الفصل الخامس عشر

الكروماتوجرافيا

15- 1 مقدمة عن الطرق الكروماتوغرافية:

الكروماتوجرافيا هي علم فصل مكونات عينة ما عن بعضها وتعيين كل من هذه المكونات. وتعتمد عملية فصل المكونات على اختلاف خواص الجزيئات لكل من هذه المكونات. فعلى سبيل المثال، يمكن فصل الجزيئات التي تختلف عن بعضها في الشحنة الكهربائية التي على الجزيئات، أو في حجم هذه الجزيئات، أو كتلة الجزيئات، كذلك في قطبية الروابط (Bond polarity)، وفي جهد التأكسد والاختزال، وثابت التأين، وفي ترتيب الروابط مثل المتشابهات (Isomers)، لهذا يمكن القيام بفصل المكونات باستخدام العديد من التقنيات.

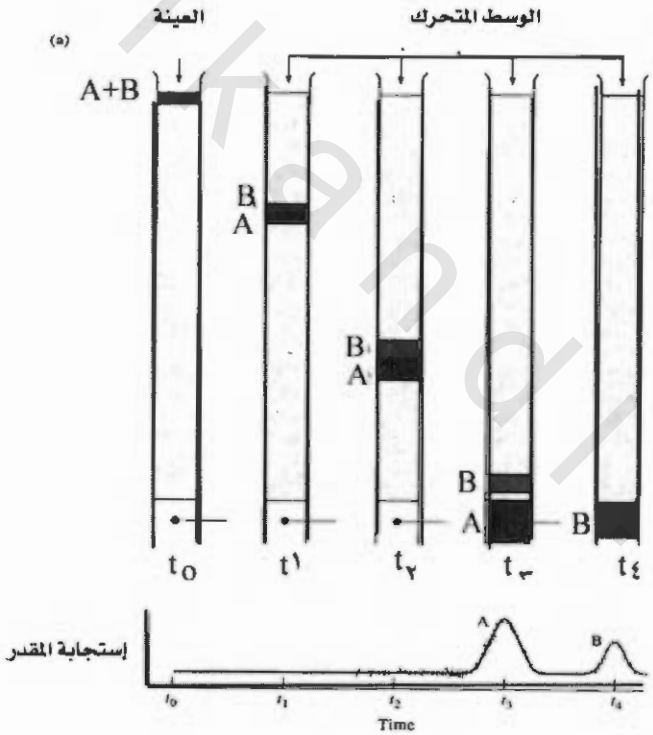
ويرجع تاريخ هذا العلم إلى القرن التاسع عشر، حيث قام عالم النبات الروسي Michael Tswet بفصل بعض الأصباغ (Pigments) مستخدمًا عمودًا زجاجيًا يشبه السحاحة قام بملئه بمسحوق كربونات الكالسيوم، ثم مزج الأصباغ النباتية بمحلول الأيثر البترولي، ومرر هذا المزيج من خلال العمود، وبعد مدة من الزمن شاهد ظهور طبقات ملونة تكونت نتيجة انفصال الأصباغ، وقام بفصل كل طبقة على حدة. وأطلق على هذا العلم الكروماتوغرافيا، حيث كلمة كروما تعني باللاتينية اللون وكلمة غرافيا تعني الكتابة. والشكل (15-1) يبين كيف يتم انفصال كل من مكونات العينة A, B لدى مرورهما داخل العمود، حيث ستتأثر كل مادة بشكل مختلف مع كل من الوسط المتحرك والوسط الساكن، وهذا يؤدي إلى انفصالهما مكونتين طبقتين، وتصل كل طبقة إلى المقدر في وقت معين، وينتج بذلك منحنى الكروماتوجرام. ومن هذا المنحنى يمكن تعيين زمن الاستبقاء لكل مركب، ومن مساحة كل منحنى أو ارتفاعه يمكن تعيين تركيز كل مادة بعد عمل المنحنى القياسي.

obeikandl.com

2-15 أنواع الطرق الكروماتوغرافية:

نظـرًا لاسـتخدام الوسـط السـاكن والمتحـرك فإنـه يمكـن تقسـيم الطـرق الكروماتوغرافية حسب حالة الوسط المستخدم من حيث كونها صلبة أو سائلة أو غازية.

الوسط الساكن	الوسط المتحرك	نوع الطريقة
صلب	سائل	الصلبة - السائلة
سائل	سائل	سائل - سائل
سائل	غاز	سائل - غاز



شكل (15-1) طريقة الفصل الكروماتوغرافي باستخدام العمود والناتج من المقدر يسمى الكروماتوغرام

وتعتمد تقنيات الكروماتوغرافيا على استخدام عمود الفصل الذي يملأ عادة بالوسط الساكن (Stationary Phase). ويتكون هذا الوسط في العادة من حبيبات مادة صلبة تؤثر وتتأثر (interact) بكل من مكونات العينة لدى مرورها تحت تأثير الوسط المتحرك.

نستطيع تعريف الكروماتوغرافيا بأنها ترتيب خروج مكونات العينة من داخل عمود الفصل حسب ازدياد معدل التوزيع لهذه المواد بالنسبة للوسط الساكن. وبمعنى آخر فالمادة التي تتداخل بشكل قليل مع الوسط الساكن يكون لها معامل توزيع قليل بالنسبة لهذا الوسط، وستمضي معظم الوقت في الوسط المتحرك، لذا فإنها ستخرج بسرعة من العمود وتصل للمقدر، حيث يظهر الكروماتوغرام الخاص بها. ثم تليها المادة التي لها معامل توزيع أكبر وهكذا. من هذا يتبين أنه بتغيير الظروف التي لها علاقة بعملية الفصل فإنه بالإمكان التوصل إلى الحصول على منحنيات واضحة ومحددة لكل واحد من مكونات العينة.

15-3 المفاهيم الرئيسة في الطرق الكروماتوغرافية:

15-3-1 معامل التوزيع:

عند دخول العينة في عمود الفصل يُعَدُّ الوسط الساكن كمثبت للعينة، في حين أن الوسط المتحرك يكون حاملا لها. وستتوزع المادة بين هذين الوسطين وتنشأ حالة الاتزان التي يمكن التعبير عنها بعامل التوزيع D، وهو عبارة عن النسبة بين تركيز المادة في الوسط الساكن C_S إلى تركيزها في الوسط المتحرك C_M.

$$D = \frac{C_S}{C_M} \qquad (1\text{-}15)$$

وإذا كانت قيمة D عالية فهذا يعني أن جزيئات المادة ستمكث لمدة طويلة داخل عمود الفصل. هذا وإن الجزء من الزمن الذي تقضيه جزيئات المادة في الوسط المتحرك سيكون له تأثير واضح في سرعة فصل هذه المادة. ولنفترض أن هذا الجزء

من الزمن = t. إذن يمكن أن نعبر عن t بنسبة عدد الجزيئات في الوسط المتحرك إلى العدد الكلي لهذه لجزيئات، التي توجد في الوسطين. وحيث إن عدد الجزيئات يمكن التعبير عنه بالتركيز مضروبا في الحجم إذن:

$$t = \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S} \qquad (2\text{-}15)$$

وبقسمة كل من البسط والمقام على $C_M V_M$ وإدخال معامل التوزيع D

$$t = \frac{1}{1 + DV_S / V_M} \qquad (3\text{-}15)$$

ويمكن إدماج معامل التوزيع وحجم الوسط الساكن وحجم الوسط المتحرك والتعويض عنهم بالمعامل K الذي يسمى معامل السعة Capacity factor فتصبح العلاقة كما يلي:

$$t = \frac{1}{1 + K} \qquad (4\text{-}15)$$

ولحساب سرعة جريان جزيء المادة r عبر العمود، نضرب t في سرعة جريان الطور المتحرك التي لها الرمز U.

$$r = Ut = U\frac{1}{1 + K} \qquad (5\text{-}15)$$

15-3- 2 زمن المكوث أو الاستبقاء t_R:

وهو عبارة عن الزمن الذي تحتاج إليه المادة لتمر خلال عمود الفصل وتصل للمقدر الذي يسجل المنحنى الخاص بهذه المادة، ومن هذا المنحنى نستطيع تعيين زمن المكوث، ومن طول العمود L وسرعة جريان المادة عبر العمود يمكن تعيين قيمة زمن المكوث كالآتي:

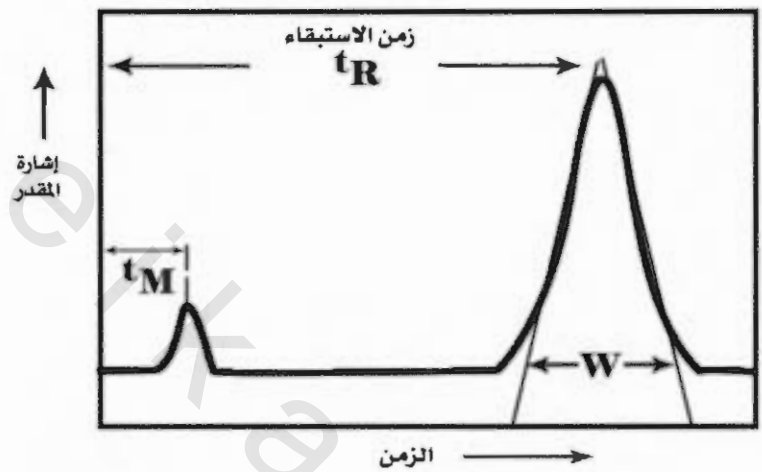
$$t_R = L / r = L/U\ (1+K) \qquad (6\text{-}15)$$

obeikandl.com

والقيمة L/ U تمثل الزمن اللازم لجزيء من الوسط المتحرك ليمر من خلال عمود الفصل وهذا يسمى $t_M = L/U$

وعلى هذا الأساس

$$t_R = L/U\ (1+K) = t_M\ (1+K) \qquad (7\text{-}15)$$



شكل (15-1) كروماتوغرام بين زمن الاستبقاء وعرض المنحنى

15-3-3 حجم الاستبقاء V_R:

وهو عبارة عن حجم الطور المتحرك الذي يلزم لتمرير المادة المراد فصلها من العمود لتصل إلى المقدر. وهو يساوي حاصل ضرب معدل سريان الوسط المتحرك في وقت الاستبقاء.

$$V_R = V_M\ (1+K) \qquad (8\text{-}15)$$

وتمثل V_M حجم الطور المتحرك الموجود في عمود الفصل في أي لحظة.

15-3-4 زمن الاستبقاء النسبي β Relative retention

إن زمن الاستبقاء يعتمد على عوامل عديدة لها تأثيرها المباشر في عملية الفصل. ومن الصعب ضبط هذه العوامل بشكل يصبح فيه زمن الاستبقاء مميزًا للمادة

المفصولة، إذ قد يحصل تغير في درجة الحرارة، وقد يحصل تغير في معدل سريان الوسط المتحرك. فلزيادة الفائدة من زمن الاستبقاء ليتسنى استخدامه في عملية التحليل الكيفي للتعرف على المواد المفصولة يستخدم الاستبقاء النسبي، حيث تتم مقارنة زمن الاستبقاء للمادة المفصولة بزمن الاستبقاء لمادة قياسية، معروفة، يتم فصلها تحت الظروف المستخدمة نفسها لفصل المادة المطلوب تحليلها. هذا ويجب طرح t_M من كلا الزمنين.

$$\beta = \frac{t_R - t_M}{t_{Rs} - t_M} \qquad (9\text{-}15)$$

حيث t_R تمثل زمن الاستبقاء للمادة، t_{Rs} تمثل زمن الاستبقاء للمادة القياسية.

4-15 نظرية الطبقة Plate Theory:

عند مرور الوسط المتحرك حاملاً معه مكونات العينة، فإن حالات من الاتزان تتشكل جراء التداخل بين كل من مكونات العينة، والوسطين المتحرك، والوسط الساكن، حيث إن كل واحد من مكونات العينة سينتشر بين هذين الوسطين. ويصبح تركيز المادة في الوسط المتحرك مختلفاً عنه في الوسط الساكن، ونستطيع أن نَعُدُّ كل حالة من حالات الاتزان بأنها عبارة عن طبقة رقيقة ذات سمك معين. وكلما زاد عدد الطبقات داخل العمود وكان سمك كل طبقة أقل ما يمكن فستكون كفاءة العمود عالية. بمعنى أن منحنيات الكروماتوغرام الناتجة تكون منفصلة تمامًا بعضها عن بعض. ونستطيع إيجاد عدد الطبقات من أحد المنحنيات الناتجة فنعين عرض المنحنى W، ونعين أيضًا زمن الاستبقاء t_R ومن المعادلة التالية نستطيع تعيين عدد الطبقات N بداخل العمود. وبقسمة هذا العدد على طول العمود L يمكن تعيين سمك الطبقة H، ومن ثَمَّ يمكن معرفة كفاءة العمود.

$$N = 16\left(\frac{t_{Ri}}{W}\right)^2 \qquad (10\text{-}15)$$

obeikandi.com

$$H = \frac{L}{N} \qquad (11\text{-}15)$$

5-15 درجة الفصل Rs:

تعبر درجة الفصل عن كيفية سير الطبقات داخل عمود الفصل، وهل كان هناك تداخل بين هذه الطبقات أم لا. ويمكن معرفة ذلك من شكل منحنى الكروماتوغرام لمادتين يكون منحنى الفصل لكل منهما في الكروماتوغرام متجاورين. فإذا كانت عملية الفصل ناجحة وكفاءة العمود عالية فإن منحنى كل مادة من هاتين المادتين يكون منفصلاً عن الآخر بشكل تام. ويعبر عن درجة الفصل بالعلاقة التالية: حيث t_R تعني زمن الاستبقاء و W تعني عرض المنحنى لكل مادة.

$$Rs = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{1/2(W_2 + W_1)} \qquad (12\text{-}15)$$

تتم الحسابات بحيث تكون قيمة R بالموجب.

تجب معرفة أن هذه العوامل قد تتغير لكل من الطبقتين المتجاورتين، حيث إنها جميعاً تعتمد على طبيعة كل من الوسط الساكن والوسط المتحرك.

من المفيد توضيح أن الفصل Rs يختلف عن الكفاءة N، إذ إن الفصل يعتمد على طبيعة الوسط الساكن والوسط المتحرك، ودرجة الحرارة، وطول الوسط الساكن (العمود) في حين الكفاءة N تعطي تصوراً عن مدى انتشار الطبقة، وتعتمد على طريقة إنشاء العمود وطريقة تعبئته بالوسط الساكن وعلى سرعة الوسط المتحرك.

6-15 مقارنة كفاءة العمود:

من المهم أن نعلم أن الكفاءة الكروماتوغرافية هي مقياس لمدى احتجاز المادة في الوسط الساكن ومقارنتها بعرض المنحنى W.

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \qquad (13\text{-}15)$$

obeikandl.com

وتُعَدُّ الكفاءة مفيدة في حالة مقارنة عمليات الفصل الكروماتوغرافي تحت تأثير ظروف مختلفة.

إن معامل الكفاءة يسمى عادة بعدد الطبقات النظرية N التي من مجموعها يتكون عمود الفصل، حيث إنه في كل طبقة من هذه الطبيقات تحدث عملية اتزان للمادة المراد تحليلها بين الوسط الساكن والوسط المتحرك. وعلى هذا الأساس كلما زاد عدد الطبيقات في العمود كانت عملية الفصل أفضل، وبدل استخدام N للدلالة على كفاءة عملية الفصل يمكن استخدام سمك الطبيقة النظرية H.

$$H = \frac{L}{N} = \frac{L}{16}\left(\frac{W}{t_R}\right)^2 \qquad (14\text{-}15)$$

وكلما كانت قيمة H منخفضة فمعنى هذا أن المادة تصل بسرعة إلى حالة الاتزان ومن ثَمَّ تخرج من العمود منفصلة وبسرعة.

7-15 تمارين على طرق الفصل الكروماتوغرافي:

1. ما المقصود بكفاءة عمود الفصل وما العوامل التي تؤثر في كفاءة العمود؟
2. مادة تم تمريرها عبر عمود كروماتوغرافي فإذا ظهر منحنى هذه المادة بعد 2 دقيقة و24 ثانية. احسب حجم الاستبقاء إذا كانت سرعة السريان 2.4 مل/ثانية.
3. عمود كروماتوغرافي تمر فيه مادة يظهر المنحنى لهذه المادة بعد 148 ثانية، فإذا كان عرض المنحنى 6.6 ثانية، فعين عدد الطبقات النظرية في هذا العمود، ثم عين كفاءة العمود H إذا كان طول العمود 120 سم.
4. ما المقصود بحجم الاستبقاء وزمن الاستبقاء ودرجة الفصل.

obeikandl.com

عين درجة الفصل Rs للمنحنيات الزوجية التالية:

$t_{R,A}$=283s ، t_{RB}=291 ، W_A=4.6s ، W_B=6.5s.

t_{RA}=145s ، $t_{R,B}$=151s ، W_A=7s ، W_B=7.2s

صنف أنواع الطرق الكروماتوغرافية بناء على حالة كل من الوسط الساكن والوسط المتحرك.

obeikandl.com