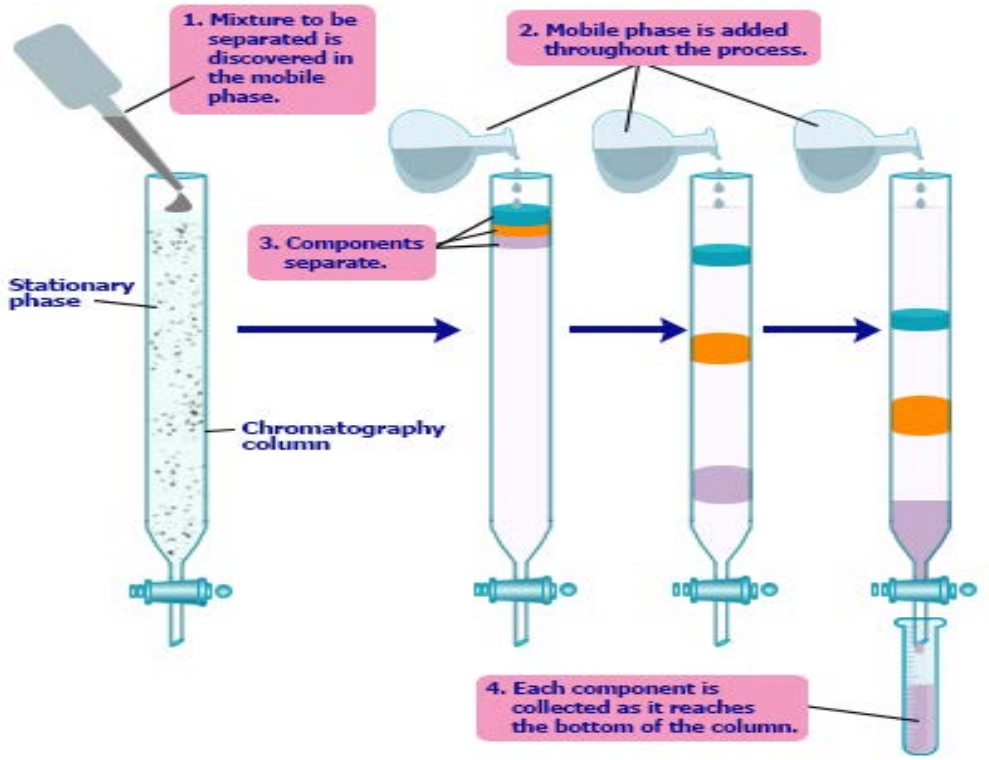
ومن أهم المذيبات المستخدمة في استخلاص الدهون ثنائي ايتيل الايتر، الكلوروفورم، ثلاثي كلور الايتيلين وثنائي كلور الميتان.

طرائق الفصل الكروماتوغرافي

إن أول من استخدام طرائق الفصل الكروماتوغرافي العالم النباتي الروسي مخائيل سويت عام 1906 حيث وصف كيفية فصل مركب الكلوروفيل وبعض الصباغات الأخرى من مستخلص نباتي باستخدام عمود زجاجي مملوء بكربونات الكالسيوم المستخدمة كمادة مازة حيث مرر على هذا العمود محلول الكلوروفيل والمواد الأخرى المنحلة في ايتر البترول ولاحظ أن مجموعة المكونات الملونة قد تجمعت في أعلى العمود ولكن بعد إضافة كميات إضافية من المذيب حدث انفصال المواد الملونة في عدة نطاقات بألوان مختلفة وعلى طول العمود سميت هذه العملية بالكروماتوغرافيا وتعني باليونانية الطباعة بالألوان.

تطورت بعد ذلك الطرائق الكروماتوغرافية وأصبحت أكثر كفاءة في فصل العديد من المركبات الكيميائية المعقدة الملونة منها وغير الملونة كما أصبحت أساساً للدراسات التحليلية والمراقبة الغذائية والدوائية والصناعية.

تعتمد الطرائق الكروماتوغرافية على العديد من العمليات المتتالية حيث تبدأ آلية الفصل بالتوزع لمكونات العينة بين طورين أحدهما ساكن ويسمى الطور الثابت وهو إما أن يكون صلب أو سائل مثبت على دعامة صلبة ويوضع في عمود أو يفرد على لوح من البلاستيك أو قطعة من الورق والآخر يسمى الطور المتحرك الذي يتحرك من خلال الطور الساكن وهو إما أن يكون سائل أو غاز ويسمى بالحامل carrier لأنه ينقل مكونات العينة عبر العمود وأحيانا يسمى بالمخرج eluent لأنه يخرج المواد من العمود كما تسمى عملية التحريك المواد عبر العمود بالتخريج elution وتتحرك المواد بسرع مختلفة تعتمد على ميل المواد للبقاء في الطور الثابت أو في الطور المتحرك. تتعلق سرعة الانتشار بنسبة توزع مكونات العينة المدروسة.



تلعب عملية تحضير الطور الثابت دوراً أساسياً في نجاح أو فشل عملية الفصل ففي بعض الأحيان يحضر هذا الطور بمزج حبيبات المادة الخاملة الصلبة مع سائل خامل وتملأ في عمود زجاجي أو توزع على سطح مستو، وفي حالات أخرى تستخدم المادة الصلبة فقط كطور ثابت بسبب قدرتها الامتزازية الكبيرة للمواد المذابة. فعند تحرك الطور السائل داخل العمود تأخذ مكونات العينة المختلفة على العمود نطاقات مختلفة يتعلق كل نطاق بقدرة المكون الامتزازية على سطح الطور الصلب (الساكن) وبتركيز هذا المكون.

تصنيف الطرائق الكروماتوغرافية:

يتم تصنيف الطرائق الكروماتوغرافية وفق ما يلي:

1- حسب طبيعة الطور المتحرك والطور الثابت:

- غاز – سائل Gas- liquid chromatography (GLC)
- غاز – صلب Gas- solid chromatography (GSC)
- سائل – سائل Liquid- liquid chromatography (LLC)
- سائل – صلب Liquid- solid chromatography (LSC)

2- حسب ميكانيكية عملية توزع (انتشار) المواد المراد فصلها في كلا الطورين:

- الكروماتوغرافيا الامتزازية
- الكروماوغرافيا تبادل الشاردي (الأيوني)
- الكروماتوغرافيا الذوبانية التجزيئية
- الكروماتوغرافيا المنخلية

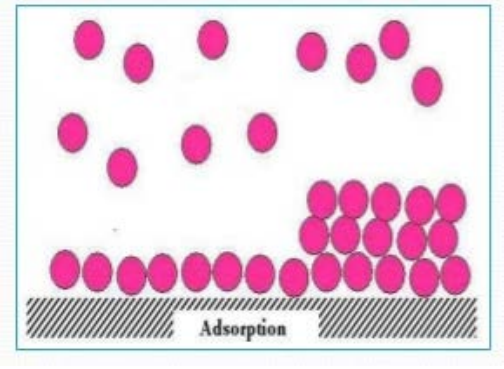
3- حسب تقنية الفصل:

- ✓ كروماتوغرافيا الأعمدة
- ✓ كروماتوغرافيا المستوية

فيما يلي سنتعرف على كل نوع من أنواع المذكورة سابقاً:

1- طريقة الكروماتوغرافيا السائلة – الصلبة (طريقة الكروماتوغرافيا الامتزازية):

اكتشفت هذه الطريقة في عام 1906 من قبل العالم سويت وتستخدم في نطاق واسع في تحليل المركبات العضوية والحيوية حيث يتكون الطور الثابت من مادة صلبة مثل هلام السيليكا silica gel أو الألومنيا والتي تكون مساحة سطحها كبير نسبياً ونشط كيميائياً. وتعبأ المادة الصلبة في عمود يمر من خلاله الطور المتحرك (سائل). ومن عيوب هذه الطريقة أن عدد المواد الصلبة التي يمكن استخدامها كطور ثابت محدود. كما أن معامل التوزع يعتمد على التركيز الكلي لذلك يكون الفصل غير تام.



إن ميكانيكية توزع المواد بين الطور المتحرك والثابت يعتمد على مدى قوة امتزاز (التصاق) المادة على سطح الطور الثابت الصلب بحيث أن المادة التي تمتز بقوة سوف تتأخر بالخروج

(أي تمكث مدة أطول في العمود) بينما المادة ذات الامتزاز الأقل تخرج من العمود في وقت مبكر وهكذا يتم فصل المواد عن بعضها ولهذا يمكن القول إن الطرائق الكروماتوغرافية التي يكون فيها الطور الثابت عبارة عن مادة صلبة تعتمد على الامتزاز ولذلك تسمى بالطريقة الكروماتوغرافية الامتزازية Adsorption chromatography.

2- طريقة الكروماتوغرافيا السائلة – السائلة:

قدمت هذه الطريقة من قبل العالمين مارتن وسينج عام 1941 حيث يكون الطور الثابت المستخدم عبارة عن طبقة رقيقة من السائل مثبتة على سطح مادة صلبة مسامية وخاملة أما الطور المتحرك يكون عبارة عن سائل آخر.

إن فصل المواد عن بعضها في هذه الطريقة يعتمد على مقدار انحلال (ذوبان) المادة في الطور الثابت بحيث أن المادة التي تذوب بشكل أكبر تتأخر أكثر في الخروج من العمود وعلى العكس المادة التي لا تحبذ الذوبان في الطور الثابت تخرج من العمود في وقت مبكر وبسرعة ولهذا يطلق على الطرائق الكروماتوغرافية التي يكون فيها الطور الثابت عبارة عن سائل بالطرائق الكروماتوغرافية الذوبانية التجزيئية partition chromatography.

3- طريقة الكروماتوغرافيا الغازي- الصلبة:

أصبحت هذه الطريقة شائعة وواسعة عندما بدأ استخدامها عام 1941 من العلماء هيس – كلايسون – فيلبس حيث تم تحضير أنواع جديدة من الأطوار الصلبة الساكنة التي تسمح بفصل الغازات المختلفة وتتميز بالدقة والحساسية العالية.

4- طريقة الكروماتوغرافيا الغازية – السائلة:

تعتبر هذه الطريقة من أكثر الطرائق انتشاراً وقد اكتشفها العالمان جيمس ومارتن عام 1952 حيث يمكن من خلالها فصل وكشف الآثار المتبقية من المواد العضوية حيث تستطيع تحديد تراكيز تصل إلى 10^{-15}g/l.

5- طريقة الكروماتوغرافيا التبادل الشاردي (الأيوني):

تعتبر هذه الطريقة نوع من الكروماتوغرافيا السائلة – الصلبة ولكن الفرق في ميكانيكية التوزع حيث لا تعتمد على آلية الامتزاز وإنما تعتمد على آلية التبادل الشاردي.

والمواد المستخدمة لعملية الفصل الشاردي هي عبارة عن حبيبات بوليميرية دقيقة وصلبة محملة بشوارد يمكن أن تستبدل مع شوارد أخرى موجودة في العينة المدروسة. تستخدم لفصل العناصر الانتقالية كما تستخدم لفصل الأحماض الأمينية.

6- طريقة الكروماتوغرافيا المستوية plane chromatography:

يختلف هذا النوع عن الطرائق السابقة حيث هنا لا يستخدم العمود الكروماتوغرافي وإنما يفرد الطور الثابت على لوح من الزجاج أو قطعة من الورق. تسمى الطريقة التي تستخدم قطعة الورق بالكروماتوغرافيا الورقية paper chromatography وتعتبر حالة خاصة من طريقة كروماتوغرافيا سائل – سائل حيث أن الطور الثابت عبارة عن طبقة رقيقة من الماء (أو أي سائل آخر) ممتزة على سطح الورقة المصنوعة من السيليلوز.

أما النوع الثاني من هذه الطرائق يسمى بالكروماتوغرافيا ذات الطبقة الرقيقة thin - layer chromatography وهي تشبه الكروماتوغرافيا الورقية لكن هنا يستبدل الورق بلوح من الزجاج أو البلاستيك مغطى بطبقة رقيقة من الألومينا أو هلام السيليكا أو أي مادة صلبة حبيبية تمتلك القدرة على الامتزاز وهي حالة من طريقة كروماتوغرافيا سائل – صلب. وتعتبر الكروماتوغرافيا ذات الطبقة الرقيقة أفضل تكرارية ودقة من الكروماتوغرافيا الورقية لذلك تستخدم بكثرة في المختبرات الكيميائية.

7- كروماتوغرافيا الترشيح على الهلام (الكروماتوغرافيا المنخلية):

ذكر مبدأ هذه الطريقة في المحاضرة الأولى.

الأسس النظرية لطرائق الفصل الكروماتوغرافي:

تعتمد طرائق الفصل الكروماتوغرافي على الأسس التي اقترحها العالمان مارتن وسينج والتي وضحت آلية الفصل بالتوزيع بين سائل – سائل. وقد استخدمت نفس الأسس بين غاز وسائل وفي بعض التقنيات الكروماتوغرافية الأخرى.

ولنبدأ بتصور مقطع صغير لعمود كروماتوغرافي حيث نجد أن جزيئات المادة المراد فصلها إما أن تكون عالقة في الطور الثابت وفي هذه الحالة تبقى المادة في العمود ولا تسير إلى الأسفل ولا تتقدم خلال العمود وإما أن توجد في الطور المتحرك وفي هذه الحالة تسير جزئيات المادة مع

العمود بنفس سرعة الطور المتحرك وبالتالي فإن وظيفة الطور المتحرك حمل ونقل المواد عبر العمود ولهذا يسمى بالحامل أما وظيفة الطور الثابت منع المواد من المرور عبر العمود عن طريق استبقائها بطرائق عديدة مثل الامتزاز أو التبادل.

1- معامل التوزع:

إن توزع جزئيات المادة المراد فصلها بين الطورين الثابت والمتحرك يعبر عنه بدلالة ثابت يسمى معامل التوزع وفق العلاقة:

$$D = \frac{C_S}{C_M}$$

حيث تعبر C_S عن تركيز المادة في الطور الثابت وC_M تركيز نفس المادة في الطور المتحرك. ويصلح معامل التوزع لجميع أنواع الفصل (امتزاز، تبادل أيوني والتجزيئي) وقيمته تحدد تواجد المادة في الطورين. فعندما يأخذ معامل التوزع قيمة كبيرة هذا يعني أن أغلب جزئيات المادة توجد في الطور الثابت مقارنة مع الطور المتحرك ونتيجة لذلك يتأخر خروجها من العمود.

2- زمن مكوث المادة في الطور المتحرك:

يمكن حساب الزمن الذي تمضيه المادة محملاً على الطور المتحرك من خلال ارتباط هذا الزمن بنسبة كمية المادة في الطور المتحرك إلى كمية في كلا الطورين:

$$\text{زمن مكوث المادة في الطور المتحرك} = \frac{\text{عدد الجزيئات الموجودة في الطور المتحرك}}{\text{العدد الكلي للجزيئات}}$$

$$t = \frac{C_M . V_M}{C_M . V_M + C_S . V_S}$$

نقسم البسط والمقام على قيمة $C_M . V_M$ ثم نختصر:

$$t = \frac{1}{1 + D\frac{V_S}{V_M}}$$

$$t = \frac{1}{1+K}$$

نرمز للمقدار $D\ \frac{V_S}{V_M}$ بالرمز K.

يسمى K معامل السعة وهو يتعلق بحجم الطورين الثابت والمتحرك.

3- معدل جريان المادة في الطور المتحرك:

يعبر عن معدل تدفق المادة في الطور المتحرك r ضمن العمود الكروماتوغرافي من حاصل جداء زمن مكوث المادة في الطور المتحرك t في سرعة جريان الطور المتحرك U:

$$r = U \cdot t = U \frac{1}{1+K} = U \frac{1}{1+D\frac{V_S}{V_M}}$$

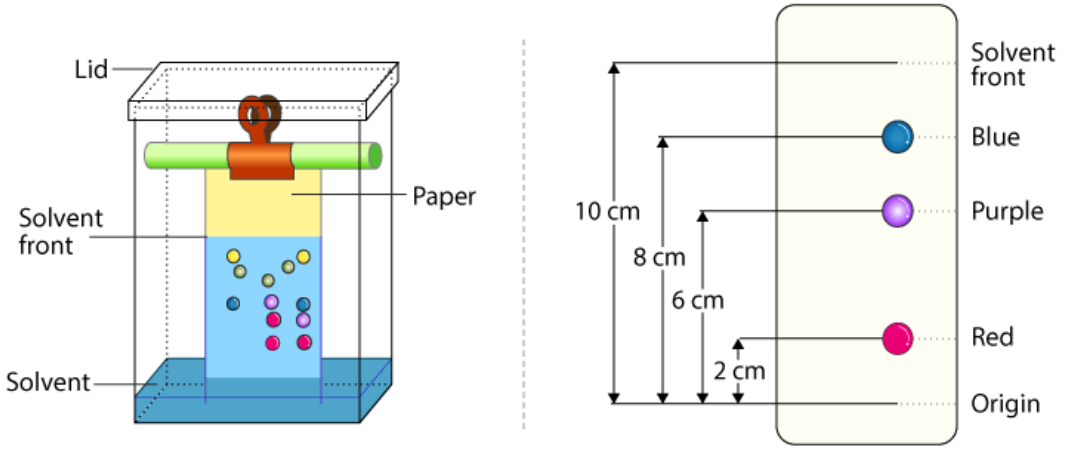
يتعلق معدل تدفق أي جزيء ضمن العمود الكروماتوغرافي بما يلي:

- ✓ بسرعة الطور المتحرك وهي سرعة ثابتة لجميع مكونات العينة.
- ✓ بالنسبة بين حجم الطور الثابت والمتحرك وهي ثابتة لجميع مكونات العينة.
- ✓ بمعامل التوزع وهو يختلف من مادة إلى أخرى وبناءاً على هذا الاختلاف يتم فصل المواد عن بعضها البعض.

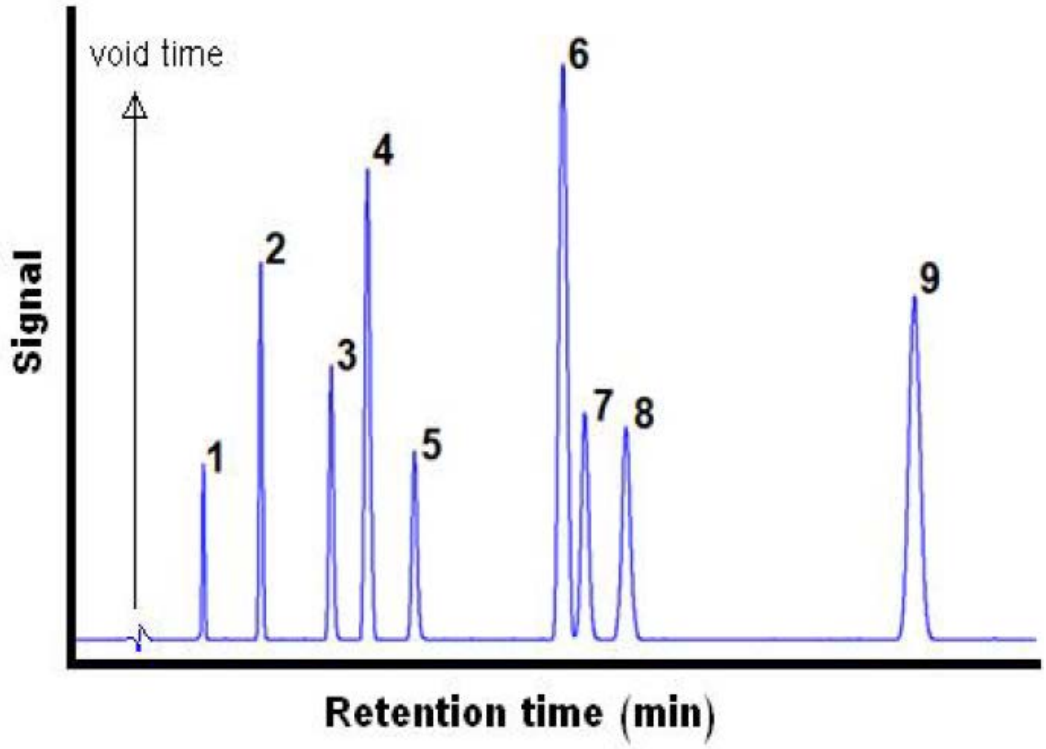
ملاحظة:

يتم فصل مكونات العينة في الطرائق الكروماتوغرافية بوضع كمية من العينة في مدخل العمود وأثناء تمرير الطور المتحرك تتحرك المكونات عبر العمود بمسافات مختلفة تعتمد على معامل التوزع لكل مكون ويوجد طريقتين لإنهاء التحليل وهما:

<u>الطريقة الأولى:</u> بعد زمن معين كافي لفصل المكونات عن بعضها تعزل مناطق الطور الثابت بحيث كل مكون ينتقل مسافة محددة تتعلق هذه المسافة بقدرة كل مكون الامتزازية على سطح الطور الصلب (طبقة رقيقة أو ورقة).



الطريقة الثانية: يتم إخراج مكونات العينة من العمود بواسطة الطور المتحرك حيث تخرج على دفعات وفي أزمنة مختلفة تبعاً لمعامل التوزع ويتم تحليل كل مكون مباشرة بعد خروجه من العمود بواسطة المقدر (الكاشف) detector مناسب يوضع في نهاية العمود. وعند رسم العلاقة بين استجابة المقدر وزمن احتفاظ المواد التي يتم فصلها عبر العمود نحصل على ما يسمى بالكروماتوغرام chromatogram.



4- زمن الاحتفاظ (الاستبقاء):

هو الزمن اللازم لفصل مكون واحد من مكونات العينة من لحظة ملامسة هذا المكون لسطح الطور الساكن إلى اللحظة التي يخرج منها من العمود ويتعلق هذا الزمن بطوال العمود الكروماتوغرافي ويتناسب معه طرداً ويرمز له t_R.

$$t_R = \frac{L}{r}$$

$$t_R = \frac{L}{U(\frac{1}{1+ D\frac{V_S}{V_M}})}$$

$$t_R = \frac{L}{U} . (1 + D \frac{V_S}{V_M})$$

$$t_M = \frac{L}{U}$$

وتصبح العلاقة:

$$t_R = t_M . (1 + D \frac{V_S}{V_M})$$

t_M: تعبر عن الزمن اللازم لمرور محلول الطور المتحرك خلال كامل الطور الثابت. وتعتبر العلاقة السابقة من العلاقات المهمة جداً واللازمة لحساب زمن احتفاظ أي مكون من مكونات العينة في جميع التقنيات الكروماتوغرافية.

5- حجم الاحتفاظ:

من المفاهيم المهمة جداً المستخدمة في مجال الفصل الكروماتوغرافي مفهوم حجم الاحتفاظ ويدل على حجم الطور المتحرك اللازم لفصل كل مكون من مكونات العينة على حدا من العمود بشكل كمي أي بمعنى آخر يعبر عن الحجم المستهلك من الطور المتحرك لخروج مكون واحد من مكونات العينة وبمردود تام ويرمز له V_R.

فإذا فرضنا أن معدل جريان الطور المتحرك في واحدة الحجم F ثابت وبالتالي يمكن حساب حجم الاحتفاظ من العلاقة الآتية:

$$V_R = t_R . F$$

نعوض قيمة زمن الاحتفاظ t_R وتصبح العلاقة:

$$V_R = t_M . (1 + D \frac{V_S}{V_M}) . F$$

يلاحظ من العلاقة الأخيرة أن جداء الزمن الذي يحتاجه الطور المتحرك للمرور عبر العمود في معدل جريان هذا الكور يعبر عن حجم الطور المتحرك نفسه. وهكذا تصبح العلاقة الأخيرة كما يلي:

$$V_R = V_M . (1 + D \frac{V_S}{V_M})$$

أو تكتب:

$$V_R = V_M + D V_S$$

حيث أن V_M تدل على حجم الطور المتحرك الموجود في العمود عند أي لحظة وهو يمثل حجم الفراغ الموجود في العمود وهو لا يتعلق بالطور الثابت.

6- الاحتفاظ النسبي:

يعبر عن صلاحية العمود للاستخدام التحليلي وتنفذ عملية حساب الاحتفاظ النسبي بشكل دوري للتأكد من صلاحية العمود والطور الثابت حيث يلاحظ أحياناً وبعد الاستخدامات المتلاحقة وعدم العناية المتكررة بالعمود الكروماتوغرافي أو نتيجة التحضير غير المثالي للطور الثابت وجود تشوهات في سطح الحبيبات أو وجود رواسب تقلل من قدرة الفصل وتكون مرتبطة مع الطور الساكن بشكل جيد بحيث لا يمكن غسلها.

لذلك لا بد من إجراء مقارنة بين زمن الاحتفاظ لمادة ما يطلب فصلها باستخدام العمود الكروماتوغرافي ضمن شروط محددة مع زمن احتفاظ نفس المادة القياسية والنقية وبنفس الشروط حيث يطرح منها الزمن اللازم لإخراج مادة لا تمكث في الطور الثابت مطلقاً t_M:

$$\beta = \frac{t_R - t_M}{t_R^* - t_M} = \frac{V_R - V_M}{V_R^* - V_M}$$

t^*_R: زمن احتفاظ المادة القياسية النقية.

V^*_R: زمن احتفاظ المادة القياسية النقية.

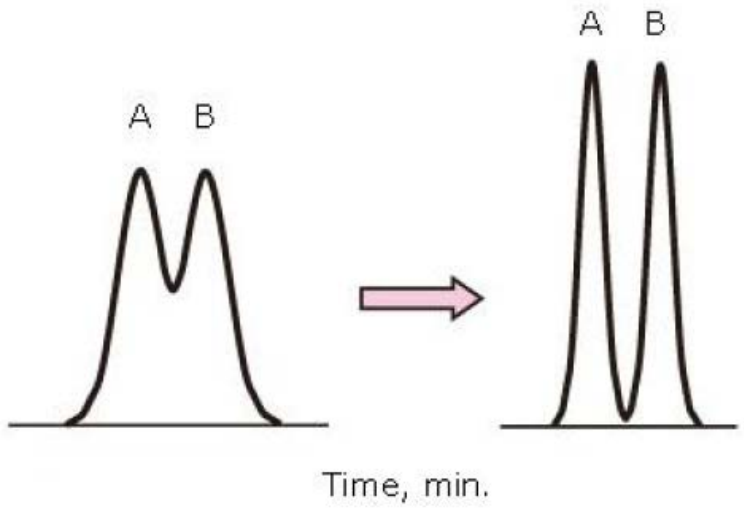
عندما تكون $\beta = 1$ هذا يعني العمود مثالي.

أما عندما تكون $\beta \backsim 1$ هذا يعني العمود مشوه.

7- درجة الفصل:

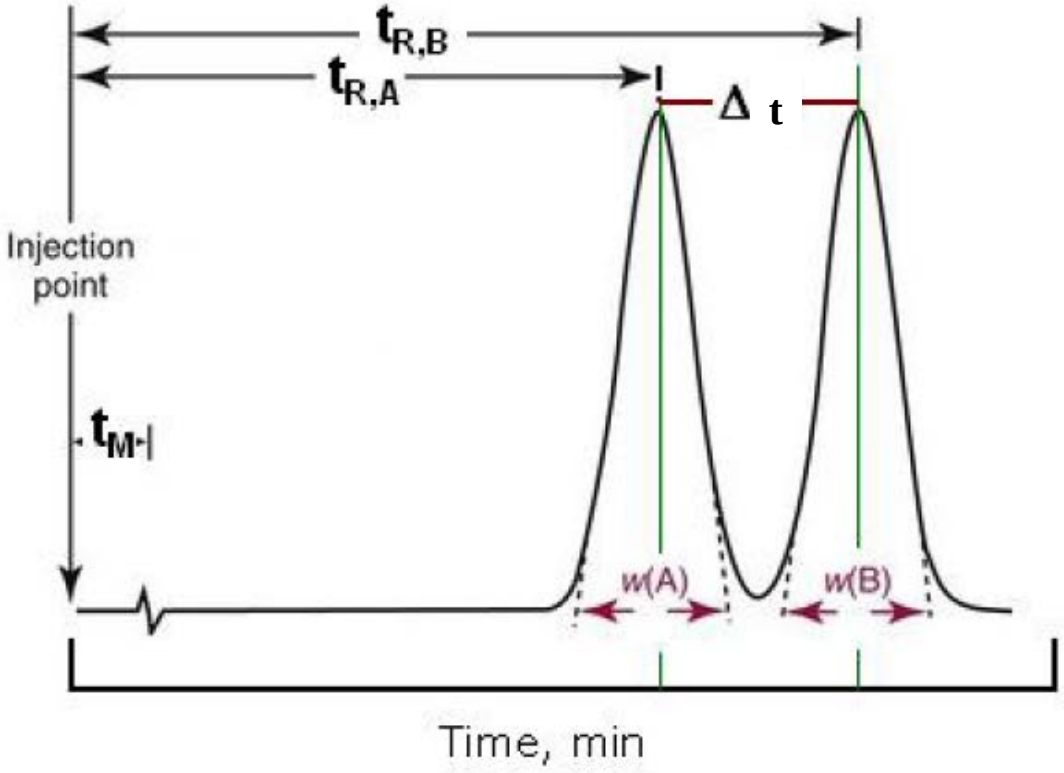
إن القدرة المتميزة للطرائق الكروماتوغرافية على الفصل تجعلها الأكثر استخداماً بسبب دقتها وسرعتها وقدرتها الانتقائية على الفصل الكمي. والمفهوم الذي يعكس هذه الميزة التحليلية يسمى بدرجة الفصل. وهي تعبر عن قدرة الطريقة التحليلية المعتمدة كروماتوغرافياً على فصل مكونين أو أكثر فصلاً كمياً تاماً دون أي تداخل بين مكونات العينة وبمردود كبير.

مثلاً: في الشكل الآتي نلاحظ أنه لم يتم فصل المكونات في الشكل الأيسر بشكل جيد بينما يعتبر الفصل بينهما ممتاز في الشكل الأيمن:



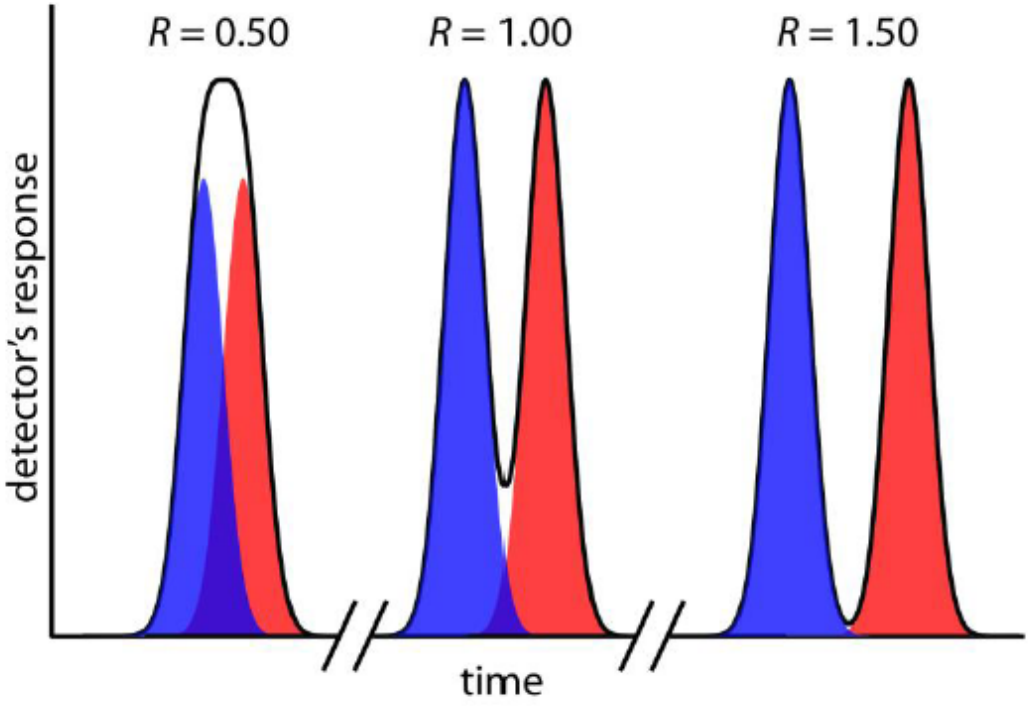
ويعبر عن درجة الفصل R بين مكونين A وB زمن احتفاظهما t_{R1} وt_{R2} وعرض قاعدة السن الكروماتوغرافي W بالمعادلة الآتية:

$$R=\frac{2(t_{R2}-t_{R1})}{W_1+W_2}$$



يعبر الشكل السابق عن عملية فصل مكونين من مكونات العينة فصلاً ممتازاً وتاماً دون أي تداخل حيث تبدو القمم الكروماتوغرافية متباعدة عن بعضها البعض وواضحة. يعود السبب في هذه الدقة إلى مجموعة الشروط المثالية المطبقة أثناء تحضير كل من المادة المراد فصلها والعمود والطور المتحرك.

- ❖ عندما تكون قيمة درجة الفصل R> 1.5 عندها يكون الفصل ممتاز ولا يوجد تداخل.
- ❖ إذا كانت قيمة درجة الفصل 1 <R> 1.5 عندها يكون الفصل جيد ولا يوجد تداخل.
- ❖ إذا كانت قيمة درجة الفصل R= 1 عندها يكون الفصل مقبول ويوجد تداخل بنسبة 2% إلا أن ذلك لا يؤثر على عملية التحليل.
- ❖ إذا كانت قيمة درجة الفصل R< 1 عندها يكون الفصل سيء ويوجد تداخل بنسبة (50-70)%.



يمكن تحسين درجة الفصل من خلال تحقيق الشروط الآتية:

1- زيادة الفرق بين القمم الكروماتوغرافية $\Delta t_R = t_{R2} - t_{R1}$ عن طريق زيادة طول العمود أو زيادة حجم الطور الثابت حيث يتحسن معها معامل الفصل والاحتفاظ النسبي.

2- التحكم بدرجة الحرارة واستبدال أحد الطورين أو كلاهما عند الحاجة لذلك.

3- التقليل من عرض السن الكروماتوغرافي من خلال:

- التعبئة المحكمة للعمود باستخدام حبيبات ناعمة ومتجانسة ومنتظمة.
- التقليل من حجم العينة المراد فصلها وزيادة مساحة التلامس بين الطورين.
- إيجاد السرعة المناسبة لجريان الطور المتحرك.

نظرية الطبقات:

إن العمود الكروماتوغرافي يتكون من عدد كبير من الطبقات المتماثلة المشكلة للطور الثابت داخل العمود وتسمى هذه الطبقات بالطبقات النظرية والتي تعبر عن كفاءة العمود الكروماتوغرافي للفصل، وعند مرور الطور المتحرك خلال العمود تتوزع مكونات العينة بنسب متفاوتة على عدد من الطبقات النظرية حسب قدرتها الامتزازية أو التجزيئية ومجموع الطبقات

يشكل بمجمله الطور الصلب الثابت ويمكن حساب عدد الطبقات النظرية n الموجودة في العمود الكروماتوغرافي من العلاقة الآتية:

$$n=(\frac{4t_R}{W})^2=(\frac{4V_R}{W})^2$$

حيث أن W عرض السن الكروماتوغرافي وتجدر الإشارة إلى أن كل من t_R و W يقاسا بنفس الواحدة (إذا تم استخدام الورقة الميليمترية عندها نعتمد واحدة cm أو ممكن استخدام واحدة الزمن).

لا يعتمد عدد الطبقات النظرية المحسوب فقط على كيفية تحضير العمود ولكنه يعتمد على طبيعة المادة المراد فصلها وسرعة جريان العينة ودرجة حرارة الفصل لذلك فإن قيمة n تعبر فقط عن عدد تقريبي يصلح لأغراض المقارنة كتحديد كفاءة العمود وقدرته على الفصل وتبعاً للعلاقة السابقة تزداد قيمة n عندما يتناقص قيمة عرض السن (عرض القمم الكروماتوغرافية) وبالتالي تقترب عملية الفصل إلى المثالية ومن أجل زيادة عدد الطبقات في العمود يوجد طريقتين:

الطريقة الأولى:

تعتمد على زيادة طول العمود L نظراً لأن كل طبقة نظرية تشغل نفس الفراغ من العمود (n تتناسب طرداً مع طول العمود L) فمثلاً عند مضاعفة طول العمود ستتضاعف عندها عدد الطبقات النظرية وأيضاً يتضاعف معها زمن الاحتفاظ لكن سوف تظهر القمم بشكل أكثر اتساعاً ولهذا فإن تحسين الفصل بهذه الطريقة قليل نسبياً.

الطريقة الثانية:

إن أفضل طريقة لزيادة n تتضمن زيادة عدد الطبقات النظرية هو جعل الارتفاع المكافئ لطبقة نظرية واحدة H أصغر ما يمكن والذي يحسب من تقسيم طول العمود على الطبقات النظرية فيه n:

$$H=\frac{L}{n}=\frac{L}{16.(\frac{t_R}{W})^2}=\frac{L}{16}(\frac{W}{t_R})^2$$

حيث H ارتفاع الطبقة الكروماتوغرافية.

مسألة:

لدينا عمود كروماتوغرافي له الخصائص الآتية:

طول العمود	24.7cm
سرعة الجريان	0.313ml/min
V_M	1.37ml
V_S	0.164ml

حصلنا على كروماتوغرام للمركبات A, B, C وكانت المعطيات كما يلي:

المركب	زمن الاحتفاظ min	عرض القمة min
مركب غير مستبقى	3.1	-
A	5.4	0.41
B	13.3	1.07
C	14.1	1.16

والمطلوب احسب:

1- عدد الطبقات النظرية لكل قمة مركب.

2- ارتفاع المكافئ للطبقة النظرية.

3- درجة الفصل للمكونين B وC.

4- زمن الاحتفاظ النسبي للمادة B بالنسبة للمادة C.

5- حجم الاحتفاظ للمادة A.

الحل:

1- $n=(\frac{4t_R}{W})^2$

للمادة A:

$$n=(\frac{4\times5.4}{0.41})^2$$

$$n= 2775.4907$$

للمادة B:

$$n=(\frac{4\times13.3}{1.07})^2$$

$$n= 2472.0412$$

للمادة C:

$$n=(\frac{4\times14.1}{1.16})^2$$

$$n= 2363.9714$$

2- الارتفاع المكافئ لطبقة نظرية:

$$n_{av}= 2537.1677$$

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

$$H = \frac{24.7}{2537.1677}$$

$$H= 0.009735cm$$

3- حساب درجة الفصل للمكونين B وC:

$$R= \frac{2(t_{R,C}-t_{R,B})}{W_C+W_B}$$

$$R= \frac{2(14.1-13.3)}{1.16+1.07}$$

$$R = 0.7174$$

4- يحسب زمن الاحتفاظ النسبي من العلاقة:

$$\beta = \frac{t_{R,B}-t_M}{t_{R,C}-t_M}$$

$$\beta = \frac{13.3-3.1}{14.1-3.1}$$

$$\beta = 0.927$$

هنا لا يمكن إجراء عملية الفصل وفق هذه الشروط.

5- حجم احتفاظ المادة A:

$$V_R = V_M + D\ V_S$$

لكن يمكن حساب معامل التوزع D للمادة A من العلاقة:

$$t_{R,A} = t_M . (1 + D \frac{V_S}{V_M})$$

$$5.4 = 3.1\ (1+ D \frac{0.164}{1.37})$$

$$D = 6.1978$$

$$V_R = 1.37 + 6.1978 \times 0.164$$

$$V_R = 2.3864$$

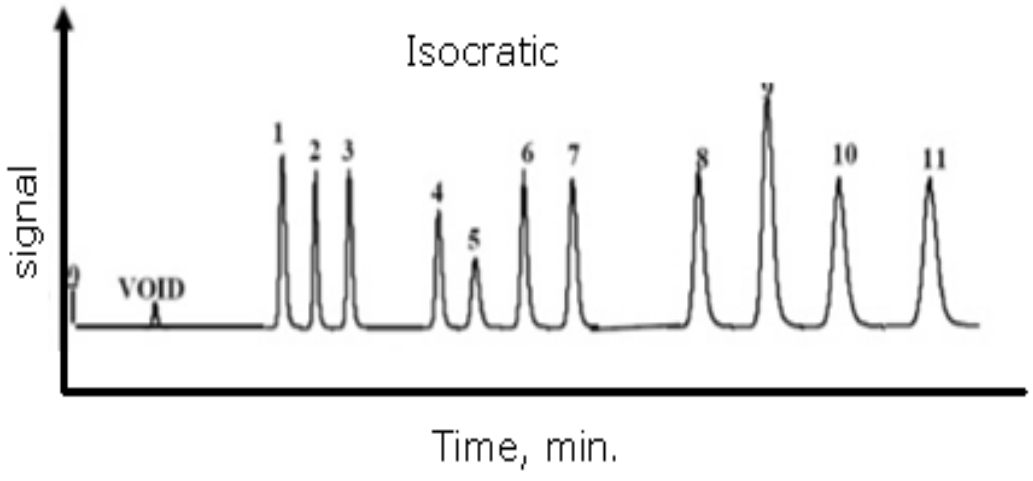
المشكلة العامة في الفصل الكروماتوغرافي:

في حالة الكروماتوغرافيا السائلة عند استخدام طور متحرك سائل ذو تركيب ثابت فإن كروماتوغرام الناتج لن يكون مثالي حيث **نعتبر أن عملية الفصل الكروماتوغرافية مثالية عندما تتحقق الشروط الآتية:**

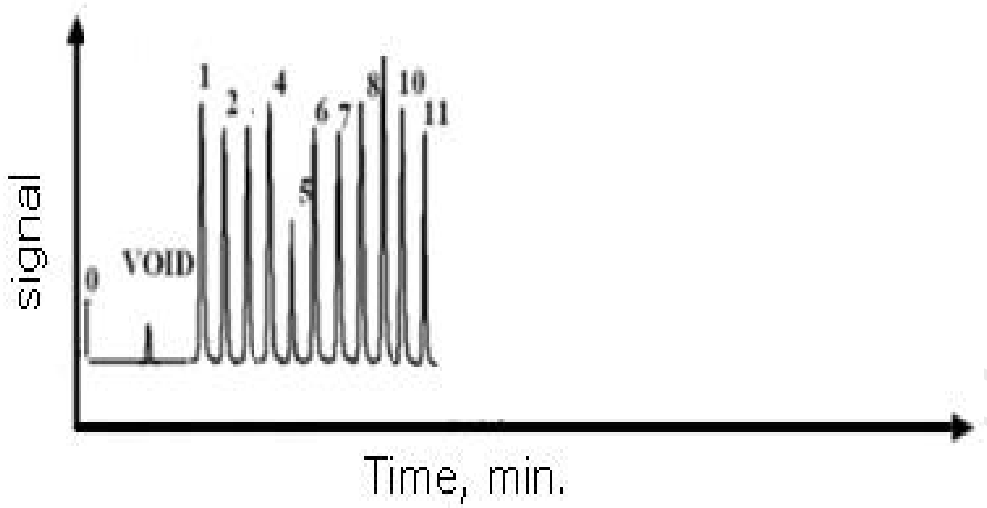
- أن تتم عملية الفصل في أقل وقت ممكن.
- أن تكون جميع المكونات مفصولة عن بعضها البعض بكفاءة عالية.
- أن يكون اتساع peaks (القمة الكروماتوغرافية) أقل ما يمكن وبالذات للمواد التي تخرج متأخرة.

لكن ما يحث فعلياً يتخلص بالآتي:

تداخل بعض peaks واتساع تلك التي تحرج متأخرة إضافة إلى كفاءة أقل وزمن مكوث كبير غير مبرر (طويل جداً) والشكل الآتي يوضح ما ذكر:



بينما عملية الفصل المثالية إلى حد كبير الكروماتوغرام الذي يظهر في الشكل الآتي:

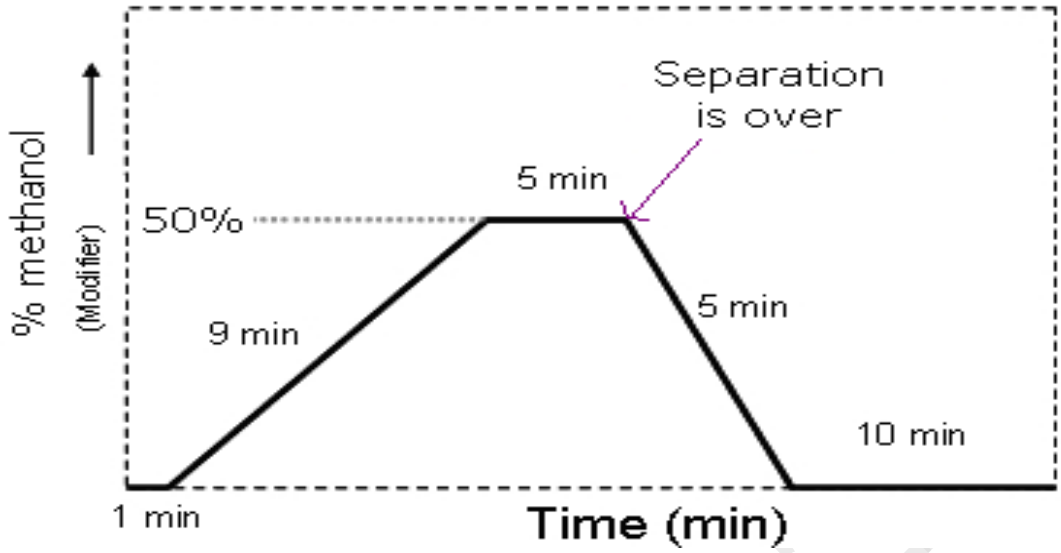


لكن كيف يمكن الوصول إلى عملية الفصل التي تعطي النتيجة المطلوبة:

الجواب يعتمد على نوع الكروماتوغرافيا المستخدمة وفي حال كانت الكروماتوغرافيا السائلة فإن الوصول لعملية فصل مثالية يتطلب استخدام طور متحرك يتغير تركيبه بشكل مبرمج ومستمر أثناء عملية الفصل بحيث نجبر كل مادة من المواد الموجودة في العينة من الخروج في زمن محدد وضمن شروط محددة.

مثلاً: في حال استخدام طور ثابت غير قطبي نجد أن المواد غير القطبية تقضي وقتاً أطول في العمود بينما تغادر المواد القطبية العمود أولاً وبالتالي يمكن تعديل تركيبة الطور المتحرك القطبي باستخدام مذيب عضوي (غير قطبي) بحيث نقلل من قطبية الطور المتحرك وبالتالي نجد أن قابلية المواد غير القطبية للبقاء في الطور المتحرك تزداد وبالتالي تغادر العمود خلال زمن أقصر. ومن الممكن أن تستخدم عدة برامج لتعديل الطور المتحرك بحيث نحصل على الفصل المثالي والكفاءة المطلوبة.

مثلاً: تطبيق برنامج التعديل الآتي:

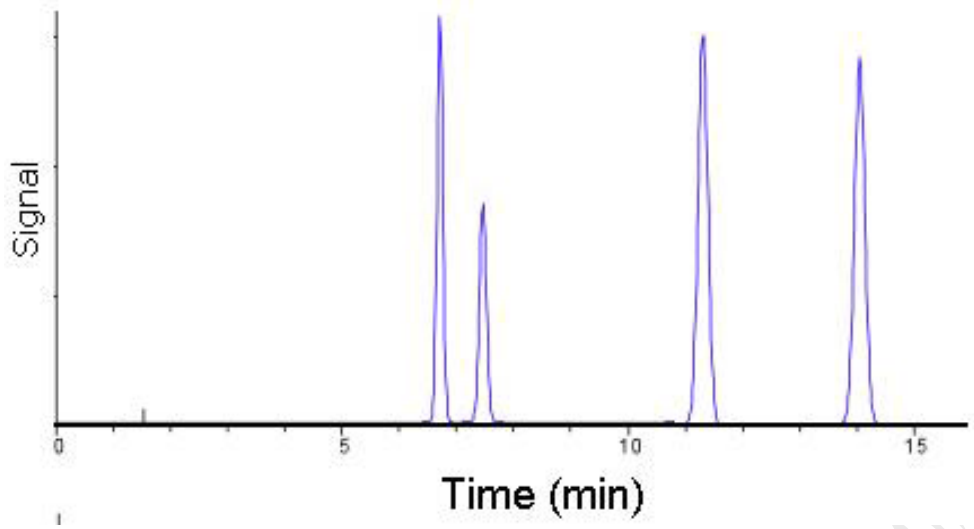


في هذا البرنامج نستخدم طور متحرك يحوي على الميتانول بنسبة 100% وذلك دقيقة واحدة ثم نبدأ بتقليل نسبة الميتانول ليصل إلى 50% خلال 9 دقائق ونحافظ على هذه النسبة مدة 5 دقائق ثم نعود إلى التركيب الأصلي للطور المتحرك خلال 5 دقائق وأخيراً نستمر في ضخ الطور المتحرك مدة 10 دقائق وذلك لإعادة حالة العمود وخصائصه إلى الحالة الأصلية.

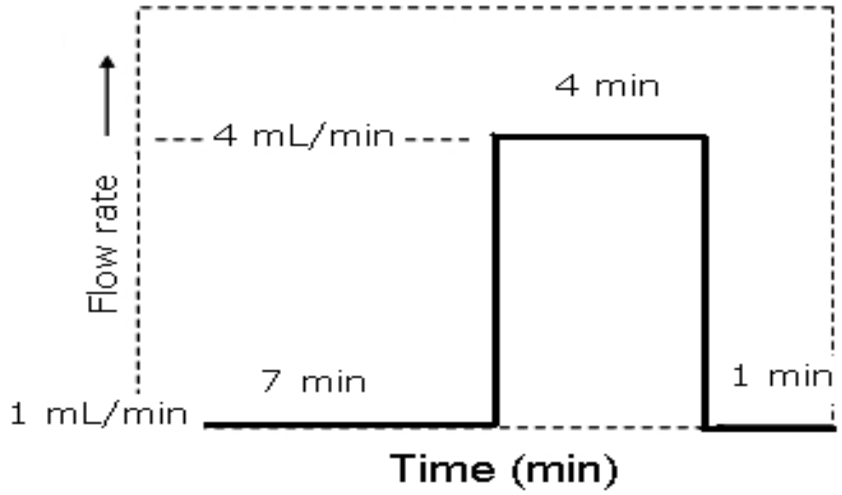
ملاحظات:

- يجدر الإشارة إلى أنه أحياناً يحدث انحدار في خط القاعة (خط الأساس) عند تعديل تركيب الطور المتحرك. مما يستدعي تحديد ذلك عن طريق تنفيذ برنامج التعديل دون حقن العينة أولاً ومن ثم يتم طرح الكروماتوغرام الناتج من كروماتوغرام العينة وبذلك يتم تصحيح خط الأساس.
- يجب الانتباه إلى طبيعة المواد العضوية المعدلة للطور المتحرك إذ يجب أن تكون منحلة (ذائبة) فيه بشكل تام عند النسب المستخدمة وأيضاً يجب أن يكون الطور المتحرك المعدل قادر على إذابة العينة.
- يفضل أن تتم عملية تعديل تدريجياً وذلك حتى يتم الخلط متجانساً.
- في بعض الأحيان يتم تعديل سرعة الطور المتحرك لإجبار peaks المتناظرة والمتأخرة على الخروج مبكراً أو ما يسمى flow rate programming.

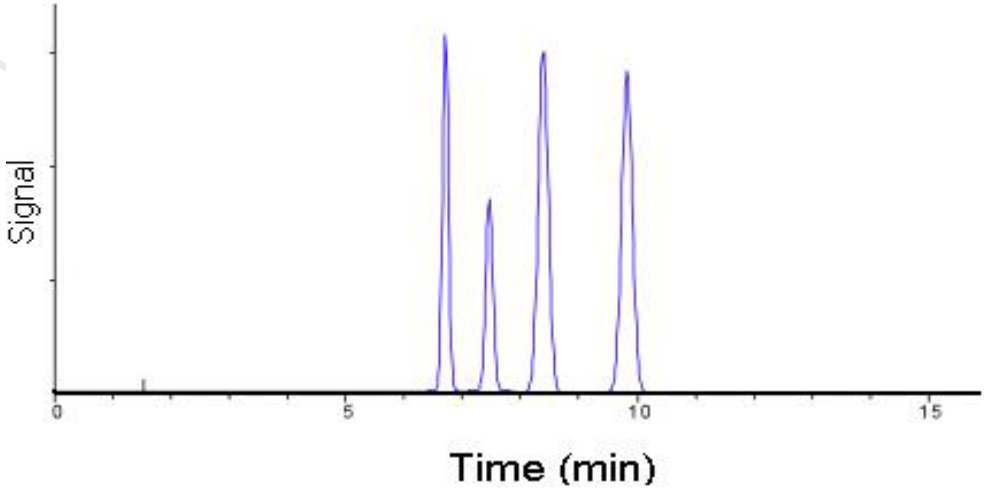
مثال: لدينا الكروماتوغرام الآتي:



حيث نلاحظ أن المركبين الثالث والرابع يأخذان وقتاً طويلاً للخروج من العمود يمكن تقليصه باستخدام برنامج تعديل سرعة الطور المتحرك كما في الشكل الآتي:

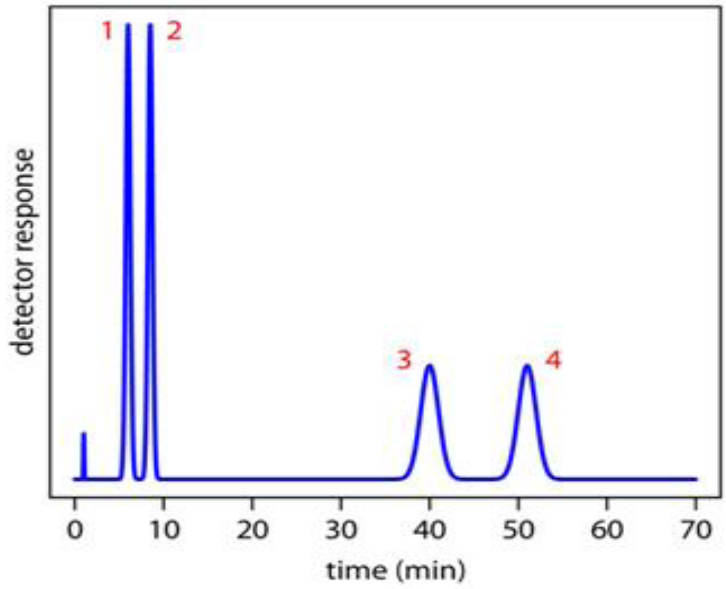


وعند تطبيق البرنامج نحصل على الكروماتوغرام الآتي حيث تم تقليص الزمن بشكل كبير:



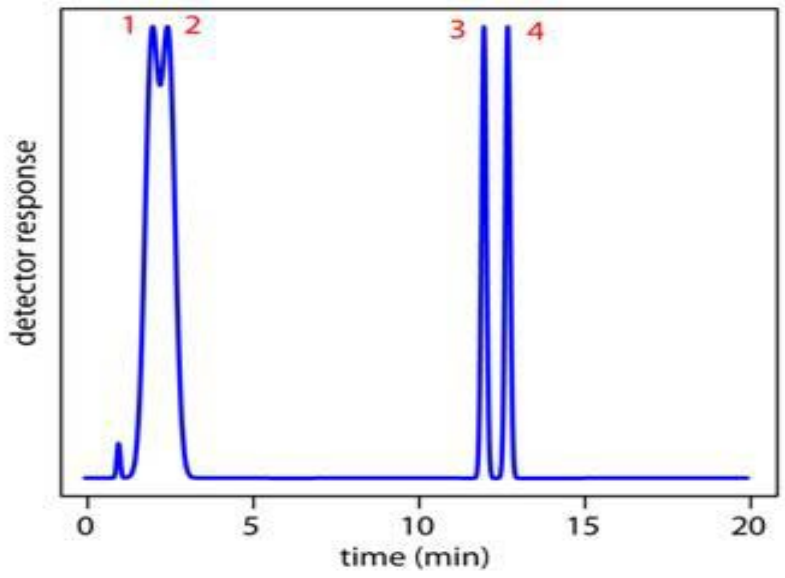
في حال الكروماتوغرافيا الغازية إن العامل الوحيد المستخدم في تحسين عملية الفصل وتقليل زمن خروج المواد هو درجة الحرارة.

مثال: للنفرض أننا حصلنا على الكروماتوغرام الآتي باستخدام الكروماتوغرافيا الغازية عند درجة الحرارة 150C°:



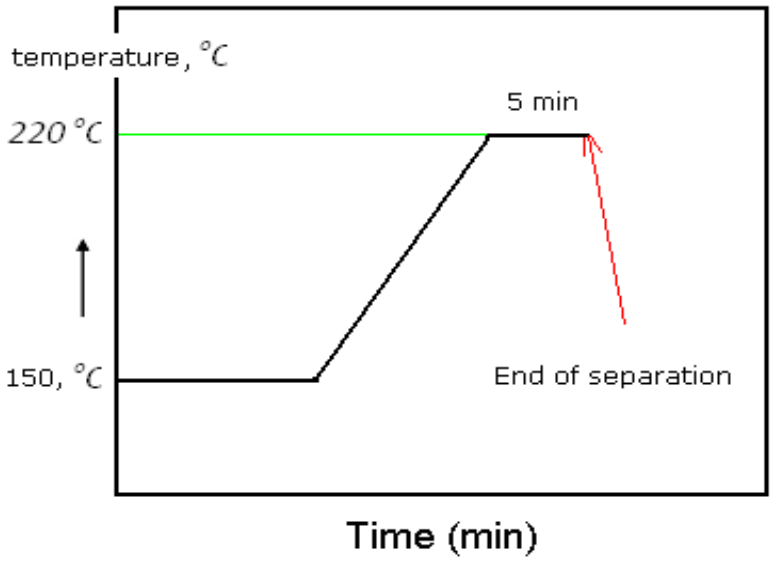
حيث نجد أن المركبين 1 و2 مفصولان بشكل جيد بينما 3 و4 تكون peaks عريضة ويخرجان بعد زمن طويل.

ولنفترض أننا حصلنا على الكروماتوغرام الآتي باستخدام الكروماتوغرافيا الغازية لكن عند درجة حرارة ثابتة لتكن 220C°:

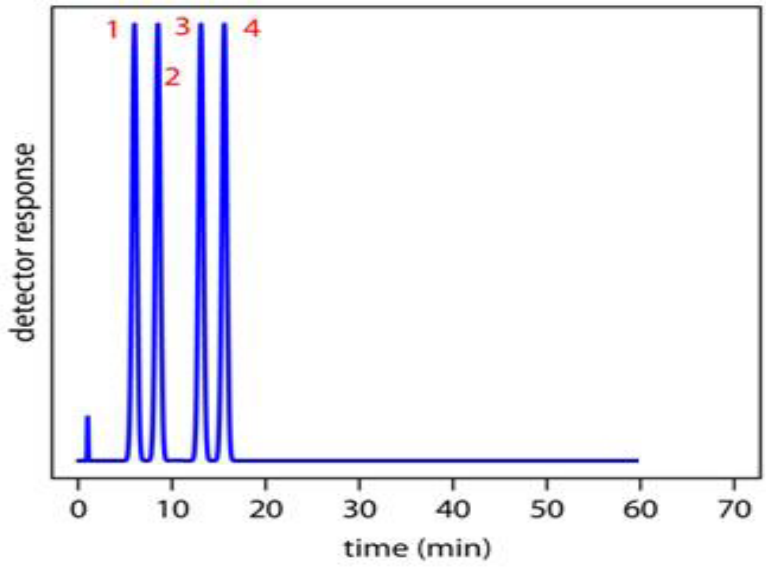


حيث نلاحظ أن الفصل بين المركبين 1 و2 أصبح سيئاً بينما تحسنت عملية فصل المركبين 3 و4.

ويتم ذلك باستخدام برنامج التدرج الحراري (تعديل درجة الحرارة للوصول إلى عملية فصل أفضل) حيث عند البداية تم استخدام درجة الحرارة 150C° لمدة 10 دقائق فحصلنا على فصل جيد للمركبين 1 و2 ومن ثم نزيد درجة الحرارة إلى 220C° بمعدل 20 درجة في الدقيقة ولمدة 5 دقائق عندها نحصل على فصل جيد للمركبين 3 و4 أي أننا نصمم برنامج الفصل كما في الشكل الآتي:



وبالتالي نحصل على الكروماتوغرام الآتي:



حيث تمت عملية الفصل بشكل جيد للمركبات الأربعة باستخدام برنامج يسمى temperature programming gas chromatography (TPGC)

العوامل المؤثرة على عملية الفصل الكروماتوغرافي:

1- الذوبانية: تتوزع المادة المراد فصلها بين الطور المتحرك والطور الثابت حيث تتحرك المادة باتجاه حركة المذيب وكلما زادت ذوبانية المادة المراد فصلها في المذيب زادت سرعة الفصل.

2- الشوائب الأيونية: وجود الشوائب في الطور الثابت يؤدي إلى ارتباط بينها وبين الشحنات المواد المراد فصلها وبالتالي سيؤدي إلى التقليل من سرعة الفصل.

3- درجة الحرارة: ذوبانية بعض المواد تزداد بازدياد درجة الحرارة أي أن الحرارة عامل مهم يتحكم في ذوبانية بعض المواد.

4- الوزن الجزيئي: يؤثر الوزن الجزيئي على عملية الفصل حيث كلما زاد الوزن الجزيئي قلت سرعة الفصل.

5- الامتزاز (الادمصاص): ازدياد امتزاز المادة المراد فصلها في الطور الثابت يؤدي إلى إعاقة حركة المذيب (الطور المتحرك) وبالتالي تقل سرعة المواد.

الطرائق الكروماتوغرافية العمودية – السائلة

يشمل هذا النوع من الطرائق على جميع الطرائق الكروماتوغرافية التي يستخدم فيها عمود ويكون الطور المتحرك سائل. تستخدم هذه الطرائق لفصل المواد ذات الجزيئات الكبيرة أو المواد الأيونية أو المواد غير الثابتة حرارياً. تستغرق هذه الطرائق زمناً طويلاً نظراً لأن سرعة جريان الطور المتحرك المناسبة لمثل هذه الطرائق عادة تكون بطيئة إلا أن الوضع تغير بعد اكتشاف طريقة الكروماتوغرافية السائلة عالية الأداء (ذات الضغط العالي) حيث أصبحت عملية الفصل سريعة ومنافسة لطريقة الكروماتوغرافيا الغازية.

1- الكروماتوغرافية السائلة – الصلبة (الامتزازية):

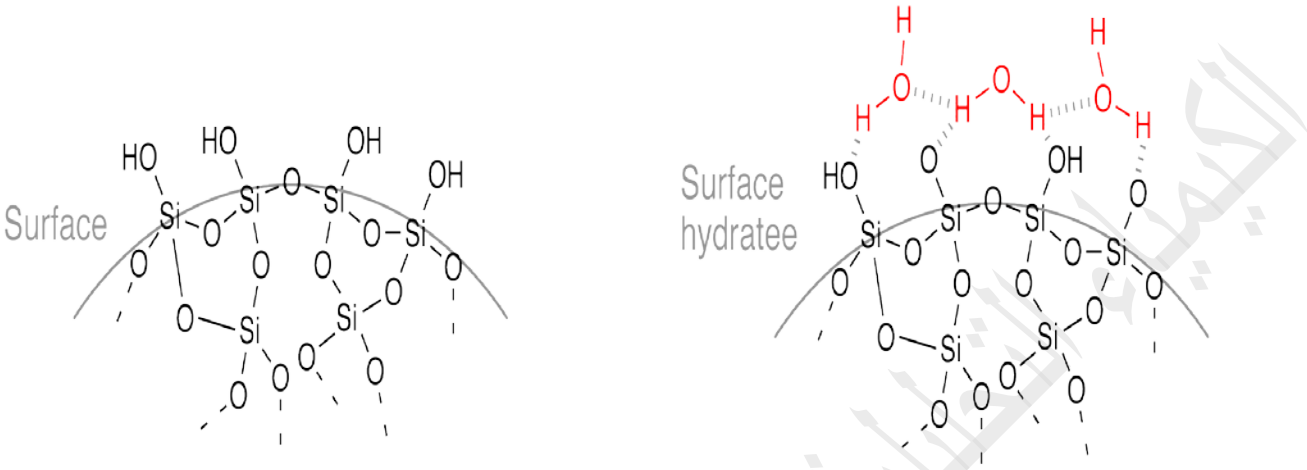
يكون الطور الثابت عبارة عن مادة صلبة قطبية تمتاز بمساحة سطحية كبيرة ونشطة بحيث تجذب وتستبقي المواد المارة من خلالها بواسطة الامتزاز (أي المواد الموجودة في الطور المتحرك) ولكن بدرجات مختلفة حسب نوع المادة وقطبيتها. وفي الحالة المثالية تكون العلاقة بين تركيز المادة في الطور المتحرك وتركيزها في الطور الثابت علاقة خطية عند درجة حرارة ثابتة. وعند التراكيز المخففة للمادة يكون منحنى الكروماتوغرام الناتج متماثل وفي هذه الحالة يكون الفصل جيداً. إلا أنه في الغالب يختلف التوزع عند التراكيز العالية مما يؤدي إلى تغير في نسبة التوزع بحيث يقل معامل التوزع مع زيادة التركيز ويعود ذلك إلى تشبع سطح الطور الثابت وبالتالي تحيد العلاقة بين C_S وC_M عن الخطية ويكون منحنى الكروماتوغرام في هذه الحالة حاد في بدايته ومتدرج في نهايته (أي غير متماثل) ويؤدي ذلك إلى فصل سيء لأن السن في هذه الحالة غير حاد.

الطور الثابت الصلب:

الطور الثابت عبارة عن مادة قطبية ذات خواص امتزازية جيدة ويعتبر الألومينا وهلام السيليكا من أكثر المواد استخداماً ويمكن أيضاً استخدام الفحم وكربونات الكالسيوم والنشاء ومسحوق السيليلوز. تعتمد قوة الامتزاز على النشاط الكيميائي لسطح المادة المازة وعلى مساحة السطح ودرجة الغسل. وكلما زادت قطبية المادة زادت قوة امتزازها على سطح الطور الصلب وقل ذوبانها في الطور المتحرك الأقل قطبية.

السيليكاجل silica gel:

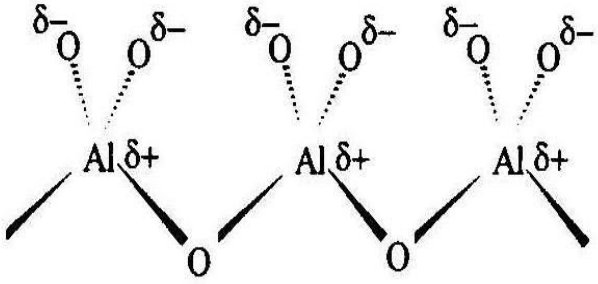
تحتوي حبيبات السيليكا على مجموعات هيدروكسيلية على سطحها والتي ترتبط بالمواد القطبية.



بنية السيليكاجل

الألومينا Alumina:

تحتوي على مجموعات الهيدروكسيل أو ذرات الأوكسجين مما يجعلها قطبية.



بنية ألومينا

الطور المتحرك السائل:

إن مهمة الطور المتحرك لا تنحصر في نقل المواد عبر العمود فقط بل له تأثير على معامل التوزع وذلك يعتمد على قوة إذابته وبالإضافة إلى ذوبان المكونات في الطور المتحرك فإن هناك تنافس بين تلك المكونات وجزيئات الطور المتحرك على الامتزاز على سطح الطور المتحرك الثابت الصلب.

شروط استخدام المذيب كطور متحرك:

1- أن لا يخرج المواد المراد فصلها من العمود بسرعة لأن ذلك لن يؤدي إلى فصلها.

2- أن لا تكون سرعة التخريج بطيئة لأن ذلك يؤدي إلى الحصول على أزمنة استبقاء طويلة وبالتالي يؤدي ذلك إلى تعريض السن (القمة الكروماتوغرافية) على حساب الارتفاع.

3- أن يكون المذيب المستخدم خالي تماماً من الشوائب التي ممكن أن تكون قطبيتها أعلى من قطبية المذيب مثل وجود الأغوال أو الحموض أو الماء في الكلوروفورم.

4- يجب عدم استخدام المذيبات التي تتأثر كيميائياً عند استخدامها مع الطور الصلب مثل يتبلمر الأسيتون عندما يكون الطور الصلب الألومينا.

ويوجد العديد من المذيبات التي تستخدم كطور متحرك وفيما يلي نرتب بعض المذيبات حسب قطبيتها:

الترتيب من الأقل قطبية إلى الأعلى قطبية:

رابع كلور الكربون – التولوين – البنزن – الكلوروفورم – الإيتر – الأسيتون – الإيتانول – الماء.

العمود الكروماتوغرافي:

يتراوح طول العمود الزجاجي بين 10-30cm بقطر يساوي 1cm أو أكثر. يسير الطور المتحرك عبر العمود بفعل الجاذبية أو بفعل ضغط منخفض ويعتمد معدل جريانه على حجم حبيبات الطور الصلب وعلى قطر العمود ولزوجة الطور المتحرك وقطبيته وعلى وضع الصمام الذي يوجد في نهاية العمود وفي أغلب الحالات يفضل أن يكون هذا المعدل في حدود 1ml/min. ويوضع في نهاية العمود كمية من الصوف الزجاجي أو القطن الطبي لمنع خروج الطور الثابت من العمود.

تحليل المواد المفصولة:

هناك العديد من الطرائق التي يمكن بواسطتها تحليل المواد بعد فصلها من قبل العمود الكروماتوغرافي وأبسط هذه الطرائق تتضمن جمع المذيب المتحرك في نهاية العمود على دفعات

في أنابيب اختبار وبعد ذلك نقوم بتحليل المواد في كل دفعة من هذه الدفعات باستخدام طرائق التحليل الحجمي أو الطيفي.

مثال: لدينا عينة تحوي مزيج من برمنغنات البوتاسيوم وثاني كرومات البوتاسيوم والمطلوب فصل المادتين عن بعضهما؟

الطور الثابت عبارة عن السيليكاجل والطور المتحرك هو حمض الكبريت 0.4M. في البداية نقوم بتنشيط العمود الكروماتوغرافي أي تنشيط الطور الثابت بغسله بحمض الكبريت 0.4M وبعد خروج كامل الحمض من العمود يتم حقن المزيج مباشرة دون أن يجف العمود وتوزيعه بشكل متجانس على كامل السطح. بعد ذلك نبدأ بعملية جرف المزيج بإضافة الطور المتحرك (حمض الكبريت) بشكل مستمر فتبدأ المادتين بالانفصال على شكل عصابتين (نطاقين) لون عصابة برمنغنات البوتاسيوم بنفسجية ولون عصابة ثاني الكرومات البوتاسيوم أصفر برتقالي. نبدأ باستقبال عصابة برمنغنات البوتاسيوم في دورق حجمي حيث تنفصل وتخرج من العمود قبل ثاني الكرومات البوتاسيوم وعندما تنفصل كامل البرمنغنات تبدأ عصابة ثاني الكرومات بالخروج وسبب خروج برمنغنات البوتاسيوم أولاً لأنه أقل قطبية من ثاني الكرومات.

2- الكروماتوغرافيا السائلة – السائلة (الذوبانية التجزيئية):

يكون الطور الثابت عبارة عن سائل مثبت على مادة صلبة خاملة مثل سيليكاجل أو مسحوق السيليلوز أو بعض أنواع البوليميرات مثل بولي ستيرين أو التفلون أما الطور المتحرك يكون عبارة عن سائل آخر. تمر المواد من العمود بسرعات مختلفة تعتمد على مدى ذوبان المادة في كل من الطورين الثابت والمتحرك.

هناك العديد من السوائل مثل الماء والأغوال والهيدروكربونات المختلفة التي يمكن أن تستخدم كطور ثابت أو متحرك ويشترط ألا يمتزج السائل الثابت بالسائل المتحرك وإلا فإن الطور الثابت سوف يذوب في الطور المتحرك ويخرج معه.

3- كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي (كروماتوغرافيا المنخلية):

نذكر بعض المواد الهلامية المستخدمة كطور ثابت والتي تختلف عن بعضها بحجم ثقوب جزيئاتها:

سيفادكس sephadex: مادة منخلية تستخدم لفصل البروتينات وهي مادة بوليميرية كربوهيدراتية قطبية وماصة للماء بسبب وجود زمر الهيدروكسيل على طول السلسلة البوليميرية.

الهلامة الحيوية Bio-Gel: هو بولي أكريل أميد وهي غير ذوابة في الماء والمذيبات القطبية.

هلامة البولي ستيرين Styragel: تستخدم في عمليات الفصل اللامائية باستعمال ثنائي كلور الميتان والتولوين ورباعي هيدروفوران وثنائي متيل سلفوكسيد ولا يمكن استخدامها مع الماء أو الأسيتون والأغوال.

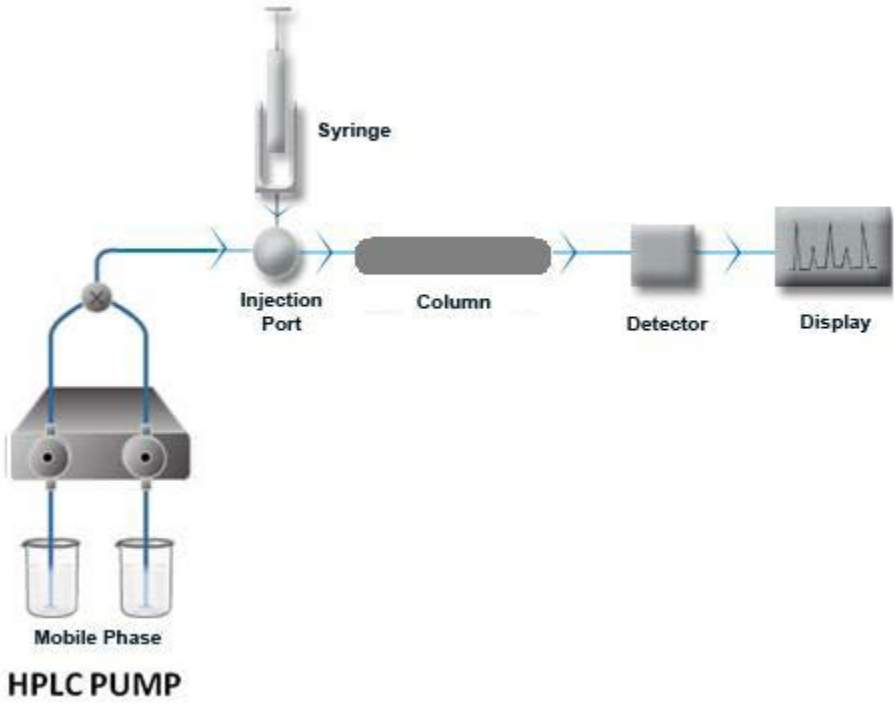
4- الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء:

(High performance Liquid Chromatography)

يستخدم في الطرائق الكروماتوغرافية العمودية السائلة التقليدية عمود ذو قطر كبير نسبياً كما أن معدل جريان الطور المتحرك المناسبة والذي يعطي كفاءة فصل جيدة تحت هذه الظروف بطيئاً نسبياً ولهذا تستغرق عملية الفصل زمناً طويلاً قد يصل لعدة ساعات كما أن جمع العينات وتحليلها يستغرق ساعات إضافية ولهذا فكر الباحثون في تطوير الطرائق الكروماتوغرافية العمودية السائلة وتوصلوا إلى طريقة تسمى الكروماتوغرافية السائلة عالية الأداء أو ذات الضغط العالي.

إن السبب الذي يجعل معدل جريان الطور المتحرك بطيئاً في الطرائق الكروماتوغرافية التقليدية هو أن معدل انتشار السوائل بطيئاً ويمكن زيادة هذا المعدل إما عن طريق رفع درجة الحرارة أو من خلال تصغير المسافة التي تنتشر عبرها الجزيئات بين الطورين الثابت والمتحرك ويتم ذلك باستخدام حبيبات صغيرة جداً للطور الثابت واستخدام عمود ذو قطر صغير ولهذا في الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء يستخدم عمود (يتراوح طوله 10-30cm وقطره 4-10mm) ويكون من الحديد أو الفولاذ المقاوم للصدأ أو الزجاج المقاوم للضغط العالي ومعبأ بحبيبات صغيرة يتراوح قطرها بين 5-10µm من السيليكا أو الألومينا (في حال كروماتوغرافيا الامتزازية) أو تكون هذه الحبيبات مغطاة بطبقة رقيقة من سائل (في حال كروماتوغرافيا التجزيئية) وتحت هذه الظروف يمكن زيادة سرعة جريان الطور المتحرك عن طريق تطبيق ضغط عالي قد يصل إلى 10000 psi لإجبار السائل على التحرك عبر العمود بالسرعة المطلوبة مما يجعل عملية الفصل تتم في دقائق.

جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء:



يتألف من: 1- خزان يحوي الطور المتحرك.

2- مضخة تقوم بضخ الطور المتحرك وفق تدفق محدد.

3- حاقن لإمرار العينة ضمن الطور المتحرك.

4- عمود كروماتوغرافي.

5- فرن للعمود الكروماتوغرافي يتحكم بدرجة حرارة العمود.

6- كاشف لتحسس القمم.

7- حاسوب لجمع البيانات.

آلية عمل الجهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء:

يتم أولاً ضخ الطور المتحرك داخل العمود بواسطة المضخة ثم يتم حقن العينة والتي يكون حجمها صغير جداً (من مرتبة µl) ولذلك تكون القمم الناتجة حادة وضيقة وبالتالي يكون الفصل جيد وسريع تنتقل بعد ذلك العينة عبر العمود حيث يتم فصلها ويأتي في نهاية العمود الكاشف

الذي يعطي إشارة كل مكون من مكونات العينة لتظهر النتيجة على شكل كروماتوغرام والذي يرسم ما بين زمن الاحتفاظ والإشارة التحليلية.

ومن الممكن القول أن محتوى العمود (بخلاف مكونات جسمه) هو المكون الجوهري في عملية الفصل، وبالتالي لا بد من دراسته وذلك من النواحي الآتية:

1- حبيبات التعبئة
2- الوسط الثابت وأنواعه
3- العوامل المؤثرة على الكفاءة
4- العوامل المؤثرة على القدرة على الفصل
5- تأثير ال pH

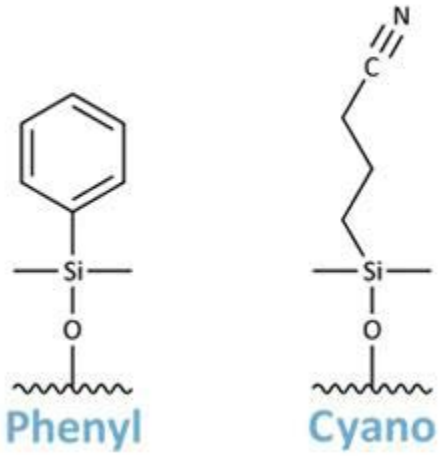
أولاً: حبيبات التعبئة

وهي حبيبات مستديرة الشكل وتحتوي على حجم هائل من المسامات بحيث تصل المساحة السطحية للغرام الواحد حوالي $200\text{-}300m^2$ وعادة ما تكون من السيليكا أو الألومينا.

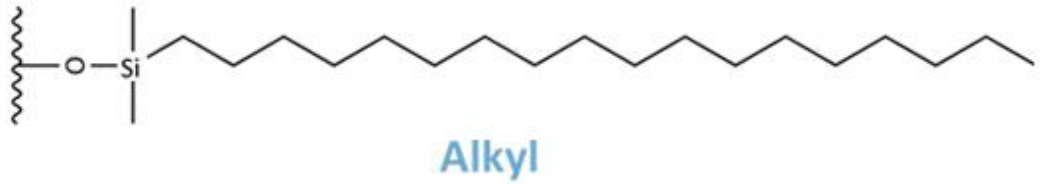
ثانياً: الوسط الثابت

من الممكن تصنيف الوسط الثابت إلى صنفين:

1- الوسط الثابت القطبي: وفي هذه الحالة نسمي هذا النوع من عملية الفصل (normal phase liquid chromatography (NPLC حيث يكون الوسط المتحرك بالضرورة سائلاً غير قطبي. ومن الجدير بالذكر أن استخدام هذا النوع من الكروماتوغرافيا قليل نسبياً. ومن أمثلة الأوساط الثابتة التي تتبع هذا الصنف تلك التي تنتهي بمجموعات قطبية مثل -CN, -OH, -NH2, -phenyl



2- الوسط الثابت غير القطبي: عادة ما يكون هذا النوع عبارة عن هيدروكربون سائل ومشبع عادي (غير متفرع) أي n-alkane مثل: C_{18} وC_8 أو C_3 مع أن أغلب الأعمدة تستخدم C_{18} كوسط ثابت.



ومن الجدير بالذكر أن الوسط المتحرك في هذه الحالة يجب أن يكون قطبياً وذلك لأن الوسط الثابت والمتحرك يجب ألا يمتزجان وتسمى الكروماتوغرافيا في هذه الحالة **بالكروماتوغرافيا المعكوسة** (reverse phase liquid chromatography). وهذا النوع السائد من عمليات الفصل باستخدام HPLC.

الكواشف المستخدمة في الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء:

يوجد العديد من الكواشف التي يمكن استخدامها مثل كاشف معامل الانكسار أو الكاشف للأشعة فوق البنفسجية أو كاشف الفلورة.

والمواصفات التي يجب أن تتوفر في الكاشف:

1- الحساسية: تقدر حساسية الكاشف بالإشارة التحليلية والتي تتناسب طرداً مع تركيز المادة المدروسة.

2- الانتقائية: هي قدرة الكاشف على رصد إحدى المواد المتملصة من العمود دون غيرها.

3- الضجيج: هو إشارة مشوشة صادرة عن الكاشف وذلك في حال غياب قمم المواد الخارجة من العمود. ويتسبب في حدوثه تغير في الطور المتحرك مثل وجود فقاعات أو شوائب وعدم ثبات معدل تدفق الطور المتحرك.

4- الانحراف: يكون خط القاعدة غير مستقر بسبب:

التدرج بالمحلات وتداخل الأطوار المتحركة (تداخل طور قديم في العمود مع الطور الجديد) وحدوث تغير في تركيب الطور المتحرك مثل تفكك أو تبخر والتي تحدث نتيجة تغير درجة حرارة العمود.

5- حد الكشف: هو أصغر إشارة يمكن أن تحديدها ويجب ألا تكون أقل من ضعف ارتفاع الضجيج فإذا كان ارتفاع قمة الضجيج 2ng عندها يكون أصغر تركيز 4ng.

نذكر الكواشف المستخدمة في HPLC:

1-كاشف الامتصاص في المجال الأشعة المرئية وفوق البنفسجية:

يتميز هذا الكاشف بالخصائص الآتية:

- ❖ الحساسية العالية
- ❖ المجال الخطي واسع
- ❖ لا يتأثر بدرجة الحرارة
- ❖ مناسب في حال اعتماد نظام التدرج في المحلات (برنامج تعديل تركيب الطور المتحرك)
- ❖ يحدد المواد التي تمتص في المجال المرئي وفوق البنفسجي
- ❖ يشترط لاستخدام هذه الكاشف أن يكون الطور المتحرك المستخدم عديم الامتصاص ضمن مجال الدراسة.

ويوجد نوعين من المصابيح المستخدمة في هذا النوع من الكواشف:

1- مصباح الديتيريوم يستخدم لقياس الامتصاصية في المجال فوق البنفسجي ضمن المجال (200-400)nm.

2- مصباح التنغستن يستخدم لقياس الامتصاصية في المجال فوق البنفسجي ضمن المجال (380-800)nm.

2- كاشف الفلورة:

- يتم استخدام هذا الكاشف للمركبات القابلة للتفلور.
- يتميز بحساسية عالية أعلى من كاشف UV بحوالي 1000 مرة.

3- كاشف قرينة الانكسار:

وهو كاشف ممتاز إذ يتوقف عمله على التغير في معامل انكسار الوسط المتحرك في وجود المادة المفصولة بالمقارنة مع محلول الوسط المتحرك النقي. ويعتبر هذا الكاشف واسع التطبيق نظراً لأن وجود أي مادة مع الوسط المتحرك يغير من معامل انكساره وبالتالي يعطي إشارة لوجود المادة وتركيزها. إلا أنه للأسف تعتبر حساسية هذا النوع من الكواشف قليلة نسبياً.

4- كاشف الالكتروكيميائية (أمبيرومترية):

يستخدم بشكل واسع لتحديد المواد الفعالة كهركيميائياً أي المواد القابلة للأكسدة والإرجاع وتتميز بحساسية عالية وغير مكلفة إلا أنها يمكن أن تتعطل إذا تركت لفترة طويلة دون عمل.

5- كاشف مطيافية الكتلة:

يعتمد على تشرد المواد المفصولة من العمود وفق تقنية التشرد الكيميائي أو التشرد بالرذاذ الكهربائي.

مبدأ عمل الكاشف:

يقوم الكاشف بعملية فصل مكونات العينة أولاً حسب كتلتها حيث تتجمع الكتل المتشابهة في طرف واحد ثم يتم التفريق بينها وتقسيمها حسب شحنتها حيث ممكن وجود أكثر من مادة متساوية في الكتلة ولكن تختلف في شحنتها وبذلك يمكن عن طريق معرفة كتلة وشحنة كل مادة من التعرف عليها بسهولة.

شروط إجراء عملية التحليل وفق تقنية HPLC:

1- تحديد طول موجة الكاشف.

2- نوع وتركيب الطور المتحرك.

3- نسبة المزج.

4- درجة pH الطور المتحرك.

5- تدفق الطور المتحرك.

6- درجة الحرارة المناسبة.

التحليل الكيفي:

نعتمد على تحديد زمن الاحتفاظ للمادة المدروسة وهو الزمن المسجل من لحظة حقن العينة أي ملامستها للطور الثابت إلى لحظة ظهور القمة الكروماتوغرافية وخروج العينة من العمود.

مثال:

لدينا عينة دوائية للتأكد من وجود مادة معينة فيها نقوم أولاً بحقن المادة العيارية (المحلول النقي القياسي من المادة المجهولة) في الجهاز فتظهر قمة كروماتوغرافية بزمن احتفاظ محدد ثم بعد ذلك نقوم بحقن العينة ونحصل على الكروماتوغرام الموافق لها وهنا لدينا عدة احتمالات:

1- يمكن ألا تظهر لدينا قمة أبداً على المخطط وبالتالي العينة الدوائية خالية من المادة المدروسة.

2- يمكن أن تظهر لدينا قمة لها زمن احتفاظ مختلف عن زمن احتفاظ المادة العيارية وبالتالي العينة الدوائية خالية من المادة المدروسة.

3- يمكن أن تظهر قمة لها نفس زمن الاحتفاظ للمادة العيارية فهذا يؤكد بنسبة 99% أن العينة تحوي المادة المدروسة.

التحليل الكمي:

نقوم بالتحليل الكمي وفق تقنية HPLC وفق الطرائق الآتية:

1- طريقة المكاملة:

في هذه الطريقة يجب أن تخرج كل المواد الموجودة في المزيج من العمود الكروماتوغرافي ثم تحسب مساحات قمم المواد الكاملة والشرط الأساسي لتطبيق هذه الطريقة أن نكون نعرف عدد المواد الموجودة في العينة وهي الطريقة الوحيدة التي لا تحتاج إلى محلول عياري وتحدد النسبة المئوية للمادة في المزيج.

النسبة المئوية للمادة تساوي مساحة القمة مقسومة على مجموع مساحات القمم كلها مضروبة بـ 100.

$$C\% = \frac{Area_i}{\sum Area} \times 100$$

حيث $Area_i$ مساحة القمة للمادة.

مسألة: حللت عينة تحوي ثلاث مواد باستخدام تقنية HPLC فحصلنا على ثلاث قمم وكانت مساحتها على التوالي 49 ,37 ,25 والمطلوب احسب النسبة المئوية لمحتوى كل مادة؟

$$C_1\% = \frac{49}{111} \times 100 = 44.14\%$$

$$C_2\% = \frac{37}{111} \times 100 = 33.33\%$$

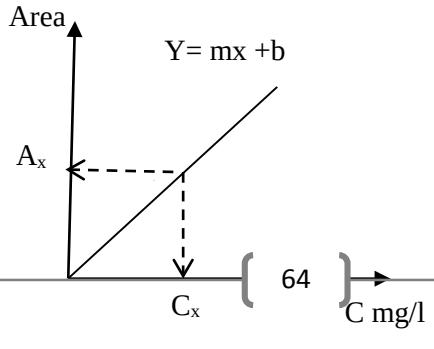
$$C_3\% = \frac{25}{111} \times 100 = 22.52\%$$

2- طريقة العياري الخارجي:

وهي الطريقة الأكثر استخداماً في المجال الصيدلاني لتحديد تركيز المواد المفصولة من العينة والشرط الأساسي لهذه الطريقة هو أن تكون العلاقة خطية طردية بين التركيز وارتفاع القمة أو مساحتها.

تحضر سلسلة عيارية للمادة المدروسة بتراكيز مختلفة (مجموعة من الستاندرات المعلومة التركيز) ثم نحقن كل محلول عياري (ستاندر) في الجهاز فينتج لدينا الكروماتوغرام الموافق ويؤخذ منه ارتفاع القمة أو مساحتها المقابل لكل تركيز.

نرسم العلاقة بين التركيز ومساحة القمة لكل ستاندر يجب أن ينتج لدينا خط مستقيم كما يلي:



ثم نحقن العينة المجهولة التركيز ونحسب مساحة القمة ثم نسقط قيمتها على الخط المستقيم وبالتالي نحصل على تركيز العينة المدروسة.

3- طريقة الإضافات المعيارية:

تطبق هذه الطريقة عندما يكون تركيز المادة المراد تعيينها أقل من أقل تركيز موجود ضمن السلسلة العيارية أي يقع خارج مجال الخطية نظراً لصغر تركيزه.

يتم في هذه الطريقة إضافة كمية محددة تماماً من المادة المدروسة وبالتالي يتم رسم الخط البياني ما بين مساحة القمم والتراكيز بعد إضافة الكمية المحددة لكل من المحلول العياري ومحلول العينة ثم نحسب التركيز المجهول ويطرح منه الكمية المضافة فيتم الحصول على التركيز الحقيقي للعينة.

أمثلة تطبيقية للكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC:

1- تحديد الباراسيتامول والايبوبروفن في المستحضر الصيدلاني اكسترابروفن باستخدام HPLC.

شروط التحليل الكروماتوغرافية المثلى التي تم التوصل إليها:

1- العمود الكروماتوغرافي C_{18} أبعاده (3.9 mm×150mm, 5µm).

2- درجة الحرارة هي درجة حرارة الغرفة.

3- الكاشف المستخدم هو كاشف الأشعة فوق البنفسجية UV وطول موجة الكشف λ=214nm.

4- زمن التحليل الكلي 7min.

5- حجم حلية الحقن 20µl.

6- الطور المتحرك المستخدم هو مزيج من (ميتانول- ماء - حمض الفوسفور) وبنسبة مزج (0.3:24.7:75).

اختير هذا المزيج كطور متحرك ومحل للعينات أيضاً؛ وذلك لأسباب متعددة أهمها:

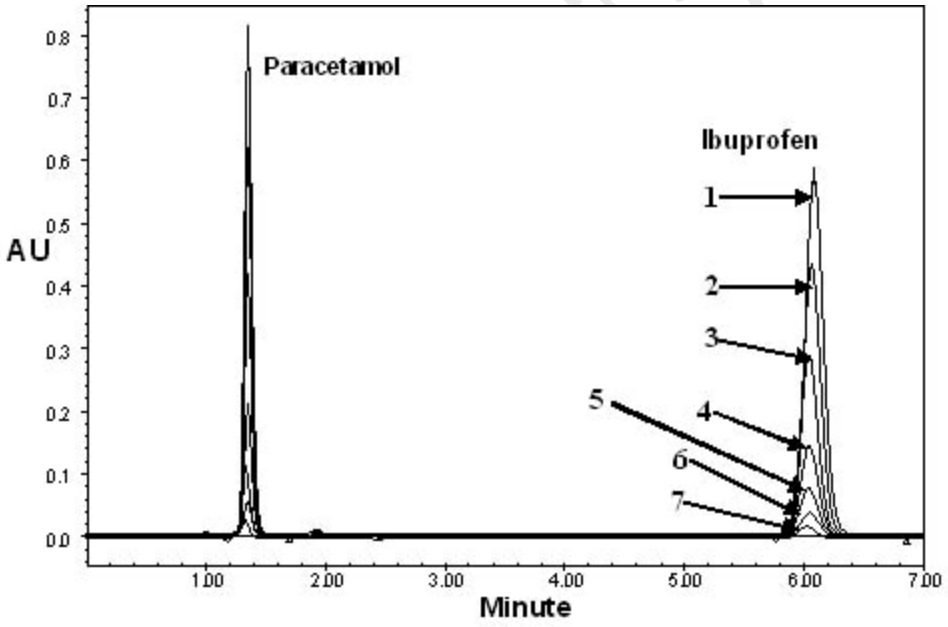
المركبات المدروسة جميعها تنحل فيه، ولا يمتص الضوء عند طول الموجة التي يتم عندها التحليل وهي 214nm ويمتلك درجة فصل (عامل تفريق) R>2 بالإضافة إلى رخص ثمن هذا المحل الذي يقلل من الكلفة الاقتصادية للتحاليل.

7- معدل سرعة التدفق r=0.8ml/min.

تحضير السلسلة العيارية:

حضرت سلسلة عيارية بتراكيز متزايدة من الباراسيتامول ضمن المجال (2.5-80µg/ml) وسلسلة عيارية أخرى من الايبوبروفن مجالها (3-100µg/ml).

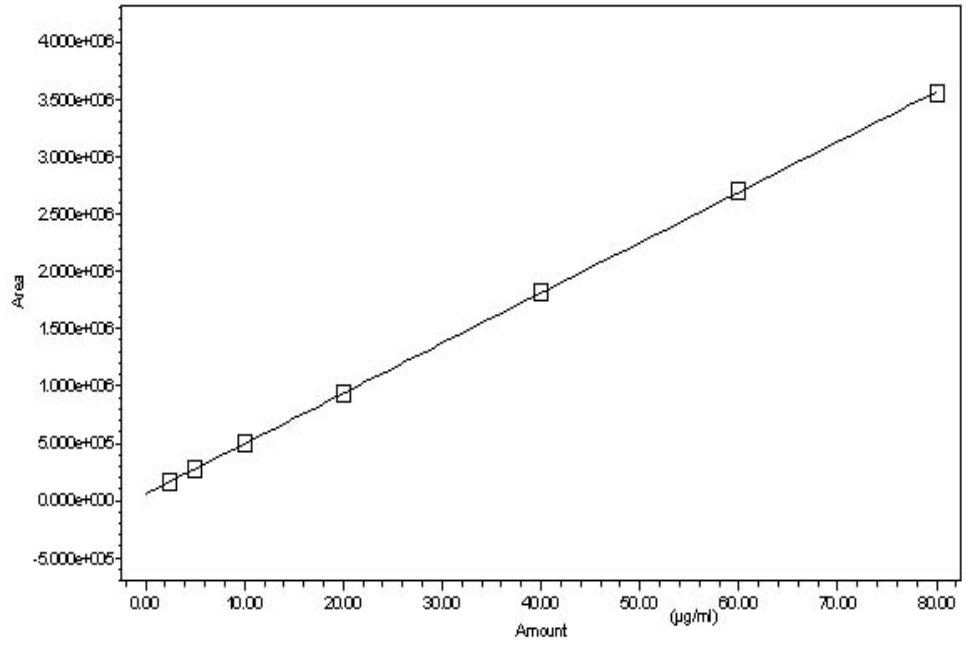
سجلت كروماتوغرامات العائدة للسلسلة العيارية لكل من الباراسيتامول والايبوبروفن فكانت كما يلي الشكل (1):



أخذ من الشكل السابق مساحة القمة المقابلة لكل تركيز بالنسبة للبارسيتامول كما في الجدول الآتي:

	Sample Name	Peak Name	Level	Amount	Response
1	Standard (7)	Paracetamol		2.500	1.662e+005
2	Standard (6)	Paracetamol		5.000	2.696e+005
3	Standard (5)	Paracetamol		10.000	4.934e+005
4	Standard (4)	Paracetamol		20.000	9.284e+005
5	Standard (3)	Paracetamol		40.000	1.824e+006
6	Standard (2)	Paracetamol		60.000	2.703e+006
7	Standard (1)	Paracetamol		80.000	3.551e+006

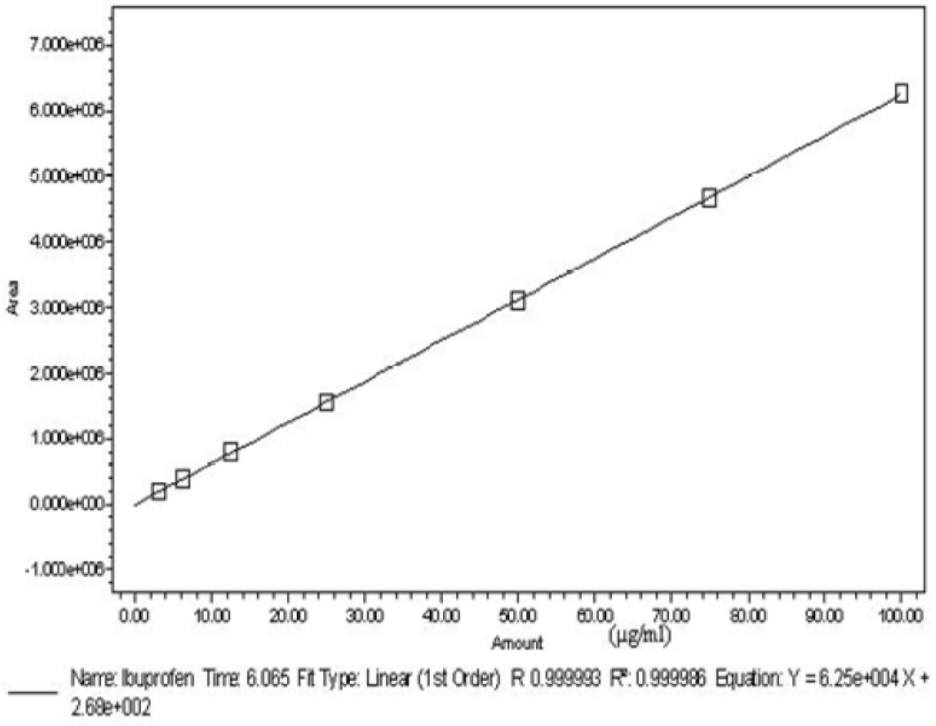
ثم رسمت العلاقة ما بين مساحة القمة والتركيز فحصلنا على الخط البياني الآتي:



أخذ أيضاً من الشكل (1) مساحة القمة المقابلة لكل تركيز بالنسبة للايبوبروفن كما في الجدول الآتي:

	Sample Name	Peak Name	Level	Amount	Response
1	Standard (7)	Ibuprofen		3.125	1.964e+005
2	Standard (6)	Ibuprofen		6.250	3.911e+005
3	Standard (5)	Ibuprofen		12.500	7.921e+005
4	Standard (4)	Ibuprofen		25.000	1.560e+006
5	Standard (3)	Ibuprofen		50.000	3.110e+006
6	Standard (2)	Ibuprofen		75.000	4.683e+006
7	Standard (1)	Ibuprofen		100.000	6.259e+006

ثم رسمت العلاقة ما بين مساحة القمة والتركيز فحصلنا على الخط البياني الآتي:



بعد الحصول على معادلة الخط البياني العياري نقوم بحضير العينة

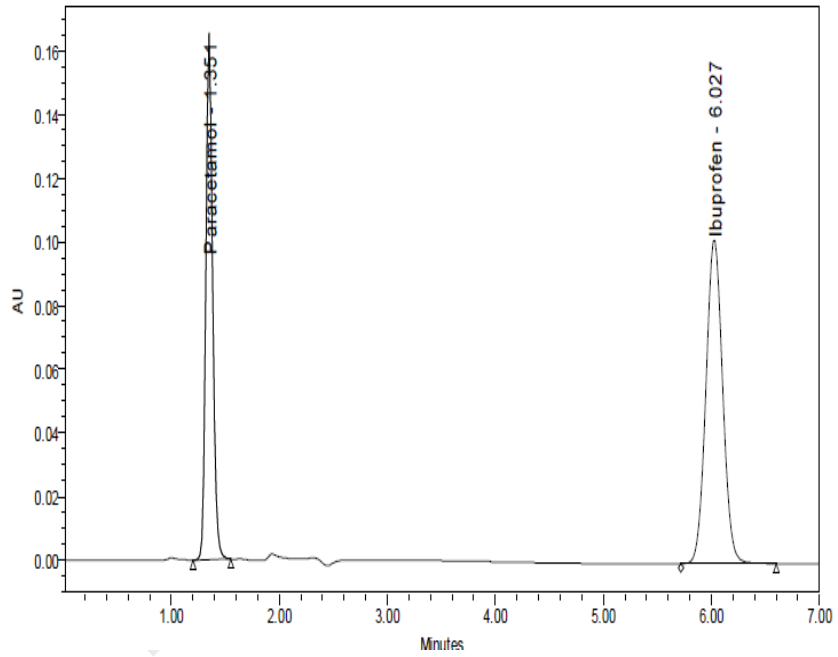
تحضير العينات وهي عبارة عن مضغوطات:

لتحضير محلول عينة الاختبار لمستحضر اكسترابروفن مضغوطات وزن ما لا يقل عن عشرين مضغوطة، وحدد الوزن المتوسط للمضغوطة الواحدة، من ثم طحنت المضغوطات جميعها طحناً جيداً وأخذ منها ما يعادل الوزن الوسطي لمضغوطة واحدة، أذيبت الوزنة بكمية مناسبة من

الطور المتحرك بالاستعانة بجهاز الأمواج فوق الصوتية ثم نقل المحلول إلى دورق حجمي سعة 100ml وأكمل الحجم حتى العلام بالطور المتحرك.

حيث كانت تراكيز المواد الفعالة الافتراضية وفق الشركة المصنعة بالنسبة لمستحضر اكسترابروفن هو 16.2µg/ml باراسيتامول و 20µg/ml ايبوبروفن.

بعد الانتهاء من تحضير العينة نقوم بحقن العينة الحاوية على مزيج من باراسيتامول والايبوبروفن معاً وتسجيل الكروماتوغرام العائد لها فكان كما يلي:



نأخذ من الكروماتوغرام السابق مساحة قمة عينة باراسيتامول ومساحة قمة عينة ايبوبروفن ونعوضها في معادلة الخط البياني للسلسلة العيارية لكل من باراسيتامول وايبوبروفن فنحصل على تركيز المادتين في مستحضر اكسترابروفن كما هو موضح في الجدول الآتي:

	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	% Height	Amount	Units
1	Paracetamol	1.351	720119	39.67	161283	61.27	16.254	ug / ml
2	Ibuprofen	6.027	1095074	60.33	101944	38.73	20.007	ug / ml

2- تحديد فيتامينات ثيامين هيدروكلورايد B_1، حمض الاسكوربيك C، النياسيناميد PP، سيانوكوبلامين B_{12} وريبوفلافين B_2 باستخدام طريقة HPLC.

شروط التحليل الكروماتوغرافية المثلى التي تم التوصل إليها لفصل الفيتامينات:

1- العمود الكروماتوغرافي من النوع C_{18} أبعاده (250×4.6mm, 5µm).

2- درجة الحرارة هي $25C^{\circ}$.

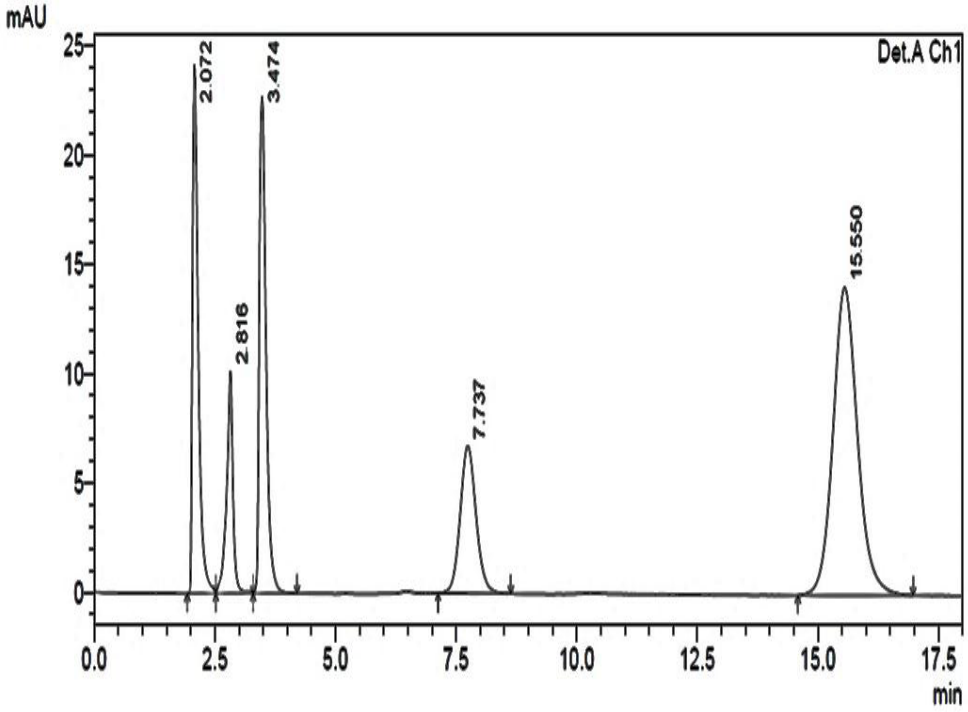
3- الكاشف المستخدم هو كاشف الأشعة فوق البنفسجية UV وطول موجة الكشف λ=265nm.

4- حجم حلية الحقن 20µl.

5- الطور المتحرك المستخدم هو مزيج من (ميتانول- ماء – حمض الخل الثلجي) وبنسبة مزج (1:69:30).

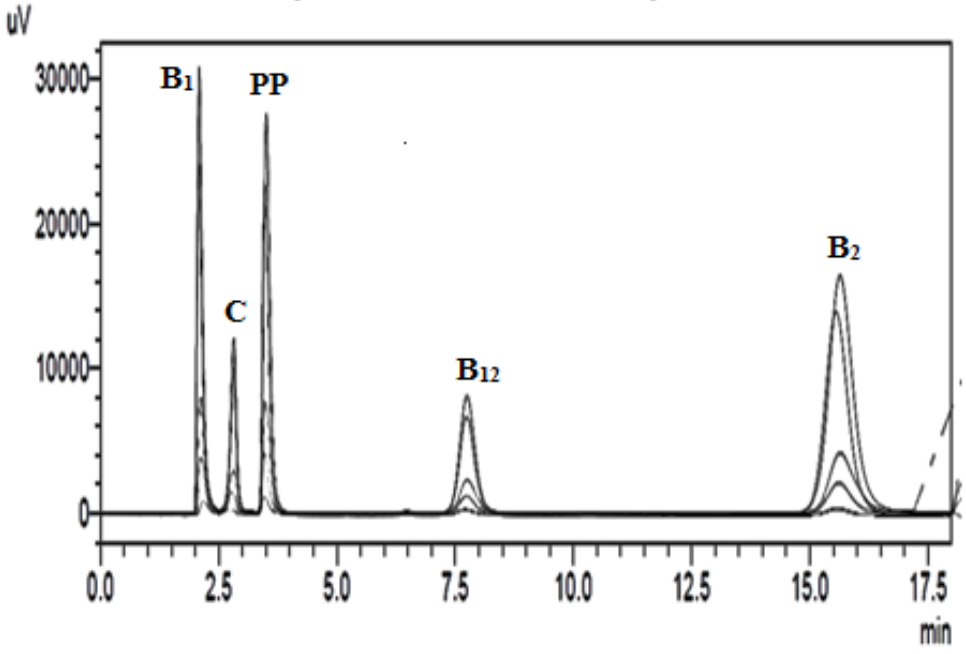
6- معدل سرعة التدفق r=1ml/min.

طبقت الشروط المثلى على محاليل عيارية للفيتامينات محضرة جميعها بتركيز 10mg/l عدا فيتامين B_{12} تركيزه 30mg/l فحصلنا على الكروماتوغرام الآتي وذلك من أجل إيجاد زمن الاحتفاظ لكل فيتامين:



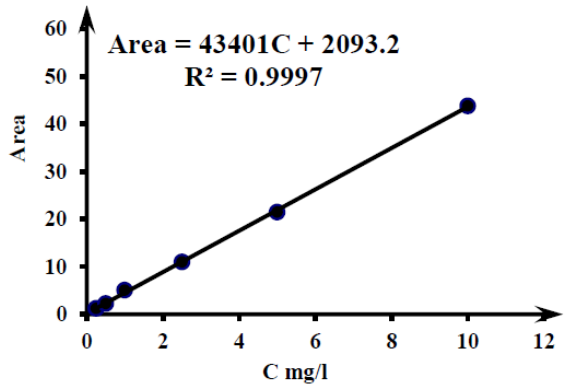
تحضير السلسلة العيارية لكل فيتامين والغاية منها إيجاد المجال الخطي لكل فيتامين:

حضرت عدد من المحاليل العيارية بتراكيز متزايدة لكل فيتامين ورسمت الكروماتوغرام ما بين الإشارة التحليلية (مساحة القمة الكروماتوغرافية) والتركيز فكانت على الشكل:

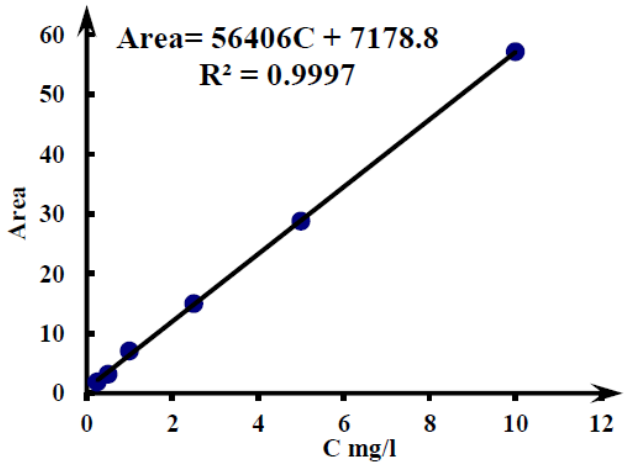


أخذ من الشكل السابق مساحة كل قمة كروماتوغرافية المقابلة للتركيز من أجل كل فيتامين ورسمت العلاقة الخطية:

من أجل الفيتامين B_2: المجال الخطي للتراكيز (0.25-10)mg/l



من أجل الفيتامين PP: المجال الخطي للتراكيز (0.25-10)mg/l



نم نقوم بسحب كروماتوغرام العائد للعينة ونعوض قيمة المساحة الناتجة من الكروماتوغرام مع معادلة الخط البياني الخاصة بكل فيتامين وبالتالي نوجد تركيز الفيتامين في العينة.

5- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني:

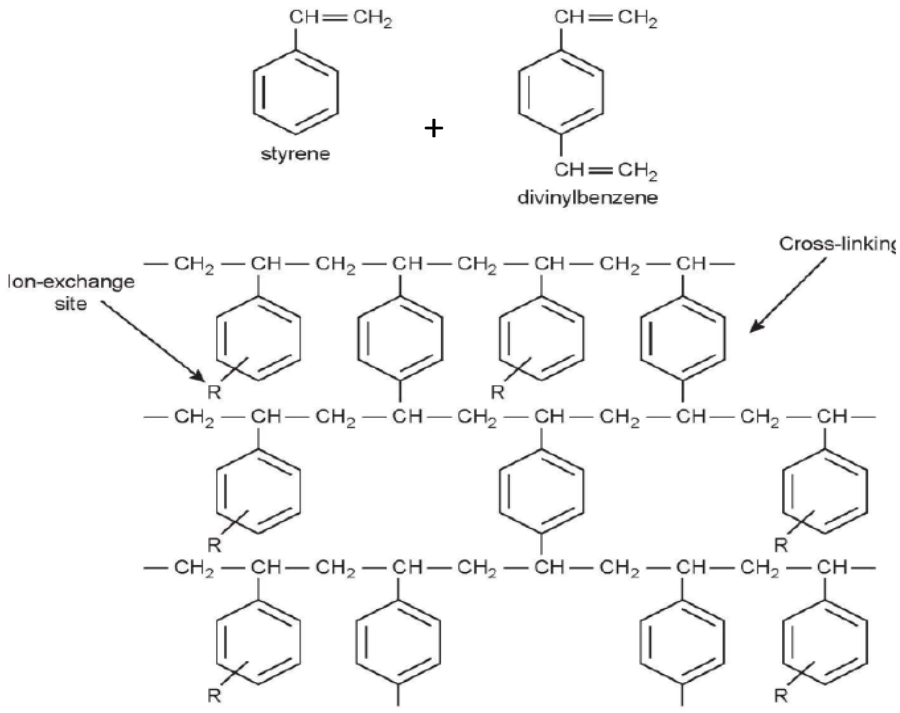
هي شكل من أشكال الكروماتوغرافيا السائلة التي تستخدم المبادلات الأيونية كطور ثابت للفصل الذري أو الجزيئي الأيوني.

المبادلات الأيونية: عبارة عن بوليميرات عضوية كبيرة الحجم (ريزينات أو راتنجات) يوجد على سطحها زمر وظيفية تحوي شاردة ثابتة وأخرى متحركة والتي يتم استبدالها بالأيونات المدروسة.

آلية الفصل: يتم فصل المواد بالتبادل الأيوني باستخدام عمود زجاجي معبأ بحبيبات المبادل الأيوني النفوذية والتي تتفتح مساماتها عندما تترطب حيث يوضع جزء من العينة في أعلى

العمود ويتم تمرير المكونات باستخدام الطور المتحرك السائل بفعل الجاذبية الأرضية أو تحت تأثير ضغط مناسب.

أكثر المواد التي تستخدم كمبادل أيوني بولي ستيرين والذي يضاف له أثناء تحضيره divinyl benzene (DVB) لربط سلاسل بولي ستيرين المستقيمة وينتج لدينا حبيبات صغيرة مستديرة الشكل.



تنقسم المبادلات إلى نوعين رئيسين:

1- المبادلات الكاتيونية: تقوم بالتبادل مع الكاتيونات (الشرجبات) وتقسم إلى نوعين:

1- المبادلات الكاتيونية القوية والتي تحتوي على حمض السلفونيك القوي $R_Z\text{-}SO_3^-\ H^+$.

2- المبادلات الكاتيونية الضعيفة والتي تحتوي على حمض الكربوكسيل الضعيف $R_Z\text{-}COO^-\ H^+$.

وهذه المجموعات الوظيفية تكون مرتبطة بنيوياً بهيكل المادة الحاملة ولا تنتقل إلى المحلول وعند إمرار محلول العينة الذي يحتوي على كاتيون M^{n+} يحدث التبادل التالي:

$$n\ R_Z\text{-}SO_3^-\ H^+ + M^{n+} \rightleftharpoons (R_Z\text{-}SO_3^-)_n\ M + nH^+$$

$$n\ R_Z\text{-}COO^-\ H^+ + M^{n+} \rightleftharpoons (R_Z\text{-}COO^-)_n\ M + nH^+$$

حيث R_Z تمثل جزيء المبادل الأيوني.

2- المبادلات الأنيونية: تقوم بالتبادل مع الأنيونات (الشرسبات) وتقسم إلى نوعين:

1- المبادلات الأنيونية القوية والتي تحتوي على مجموعة أساسية قوية مثل مجموعات الأمونيوم الرباعية $R_Z\text{-}\ N^+R_3OH^-$.

2- المبادلات الأنيونية الضعيفة والتي تحتوي على مجموعة أساسية ضعيفة مثل $R_Z\text{-}\ N^+H_3OH^-$.

وهذه المجموعات الوظيفية تكون مرتبطة بنيوياً بهيكل المادة الحاملة ولا تنتقل إلى المحلول وعند إمرار محلول العينة الذي يحتوي على أنيون A^{n-} يحدث التبادل التالي:

$$n\ R_Z\text{-}\ N^+R_3OH^- + A^{n-} \rightleftharpoons (R_Z\text{-}\ N^+R_3)_n\ A + nOH^-$$

$$n\ R_Z\text{-}\ N^+H_3OH^- + A^{n-} \rightleftharpoons (R_Z\text{-}\ N^+H_3)_n\ A + nOH^-$$

ويمكن استبدال الشكل الهيدروكسيلي بالشكل الكلوري $R_Z\text{-}\ N^+R_3\,Cl^-$.

حيث R مجموعات عضوية غالباً تكون مجموعة الميتيل.

وتعتمد آلية الفصل في الكروماتوغرافيا الأيونية على:

1- التبادل الأيوني بين الأيون المدروس والأيون المتحرك على هيكل الريزين.

2- قوة الرابطة الأيونية (الشاردية) بين الأيون المدروس والأيون الثابت على سطح الريزين.

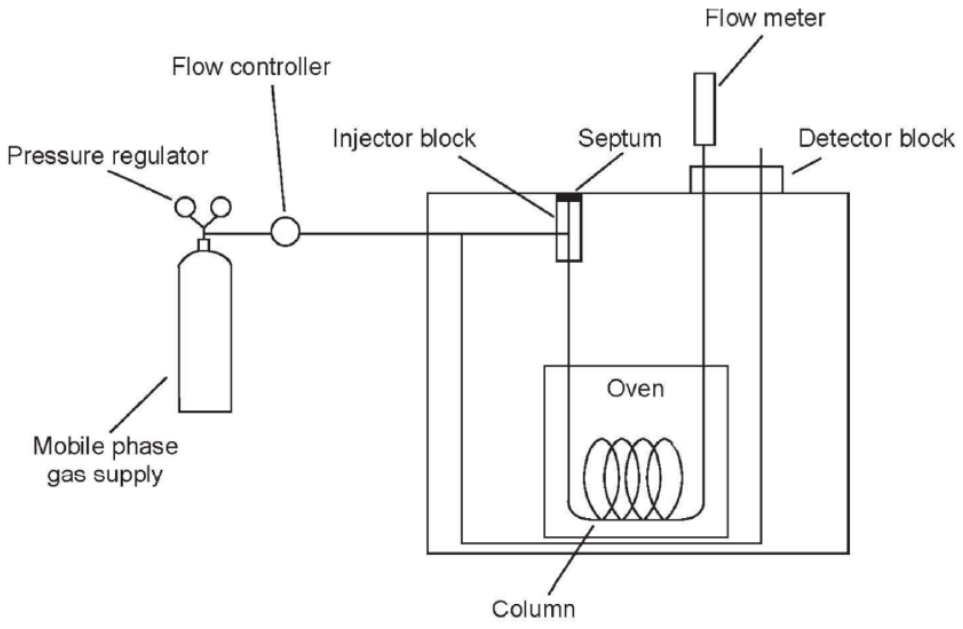
الكروماتوغرافيا الغازية

الطرائق الكروماتوغرافية الغازية gas chromatoghraphy (GC):

يكون فيها الطور المتحرك عبارة عن غاز خامل مثل النتروجين أو الهليوم ويسمى بالغاز الحامل carrier gas لأنه يحمل معه أبخرة المكونات المراد فصلها. بينما الطور الثابت قد يكون مادة صلبة عندها تسمى الطريقة بالطريقة الكروماتوغرافيا الغازية الصلبة gas solid chromatoghraphy (GSC) أو مادة سائلة مثبتة على دعامة صلبة وتسمى بالكروماتوغرافيا الغازية السائلة gas liquid chromatoghraphy (GLC).

مبدأ الكروماتوغرافيا الغازية:

يمر الغاز الحامل من أسطوانة مضغوطة خلال منظم الضغط الذي يتحكم في معدل جريان الغاز الحامل خلال العمود ويتم حقن العينة بواسطة إبرة حقن أو حاقن معين syringe من خلال فتحة الحقن (injector) إذا كانت العينة سائلة أو بواسطة صمام خاص إذا كانت العينة غازية وينقل الغاز الحامل مكونات العينة عبر العمود حيث يتم فصلها عن بعضها بناءً على اختلاف معامل توزعها بين الغاز الحامل والطور الثابت ثم تمر المكونات المفصولة عبر الكاشف الذي يستجيب لكل مكون حسب تركيزه ويتصل بالكاشف مسجل يقوم بتسجيل استجابة الكاشف على هيئة سن peak.



ميزات الكروماتوغرافيا الغازية GC:

1- السرعة: إن استخدام الغاز كطور متحرك يسمح بتحقيق توازن سريع بين الطورين الثابت والمتحرك كما يسمح باستخدام سرعات عالية للغاز الحامل حيث يتم الفصل بسرعة خلال زمن لا يتجاوز الدقائق.

2- الفصل والتفريق: يمكن باستخدام هذه الطريقة فصل مركبات متقاربة في درجات غليانها دون حدوث أي تداخل.

3- التحليل الكيفي: يتم عن طريق مقارنة زمن الاحتفاظ للمادة المدروسة مع زمن احتفاظ المادة القياسية عند نفس لظروف وخاصة درجة الحرارة. أو عن طريق تجميع كل مكون بعد خروجه من العمود وتحليله بالطرائق المعروفة مثل الأشعة تحت الحمراء أو طيف الكتلة.

4- التحليل الكمي: تستخدم مساحة القمة إذا كان السن عريض بينما يستخدم ارتفاع السن عندما يكون ضيقاً وطويلاً حيث نجد أن ارتفاع السن أو مساحته يتناسبان طرداً مع التركيز.

5- الحساسية: تمتاز هذه الطريقة بحساسية عالية وذلك بسبب استخدام كواشف مختلفة مثل اللهب الذي يكشف أجزاء من المليون وكاشف الالتقاط الالكتروني.

6- تستهلك حجوم صغيرة جداً من العينة.

7- البساطة.

الكروماتوغرافيا الغازية السائلة:

يتألف جهاز الكروماتوغرافيا الغازية السائلة من المكونات الآتية:

1- الطور المتحرك الغاز الحامل:

يجب أن يكون الغاز الحامل خامل كيميائياً حتى لا يحدث أي تفاعل بينه وبين جزيئات المواد المراد فصلها ويعتمد اختيار الغاز الحامل على مدى توافره ورخصه وكذلك على طبيعة الكاشف المستخدم. فمثلاً يستخدم كاشف الناقلية الحرارية غاز الهيدروجين أو الهليوم أما مع كاشف التأين اللهبي يستخدم غاز النتروجين.

يمرر الغاز الحامل من أسطوانة الغاز تحت ضغط مناسب يتراوح عادة ما بين 10-50psi وبمعدل جريان خلال العمود في حدود 10-100ml/min.

2- إدخال العينة:

يتم حقن محلول العينة عن طريق أنبوبة الحقن ويتم حقن العينات السائلة بواسطة حاقن مدرج ويجب أن تسخن أنبوبة الحقن في الفرن عند درجة حرارة معينة بحيث نضمن تبخر العينة فوراً عند حقنها كما يجب أن تتم عملية الحقن بسرعة حتى تتبخر العينة مع بعضها قبل انتشارها على نطاق واسع. بالنسبة للعينات الغازية يوجد حاقن خاص لحقنها في الجهاز وتعتمد كمية العينة المحقونة على سعة العمود وعلى حساسية الكاشف.

3- العمود الكروماتوغرافي:

يثبت العمود داخل فرن مغلق عند درجة الحرارة المناسبة ويوجد نوعين من الأعمدة المستخدمة **أحدهما يسمى العمود المعبأ التقليدي** الذي يملأ بحبيبات المادة الصلبة والمثبت عليها طبقة رقيقة من السائل ويصنع غالباً من الحديد الصلب يتراوح طوله من 1-20m وقطره 3-10mm.

يشترط في العمود المعبأ أن يكون الطور الثابت ثابتاً حرارياً وغير متطاير عند درجة الحرارة المستخدمة وألا يتفاعل مع مكونات العينة لكن بالنسبة للمواد التي تتفاعل مع الحديد الصلب أو تمتز على سطحه مثل مبيدات الحشرات عندها يستخدم عمود مصنوع من الزجاج بدلاً من العمود المعدني. كما يجب أن تتم التعبئة بشكل محكم باستخدام حبيبات صغيرة الحجم وذات شكل منتظم من الدعامة الصلبة. في هذه الأعمدة يكون السن عريض لذلك تقاس مساحته بدلاً من ارتفاعه.

تعالج الأعمدة المعبأة كمية كبيرة من العينة مقارنة بالأعمدة الشعرية حيث تقوم بتحليل كمية من العينة تقع ضمن المجال 0.1-10µl أما كفاءتها تكون من عدة مئات إلى 2000 طبقة نظرية لكل متر من طول العمود.

نظراً لطول العمود سواء المعبأ أو الشعري فإنه غالباً يلف حتى لا يشغل حيزاً واسعاً.

أما النوع الثاني يسمى بالأعمدة الشعرية وهي عبارة عن أنبوب طويل 25-100m من الزجاج ذو قطر خارجي 0.2-1.2mm أو أقل. والأعمدة الشعرية غير معبأة ولكن يطلى على سطحها الداخلي طبقة رقيقة من الطور الثابت وهي ذات كفاءة عالية نظراً لطولها (50.000-100.000)≤n ولهذا تستخدم لفصل العينات المعقدة التركيب. كما أن معدل جريان الغاز الحامل في الأعمدة الشعرية 4-10ml/min.

نظراً لطول الأعمدة الشعرية فإن الأسنان الناتجة (القمم) تكون ضيقة وحادة ومرتفعة ولهذا يفضل في هذه الحالة قياس ارتفاع السن بدلاً من قياس مساحته بدلالة التركيز.

على الرغم من طول الأعمدة الشعرية إلا أن مساحة سطح الطور الثابت أقل وبالتالي سعتها أقل مقارنة مع الأعمدة المعبأة لذلك تكون كمية العينة المحللة صغيرة جداً µl(10^{-3}- 10^{-2}).

4- الطور الثابت: هو عبارة عن دعامة صلبة مثبت عليها طبقة رقيقة من السائل

أولاً: الدعامة الصلبة:

تكون على هيئة حبيبات صغيرة الحجم ومنتظمة ويشترط في الدعامة الصلبة أن تكون ذات مساحة كبيرة وأن تكون خاملة كيميائياً وثابتة حرارياً ومن المواد التي تستخدم كدعامة الطوب الحراري والزجاج والغرافيت.

يتم تثبيت الطور السائل على حبيبات الدعامة الصلبة بواسطة إذابة كمية من السائل في مذيب مناسب ذو درجة غليان منخفضة مثل الأسيتون وبعد ذلك يتم خلط هذا المحلول مع حبيبات الدعامة الصلبة ويترك المذيب ليتبخر عند درجة الحرارة المناسبة حيث يبقى الطور السائل ملتصقاً بالحبيبات على هيئة طبقة رقيقة.

ثانياً: الطور السائل:

إن أهم الشروط الواجب توافرها في الطور السائل:

1- أن يكون غير متطايراً وثابتاً حرارياً عند درجة الحرارة المستخدمة في الفصل.

2- يجب أن تكون تكراريته جيدة.

3- يجب ألا يتفاعل مع المواد المراد فصلها.

4- يجب ألا ينزع من حبيبات الدعامة الصلبة المثبت عليها أثناء تحرك الغاز.

5- أن تبدي العينات عوامل توزع مختلفة.

6- أن تكون العينات ذات درجات ذوبانية مقبولة في المذيب.

ضبط وبرمجة درجة الحرارة:

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.

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 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.

الكواشف المستخدمة في جهاز GC:

يشير الكاشف إلى وجود المركبات ويقيس كميات هذه المركبات المارة خلال العمود جميع الكواشف المستخدمة تعتمد على قياس خاصية فيزيائية مثل الناقلية الحرارية، التأين (التشرد) اللهبي، كاشف الناقلية الكهربائية وكاشف الالتقاط الاكتروني أي أن الكاشف يقيس المواد بناءً على مدى تأثيرها على الخصائص الفيزيائية للغاز الحامل.

مواصفات التي يجب أن تتوافر في الكاشف المستخدم في جهاز GC:

1- الحساسية العالية.

2- الاستجابة خطية ضمن مجال واسع لتراكيز المواد المدروسة.

3- أن يبدي استجابة لجميع مكونات المزيج أو انتقائي لنوع معين من المركبات.

4- أن يكون مستوى التشويش منخفض جداً.

5- ألا يتأثر بتغيرات الحرارة والتدفق.

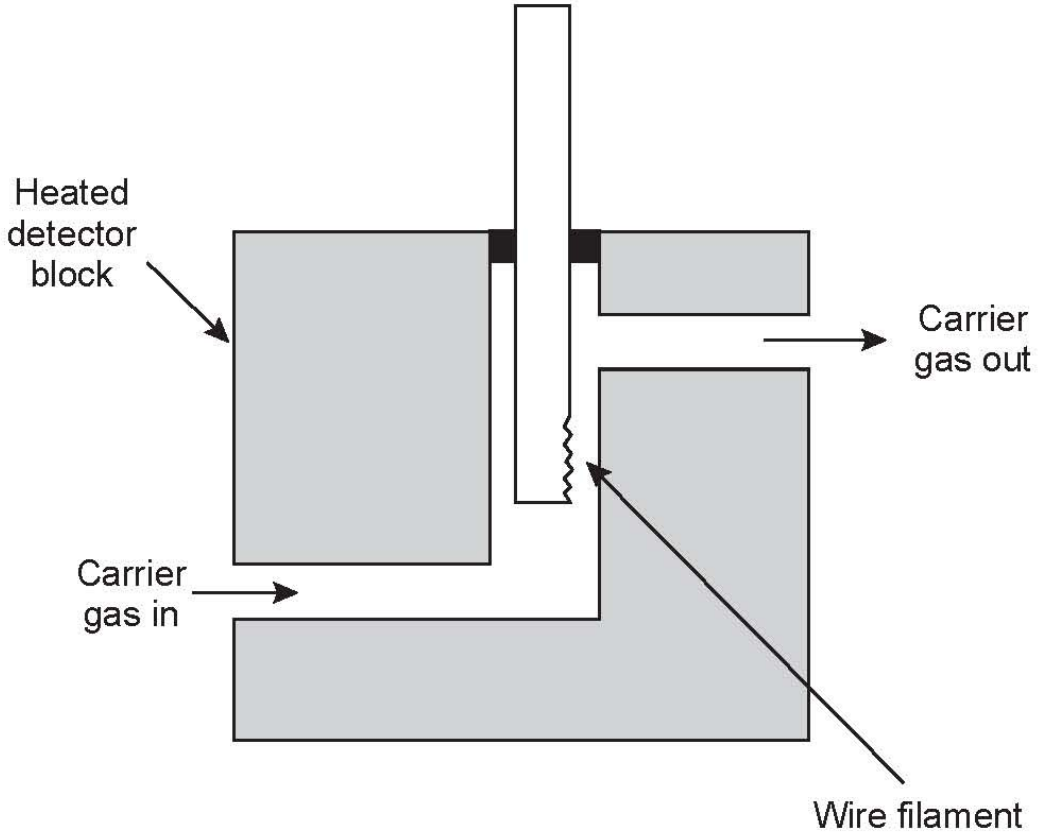
نوضح في الجدول الآتي أنواع الكواشف ومجال تطبيقها:

نوع الكاشف	الرمز	مجال التطبيق
الناقلية الحرارية	TCD	جميع المركبات
التشرد باللهب	FID	الهيدروكربونات
الالتقاط الالكتروني	ECD	المركبات الحاوية على الكبريت والهالوجينات ومركبات النترات والنتريت والمركبات العضوية المعدنية
الآزوت والفوسفور	NPO	مركبات الحاوية على الآزوت والفوسفور
الضوئي اللهبي	FPO	مركبات حاوية على الفوسفور والكبريت
التشرد الضوئي	PID	المركبات العطرية
الأشعة تحت الحمراء	IR	جميع المركبات العضوية
طيف الكتلة	MS	جميع المركبات

أولاً: كاشف الناقلية الحرارية: Thermal Conductivity Detector (TCD)

يعتمد هذا الكاشف على قياس كمية الحرارة المفقودة في السلك المعدني الساخن الموجود داخل الكاشف وتعتمد الناقلية الحرارية على تركيب الغاز لكن بدلاً من قياس حرارة السلك للدلالة عن الناقلية نقوم بقياس مقاومة السلك والتي تتناسب طرداً مع درجة حرارته.

يتكون هذا الكاشف من ممرين كل منهما يحتوي سلك ملفوف مصنوع من معدن مثل البلاتين. يمر الغاز النقي عبر الممر الأيسر للكاشف حيث تقاس ناقليته الحرارية من خلال قياس مقاومة السلك أثناء مرور الغاز بواسطة قنطرة ويتستون وبعد خروج الغاز الحامل من الكاشف تحقن العينة ثم يتم فصل مكونات العينة في العمود ثم يمر الغاز الحامل للمكونات عبر الممر الأيمن للكاشف حيث تقاس ناقليته الحرارية ثم يقول المسجل بتسجيل الناقلية الحرارية لكل مكون على هيئة سن وذلك بعد طرح ناقلية الغاز النقي منه.



خصائص كاشف الناقلية الحرارية:

يتميز هذا الكاشف بميزات هامة منها:

1- تركيبه بسيط.

2- لا يقوم بتكسير المواد التي يتم فصلها.

3- سريع الاستجابة.

4- يستجيب لكافة المواد حيث أنها بالضرورة تمتلك معامل ناقلية حرارية مختلفة وأقل من الهليوم.

5- ويمتاز بمصداقية وتكرارية جيدة ويكون مجال العلاقة الخطية من التراكيز متوسط.

عيوب كاشف الناقلية الحرارية:

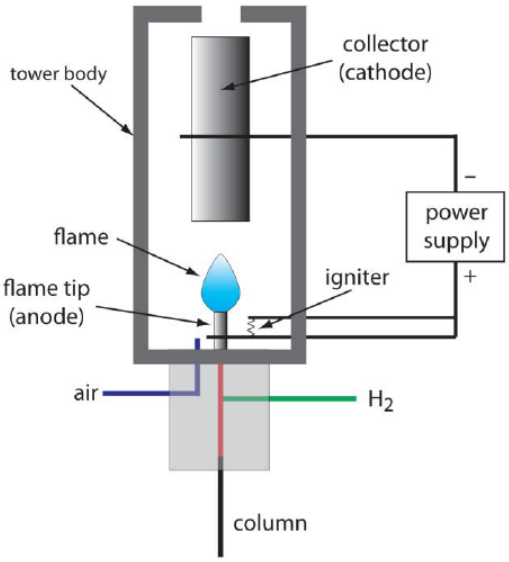
1- الحساسية متوسطة.

2- يتأثر بتغيرات طفيفة في درجة الحرارة وبمعدل جريان الغاز الحامل.

3- ممكن أن يتأكسد معدن السلك بوجود الأوكسجين.

ثانياً: كاشف التأين اللهبي: Flame Ionization Detector (FID)

أغلب المركبات العضوية تتأين في اللهب ويتكون هذا الكاشف من موقد صغير يحتوي على الهيدروجين والهواء أو الأوكسجين ويحاط اللهب بقطبين مختلفي الشحنة. عندما يمر الغاز الحامل المحمل بالمركبات العضوية خلال اللهب تتأين تلك المركبات ويمر نتيجة لذلك تيار كهربائي بين القطبين تتناسب شدته مع كمية المادة المتأينة.



خصائص كاشف التأين اللهبي:

1- حساسية عالية في مجال ng أي أنه أكبر 1000 مرة من حساسية كاشف الناقلية الحرارية.
2- إشارته ثابتة بمرور الزمن.
3- يستعمل لفترة طويلة بنفس الفعالية.
4- مجال العلاقة الخطية واسع.

عيوب كاشف التأين اللهبي:

1- يقوم على أساس تحطيم وتأين المواد المفصولة وبالتالي لا يمكن استرجاع المواد لإعادة استخدامها أو إجراء أي تحاليل أخرى.

2- تعتمد إشارته على عدد ذرات الكربون في المركب أي الإشارة لا تعتمد على التركيز فقط وإنما أيضاً على عدد ذرات الكربون فالمركب الحاوي على عدد ذرات الكربون أكبر يعطي إشارة أكبر.

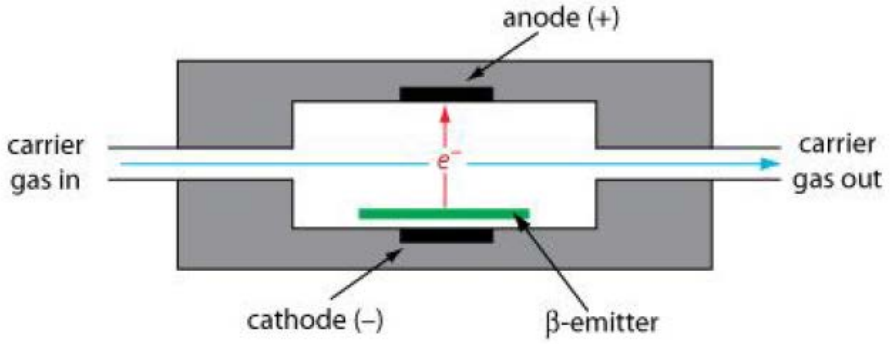
3- أكثر تعقيداً حيث يتطلب تشغيله استخدام أسطوانة لغاز الهيدروجين وأخرى للهواء من أجل تشغيل اللهب بالإضافة للغاز الحامل وجميعها تحتاج إلى وقت لضبط معدل سرعة الغازات في كل منها.

4- لا يستجيب لبعض المركبات مثل CO_2، NO_x، SO_x، H_2O.

5- حساسية منخفضة لمجموعة الكربونيل والأمينات والكحولات.

ثالثاً: كاشف الالتقاط الالكتروني: Electron Capture Detector (ECD)

يستخدم هذا الكاشف النتروجين كغاز حامل يقوم مبدأ عمله على استخدام مادة مشعة تكون مصدر لأشعة β (الالكترونات) مثل ^{63}Ni أو ^{3}H التي تعمل على تأيين الغاز الحامل وتعطي فيضاً من الالكترونات وبالتالي يمر تيار ثابت بين القطبين وعندما يمر مع الغاز الحامل مواد ذات ألفة الكترونية عالية (محبة للالكترونات) تكون قادرة على التقاط الالكترونات وبالتالي سوف تلتقط بعضاً من تلك الالكترونات مما يقلل من قيمة التيار.



خصائص كاشف الالتقاط الالكتروني:

1- حساسية عالية.

2- لا يكسر المواد المفصولة.

3- بسيط وإشارته ثابتة.

عيوب كاشف الالتقاط الالكتروني:

1- يستخدم مواد مشعة وهذا غير مرغوب به خاصة عند إجراء صيانة له.

2- مجال العلاقة الخطية محدود للغاية.

3- تعتمد إشارته على عدد الذرات المحبة للالكترونات في المركب أي الإشارة لا تعتمد على التركيز فقط وإنما أيضاً على عدد الذرات المحبة للالكترونات فالمركب الحاوي على عدد أكبر من تلك الذرات يعطي إشارة أكبر.

4- يستجيب فقط للمواد التي تحتوي على ذرات تلتقط الالكترونات مثل الهالوجينات والكبريت بينما لا يستجيب للمركبات الهيدروكربونية والأمينات والكحولات.

رابعاً: الكاشف الضوئي اللهبي:

صمم بشكل خاص للكشف عن الكبريت والفوسفور حيث يعتمد مبدأ عمله على ما يلي:

عند مرور المركبات الحاوية على الكبريت والفوسفور فوق اللهب فإنها تحترق وتعطي أكاسيد الفوسفور والكبريت (مشتقات ملونة) وهذه المشتقات تمتص الضوء بكمية تتناسب مع تركيز المادة ويتم تحديد تركيز المادة بناءً على كمية الضوء الممتص.

طول الموجة التي يمتص عندها الكبريت $\lambda=394nm$ بينما يمتص الفوسفور عند طول الموجة $\lambda=520nm$.

خامساً: كاشف التشرد الضوئي:

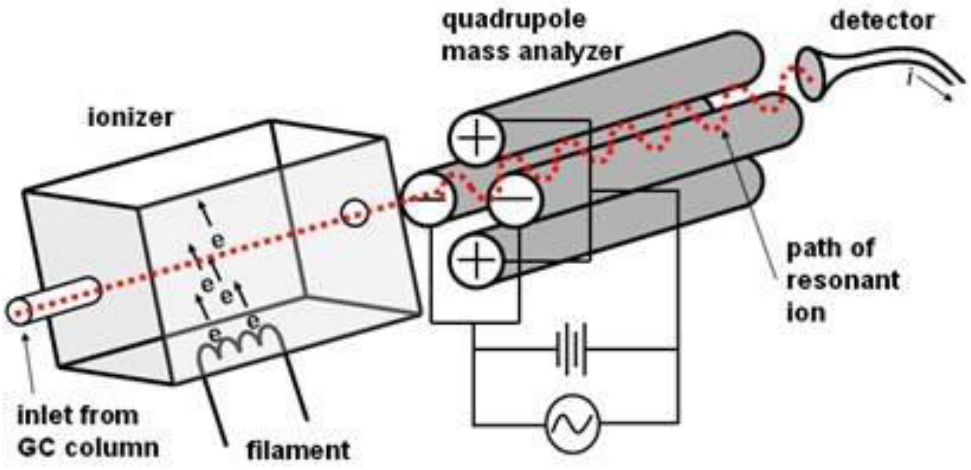
يستخدم في هذا الكاشف الأشعة فوق البنفسجية (UV) بدلاً من اللهب حيث تتشرد المركبات القابلة للتأين مما يؤدي إلى إنتاج تيار كهربائي يتناسب طرداً مع تركيز المادة المفصولة. وهذا الكاشف انتقائي فقط للمركبات العطرية.

سادساً: كاشف الناقلية الكهربائية:

يعد هذا الكاشف من الكواشف الحديثة جداً يعتمد على امتزاج المركبات مع غاز التفاعل (الهيدروجين) ثم مرور هذه المركبات في أنبوب التفاعل مؤدياً إلى إرجاعه حيث تمرر هذه المركبات عبر خلية كهرليتية وتحل في مذيب مناسب (البروبانول) مما يؤدي إلى تغير ناقليته الكهربائية ومن ثم يقاس هذا التغير. يعد هذا الكاشف خاص بالكبريت والهالوجينات والآزوت ويتمتع بخطية واسعة.

سادساً: كاشف مطياف الكتلة:

يعتبر هذا الكاشف من أفضل وأغلى أنواع الكواشف إذ أنه بالإضافة إلى الحساسية العالية فإنه يتميز بالقدرة على التعرف على المركبات المختلفة بدرجة عالية جداً من التأكد قد تصل إلى اليقين. ذلك لأن هذا الكاشف يقوم على أساس تفتيت المادة إلى أجزاء أيونية أصغر والتعرف على الكتلة الجزيئية لكل منها أي أنه يستخدم كلاً من زمن الاحتفاظ والتركيب الجزيئي لتحديد هوية المادة بينما الكواشف الأخرى لا تستطيع تحديد ذلك.



وحيث أن هذا النوع من مطياف الكتلة هو الأكثر انتشاراً مع أجهزة كروماتوغرافيا الغازية عالية الجودة فمن المفيد إعطاء تصور بسيط عن تركيبه وآلية عمله:

يتكون مطياف الكتلة من المكونات الآتية:

1- غرفة التأين:

وهي عبارة عن غرفة تدخلها المواد الخارجة من العمود مادة تلو أخرى بعد فصلها فتتعرض المادة إلى شعاع من الالكترونات التي تعمل على تأيينها وتفتيتها إلى أيونات أبسط تتفاوت في كتلتها الجزيئية.

2- عدسات التركيز:

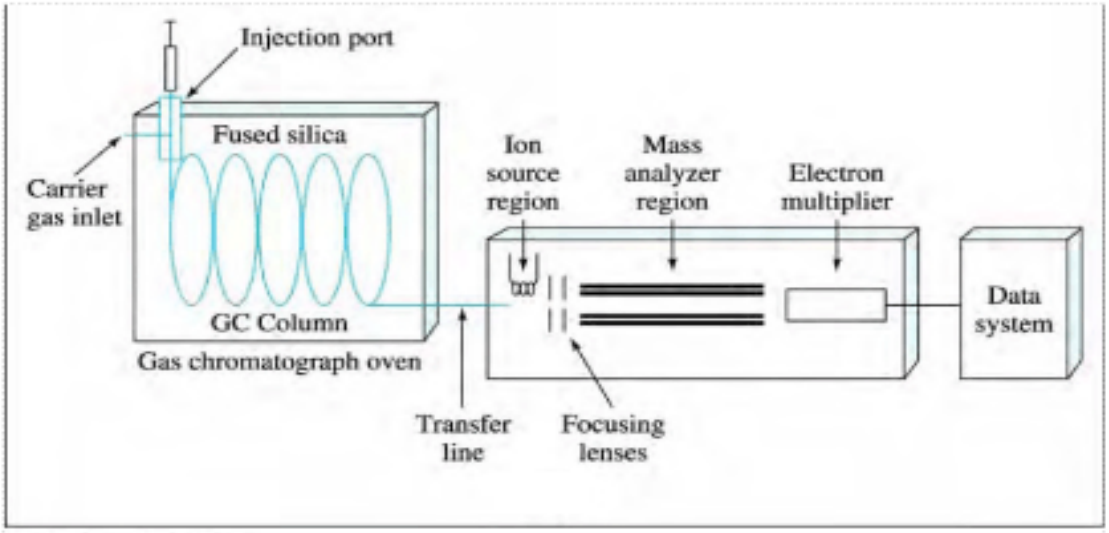
يتم توجيه تلك الأيونات عبر ما يسمى بعدسات التركيز وهي ليست عدسات بصرية بل هي ألواح مشحونة بشحنات سالبة تقوم بتسريع حركة الجزيئات نحو محلل الكتلة.

3- محلل الكتلة:

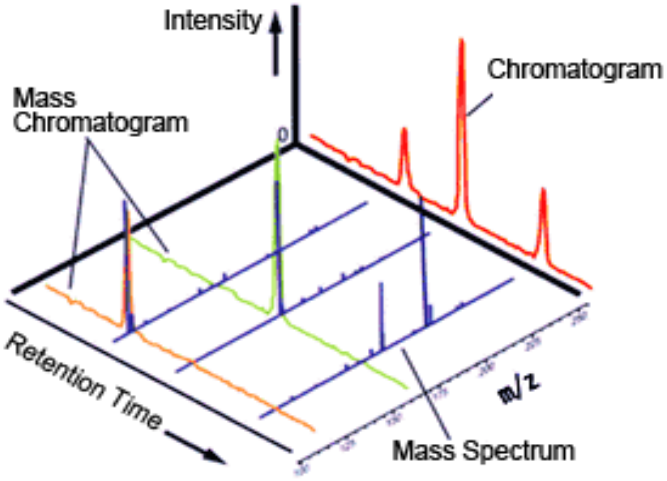
هناك عديدة من محللات الكتلة وأكثرها استخداماً quadrupole mass analyzer ويتكون من أربع أقطاب كل اثنان منهما متقابلين وموصولان بجهد متردد وثابت. إن قيمة الجهد الثابت تسمح فقط لكتلة جزيئية واحدة بالمرور خلال محلل الكتلة والوصول إلى الكاشف.

4- الكاشف:

يسمى أنبوبة مُضاعِف الالكترونات (electron multiplier tube).



وبالتالي فإن العينة عند حقنها تنفصل في العمود إلى المواد المختلفة المكونة لها ومن ثم تبدأ المواد تباعاً في الدخول إلى مطياف الكتلة ليتم تحليلها والتعرف عليها وعلى تركيزها. والنتيجة تكون على صورة كروماتوغرام كالمعتاد للمواد المكونة للعينة إضافة إلى طيف الكتلة الخاص بكل مادة:

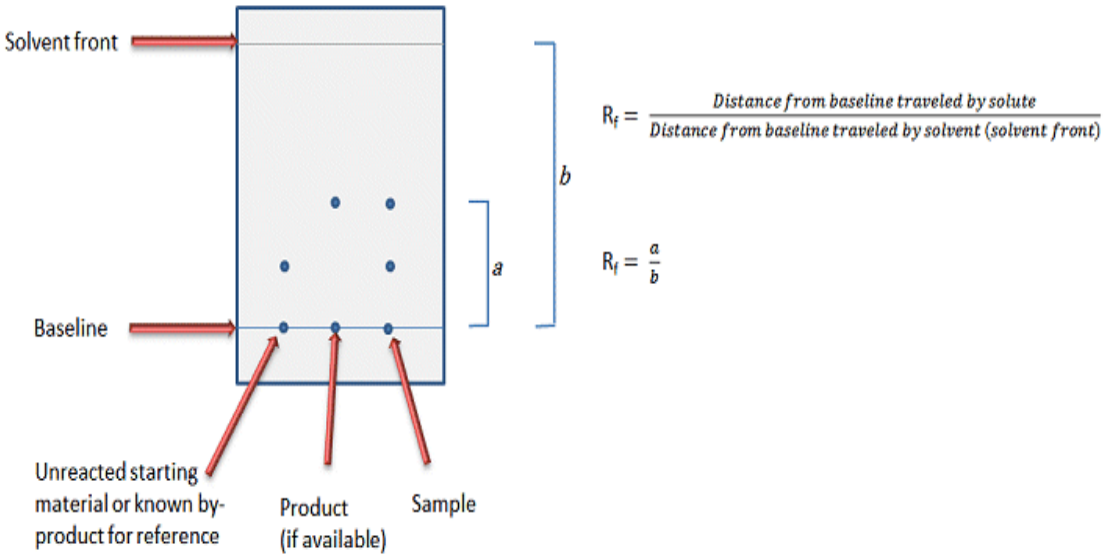


الكروماتوغرافيا المستوية:

في الطرائق الكروماتوغرافية المستوية يتم إجراء عمليات الفصل الكروماتوغرافية على سطح مستو بدلاً من استخدام عمود معبأ. هذه الطرائق بسيطة ولكن ذات كفاءة وحساسية عاليتين. ويوجد نوعين من الكروماتوغرافية المستوية إحداهما يسمى الكروماتوغرافية الورقية والآخر يسمى بالكروماتوغرافية ذات الطبقة الرقيقة.

1- الكروماتوغرافية الورقية paper chromatography:

يكون الطور الثابت سائل وهو غالباً الماء المحيط بالسيليلوز مثبت أساساً على دعامة وهي عبارة عن ورقة الترشيح. توضع كميات صغيرة من العينة المختلفة على خط يرسم في بداية الورقة بحيث تبدو العينات على شكل بقع على هذا الخط وبعد ذلك تغمس الورقة في المذيب المتحرك (الطور المتحرك) في جو مغلق (حجيرة كروماتوغرافية) وذلك حتى يصبح محيط الحجيرة مشبع ببخار المذيب المتحرك.



يتحرك المذيب إلى أعلى الورقة بفعل الخاصية الشعرية أو يتحرك إلى الأسفل بفعل الجاذبية إذا وضع المذيب أصلاً في أعلى الورقة أو يتحرك أفقياً بفعل الانتشار. وأثناء تحرك المذيب تتوزع مكونات العينة بين المذيب المتحرك والطور الثابت وبالتالي تتحرك المكونات بسرعات مختلفة عبر الورقة.

بالنسبة للطور المتحرك يمكن استخدام مذيب واحد أو مزيج من المذيبات العضوية. أما الطور الثابت فهو عبارة عن الماء الممتز على الورقة وفي هذه الحالة يستخدم مذيب عضوي كطور متحرك لا يمتزج مع الماء.

بعد فصل المواد عن بعضها على هيئة بقع يستخدم معامل التأخير R_f لوصف كل مادة تحت شروط معينة ويستخدم هذا المفهوم أيضاً في الكروماتوغرافية ذات الطبقة الرقيقة:

$$R_f = \frac{L_S}{L_M}$$

حيث L_S: المسافة التي تقطعها المادة على الورقة.

L_M: المسافة التي يقطعها المذيب المتحرك.

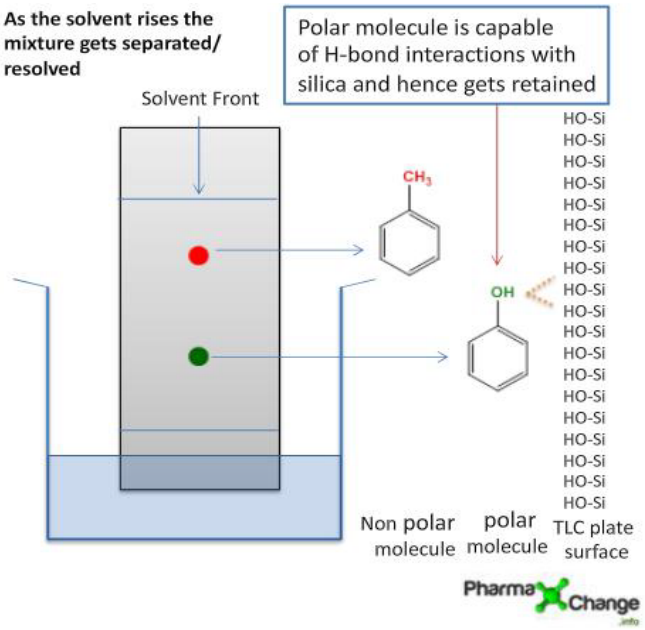
وتقاس عادة من مركز البقعة وقيمة R_f يجب ألا تتعدى الواحد وهي تقابل معامل التوزع D في الطرائق الكروماتوغرافية الأخرى. بعد ذلك يتم إظهار البقع عن طريق رش الورقة بكاشف طيفي يكون ألوان مع المواد المفصولة وذلك لتوضيح مكان كل مادة على الورقة. ويتم تقدير كل مادة

كمياً إما على الورقة عن طريق قياس كمية الضوء المنعكس من كل بقعة أو عن طريق قطع كل بقعة على حدا ثم يتم تحليل كل مادة باستخدام طرائق التحليل المناسبة.

2- الكروماتوغرافية ذات الطبقة الرقيقة Thin-Layer Chromatoghraphy:

من عيوب الكروماتوغرافية الورقية أن ورق الترشيح غير متجانس التركيب كما أن عملية الفصل سيئة فيها بسبب تأثير الانتشار الجزيئي ودرجة الحرارة لهذا السبب يفضل استخدام الكروماتوغرافية ذات الطبقة الرقيقة في هذه الطريقة يستعمل لوح زجاجي أو صفيحة صغيرة من البلاستيك تغطى بطبقة رقيقة (0.2-0.3mm) من مادة مازة قطبية مثل الألومينا أو هلام السيليكا أو مسحوق السيليلوز. وهذه المادة قد تكون جافة أو مغطاة بطبقة من مذيب مناسب مثل الماء كما يمكن استخدام مبادل أيوني أو هلام كطور ثابت ويمكن استخدام أي مذيب مناسب كطور متحرك. إن ميكانيكية التوزع في هذه الطريقة تعتمد على الامتزاز أو الذوبان التجزيئي أو التبادل الأيوني أو الاختلاف في حجم جزيئات المكونات.

مثال عن ميكانيكية التوزع بالاعتماد على آلية الامتزاز باستخدام TLC:

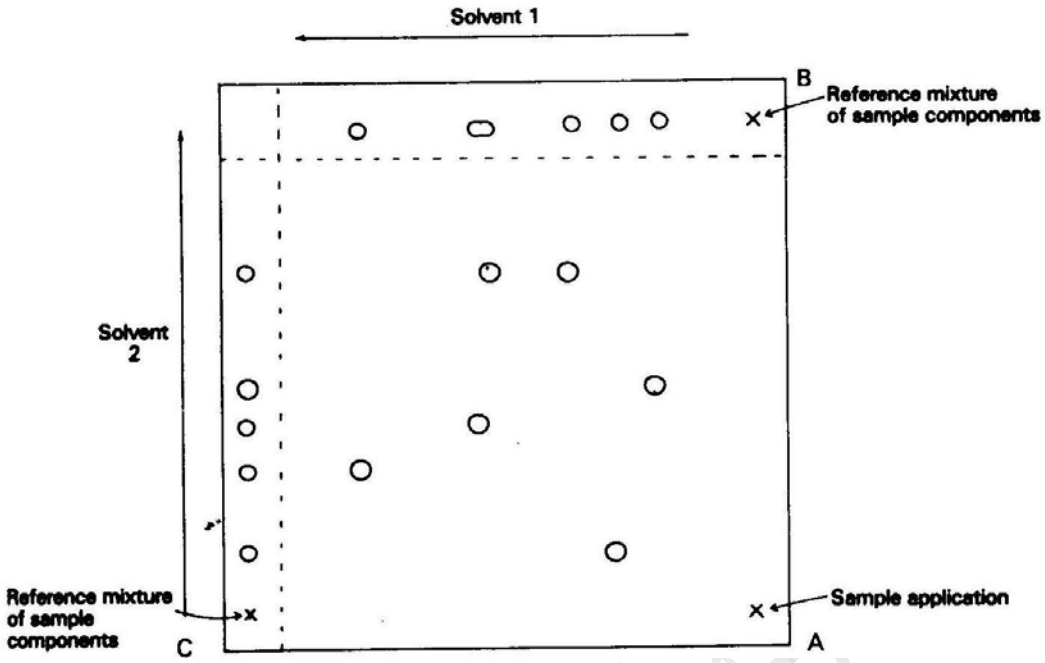


وهنا أيضاً يتم الفصل في جو مغلق حتى يتشبع الجو ببخار المذيب المتحرك وذلك من أجل الحصول على تكرارية جيدة لقيم R_f لأن تبخر المذيب في جو مفتوح سيؤدي إلى زيادة L_S وتقليل L_M أي أن قيمة R_f سوف تزيد في هذه الحالة.

صفائح TLC والحجيرة الكروماتوغرافية

يفضل في هذه الطريقة أن تكون قيمة العينة في حدود 0.01-50µg وذلك حتى نقلل من انتشار البقع وبالتالي نحصل على فصل جيد كما أن قيمة R_f تعتمد على كمية العينة غالباً تذاب العينة في 10µl من مذيب متطاير وذلك لمنع انتشار البقعة.

يمكن تحسين عملية الفصل باستخدام تقنية الإظهار ذو البعدين تستخدم عند وجود مجموعة من المركبات المتماثلة في بينتها وخصائصها الكيميائية مثل الحموض الأمينية التي تكون قيم متقاربة عند استخدام تقنية البعد الواحد وفي هذه الحالة تستخدم تقنية الإظهار ذات البعدين التي يستخدم فيها طور متحرك ثاني حيث يتم أولاً الفصل في اتجاه معين على اللوح وبعد تبخر المذيب يدار اللوح بزاوية 90C° ثم يستخدم مذيب آخر.



كما يتم تحسين عملية الفصل باستخدام حبيبات صغيرة جداً من الطور الثابت بحيث تفرد على اللوح بشكل محكم وهذا يجعل ارتفاع المكافئ لطبقة نظرية واحدة H صغيراً جداً.

خطوات العمل بكروماتوغرافيا ذات الطبقة الرقيقة:

- ❖ تجهيز ألواح الطبقة الرقيقة.
- ❖ اختيار الوسط المتحرك المناسب.
- ❖ وضع العينة على لوح الطبقة الرقيقة.
- ❖ تظهير البقع المفصولة والتعرف على مكوناتها.
- ❖ حساب معامل التأخير R_f.

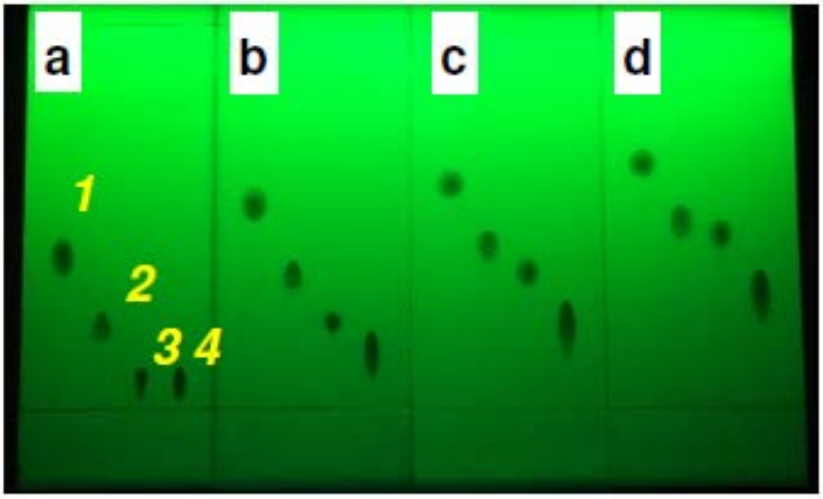
الكشف عن المواد المفصولة:

إذا كانت المواد المفصولة ملونة وبالتالي نستطيع ملاحظتها عند فصلها بالعين المجردة ولكن إذا كانت غير ملونة عندها ترش بكاشف مولد للون يكون مركبات ملونة مع المواد المفصولة وبالتالي تبدو كبقع ملونة. ومن أمثلة هذه الكواشف اليود الذي يكون مركبات ملونة مع المركبات العضوية غير المشبعة وكاشف الناينهدرين للحموض الأمينية وحمض الكبريت الذي يحرق المواد العضوية بالتسخين ويحولها إلى بقع سوداء لهذا لا يستعمل مع الكروماتوغرافية الورقية وإنما فقط مع الكروماتوغرافية ذات الطبقة الرقيقة نظراً لأنه يحرق الورقة.

يبين الجدول الآتي بعض الكواشف التي تحدد مواقع البقع في TLC:

Reagent detected	Colour of spots	Component
Iodine vapour	Brown	General organic Unsaturated compounds
2,7-Fluorescein	Yellow–green	Most organic compounds
Ninhydrin	Pink–purple	Amino acids and amines
2,4 DNP	Orange–red	Ketones and aldehydes
Antimony chlorides	Various Characteristic	Steroids, alicyclic Vitamins and carotenoids
Bromophenol blue or bromocresol green	Yellow	Carboxylic spots
Diphenylcarbazide	Various Characteristic	Metals

كثير من المركبات العضوية تتألق عند إثارتها بالأشعة عند 254nm لذلك يستخدم أجسام مازة (اللوح) تحوي مشعر فلورة التي تمتص عند 254nm ثم تتألق وتصدر أشعتها عند نهاية الأخضر من الطيف وبعد الفصل يتم تسليط الأشعة فوق البنفسجية على اللوح عندها سوف يتألق كامل اللوح ويصبح لونه أخضر ما عدا البقع المفصولة التي تظهر بلون داكن وخلفية خضراء حيث يكون لها تأثير انطفائي.

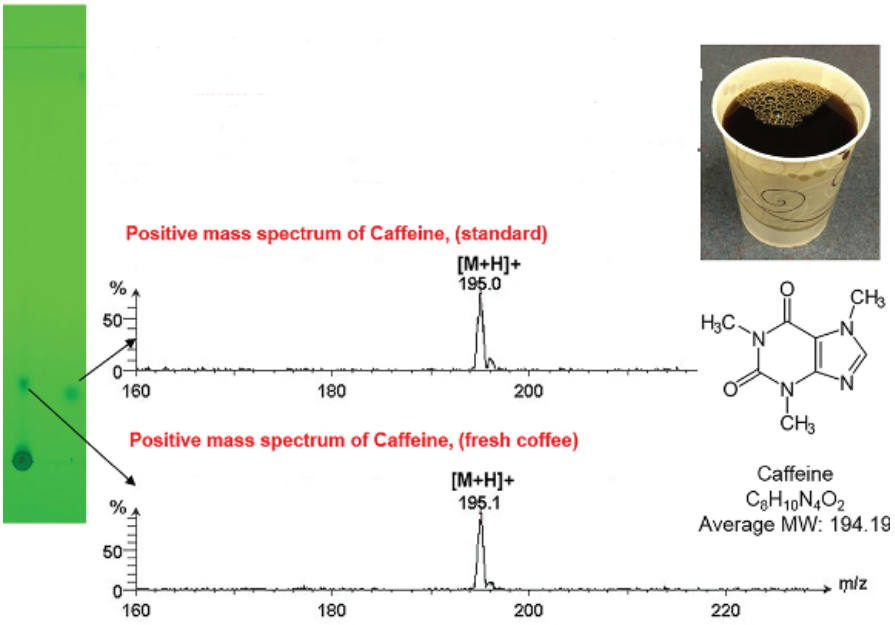


تطبيقات الكروماتوغرافية المستوية:

1- التحليل الكيفي:

يمكن تمييز مزيج من المكونات مثل مزيج مكون من عدة ملونات عن طريق مقارنة R_f لتلك المكونات مع قيم R_f للمواد القياسية تحت تأثير نفس الظروف أو عن طريق فصل المكونات والكشف بالطرائق الأخرى مثل التحليل الطيفي الكتلي أو طريقة الأشعة تحت الحمراء....

مثال: الكشف عن Caffeine باستخدام TLC حيث المذيب المتحرك عبارة عن مزيج من المذيبات Ethyl acetate/hexane/acetic acid (20/10/0.5, v/v/v) واستخدم كاشف UV عند طول الموجة 254nm وكاشف طيف الكتلة MS.



2- التحليل الكمي:

إن دقة ومصداقية الطرائق الكروماتوغرافية المستوية ليست جيدة حيث يتراوح الخطأ ما بين 5-10% لذلك فإن استخدامها في التحليل الكمي محدود نسبياً إلا أنه يمكن عن طريق رسم العلاقة بين وزن المادة واللوغاريتم أو الجذر التربيعي لمساحة البقعة إيجاد التركيز التقريبي للمادة. كما يمكن تحليل المواد بالطرائق الطيفية أو الكيميائية.

ويوجد العديد من المواد التي يمكن فصلها باستخدام الكروماتوغرافية المستوية مثل الحموض الأمينية، الفيتامينات، السكريات والملونات الغذائية.

مسألة: حصلنا على المعطيات التالية بالكروماتوغرافيا الغازية السائلة على عمود محشو طوله 40cm وسرعة جريان الطور المتحرك 21.05 cm/min:

المركب	t, min	H, cm
مركب غير محتفظ	?	-
متيل الهكسان الحلقي	10	0.0144
التولوين	13.4	0.0144

وإذا كانت V_S=19.6ml و V_M=62.6ml احسب ما يلي:

1- زمن مرور الطور المتحرك في العمود.

2- معامل توزع كلاً من متيل الهكسان الحلقي والتولوين.

3- احسب حجم الاحتفاظ كل مكون.

4- عدد الطبقات النظرية وعرض القمة الكروماتوغرافية لكل مكون.

الحل:

1- يحسب زمن مرور الطور المتحرك في العمود من العلاقة:

$$t_M = \frac{L}{U}$$

$$t_M = \frac{40}{21.05}$$

وبالتالي: $t_M = 1.9$ min

2- نستطيع حساب معامل التوزع وفق المعطيات السابقة من العلاقة:

$$t_R = t_M \,.\, (1 + D\ \frac{V_S}{V_M})$$

من أجل متيل الهكسان الحلقي:

$$10 = 1.9 \times (1 + D\ \frac{19.6}{62.6})$$

وبالتالي:

$$10 = 1.9 + 0.59488D$$

$$D = 13.61$$

من أجل التولوين:

$$13.4 = 1.9 \times (1 + D\ \frac{19.6}{62.6})$$

وبالتالي:

$$13.4 = 1.9 + 0.59488D$$

$$D = 19.33$$

3- يحسب حجم الاحتفاظ من العلاقة:

$$V_R = V_M + D\ V_S$$

من أجل متيل الهكسان الحلقي:

$$V_R = 62.6 + 13.61 \times 19.6$$

$$V_R = 329.356\ ml$$

من أجل التولوين:

$$V_R = 62.6 + 19.33 \times 19.6$$

$$V_R = 441.468\ ml$$

4- تحسب عدد الطبقات النظرية من:

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

$$n = \frac{40}{0.0144} = 2777.77$$

تحسب عرض القمة الكروماتوغرافية من العلاقة:

$$n=(\frac{4t_R}{W})^2$$

من أجل متيل الهكسان الحلقي:

$$2777.77 =(\frac{4\times10}{W})^2$$

وبالتالي: W= 0.758 min

من أجل التولوين:

$$2777.77 =(\frac{4\times13.4}{W})^2$$

وبالتالي: W= 1.016 min

مسألة: يعطي الايزو أوكتان ونظامي الأوكتان قمتين كروماتوغرافيتين زمن احتفاظهما 800sec و815sec على الترتيب على عمود يحوي 8100 طبقة نظرية والمطلوب:

احسب درجة الفصل التي سنحصل عليها إذا حقنت عينة تحوي المكونين في هذا العمود.

$$R=\frac{2(t_{R,2}-t_{R,1})}{W_1+W_2}$$

يجب حساب عرض القمة الكروماتوغرافية لكل مكون:

$$n=(\frac{4t_R}{W})^2$$

من أجل ايزو أوكتان:

$$8100=(\frac{4\times800}{W})^2$$

$$8100W^2 = 10240000$$

$$W = 35.555sec$$

من أجل أوكتان:

$$8100=(\frac{4\times815}{W})^2$$

$$8100W^2 = 10627600$$

$$W = 36.222sec$$

وبالتالي درجة الفصل:

$$R=\frac{2(t_{R,2}-t_{R,1})}{W_1+W_2}$$

$$R=\frac{2(815-800)}{35.555+36.222}$$

$$R=0.417$$

الكيمياء التحليلية الصيدلانية ٢ – د. شهامة عدي