الكروماتوغرافي Chromatography:

الاسس العامة General Principles:

قام العالم النباتي Tsweet سنة ١٩٠٣ تحليل مادة الكلوروفيل وفصلها الى عدة مقاطع ملونة وذلك بترشيحها خلال اعمدة مملوءة بممتز معين Adsorbent واظهرها بمذيب معين لذا اطلق على هذه الطريقة اسم كروماتوغرافي ومعناها باليونانية كتابة الالوان. واصبح يطلق هذا الاسم عل جميع الطرق الكروماتوغرافية المعروفة في الوقت الحاضر وحتى على تلك التي لاتحلل مقاطع ملونة.

الكروماتوغرافيا هي العمليات التي بواسطتها نستطيع فصل مكونات مزيج، وتعتبر احد اهم الطرق التحليلية لكشف وتقدير المركبات في الحالة السائلة والغازية (فصل وتقدير في نفس الوقت)، وهي طريقة فيزيوكيميائية تستخدم لفصل مكونات من مزيج باستخدام طورين غير ممتزجين احدهما الطور ثابت Stationary Phase يكون عادتا مادة صلبة ذات مساحة سطحية كبيرة نسبيا او سائل محمول على مادة صلبة خاملة. والاخر الطور المتحرك Mobile Phase الذي يسير عبر الطور الثابت ويحوي عادتا على الانموذج المراد فحصه ويكون عادتا اما سائل او غاز.

وتمتاز الطرق الكروماتوغرافية بالمزايا التاليه والتي توضح مدى اهميتها:

١- تحليل مكونات المزيج نوعيا وكميا.
٢- تحضير المواد بنقاوة عالية.
٣- تنقية المواد من الشوائب.
٤- وتستخدم لدراسة التفاعلات الكيميائية وتعين سرعتها او لتعين الوزن الجزيئي او الضغط البخاري من اجل الحصول على منحني التقطير في الصناعة النفطية Distillation Curve.

ان العمليات الطاغية والمؤثرة في طرائق الفصل الكروماتوغرافية هي توزيع المادة المراد فحصها بين الطورين المتحرك والثابت ، ويتم اما باختلاف قابلية ذوبان المادة في كلا الطورين ويدعى في هذه الحالة كروماتوغرافيا التجزئه Partition Chromatography او باختلاف

امتزاز المادة في الطور الثابت الماز ويدعى كروماتوغرافيا الامتزاز Adsorption Chromatography .

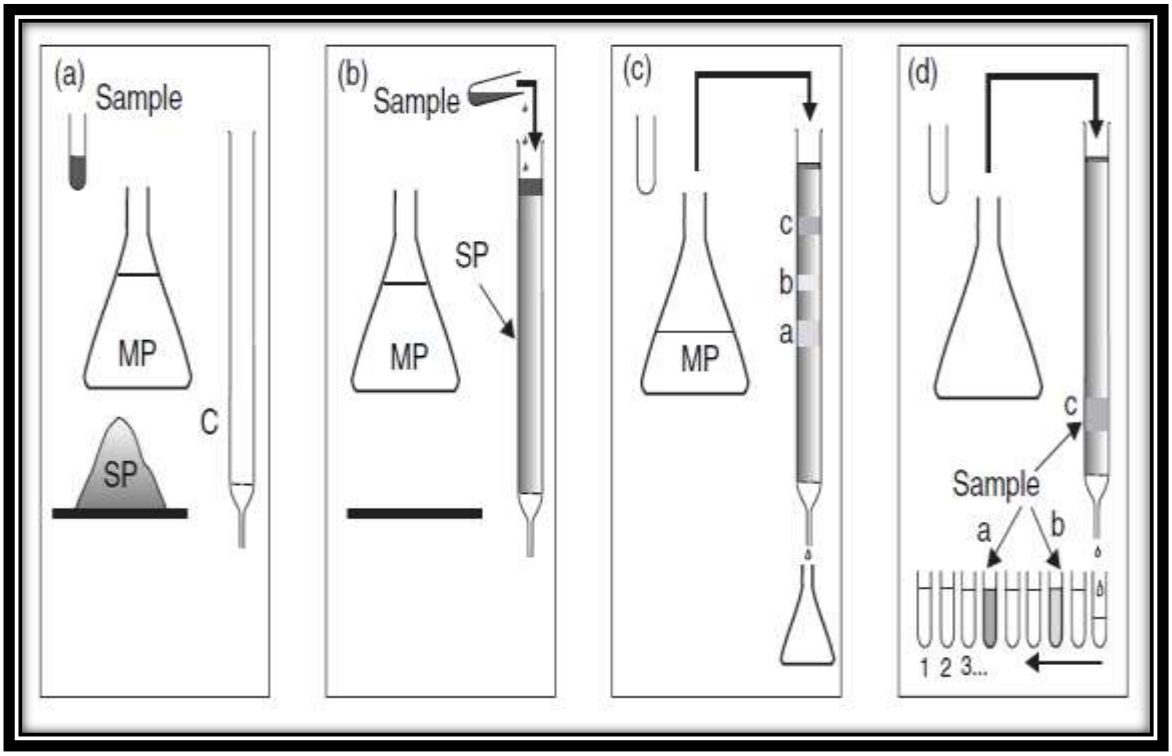
فكرة عامة عن التحليل الكروماتغرافي General concepts of analytical chromatography:

يمكن وصف العمليات الكروماتوغرافية الاساسية بالشكل التالي:

١- ملأ العمود بالطور الثابت.

٢- وضع الأنموذج المراد فصل مكوناته فوق الطور الثابت في العمود.

٣- اضافة الطور المتحرك، حيث يعمل على اخذ الانموذج وبشكل مستمر وادخاله في الطور الثابت هذه العملية تدعى التتابع *elution* ، وبسبب اختلاف سرعة هجرة مكونات الأنموج داخل العمود سيتم فصل المكونات عن بعضها والكشف عنها بشكل متتابع في الطور المتحرك. والشكل التالي يوضح العمليات اعلاه.



تصنيف الطرق الكروماتوغرافية Classification of Chromatography Methods:

يكون الطور المتحرك مادة سائلة او غازية ويكون الطور الثابت مادة صلبة او سائلة وبناء على ذلك فسوف يكون التصنيف الرئيسي بموجب الطور المتحرك (أي اذا مثلا قلنا كروماتوغرافيا الغاز يعني الطور المتحرك هو مادة غازية)، والتصنيف الثاني يعتمد على حالة الطور الثابت ونوع التفاعل المتبادل بين المذاب والطور الثابت وكما موضح في ادناه:

١- الطور المتحرك غاز وتدعى كروماتوغرافيا الغاز Gas Chromatography(GC) :

فاذ اكان الطور الثابت:

أ- صلبة ممتزة فتدعى غاز – صلب كروماتوغرفي Gas-Sold Chromatography(GSC) وهنا تطغي عملية الامتزاز، وتدعى ايضا كروماتوغرافيا الامتزاز.

ب- صلبة، منخل جزيئي فتدعى كروماتوغرافيا المنخل الجزيئي Molecular Sieve Chromatography.

ت- سائل فتدعى غاز – سائل كروماتوغرفي Gas-liquid Chromatography(GLC)وهنا تطغي عملية التوزيع.

٢- الطور المتحرك سائل كروماتوغرفيا السئل Liquid Chromatography(LC):

فاذا كان الطور الثابت:

أ- صلبة ممتزه فتدعى سائل – صلب كروماتوغرفي Liquid-Sold Chromatography(LSC) وهنا تطغي عملية الامتزاز. وتدعى ايضا كروماتوغرافيا الامتزاز.

ب- صلبة راتنجات التبادل الآيوني وتدعى كروماتوغرافيا التبادل الآيوني Ion Exchange Chromatography(IC).

ت- صلبة منخل جزيئي فتدعى كروماتوغرافيا الاستثناء Size Exclusion Chromatography وتعى ايضا كروماتوغرافيا الترشيح الجيلي Gel Filtration ، وهنا تطغي عملية التوزيع معتمدتا على الحجم. الطور الصلب يكون مسامي ذي ابعاد انتقائية ويتم الفصل حسب الحجم.

ث- سائل فتدعى سائل – سائل كروماتوغرفي Liquid-liquid Chromatography(GLC) وهنا تطغي عملية التوزيع.

ج- مادة مسطحة، فاذا كات :

١- ورق فتدعى كروماتوغرافيا الورق Paper Chromatography(PC).

٢- صلبة(ممتزة راتنجات التبادل الآيوني او المنخل الجزيئي) وتدعى كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography(TLC).

في اغلب الاحيان يكون الطور الثابت اكثر قطبية من الطور المتحرك واذا كان العكس فتدعى العملية كروماتوغرافيا الطور العكوس.

السلوك الكروماتوغرافي للمذاب Chromatographic Behavior of Solutes:

يمكن وصف السلوك الكروماتوغرفي للمذاب اما بواسطة عامل الاعاقة Retardation Factor(R) او حجم الاحتجاز Retention Volume(V_R) او زمن الاحتجاز Retention Time(t_R) . واي من هذه التعابير يصف لنا جزءا من الوقت الذي تقضيه جزيئة المذاب في الطور المتحرك أي الفترة الزمنية التي تتحرك خلالها الجزيئة في اتجاه الطور المتحرك، وكل مادة تمتلك عامل اعاقة لكل مجموعة من المذيب والمادة الممتزة.

معامل التوزيع Partition Cofficient: يعبر عن نسبة تركيز المذاب في كل من الطور الثابت والمتحرك ويرمز له بالرمز Kd :

$$Kd = \frac{C_s}{C_M}$$

حيث ان C_s ، C_M تركيز المذاب في الطورين الثابت والمتحرك على التوالي.

عامل الاعاقة النسبي Retardation Factor(R): هو نسبة الفترة الزمنية التي يقضيها المكون في الطور المتحرك الى الفترة الكلية التي يقضيها داخل العمود اي ان:

$$R = \frac{t_M}{t_M + t_S}$$

حيث ان t_S الوقت الذي يقضيه المذاب في الطور الثابت، t_M الزمن الميت او الزمن الذي يحتاجه الطور المتحرك للمرور خلال العمود (وهي نفس الفترة الزمنية التي يحتاجها الطور المتحرك لاجتياز العمود حاملا معه ذلك الجزء من المكون).

اما عندما يكون المقطع العرضي ومعامل التوزيع غير ثابت على مسار التظهير كما هو الحال في كروماتوغرافيا الصفائحيه (كروماتوغرافيا الورق و كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة) فان نسبة المسافات التي يقطعها المذاب والطور المتحرك تدعى R_f:

$$R_f = \frac{\text{المساحة التي يقطعها المذاب}}{\text{المساحة التي يقطعها الطور المتحرك}}$$

وتمثل قيمة R ايضا نسبة عدد جزيئات المكون في الطور المتحرك الى عدد جزيئات المكون الكلية في الطورين:

$$R = \frac{M_M}{M_M + M_S}$$

حيث ان M_M ، M_S عدد جزيئات المكون في الطور المتحرك والثابت على التوالي. وتساوي تركيز المكون في الطور(متحرك او ثابت) مظروب في حجم الطور أي :

$M_M = C_M . V_M$

$M_S = C_S . V_S$

وبتعويض عن قيم M_M ، M_S في معادلة R ينتج:

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

وبقسمة البسط والمقام الطرف الايمن على $C_M . V_M$ ينتج:

$$R = \frac{1}{1 + \frac{C_S V_S}{C_M V_M}}$$

وبما ان

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

اذن ينتج

$$\boldsymbol{R = \frac{1}{1 + Kd \ . \ \frac{V_S}{V_M}}}$$

وعند ظرب البسط ومقام الطرف الايمن ب V_M ينتج:

$$\boldsymbol{R = \frac{V_M}{V_M + Kd \ . \ V_S}}$$

كما ان $\frac{R}{1-R}$ يمثل جزء المذاب في الطور المتحرك مقسوما على جزء المذاب في الطور الثابت.

$$\frac{R}{1-R} = \frac{C_M \, V_M}{C_S \, V_S}$$

ملاحظة/ R يدعى ايضا عامل الاعاقة او الاستبقاء.

ملاحظة/ ان عامل الاعاقة R هو دالة لمعامل التوزيع وحجم كل من الطورين.

زمن الاحتجاز وحجم الاحتجاز Retention Time and Retention Volume:

ان الفترة التي تمثل الوقت اللازم لتدفق المكون واخراجه من العمود الى الخارج تسمى زمن الاحتجاز Retention Time(t_R) . او بتعبير آخر فهي تمثل الفترة الزمنية التي يحتجز فيها المكون من قبل الطور الساكن زائدا الفترة الزمنية التي يحتاجها الطور المتحرك للمرور خلال بدون اعاقة(وتدعى هذه الفترة بالزمن الميت Dead Time(t_M) :

$$\boldsymbol{t_R = t_S + t_M}$$

اما حجم الطور المتحرك اللازم لتصفية او اخراج المكون من الطور الساكن وتدفقه الى خارج العمود فيسمى بحجم الاحتجاز Retention Volume(V_R) ويحسب من القانون التالي:

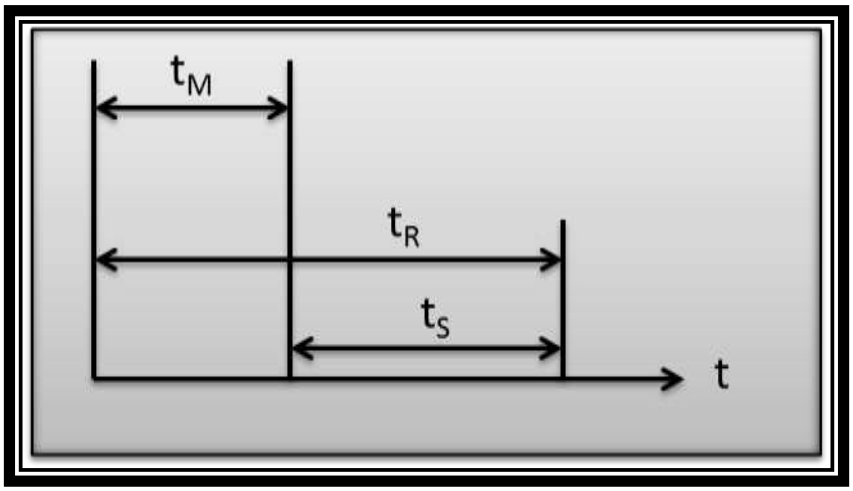
$V_R = F \cdot t_R$

حيث ان F سرعة الطور المتحرك.

وكذلك يحسب الحجم الميت من:

$V_M = F \cdot t_M$

ويحسب الحجم الميت من طرح حجم الطور الساكن من حجم العمود والذي يحسب من حجم الاسطوانة= مربع نصف القطر × الارتفاع × π



- ويمكن ربط ماذكر اعلاه بقيمة R وكما يلي:

$$R = \frac{t_M}{t_M + t_S}$$

$$t_R = t_S + t_M$$

$$\boldsymbol{R = \frac{t_M}{t_R}}$$

معامل السعة Capacity Factor(k) او معامل الاحتجاز Retention Factor:

ان الحد $Kd \cdot \frac{V_S}{V_M}$ في R التي تم ذكرها سابقا يسمى عامل السعة. أي ان

$$\boldsymbol{k = Kd \,.\, \frac{V_S}{V_M}}$$

وبتعويض قيمة k في المعادلة التاليه ينتج:

$$R = \frac{1}{1 + Kd \;.\; \frac{V_S}{V_M}}$$

$$R = \frac{1}{1 + k}$$

ويمكن ايجاد العلاقة بين k و t_R كما يلي:

$$R = \frac{t_M}{t_R}$$

$$\frac{1}{1 + k} = \frac{t_M}{t_R}$$

$$\boldsymbol{t_R = t_M\,(1 + k)}$$

ويمكن ايجاد مايلي ايضا:

$$\boldsymbol{k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_S}{t_M}}$$

علاقة حجم الاحتجاز V_M بمعامل التوزيع K_d وعامل السعة k :

حجم الاحتجاز يقابل الحجم الاعظم V_{max} ايضا، وهو حجم الطور المتحرك اللازم لاخراج التركيز الاعظم C_{max} من المذاب خارج عمود الفصل. أي هو كمية الطور المتحرك الذي يترك العمود عندما تكون كمية المذاب الخارجة من العمود قد وصلت الذروة. وعند ظهور قمة الذروة او خروج التركيز الاعظم من العمود فان نصف كمية المذاب قد خرجت في حجم احتجاز V_R او V_{max} . أي ان كمية المذاب التي تخرج من العمود عند هذا الحجم تساوي كمية المذاب المتبقية على الطور الساكن مضافا لها كمية المذاب الموجودة بين دقائق الطور الساكن.

$V_R\, C_M = V_M\, C_M + V_S C_S$

وبقسمة طرفي المعادلة على C_M ينتج:

$$V_R = V_M + V_S \frac{C_S}{C_M}$$

وبما ان $\frac{C_S}{C_M} = Kd$ ينتج:

$$\boldsymbol{V_R = V_M + V_S \,.\, Kd}$$

وبما ان

$$k = Kd \,.\frac{V_S}{V_M}$$

اذن يمكن كتابة مايلي:

$$Kd = k \,.\frac{V_M}{V_S}$$

وبتعويض المعادلة الاخيرة في معادلة V_R ينتج:

$$V_R = V_M + V_S \,.\, k \,.\frac{V_M}{V_S}$$

$$V_R = V_M + \; k \,.V_M$$

$$\boldsymbol{V_R = V_M(1 + \; k\,)}$$

الاحتجاز النسبي Relative Retention:

هو نسبة زمن او حجم الاحتجاز المصحح (t_R^-)(بعد طرح t_M او V_M منه) الى زمن او حجم احتجاز مادة قياسية (t_{Ref} او V_{Ref}). ويدعى ايضا بمعامل الفصل:

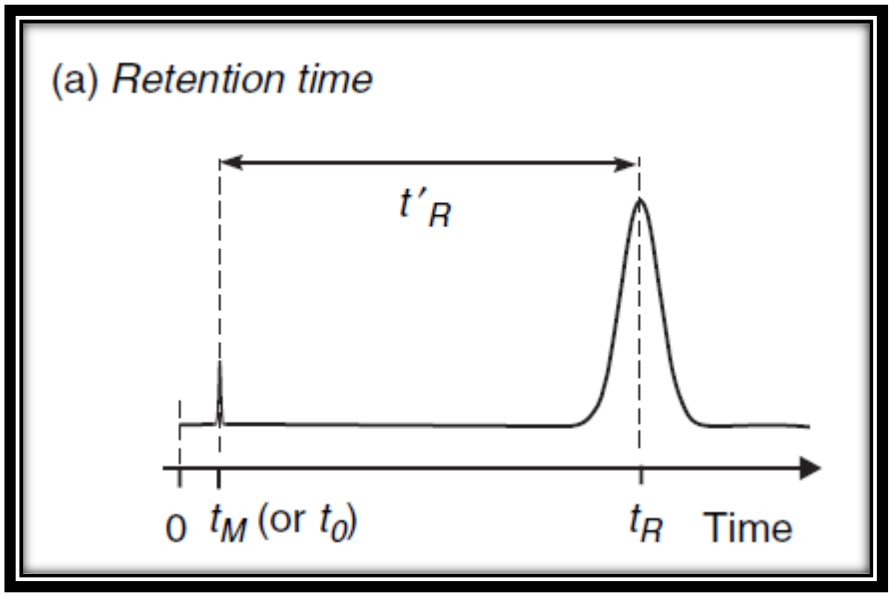
$$t_R^- = t_R - t_M$$

$$\alpha = \frac{t_R - t_M}{t_{Rer} - t_M} = \frac{t_R{}^{-}}{t_{Ref}{}^{-}}$$

$$\alpha = \frac{V_R - V_M}{V_{Rer} - V_M} = \frac{V_R{}^{-}}{V_{Ref}{}^{-}}$$

ويمكن ان يحسب ايضا بدلالة عامل السعة ومعامل التوزيع وكما يلي:

$$\alpha = \frac{Kd}{Kd_{Ref}} = \frac{k}{k_{Ref}}$$



قدرة الفصل Resolution:

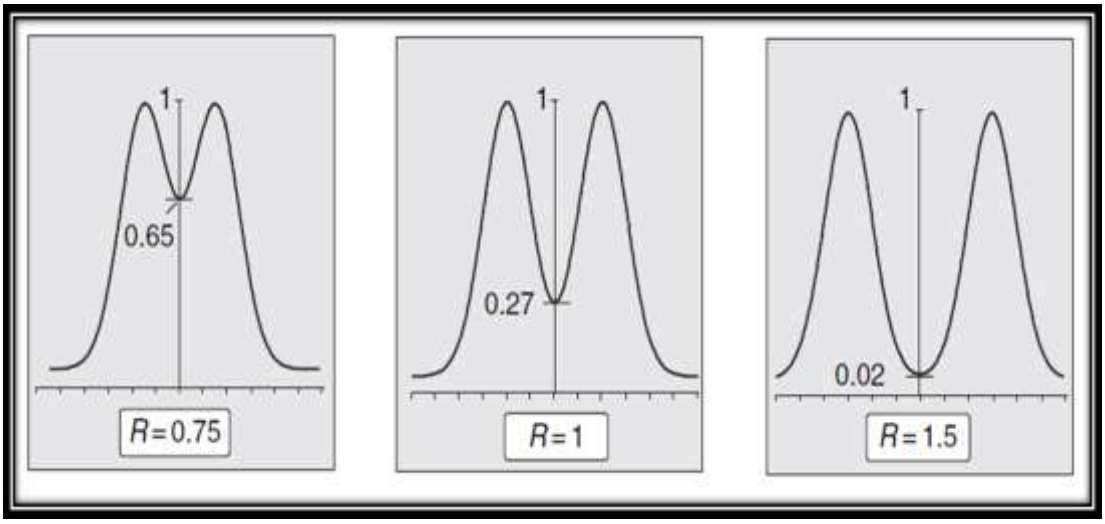
ان الهدف الناحية العملية هو القدرة على الفصل الجيد لمكونات نموذج وهو مايدعى بقدرة الفصل لمركبات ذات صفات متشابهة. وهو يعبر عن قدرة العمود على فصل مكونين. ويمكن تحسين درجة الفصل باحدى الطريقتين:

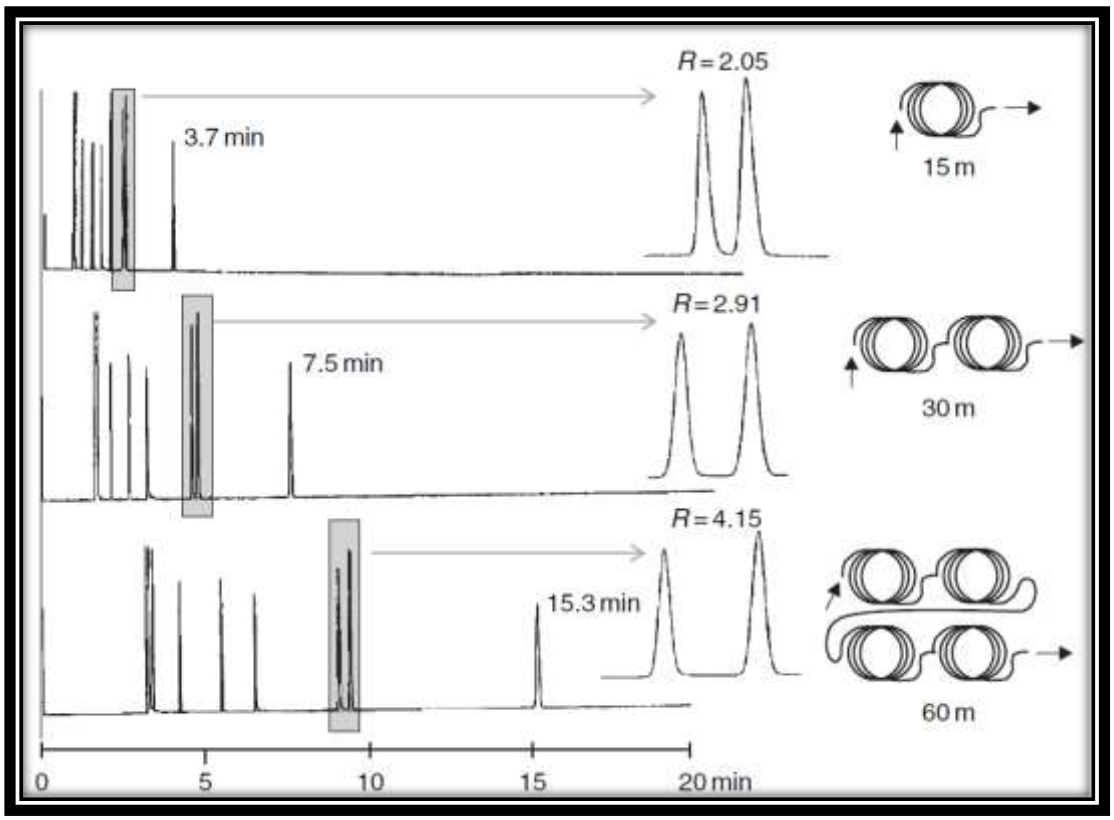
أ- تغيير الحرارة او الاطوار للتوصل الى فصل جيد بين الذروتينوكما موضح فيما ادناه.

ب- تقليل عرض الذروه Peak Width وذلك بتحسين كفاءة العمود (يعني تقليل H وزيادة n والتي سيتم توضيحها لاحقا). وتقدر قدرة الفصل R_S كميا لذروتين لهما زمن احتجاز t_1 و t_2 وعرض ذروات W_1 و W_2 من المعادلة التالية:

$$R_S = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

اذا كانت قدرة الفصل اكبر من 1.5 يدعى Baseline Resolution أي فصل تام للذروتين. واذا كانت تساوي 1 فنسبة تلوث المكون الاول بالثاني في حدود 2% وتعتبر كافية لغرض التحليل.




R = 2.05
3.7 min
15 m
R = 2.91
7.5 min
30 m
R = 4.15
15.3 min
60 m
0
5
10
15
20 min

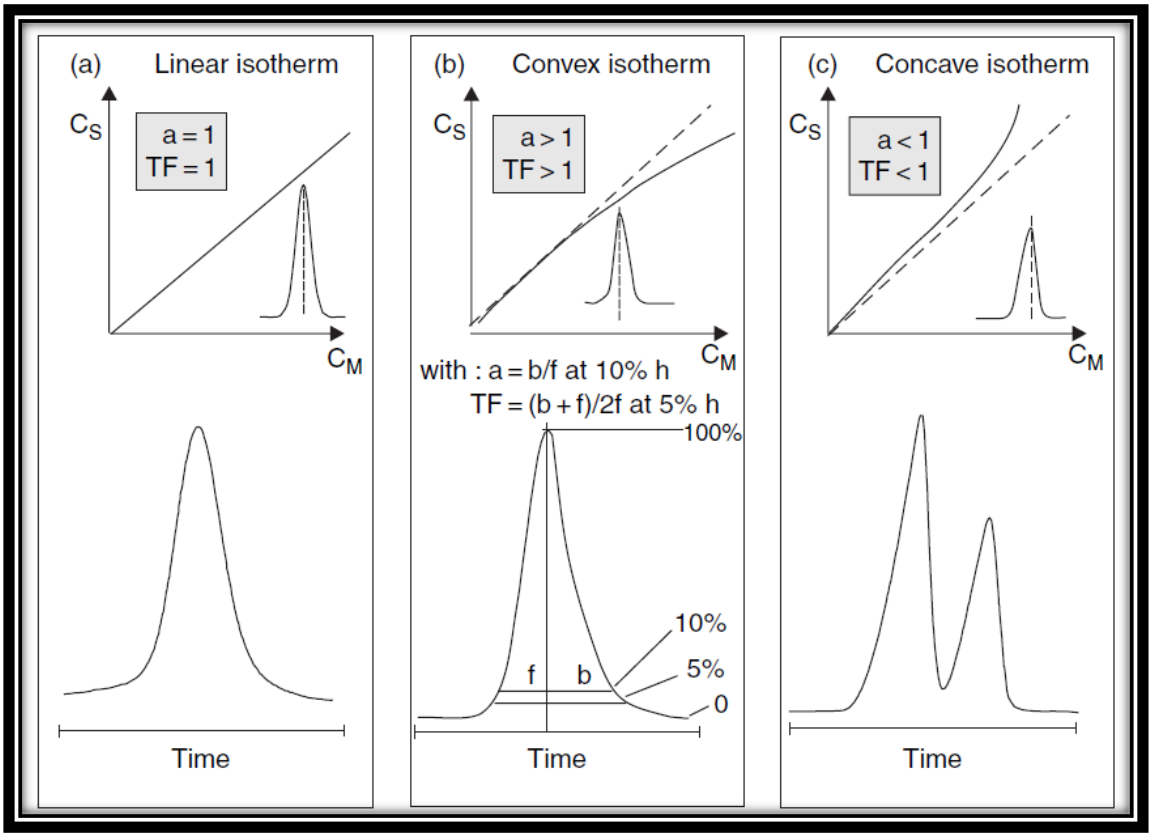
التوزيع الايسوثرمي Partition Isotherms :

ان القيم النسبية لمعامل التوزيع ودرجة اعتمادها على التراكيز اهمية كبيرة في السلوك الكروماتوغرافي والاشكال التالية توضح التوزيع الايسوثرمي النموذجي .

ففي الحالة a يعتبر الايسوثرم في هذه الحالة الايسوثرم الخطي ويحدث عندما تكون تراكيز الطور المتحرك قليلة جدا وتسود هذه الوضعية في كروماتوغرافيا الغاز، وفي هذه الحالة يكون المظهر الجانبي لتركيز المكونات يكون ذروة متناظرة جرصية (الشكل منحني جرصي) ، حيث تكون هنالك علاقة طردية بين التركيز(او الضغط) المذاب في الطور الثابت وتركيزه في الطور المتحرك، وزمن الاحتجاز لايعتمد على التركيز. وهنا تنطبق معادلة هنري($C_S = K \,.\, C_M$) .

اما في الحالة b حيث تكون الذروات من الامام حادة ومؤخرة ذيلية مسببه ايسوثرم غير خطي، وغالبا ما يلاحظ هذا النوع كروماتوغرافيا الامتزازية ، والسبب في ذلك هو اشغال مراكز الامتزاز الفعالة من قبل المادة الممتزة، وهنا يتغير زمن الاحتجاز بتغير حجم الانموذج، وهنا تطبق معادلة لانكماير Langmuier حيث تخرج العلاقة الطردية عن الخطية ($C_S = \frac{K_1}{1+K_2\,P}$) ، ومن المعادلات الشائعة لتفسير ذلك هي معادلة فرويندلش Freundlich ($C_S = K \,.\, C_M^{\frac{1}{n}}$). ويمكن الحصول على ذروات متناظرة باستخدام كميات قليلة من الانموذج وباستخدام جسيمات الممتزه بحيث تقع حجومها في مدى ضيق.

اما في الحالة c حيث تكون الذروات من الامام مائلة ومؤخرة حادة مسببه ايسوثرم غير خطي، ان هذا النوع غالبا مايحدث عندما تكون قابلية ذوبان المذاب في الطور السائل الثابت قليلة حيث يقدر الجزء الاخير من التمسك بجزيئات المذاب مسببا خروج الجزء الرئيسي من الحزمة بسرعة ابطا من النهايات، وهنا ايضا يعتمد حجم الاحتجاز على حجم الانموذج، ان هذا النوع يمكن ان يتغير انحداره بتغير الحرارة. ووضع العلماء بروناور و اميت و تيلر Burunauer- Emmet-Tellar (BET) معادلة خاصة بالامتزاز الفيزيائي للغازات لعد n من الطبقات المازة (للاطلاع)هي :

$$V = V_M \,.\, C.P/[P^0 - P][\,1 + (C-1)\frac{P}{P^0}]$$

حيث C كمية ثابتة عند درجة حرارة معينة ، V حجم الغاز الممتز الذي ضغطه P ، P^0 الضغط البخاري.