مقرر: كيمياء تحليلية صيدلانية 2 (نظري)	**كلية:** الصيدلة
مدرس المقرر: أ. د. جمال محفوض	**الرمز:** PHAC457

جامعة الشام الخاصة
Al-Sham Private University
كليّة الصيدلة
Faculty of Pharmacy

كيمياء تحليلية صيدلانية 2

ANALYTICAL PHARMACEUTICAL CHEMISTRY 2

السنة الثانية

أ. د. جمال محفوض

Prof. Dr. Jamal MAHFOUD

الفهرس

الفهرس	**2**
مقدمة	**7**
الفصل الأول : طرائق الفصل	**9**
1-1- مقدمة	10
1-2- أنواع طرائق الفصل	10
الفصل الثاني: الاستخلاص سائل - سائل	**16**
2-1- مقدمة	16
2-2- تعريف الاستخلاص والهدف منه	16
2-3- الشروط الواجب توافرها بالمذيب العضوي المستخدم للاستخلاص	19
2-4- اتزان الاستخلاص	19
2-5- التوزيع الكتلي (Dm): ratio distribution mass	20
2-6- حساب الجزء من المادة الذي لم يستخلص	21
2-7- كفاءة الاستخلاص	23
2-8- طرائق الاستخلاص (سائل-سائل) في التحاليل الصيدلانية	23
2-9- بعض الأمثلة عن طرائق الاستخلاص) سائل-سائل	24
الفصل الثالث: التبادل الايوني	**28**
3-1- مقدمة	28
3-2-أنواع المبادلات الأيونية	28
3-2-1- المبادلات الايونية الطبيعية	28
3-2-2- المبادلات الايونية الصناعية	28
3-3- الصفات الاساسية للمبادل الايوني	30

3-4- السعة Capacity او السعة الكلية	31
3-5 الانتقائية	32
3-5-1- معامل الانتقائية	32
3-5-2- قواعد عامة للانتقائية :	32
3-6- تطبيقات التبادل الايوني	33
الفصل الرابع: المبادئ الأساسية في الكروماتوغرافيا	**35**
4-1- المقدمة	36
4-2- آلية الفصل	36
4 - 3 - تصنيف الكروماتوغرافيا	44
4-3-1- تصنيف الكروماتوغرافيا حسب الطور المتحرك	44
4-3-2- تصنيف الكروماتوغرافيا حسب نوعية الطور الثابت	44
4-4- بعض المقادير المستخدمة في الـ (HPLC)	44
4-5- مزايا الطرائق الكروماتوغرافية	53
4-6- اختيار الطريقة المناسبة لفصل مادة ما	54
الفصل الخامس : الكروماتوغرافيا المستوية	**55**
5-1- المقدمة	55
5-2- الكروماتوغرافيا الورقية	55
5-3-التحليل النوعي في الكروماتوغرافيا الورقية	60
5-4- التحليل الكمي في الكروماتوغرافيا الورقية	61
5-5- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة	64
5-5-1- المقدمة	64
5-5-2- المبدأ العام لكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة	64

5-5-3- خطوات التحليل في كروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة	65
الفصل السادس: الكروماتوغرافيا الغازية	**76**
6-1- مقدمة	76
6-2- مبدأ الكروماتوغرافيا الغازية	77
6-3- مكونات جهاز الكروماتوغرافيا الغازية	77
6-4- الغاز الحامل	78
6-5- نظام حقن العينة في الجهاز	79
6-6 العمود الكروماتوغرافي	81
6-7- متحريات الكروماتوغرافيا الغازية	84
6-7-1 متحري الناقلية الحرارية	85
6-7-2- متحري تأين اللهب	87
6-7-3- متحري طيف الكتلة	88
6-7-4- متحرى اللاقط الالكتروني	88
6-8- تأثير الحرارة	90
6-9- التحليل الكيفي في الكروماتوغرافيا الغازية	91
6-10- التحليل الكمي في الكروماتوغرافيا الغازية	92
الفصل السابع : كروماتوغرافيا العمود	**93**
7-1- مقدمة	93
7-2- الطور الثابت الصلب	94
7-3- الطور المتحرك السائل	95
7-4 الطور الثابت السائل	96
7-5- تحليل المواد المفصولة	97
7-6- الكروماتوغرافيا الشاردية (الأيونية)	99
الفصل الثامن: الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء	**101**
8-1- مقدمة	101
8-2- المكونات الأساسية لأجهزة الـ HPLC	104

8-2-1- خزانات الطور المتحرك	105
8-2-2- أنظمة الضخ	105
8-2-3- نظام التحكم في التدفق والبرمجة	107
8-2-4- أنظمة حقن العينة	107
8-2-5- الأعمدة الكروماتوغرافية	109
8-2-6- الفرن	110
8-2-7- متحريات الـ HPLC	111
8-2-7-1- متحريات المجال المرئي وفوق البنفسجي	111
8-2-7-2- متحريات الفلورة	111
8-2-7-3- متحريات الالكتروكيميائية	112
8-2-7-4- متحريات الأشعة تحت الحمراء	112
8-2-7-5- متحريات قرينة الانكسار	112
8-2-7-6- متحريات مطيافية الكتلة	112
8-2-8- وحدة معالجة النتائج	113
8-3- أنواع الكروماتوغرافية السائلة العالية الأداء	114
8-3-1- كروماتوغرافيا الطور العادي	114
8-3-2- كروماتوغرافيا الطور المعكوس	115
8-3-3- كروماتوغرافيا الأزواج الأيونية	116
8-3-4- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني	117
8-4- التحليل الكيفي والكمي في الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء	118
8-4-1- التحليل الكيفي في الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء	118
8-4-2- التحليل الكمي في الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء	118
8-5- العناية بأعمدة الـ HPLC	122
8-6- تطبيقات على الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء	125
8-7- تحليل بعض المستحضرات الدوائية باستخدام الـ HPLC	128
8-7-1- تحليل مستحضر دوائي يحتوي على بعض المسكنات	128

8-7-2- تحليل مستحضر دوائي يحتوي على بعض الفيتامينات	130
الفصل التاسع : الرحلان الكهربائي	**132**
9-1- مقدمة	132
9-2- مبدأ الرحلان الكهربائي	133
9-3- مكونات جهاز الرحلان الكهربائي	134
9-4- أنماط الرحلان الكهربائي	137
9-5- بعض التطبيقات على الرحلان الكهربائي	138

مقدمة

الكيمياء التحليلية تخصص علمي يطور ويستخدم الطرائق ، والوسائل ، والنظريات ، والأساليب التي تؤدي للحصول على المعلومات عن تركيب وطبيعة المادة في الزمان والمكان.

وازداد الاهتمام بالكيمياء التحليلية من قبل الكوادر المتخصصة بهذا الشان، وهذا مرده إلى الهوة السحيقة بين الكيمياء التحليلية المعاصرة ومحتوى الخطط الدرسية التي ما زالت في العديد من الكليات والمعاهد العليا تستند على التحليل الكلاسيكي الكيفي والكمي للمركبات اللاعضوية . إن التغير في البرامج لا يستطيع اللحاق بالتطور الحاصل في الجوانب التطبيقية للكيمياء التحليلية . فقد توسعت تشكيلة المواضيع لتشمل المركبات عضوية المنشأ ، والمواضيع ذات الصلة بالبيئة المحيطة بكل عناصرها من ماء وهواء وتراب . ويزداد التشديد يوماً تلو الآخر على المطالبة الصارمة نحو الدقة والحساسية وموثوقية نتائج التحليل.

تعد الكيمياء التحليلية (Analytical Chemistry) جزءاً لا يتجزأ من علم الكيمياء بكافة فروعه . وهي تهتم بتحليل المواد المدروسة نوعاً وكماً .

تلعب الكيمياء التحليلية في وقتنا الحاضر دوراً أساسياً في مجالات متعددة كالصيدلة والطب والعلوم والزراعة والجيولوجيا وبقية أنواع العلوم المختلفة.

كما ازدادت أهمية الكيمياء التحليلية بسبب التزايد المستمر في الإنتاج والسعي الدائم إلى الوصول لطرق تحليلية تقدم سرعة عالية في التحليل بالإضافة إلى تخفيض التكلفة، لهذا تزداد طرائق التحليل وتتطور يوماً بعد يوم نتيجة الحاجة الماسة لها .

أصبحت الكيمياء التحليلية وستبقى لعقود قادمة بمثابة المفتاح نحو مستقبل آمن للبشرية لأنها ستكون مسؤولة مباشرة عن مراقبة كل ما يمس حياة المواطن اليومية ويضمن جودة منتجاته.

مما تقدم يمكن التوصل إلى نتيجة مفادها أن تحضير وإعداد كوادر كيميائية تتقن الكيمياء التحليلية المعاصرة كتخصص علمي مستقل يقع في بؤرة اهتمام المؤسسات الأكاديمية ومراكز البحوث العلمية على المستوى العالمي . وقد بدأ هذا الموضوع يأخذ طابعاً كونياً منذ عقدين من الزمن نظراً لأهمية وحاجة البشرية كافة إليه .

يشتمل هذا الكتاب على المبادئ والأسس الضرورية لطرائق التحليل الحديثة التي يحتاجها المحلل خلال عمله، من معلومات عامة عن الكيمياء التحليلية، و طرائق الفصل بأنواعها ، الاستخلاص وأنواعه ، ، التبادل الأيوني ، كروماتوغرافيا الورقية ، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ، كروماتوغرافيا العمود ، كروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء (HPLC) والرحلان الكهربائي.

كما تم عرض بعض الأمثلة والتطبيقات الواقعية مما يساعد على تبسيط المواضيع المطروقة ليتم فهمها بشكل جيد .

وأتقدم بالشكر والتقدير إلى كل من ساهم في إنجاح هذا المقرر.

وأرجو أن أكون قد وفقت في إفادة طلابي الأعزاء في اكتساب المزيد من المعرفة العلمية، وفي تأدية الجزء اليسير من واجبي تجاه وطني العزيز .

أ.د. جمال محفوض

الفصل الأول

Chapter 1

طرائق الفصل

Separation Methods

كيمياء تحليلية صيدلانية 2

السنة الثانية

أ. د. جمال محفوض

الفصل الأول

طرائق الفصل

Separation Methods

1-1- مقدمة:

تعتمد طرائق الفصل المستخدمة في مختلف المجالات الدوائية والصناعية وغيرها على اختلاف مكونات الأمزجة والمحاليل ، فلا يمكن استخدام نفس طرائق الفصل عندما يراد فصل الرمل عن الحصى أو عند فصل الملح عن الماء النقي أو عند فصل مادة فعالة عن بقية المواد الأخرى لذلك تتضمن طرائق الفصل عدة أنواع .

1-2- أنواع طرائق الفصل

يوجد عدة أنواع من طرائق الفصل ومنها التقطير والترشيح والاستخلاص والتثفيل والكروماتوغرافيا. ولندرس كل منها بشيء من التفصيل.

1- التقطير: Distillation

يعتمد مبدأ التقطير على فصل السوائل ذات درجات الغليان المتفاوتة، وعل سبيل المثال تستخدم هذه الطريقة في فصل الكحول عن الماء.

2-الترشيح : Filtration

يعتبر من أفضل الطرق المستخدمة لفصل المواد ذات الجزيئات المختلفة في الأحجام سواءً كانت على شكل حبيبيات معلقة ضمن سائل أو على شكل خليط من مكونات صلبة مختلفة في أحجام حبيباتها . ويوجد نوعان للترشيح وهما:

-الترشيح البسيط Filtration Gravity

كثيراً ما تتبع هذه الطريقة في المخابر البسيطة . وهي تعتمد على آلية مرور السائل عبر ورقة الترشيح تحت تأثير الجاذبية الأرضية.

وهناك أنواع من ورق الترشيح المستخدمة قُسِّمت تبعاً لسماحها بمرور الراسب. وحسب معيار (Whatman) تُعطى لها الأرقام التالية:

No.40 تستخدم من أجل الرواسب ذات البنية البلورية.

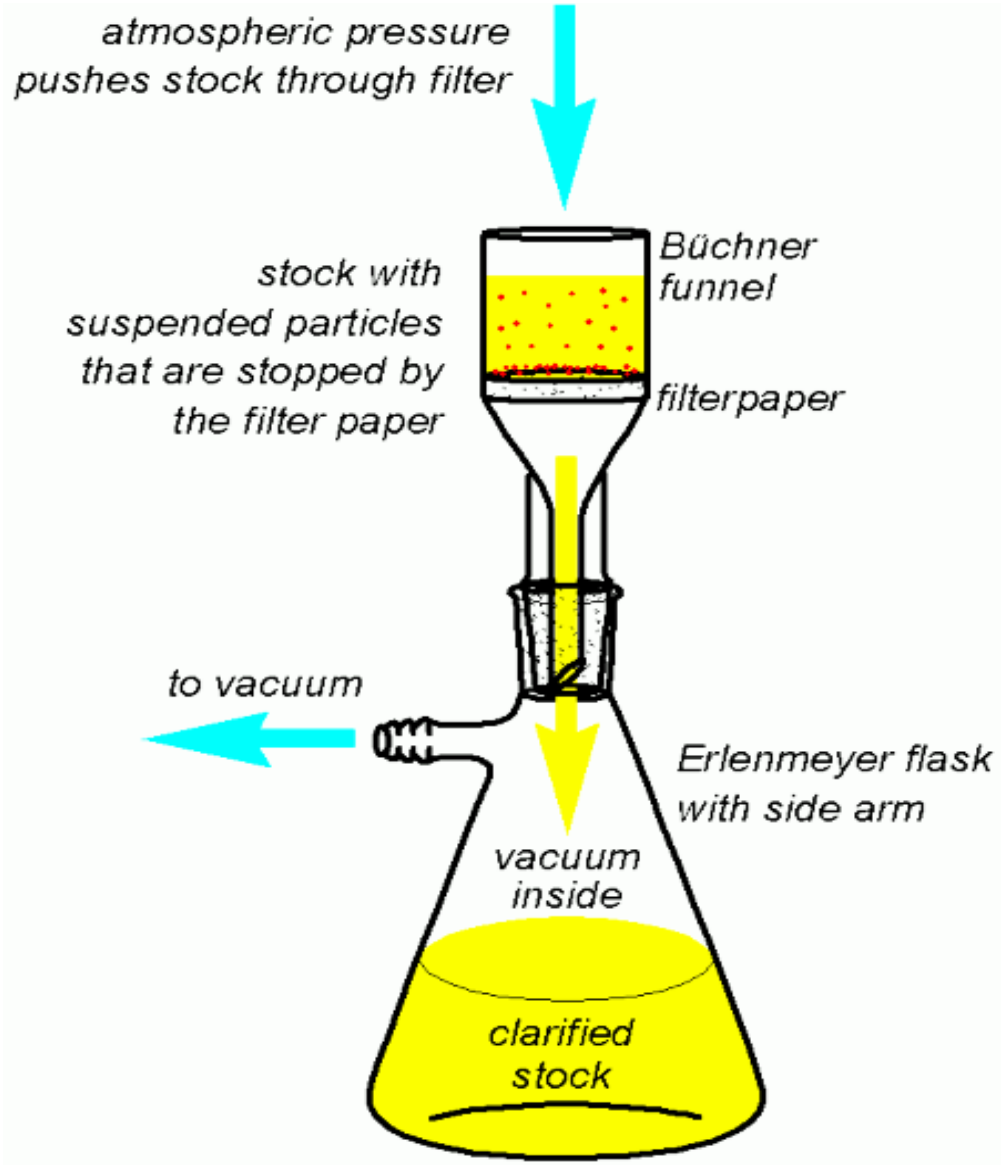
No.41 تستخدم من أجل الرواسب ذات البنية الخشنة أو الجلاتينية.

No.42 تستخدم من أجل الرواسب ذات البنية الدقيقة جداً.

- الترشيح تحت ضغط مخفف أو Vacuum Filtration

يستخدم هذا النوع بشكل أساسي لجمع النواتج الصلبة المطلوبة (مثل عمليات جمع البلورات بعد إجراء إعادة بلورة للراسب)

يمكن استخدام قمع بوخنر Buchner funnel ، يعد هذا النوع أكثر سرعة من الترشيح البسيط لاعتماده على آلية تخفيف الضغط عبر مصدر مفرغ للهواء أو مخليه لاحظ الشكل رقم (1) الذي يوضح ذلك.

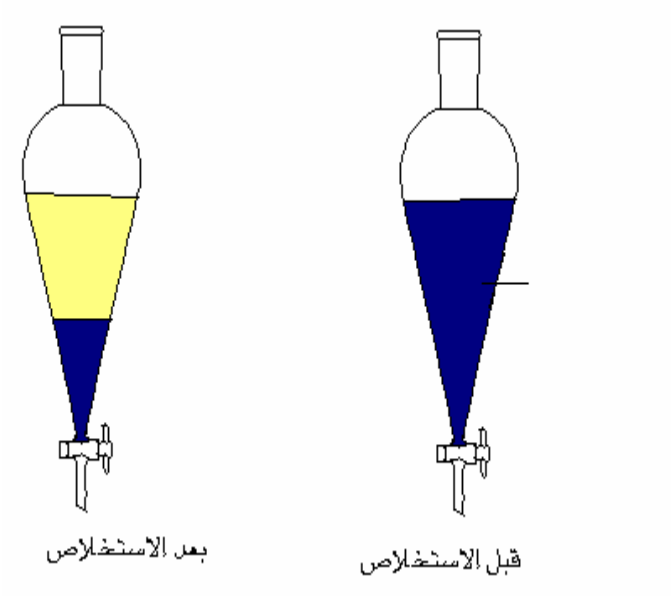


الشكل (1) : الترشيح بواسطة قمع بوخنر

3-الاستخلاص: Extraction

تعتمد بشكل أساسي على فصل المواد المختلفة في انحلاليتها في المحاليل العضوية الغير قابلة للامتزاج ، كما ان درجة الحموضة يمكن أن تلعب دوراً هاماً في هذه الطريقة حيث انها تؤثر في درجة تشرد المواد وبالتالي اختلاف قابليتها للانحلال وللانتقال من محل لآخر. فمثلاً لنفترض أنه لدينا محلول مائي

يحتوي على اليود I_2 (غير قطبي) وعلى الحديد Fe^{3+} ويراد فصل كل منهما على حدة ففي هذه الحالة يتم إضافة مذيباً عضوياً مثل الكلوروفورم ، وبعد الرج في قمع الفصل وترك المحلول ليستقر سنجد أن اليود سينتقل إلى طبقة الكلوروفورم السفلية بينما الحديد سيبقى في الطبقة المائية لاحظ الشكل (2) وبالتالي يمكن فصل اليود عن ايون الحديد .



الشكل (2): الاستخلاص بالمذيبات

وسوف يتم دراسة الاستخلاص بالمحلات بشكل مفصل في فصل لاحق.

4-التثفيل: Centrifugation

هو عملية فيزيائية تعتمد على تطبيق مبدأ القوة النابذة centrifuge force الناتجة من فعل الدوران المتسارع، الغاية منه فصل مزيج من المواد السائلة أو الغازية ذات الكثافة المتباينة، أو فصل الجزيئات أو القطيرات أو العناصر المعلقة في سائل.

5 -الكروماتوغرافيا (التفريق اللوني): Chromatography

وتستخدم لفصل مزيج من سوائل معتمدة بشكل أساسي على اختلافها في الخواص الفيزيائية مثل القطبية واختلاف احجام مكوناتها أو ألفتها تجاه بعض المركبات ، لها العديد من الأنواع مثل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC وكروماتوغرافيا العمود الكروماتوغرافيا الغازية .

تتم آلية الفصل في الكروماتوغرافيا بفضل اختلاف ثوابت توزيع مزيج العينة المدروسة ، وذلك عند توزعها بين طورين ، أحدهما طور متحرك (mobile phase) تنحل فيه المركبات المدروسة وتتحرك معه والآخر طور ساكن أو ثابت (stationary phase) يمارس على هذه المركبات فعل الاحتفاظ أو التأخير .وبفضل التطبيق العملي للكروماتوغرافيا الذي يتطلب جريان الطور المتحرك خلال حبيبات الطور الثابت فإن عملية التوزيع تتكرر عدداً كبيراً من المرات بشكل آلي . وهذا الأمر يؤدي إلى فصل المكونات عن بعضها بعضاً نتيجة انتقال مركبات المزيج بسرعات مختلفة.

تستخدم كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة في عمليات الفصل السريع وفي تحليل المواد كماً ونوعاً ويعود ذلك لبساطة الطريقة وعدم الحاجة إلى أجهزة معقدة وسيتم دراسة هذا النوع من الكروماتوغرافيا بشكل مفصل.

-كما تعتبر الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء من أهم طرق الفصل لمزيج من المكونات الموجودة مع بعضها بعضاً.

ويتم التحليل الكيفي من معرفة زمن الاحتفاظ Retention time أما التحليل الكمي يتم من حساب مساحة القمة الكروماتوغرافية وغالباً ما تتم المقارنة مع محلول مادة عيارية لمعرفة ذلك.

-طريقة الكروماتوغرافيا الغازية Gas Chromatography لفصل الواد القابلة للتبخر ضمن شروط عمل الجهاز.

6- طريقة الرحلان الكهربائي Electrophoreses بأنواعها من طرائق الفصل التي تطبق بشكل كبير على فصل الجزيئات الضخمة.

7- تبادل الشوارد Ion exchange ويتم ذلك عن طريق الامتزاز على جسم صلب يتم تبادل الأيونات على سطحه.

- التبادل الأيوني أو الشاردي عملية كيميائية يحدث خلالها تبادل الأيونات (الشوارد) في محاليل ومركب كيميائي (مبادلات للأيونات).

- وقد تكون مبادلات الأيونات من النوع الذي يقوم بفصل الشحنات السالبة أو الشحنات الموجبة من المحلول. كما توجد أنواع في قدرتها عزل الأيونات السالبة والأيونات الموجبة على السواء.

8- البلورة Crystallization

التبلور (أو البَلْوَرَة) عبارة عن عملية تشكيل (طبيعية كانت أم اصطناعية) للبلورات الصلبة من المحلول. تعد عملية التبلور أيضاً من تقنيات الفصل في الأوساط الصلبة-السائلة، حيث تحدث عملية انتقال لجزيئات المادة من الحالة السائلة إلى الحالة الصلبة.

وسوف يتم دراسة طرائق الفصل السابقة الذكر بشكل مفصل في فصول لاحقة ضمن هذا المقرر.

الفصل الثاني
الاستخلاص سائل -سائل
Liquid –Liquid Extraction

2-1- مقدمة

تعتمد طرائق الفصل على وجود اختلاف في خاصية واحدة أو أكثر من الخواص الفيزيائية الكيميائية للمواد المراد فصلها .مثل : درجة الغليان - الانحلالية - درجة الانصهار - الكثافة وكلما زاد الاختلاف في خاصية من هذه الخصائص لمادتين كلما سهل فصل هاتين المادتين. يعد الاستخلاص من الطرق العملية الهامة المستعملة في فصل المركبات العضوية و تنقيتها ويستخدم على نطاق واسع في استخلاص المركبات العضوية الموجودة في أوراق النبات و بذورها وفي الأجسام الحية.

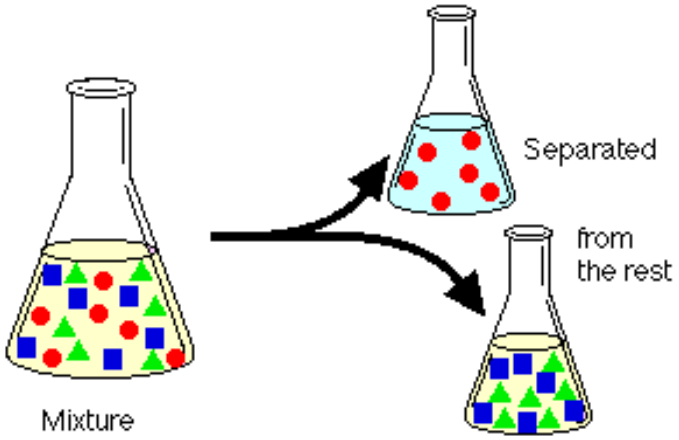
2-2- تعريف الاستخلاص والهدف منه

يمكن تعريف الاستخلاص :بأنه عملية فصل مركب من مزيج بواسطة مذيب مناسب.

وعملياً يستخدم الاستخلاص في فصل مركب عضوي من محلول مائي ،أو فصل مادة معلقة في محلول ما . يتم الاستخلاص مثلا بواسطة خض المحلول المائي مع مذيب عضوي لا يمتزج مع الماء ومن ثم السماح للطبقتين السائلتين بالانفصال عن بعضهما البعض. وأثناء هذه العملية تتوزع المادة المذابة (التي يراد استخلاصها) بين الطبقتين المائية والعضوية بدرجة تركيز معتمدة على درجة قدرة الإحلال للمذيبين (الماء والمذيب العضوي) ويدعى المذيب العضوي بشكل عام بالمذيب المستخلص **ويعتمد اختياره على عاملين أساسيين:**

الأول: قدرته الجيدة على إذابة المادة المراد استخلاصها.

الثاني: سهولة فصله من المذاب.والشكل رقم (1) يوضح طريقة استخلاص مكون من خلال مذيب ما.

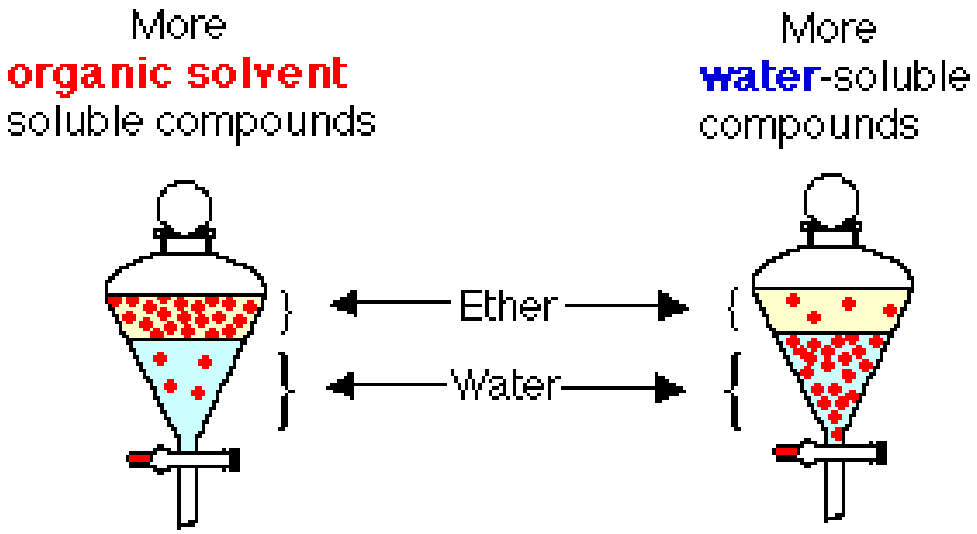


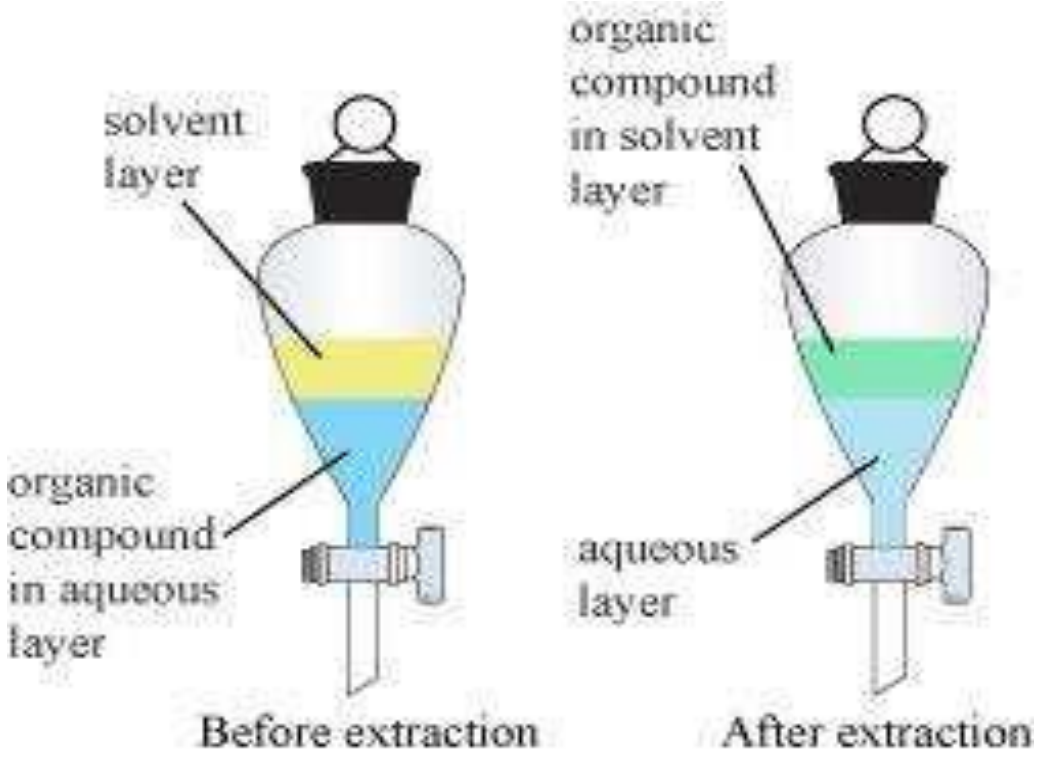
الشكل (1): طريقة استخلاص مكون من خلال مذيب ما

والاستخلاص سائل - سائل هي طريقة تستخدم لفصل المادة بناءً على نسبة انحلالها في طورين غير ممتزجين مع بعضهما البعض ويستخدم **لتحقيق الأهداف التالية**:

- التخلص من المتداخلات remove interference
- لزيادة تركيز المادة قبل التحليل Concentrates species prior analysis
- انتاج مادة قابلة للتقدير والقياس Produce measurable form of species

والشكلين التاليين يوضحان طريقة استخلاص مكون من خلال الاختلاف في الانحلال.





الشكل (2): طريقة استخلاص مكون من خلال الاختلاف في الانحلال.

2-3- الشروط الواجب توافرها بالمذيب العضوي المستخدم للاستخلاص

1 -أن يكون مذيب جيد للمادة المراد استخلاصها (نوعي)

2- أن ينفصل عن الماء بسرعة وبشكل كامل عند استقرار المحلول (لا يمتزج)

3-الوزن النوعي specific gravity وهو يساوي كثافة المذيب العضوي مقسوما على كثافة الماء .(الفرق بالكثافة عن الماء كبير) كلما كان الوزن النوعي للمحل العضوي أكبر بكثير من واحد أو أصغر بكثير من الواحد كلما كان الانفصال تاماً وسريعاً.

4 -عدم حدوث أي تفاعل كيميائي مع المذيب.

5 - تكلفته منخفضة.

6 - امكانية استعادة المادة منه.

7 - أن يمتلك لزوجة منخفضة.

لماذا تفضل بعض المركبات (كالمواد الدوائية مثلا) أن تبقى في الطور العضوي على الطور المائي وبعضها بالعكس يبقى في الطبقة المائية ؟ لا يوجد جواب قاطع لهذا السؤال ولكن نستطيع أخذ الملاحظات التالية بعين الاعتبار:

المادة المنحلة تفضل المذيب الذي تكون فيها أكثر ثبات اً و الشبيه يحل الشبيه:

- الأدوية القطبية ، والأملاح تنحل بالمحلات القطبية.
- الأدوية غير القطبية لا تذوب بالماء ولكنها تذوب بالمحلات العضوية.
- درجة الـ pH تلعب دوراً كبيراً في عملية الإستخلاص.

2-4- اتزان الاستخلاص:

عند استخلاص المذاب (A) الموجود في محلول مائي يتم استخدام مذيب عضوي لاستخلاص المذاب من الطور المائي ، فتتوزع تراكيز المذاب بين الطبقتين المائية والعضوية بنسبة ثابتة وذلك بعد إضافة المذيب العضوي والرج والوصول إلى حالة الاتزان.

وتوصف عملية التوزع بما يسمى **نسبةالتوزيع التركيزي**

Concentration distribution ratio (D_c)

$$D_C = \frac{[A]_O}{[A]_W} \quad \text{..... (1)}$$

$$D_c = \frac{(mmoles\,A)_o / V_o}{(mmoles\,A)w / V_w} = \frac{(mmoles\ A)_o \times V_w}{(mmolesA)w \times V_o}$$

..... (2)

حيث أن :

$(mmoles\ A)_O$: تمثل عدد مليمولات A في الطبقة العضوية.

$(mmoles\ A)_w$: تمثل عدد مليمولات A في الطبقة المائية.

V_o : حجم المذيب العضوي المستخدم بالمليلتر

V_w : حجم الماء المستخدم بالمليلتر

هذا يعني أنه كلما كانت ثابتة التوزع التركيزي كبيرة كلما كان الاستخلاص أكبر ، لأنه غالباً ما يكون الاستخلاص من الماء للطبقة العضوية.

ولأن قيمة *Dc* ثابتة فإنه كلما زاد حجم المذيب العضوي كلما زاد ت كمية المادة المستخلصة.

5-2- التوزيع الكتلي mass distribution ratio (D_m):

هي نسبة كمية المذاب في الطبقة العضوية الى كميتة في الطبقة المائية

$$D_m = \frac{(mmoles\,A)_0}{(mmoles\,A)_w} \quad \text{.....(3)}$$

بتعويض المعادلة 3 في المعادلة 2 نحصل على العلاقة التالية رقم (4):

ب

$$D_c = D_m \frac{V_w}{Vo}$$

وباعتبار أنه في أغلب عمليات الاستخلاص يكون Vo=Vw فهذا يعني أن Dc=Dm

6-2- حساب الجزء من المادة الذي لم يستخلص :

لحساب المتبقي من المذاب في الطبقة المائية (F): يتم ذلك من حساب الكسر المولي للمادة في الطور المائي:

$$F = \frac{(mmolesA)w}{(mmoles\ A)o + (mmoles\ A)w} = \frac{1}{D_m + 1}$$

..... (5)

اذا تكررت عملية الاستخلاص لعدة مرات n بإضافة حجم أخر من المذيب العضوي إلى الطبقة المائية فانه يمكن حساب المتبقي من المذاب في الطبقة المائية كالتالي:

$$F = \frac{1}{(D_m + 1)^n}$$

..... (6)

أو يمكن حسابه بالشكل التالي: من خلال حساب معامل التوزع k

$$K = \frac{mass_{organic\ phase}}{mass_{aqueous\ phase}}$$

$$K = \frac{M_{org} V_{org}}{M_{aq} V_{aq}}$$

حيث يحسب الجزء المولي المتبقي في الطور المائي (q) بعد عملية فصل واحدة من العلاقة التالية:

$$q = \frac{M_{aq} V_{aq}}{M_{aq} V_{aq} + M_{org} V_{org}}$$

وبالتقسيم على M_{aq} نحصل على:

$$q = \frac{V_{aq}}{V_{aq} + K V_{org}}$$

حيث أن:

$$\frac{M_{org}}{M_{aq}} = K$$

وبالتقسيم على V_{aq} نجد:

$$q = \frac{1}{1 + K V_R}$$

حيث أن:

$$V_R = \frac{V_{org}}{V_{aq}}$$

اذا تكررت عملية الاستخلاص لعدة مرات n بإضافة حجم أخر من المذيب العضوي إلى الطبقة المائية فانه يمكن حساب المتبقي من المذاب في الطبقة المائية كالتالي:

$$q^n = \left(\frac{1}{1 + K V_R}\right)^n$$

وبنفس الطريقة يمكن حساب الجزء المولي المفصول في الطور العضوي (p) بعد عملية فصل واحدة من العلاقة التالية:

$$P = \frac{M_{org} V_{org}}{M_{aq} V_{aq} + M_{org} V_{org}}$$

وبالتقسيم على Maq Vaq نجد:

$$P = \frac{K V_R}{1 + K V_R}$$

حيث أن

$$\mathbf{p + q = 1}$$

2-7- كفاءة الاستخلاص

ولحساب النسبة المئوية للمذاب المستخلص (كفاءة الاستخلاص E%) في حالة تكرار الاستخلاص من هذا القانون:

$$\mathbf{E\% = 100 \times P}$$

2-8- طرائق الاستخلاص(سائل-سائل) في التحاليل الصيدلانية:

المبدأ : فصل المادة الفعالة من بين السواغات التي تعيق عملية التحليل من خلال استخدام مذيب مناسب لحل المادة الدوائية وغير مناسب لحل السواغات.

تطبيقاتها :

- معظم التحاليل الصيدلانية تتطلب الاستخلاص
- واسعة الاستخدام بالتحاليل الحيوية

ميزات الطريقة : سهلة ورخيصة.

مساوئها: انتقائية محدودة ، مقتصرة على محلات معينة - تستهلك حجم كبير من المحلات.

2-9- بعض الأمثلة عن طرائق الاستخلاص) سائل-سائل

مثال1

محلول مائي حجمه 80 مل، تم استخلاص المادة الموجودة فيه بمحل من دي كلوروميتان حجمه (20مل)، فإذا كانت نسبة التوزع للمادة فيه هي 4. احسب كفاءة الاستخلاص المئوية.

$$P = \frac{K V_R}{1 + K V_R}$$

$$P = \frac{K \times 20/80}{1 + K \times 20/80}$$

$$P = \frac{4 \times 0.25}{1 + 4 \times 0.25}$$

$$P = 1/2 \qquad P = 0.5$$

$$E\% = 100 \times P$$

$$E\% = 100 \times 0.5$$

$$E\% = 50\%$$

مثال 2

محلول من اليود حجمه (50 مل) وتركيزه (0.1N) تم استخلاصه بواسطة (10 مل) من الكلوروفورم والمطلوب حساب النسبة المئوية المتبقية من اليود في الطور المائي وكتلته في الميلغرام علماً أن معامل التوزيع هو 80 والوزن الذري لليود هو 127

$$q = \frac{1}{1 + K\,V_R}$$

$$q = \frac{1}{1 + 80 \times 10/50}$$

$$q = 0.0588$$

$$q = 5.88\%$$

التركيز البدائي لليود هو:

$$0.1 \times 50 \times 127 = 635 \text{ mg}$$

تركيز اليود الغير مستخلص:

$$635 \times 0.0588 = 37.34 \text{ mg}$$

مثال 3
محلول مائي حجمه 30مل استخلص بواسطة 50 مل من دي كلوروميتان وكانت نسبة التوزيع 7.5 والمطلوب حساب عدد مرات الاستخلاص للحصول على كفاءة استخلاص 99%

$$q^n = \left(\frac{1}{1 + K V_R}\right)^n$$

$$0.01 = \left(\frac{1}{1 + 7.5 \times 50/30}\right)^n$$

$$0.01 = (0.074)^n$$

$$\log 0.01 = n \log 0.074$$

$$n = \frac{\log 0.01}{\log 0.074}$$

$$n = 1.77$$

مثال 4

استخلصت مادة من محلول مائي حجمه 80 مل بواسطة 20 مل من دي كلوروميتان وكانت نسبة التوزع 7.5 والمطلوب حساب عدد مرات الاستخلاص للحصول على كفاءة استخلاص 88%

$$q^n = \left(\frac{1}{1 + K V_R}\right)^n$$

$$0.12 = \{ 1/ (1+ 7.5x20/80)\}^n$$

$$\log 0.12 = n \log 0.3478$$

$$-0.9208 = -n\ 0.4586$$

$$n = 2.0078$$

الفصل الثالث
التبادل الايوني
Ion Exchange

3-1- مقدمة:

التبادل الايوني : عملية تتضمن انتقال ايونات عبر الحدود بين طورين احدهما سائل والاخر صلب حيث تزيح الايونات في الطور السائل الايونات الموجودة على سطح الطور الصلب . ويتم ذلك باستخدام مادة تسمى المبادل الايوني والذي يمكن تعريفه بالشكل التالي:

المبادل الايوني : بوليمر عضوي يحتوي في تركيبه مواقع عاملة تسمى مواقع التبادل الايوني وهي مجاميع فعالة قد تكون حامضية او قاعدية قادرة على التأين .

3-2-أنواع المبادلات الأيونية

يمكن تقسيم المبادلات الايونية الى :

1- مبادلالت ايونية طبيعية

2- مبادلات ايونية صناعية

3-2-1- المبادلات الايونية الطبيعية :

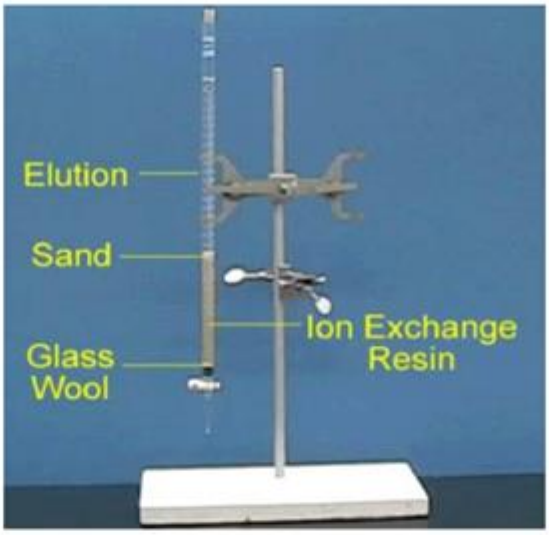
هي مواد طبيعية متوفرة تمتلك القدرة على التبادل الايوني من امثلتها : الرمل - التربة.

3-2-2- المبادلات الايونية الصناعية :

1-المبادلات اللاعضوية: مثال على ذلك سليكات الالمنيوم والتي تستعمل في إزالة عسرة الماء .

2- المبادلات العضوية :- وتسمى الراتنجات (Resins) .

هي اكثر انواع المبادلات شيوعاً واستخداماً وهي ذات امكانية كبيرة لفصل الايونات الموجبة او السالبة حسب نوع المبادل المستخدم ومتوفرة بكثرة على المستوى التجاري وهي سهلة التحضير والشكل التالي يوضح شكل المبادالأيوني.



الشكل (1): المبادلات العضوية (الراتنجات) Organic resins

يمكن تحضير المبادلات في المختبرات بصفات فيزيائية وكيميائية معلومة وتحضر هذه المبادلات بخطوتين : **الاولى** تحضير جسم الراتنج الصلب .

والثانية هي اضافة المجاميع الوظيفية والتي تحدد فيها كون الراتنج مبادل ايوني موجب Cation او مبادل ايوني سالب

أولاً: تحضير جسم المبادل الصلب :

بعملية البلمرة المشتركة Copolymariztion يتم تحضير المبادل عن طريق بلمرة مادة styrene العضوية بنسبة قد تصل الى 90% وثنائي فينيل البنزين DVB (100%) divinylbenzen بنسبة قد تصل الى 10% وبوجود اكسيد البنزيل .

ناتج التفاعل اعلاه يضاف الى محلول صابوني وينتج هذا مستحلب (قطرات عضوية في الماء) ويسخن المستحلب ويتحول بدوره الى جسم كروي صلب ويتم طحنه ويتكون الراتنج الصلب.

ثانياً : اضافة المجاميع الوظيفية

يتم في هذه الخطوة تحديد نوعية المبادل فيما اذا كان مبادل موجب Cation او مبادل سالب anion . باضافة مجاميع حامضية او قاعدية على جسم الراتنج الصلب .

A) مبادل كايتوني قوي (موجب) Strong cation exchanger

قوي في شكله الهيدروجيني (H Form)

ان الشحنة ($R - So_3^-$) تسمى الشحنة الثابتة او H^+ تسمى الشحنة المتحركة .
هذا النوع يقوم باستبدال الايونات الموجبة للعينة بايونات (H^+) كما في المعادلة :

$$RSO_3^-H^+ + M^+ \longrightarrow RSO_3^- + H^+$$

المبادل الأيوني المحلول المبادل الايوني المحلول

يمكن ايضا الحصول على مبادلات كايتونية ضعيفة بإدخال مجموعة (COOH) على حلقة البنزين .

B) مبادل انيوني قوي (سالب) Anion Exchanger

يسمى مبادلا سالباً في الشكل الكلوريدي Cl^- form يقوم هذا النوع باستبدال الايونات السالبة مع الايونات السالبة في العينة (النموذج)

$$R\text{-}CH_2N^+(CH_3)_3Cl^- + X^- \longrightarrow R - CH_2N^+(CH_3)_3X + Cl^-$$

محلول المبادل الايوني الطور المتحرك المبادل الايوني

يمكن الحصول على مبادل انيوني (سالب) اضعف باستخدام الامينات الثانوية او الامينات الاولية .

إن كلاً من المبادلات الايونية الموجبة والسالبة يمكن الحصول عليها تحت اسماء تجارية :

Dowex or Amberlite IR 120

Dowex 1 or Amberlite 1RA 400 .

كذلك يمكن ان يوجد المبادل الايوني بشكل H -form أو Na -form والمبادل الايوني السالب بشكل Cl -form او OH -forrm .

3-3- الصفات الاساسية للمبادل الايوني :

- ذوبانية قليلة جدا يمكن اهمالها عن طريق وجود ترابطات عمودية كافية .

- له تراكيب مسامي لنفوذ الايونات في داخل شبكته بشكل منتظم
- يجب ان يكون ثابتا كيميائيا
- يجب ان يمتلك مجاميع موجبة او سالبة فعالة قابلة للاستبدال مع الطور المتحرك .
- يجب ان يكون الراتنج اكثر كثافة من الماء
- تزداد قابلية الانتفاخ بزيادة كثافة شحنة المجاميع الفعالة

4-3- السعة Capacity او تسمى السعة الكلية Total Capacity عدد المليمولات المستبدلة (الماخوذة) بواسطة 1 غرام من الراتنج الجاف

مثلاً:

$$RSO_3^-H^+ + Na^+ \longrightarrow RSO_3^-Na$$
$$2RSO_3^-H^+ + Ca^{2+} \longrightarrow (RSO_3^-)_2\,Ca$$

أي أن السعة التبادلية للكالسيوم Ca^{2+} تساوي نصف السعة الاستبدالية للصوديوم. أي أن
1 مول من هيدروجين يستبدل 1 مول صوديوم وأن
2 مول هيدروجين يستبدل 1 مول من الكالسيوم

مثال: تم رج 1غ من راتنج ايوني رطب وبعد تجفيفه كان وزنه 0.5 غ بشكل H-form مع 100 ml من محلول يحوي على ايونات الصوديوم بتركيز 0.1 M . وبعد ازاحة الصوديوم من المبادل بواسطة 2 M من حمض HCl وجد ان 100 ml من الصوديوم المزاح تركيزه 0.075 M احسب سعة المبادل

الحل : عدد مليمولات الصوديوم قبل الاستبدال $= 0.1\ M \times 100\ ml = 10\ mmol$

عدد مليمولات الصوديوم بعد الاستبدال $= 0.075\ M \times 100\ ml = 7.5\ mmol$

عدد مليمولات الصوديوم الماخوذة من قبل الراتنج

$$10 - 7.5 = 2.5\ mmol$$

$$\text{السعة التبادلية} = \frac{\text{كمية المادة المأخوذة}}{\text{وزن المبادل الجاف}}$$

$$T.C = \frac{2.5\ mmol}{0.5\ g} = 5\ mmol/g$$

5-3 الانتقائية Selectivity

هي خاصية المبادل التي تعين قابلية او استعداد المبادل لمبادلة الايونات المختلفة تحت نفس الظروف ، وهي مقدار ميل المبادل لهذا الايون او ذاك .

3-5-1- معامل الانتقائية Coefficient of Selectivity

مما سبق يتبين ان كافة المبادلات الايونية وتحت نفس الظروف لها ميل (تفضيل) لأيون عن آخر .

فاللتفاعل التالي : $R - H + A^+ \longrightarrow R - A + H^+$

صلب المحلول جسم المبادل

$$K = [A]resin / [H]resin$$

كلما كان معامل الانتقائية كبير كلما كانت قابلية الراتنج على التبادل كبيرة . مثال ذلك محلول يحتوي على ايونات (A^+ , B^+ , C^+ , D^+) لها معاملات انتقائية (2 , 5 , 10 , 20) على التوالي هذا يعني ان الالفة النسبية للتبادل هي D > C > B > A

3-5-2- قواعد عامة للانتقائية :

1- في التراكيز المنخفضة :

A) تزداد الانتقائية للأيونات حسب كبر شحنتها $Th^{4+} > La^{3+} > Ca^{2+} > Na^+$

B) عندما تمتلك الأيونات نفس الشحنة : (نفس التكافؤ)

تزداد الفتها كلما زاد نصف القطر الفعال للأيون ، كلما زاد العدد الذري

$$Cs^{+} > Rb^{+} > K^{+} > Na^{+} > Li^{+}$$

$$Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$$

$$I^{-} > Br^{-} > Cl^{-} > F^{-}$$

2- في التراكيز العالية :

تنخفض فروقات الانتقائية للأيونات مختلفة الشحنة وفي بعض الحالات قد تزداد انتقائية الايون ذو الشحنة القليلة مثل $Na^{+} > Ca^{2+}$. (هنا لايكون للشحنة دور وإنما للتركيز الدور الأكبر في تحديد الانتقائية).

3- لا دور لدرجة الحرارة في انتقائية الايونات . بل تتشابه الانتقائية الى حد كبيربين مختلف الأيونات ، و قد تنقص الانتقائية للأيونات التي تملك أوزان ذرية عالية .

4- تقل امكانية التبادل الايوني عندما ينقص الترابط العرضي Cross – linking (بنية البوليمر أو الراتنج)

5- تعتمد قدرة التبادل الايوني على التركيز على المجموعة الحمضية او القاعدية العاملة أي وجود H^{+} او OH فعندما تقل قوة حمضية او قاعدية الراتنج Resine تزداد قابلية تبادل H^{+} او OH^{-} في المحلول نحو الراتنج . وهذا يفيد في العملية المعاكسة (تنظيف الراتنج أو المبادل).

3-6- تطبيقات التبادل الايوني

1- ازالة الايونات Removal of Ions

ان مزيل العسرة ((Softener)) للمياه المستعملة للأغراض المنزلية يعتبر من أهم الامثلة لعمليات التبادل الايوني .

فجميع الايونات الموجبة ($Fe^{2+} - Mg^{2+} - Ca^{2+}$) يمكن ان تستبدل مع ايون الصوديوم فالماء الذي اصبح يسراً بالتبادل الايوني يحتوي املاح صوديوم غير ضارة بشبكة انابيب الماء ولمعظم الاستعمالات المنزلية .

ويمكن تحضير الماء الخالي من الايونات (deionized water) من خلال امرار الماء الخام على مبادل كايتوني حيث يبادل جميع الكايتونات [الايونات الموجبة] بالهيدروجين ومن ثم امراره على مبادل ايوني الذي يبادل الايونات السالبة بالهيدروكسيد وان المحصلة هي ماء خالي من الايونات .

2- تركيز مكون ضئيل (Concentration of trace of Constituent)

يتم اختيار طريقة التبادل الايوني عندما يكون المطلوب فصل وتقدير مكون موجود بتركيز قليل في حجم محلول كبير حيث يتم امرار هذا المحلول على مبادل ايوني مناسب فيتم حجز المكون على المبادل ويخرج بقية المحلول من نهاية العمود وبعدها يتم استرجاع المكون المفصول باستخدام محلول آخر(eluent) حجم صغير جدا ويستفاد من هذه الطريقة في التحليل الكمي .

3- تحضير الكواشف preparation of Reagents

ليس من السهولة تحضير محاليل محدودة التركيز لحموض او قواعد قوية بسبب عدم وجود بعض الكواشف القياسية الاولية . فعند امرار حجوم صغيرة من هذه المحاليل على راتنج [مبادل] ايوني بشكل هيدروجين او هيدروكسيلي سوف تنتج كميات مكافئة من حامض او قاعدة . يمكن الكشف عن تراكيزها بسهولة .

4- فصل الفلزات Separation of Metals

ان التبادل الايوني مفيد في فصل الايونات الفلزية المتشابهة فمن السهولة فصل الفلزات القلوية والقلوية الترابية في محاليل خلائطها رغم انه لايمكن فصلها بالطرق الاخرى .

5- فصل الحوامض الامينية Separation of Amine acid

تستخدم تقنية التبادل الايوني في فصل الحوامض الامينية وتستخدم لهذا الغرض طرقمختلفة منها الاستفادة من تغير PH المحلول او استخدام فلزات تعقيد Cd^{2+} , Cu^{2+} .

الفصل الرابع
Chapter 4

المبادئ الأساسية في الكروماتوغرافيا

Basic principles of chromatography

كيمياء تحليلية صيدلانية 2

السنة الثانية

أ.د. جمال محفوض

الفصل الرابع
المبادئ الأساسية في الكروماتوغرافيا

Basic principles of chromatography

4-1- المقدمة :

تعد الكروماتوغرافيا من الطرائق الهامة في الكيمياء التحليلية ، حيث تطبق بشكل واسع في التحليل الكيفي والكمي ودخلت في مجالات واسعة وعديدة ، وهي تهدف إلى تقدير المواد المفصولة نتيجة التحليل سواء كان المركب المدروس موجوداً بشكل إفرادي أو مع مركبات أخرى.

أول من أسس علم الكروماتوغرافيا هو العالم الروسي ميشيل تسويت عام 1901 حيث تمكن من تحليل مادة الكلوروفيل على عمود كروماتوغرافي وأطلق على هذا النوع من التحليل Chromatography والذي مازال إلى عصرنا هذا تحت نفس الاسم. لكن سرعان ما تقدم هذا النوع من التحليل بشكل كبير لما له من تطبيقات واسعة في مختلف مجالات العلوم.

وكلمة كروماتوغرافيا كلمة يونانية الأصل مؤلفة من كلمتين كرومو (chromo) وتعني اللون ، وغرافي (graphy) تعني الطباعة أو الرسم وبالتالي كلمة كروماتوغرافيا تعني الطباعة اللونية أو الرسم اللوني ، حيث قديماً كان يعتمد الفصل بشكل رئيسي على لون المادة المراد تحليلها ، وإنما تعدت ذلك لتحليل المواد الملونة وغير الملونة كافة نتيجة استعمال التكنولوجيا الحديثة التي أدخلت عليها .

4-2- آلية الفصل:

تتم آلية الفصل في الكروماتوغرافيا بفضل اختلاف ثوابت توزيع مزيج العينة المدروسة ، وذلك عند توزعها بين طورين ، أحدهما طور متحرك (mobile

phase) تنحل فيه المركبات المدروسة وتتحرك معه والآخر طور ساكن أو ثابت (stationary phase) يمارس على هذه المركبات فعل الاحتفاظ أو التأخير .وبفضل التطبيق العملي للكروماتوغرافيا الذي يتطلب جريان الطور المتحرك خلال حبيبات الطور الثابت فإن عملية التوزيع تتكرر عدداً كبيراً من المرات بشكل آلي . وهذا الأمر يؤدي إلى فصل المكونات عن بعضها بعضاً نتيجة انتقال مركبات المزيج بسرعات مختلفة . لهذا يمكن تعريف التحليل الكروماتوغرافي من خلال آلية الفصل بأنه : طريقة لفصل وتحليل مزيج من المركبات باستعمال طورين طور ثابت وآخر متحرك حيث تظهر كل حلالة إلفة لكلا الطورين ، إلا أن مقدار الألفة لكل من الطورين الثابت والمتحرك تختلف باختلاف هذين الطورين .

كما تعتمد عمليات الفصل على آليات مختلفة تساهم فيها وهي :

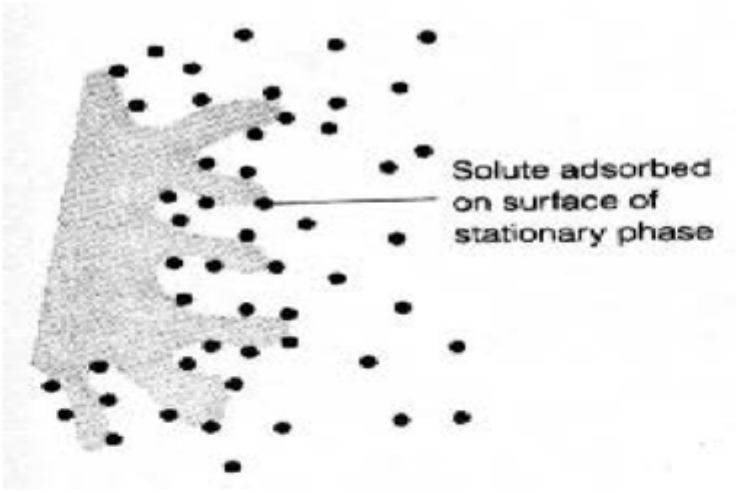
-الامتزاز (الادمصاص) Adsorption
-التوزيع والتجزئة partition
-التبادل الأيوني Ion Exchange
-تبادل المرتبطات Ligand Exchange
-الألفة Affinity
-الفصل بالاستبعاد الحجمي Size Exclusion

ولندرس مبدأ كل من الآليات السابقة الذكر بشيء من التفصيل.

-كروماتوغرافيا الامتزاز (الإدمصاص)

في هذه الآلية (الإدمصاص) أو الإمتزاز تتنافس جزيئات العينة أو الحلالة (Solute) وجزيئات المذيب أي الطور المتحرك (Solvent) على مواقع المادة الدامصة (Adsorbent) أي الطور الثابت ، وبالتالي على جزيئة العينة أو الحلالة أن تزيح جزيئةالمذيب وتحل محلها . فإذا كانت طبيعة الطور الثابت قطبية (سيليكا أو ألومينا أي تحوي – OH) فان الجزيئات غير القطبية في العينة سوف لن تدمص أو تمتزعلى سطح الطور الثابت وسوف لن تحتجز وتخرج من العمود بزمن قصير. والشكل رقم (1) يوضح آلية الفصل في كروماتوغرافيا الامتزاز.

أما الجزيئات من العينة والتي تملك قطبية أو زمر فعالة ذات قطبية أو القادرة على تشكيل روابط هيدروجينية فسوف تدمص بقوة على سطح الطور الثابت وسوف تحتجز وتتأخر بالخروج من العمود وبالتالي ستحتاج لزمن أكبر حتى تنفصل .



الشكل (1): آلية الفصل في كروماتوغرافيا الإدمصاص

أي أن درجة الحجز تعتمد على استقطابية الزمرة الفعالة على الجزيئة أو قطبية الجزيئة ككل في الطور الثابت غير القطبي مثل (الكربون الفحمي) فالجزيئات القطبية في العينة سوف لن تحتجز وستخرج بزمن أقل .

يتكون سطح الطور الثابت (المادة الدامصة) من مواقع ادمصاص منفصلة ، ففي حالة السيليكا لدينا مجموعات أو زمر الهيدروكسيل (OH -) وزمر(Si-OH-) المعروفة باسم السيلانول ، والقوى بين جزيئات العينة وجزيئات الطور الثابت تعتمد على القطبية ولهذا تعتبر كروماتوغرافيا الادمصاص أو الامتزاز الأفضل لفصل مزائج من الكحولات ، الكيتونات ، الاسترات .... من فصل سلاسل متجانسة من الهيدروكربونات حيث أن وجود مجموعة CH_2– غير كاف لإيجاد قوى تسمح بالفصل .

يخضع ترتيب خروج (elution) الجزيئات القطبية المفصولة على طور ثابت قطبي لترتيب قطبية المجموعات والزمر الفعالة الموجودة في العينة بالشكل :

$$-CH=CH- < -OCH_3 < -CO_2R < -C=O < -CHO < -SH < -NH_2 < -OH < -CO_2H$$

وهذا الترتيب سيكون معكوساً في حال كان الطور الثابت غير قطبي .

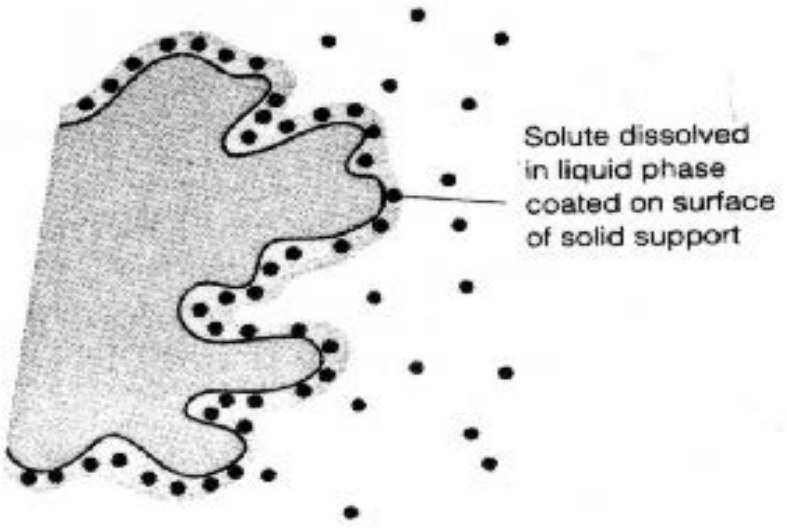
وتسمى الطرق الكروماتوغرافية التي يكون فيها الطور الثابت مادة صلبة تعتمد على الامتزاز بالطرق الكروماتوغرافية الامتزازية .

وتستخدم على نطاق واسع في تحليل المركبات العضوية والحيوية .

- كروماتوغرافيا التجزئة Partition chromatography

يتكون الطور الثابت من طبقة رقيقة من سائل أو من خليط من السوائل مثبتة على سطح مادة صلبة نفاذة وخاملة أما الطور المتحرك فعبارة عن سائل آخر (السائلان لايمتزجان) .

الميكانيكية التي يتم فيها الفصل يوضحها الشكل رقم (2) :

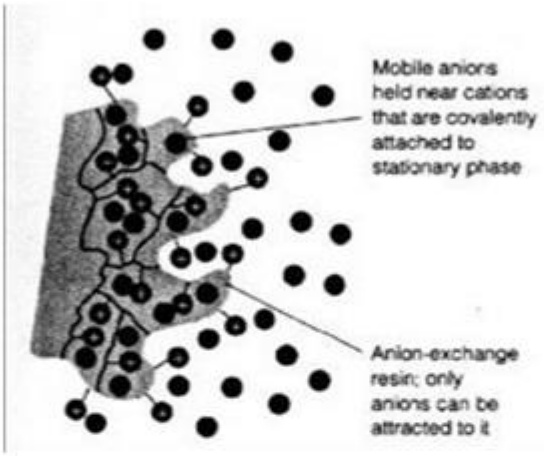


الشكل (2): آلية الفصل في كروماتوغرافيا التجزئة

يعتمد فصل المواد في هذه الطريقة على مقدار ذوبان المادة في الطور الثابت، بحيث أن المادة التي تذوب بشكل أكبر تتأخر أكثر ، والمادة التي لا تذوب في الطور الثابت تخرج من العمود في وقت مبكر وبسرعة .

تعتبر كروماتوغرافيا التجزئة التقنية الأفضل لفصل العديد من الجزيئات ، وبشكل عام تسمى الطرق التي يكون الطور الثابت فيها عبارة عن سائل بالكروماتوغرافيا الذوبانية التجزيئية .

تعتبر هذه الطريقة حالة خاصة من طرق الفصل الكروماتوغرافي سائل – صلب حيث الطور المتحرك سائل والطور الثابت صلب مؤلف من مادة خاملة مثل السيليكا أو البولي ستارين المحتوي على مكونات أيونية (زمر فعالة) مثل مجموعات الكربوكسيل أو السلفوهيدريل أو مجموعات الأمونيوم في المبادل الإيوني ، حيث يمكن أن تتبادل المكونات الأولية في العينة المارة في العمود مع المكونات الإيونية في الطور الثابت مؤدية إلى فصلها.
أي أن الميكانيكية هنا لا تعتمد على الإمتزاز أو الذوبان و إنما تعتمد على التبادل الأيوني لاحظ الشكل.



الشكل (3): آلية الفصل في كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

تتضمن تقنية التبادل الأيوني استبدال شاردة بأخرى ، فالطور الثابت (المبادل) هنا عبارة عن مادة قاسية (rigid matrix) نرمز لها بـ (M) سطحها يحمل شحنة موجبة أو سالبة تسمى بمواقع التبادل الأيوني (R^+ or R^-) والشوارد المعاكسة (Y^- or Y^+) تتشارك معها نفس المواقع على المادة الصلبة وهذا يسمح بتبادل الايونات ذات الشحن المتماثلة الموجودة في الطور المتحرك حيث تتوضع على مواقع التبادل والعينة الموجودة في الطور المتحرك والتي تتضمن شوارد (X^- or X^+) تتبادل مع الايونات المعاكسة (Y^- or Y^+) بالشكل:

$$MR^+Y^- + X^- \leftrightarrow MR^+X^- + Y^-$$

$$MR^-Y^+ + X^+ \leftrightarrow MR^-X^+ + Y^+$$

إذا تضمن هذا التبادل تبادلاً للايونات السالبة فتسمى العملية بـ Anion-exchange والعملية التي يتم فيها تبادل للايونات الموجبة تعرف بـ cation-exchange .

المبادل الموجب (Cation exchange) : يستخدم لحجز وفصل الايونات المشحونة إيجاباً على سطح سالب.

المبادل السالب (Anion exchange) : يستخدم لحجز وفصل الايونات المشحونة سلباً على سطح موجب .

وبديهي أن هذه التقنية تستخدم من أجل فصل عينات تتصف بأنها عبارة عن أيونات أو جزيئات قابلة لإعطاء ايونات عند pH معينة أي جزيئات قابلة للتأين مثل حمض عضوي أو أساس عضوي .

ولكن ما الذي يحدد الحجز في تقنية التبادل الأيوني ؟

يعتمد الحجز في هذه التقنية على قوة التفاعلات بين ايونات العينة ومواقع التبادل على الطور الثابت (المبادل) فالشاردة التي تتفاعل (تتبادل) بشكل ضعيف مع موقع التبادل سوف لن تحتجز وستخرج بسرعة من العمود ، بينما الشاردة التي تتفاعل بقوة فسوف تخرج ببطء وتتأخر على المبادل .

قوة التفاعلات (وهنا يقصد بها الحجز) سوف تعتمد على طبيعة المجموعات الفعالة الموجودة على سطح المبادل وعلى الشوارد المراد فصلها .

المبادلات الموجبة (cation-exchange) تتضمن مجموعات حمضية قد تكون ضعيفة مثل ($-COO^-$) أو قوية مثل ($-SO_3^-$) بينما المبادلات السالبة فتتضمن مجموعات أساسية قد تكون ضعيفة مثل ($-NH_2^+$) أو قوية مثل ($-NR_3^+$) .

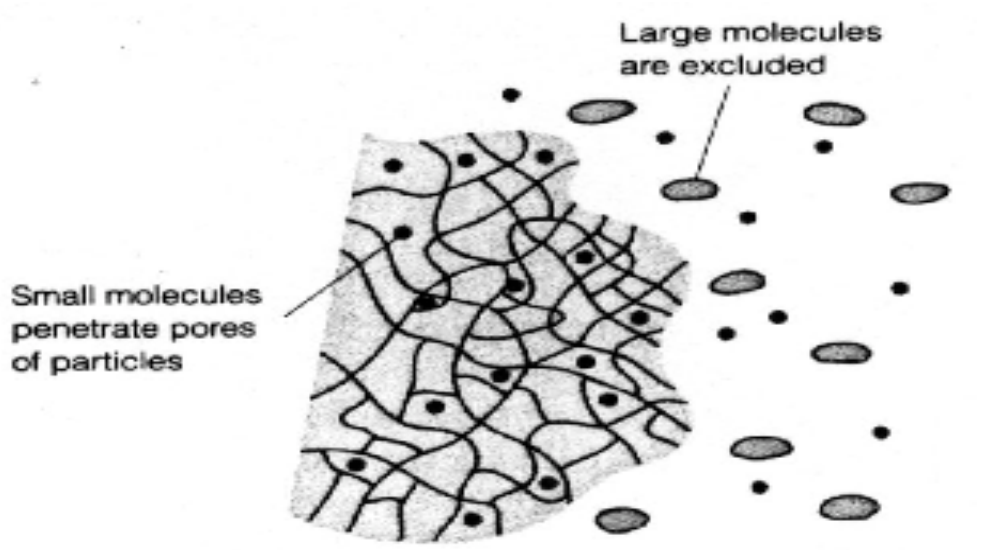
يستخدم التبادل الأيوني بشكل كبير صناعياً خاصة في مجال تحلية المياه Water-Softening.

الكروماتوغرافيا المنخلية : Gel permeation Chromatography

تعتمد هذه التقنية على أبعاد مسامات الطور الثابت المصنوع من السيليكا أو من بوليمير هلامي بحيث الجزيئات التي تمتلك نصف قطر جزيئي أكبر من أكبر مسام في الطور الثابت سوف تستبعد وسوف تمر سريعاً بشكل مستقيم وتخرج من العمود . أما الجزيئات الصغيرة والصغيرة جداً فسوف تخترق حتى أصغر مسام على الطور الثابت وسوف تأخذ

وقتاً أطول في الخروج من العمود . الجزيئات ذات الحجم المتوسط ربما تنفذ داخل المسام وعندها ستخرج في زمن متوسط أيضاً .

وبناء عليه فالجزيئات ذات الحجم الأكبر ستخرج أولاً من العمود والجزيئات الأصغر حجماً ستخرج آخراً ، لاحظ الشكل التالي.



الشكل (4): آلية الفصل في الكروماتوغرافيا المنخلية

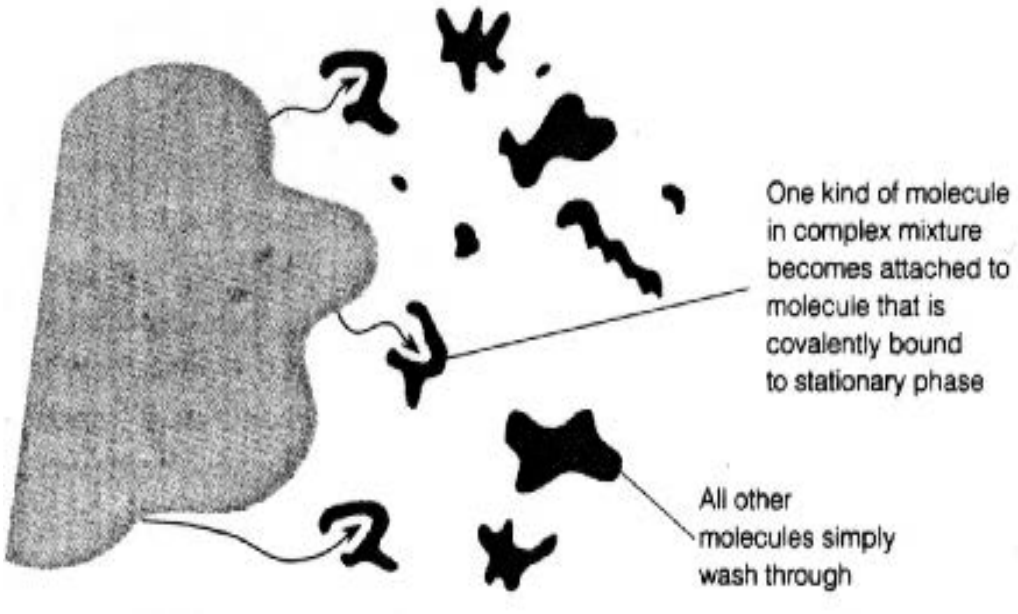
- **كروماتوغرافيا الإلفة : Affinity Chromatography**

هذه حالة خاصة من الكروماتوغرافيا السائلة – السائلة وتعتبر هذه التقنية في الفصل حديثةً جداً ونوعيةً جداً فهي تختص بالتفاعلات البيولوجية بين جزيئة بروتين ومرتبطة مناسبة ،حيث المرتبطة تشكل رابطة مع البروتين ، والطور الثابت عبارة عن مادة هلامية (gel) ذات روابط تساهمية .

عند إضافة جزيئات العينة في الطور المتحرك الموقي المناسب فان المكونات في العينة (البروتينات) والتي لها إلفة نوعية للروابط سوف تقيد وتحتجز والمكونات التي لاترتبط مع هذه الروابط سوف تخرج مع الطور المتحرك .

إن تركيب الطور المتحرك وقيمة pH الوسط هما العاملان المسؤولان عن تحديد قوة ارتباط جزيئات البروتين بالروابط ، وللحصول على المكونات التي تم فصلها فان تغيير هذه

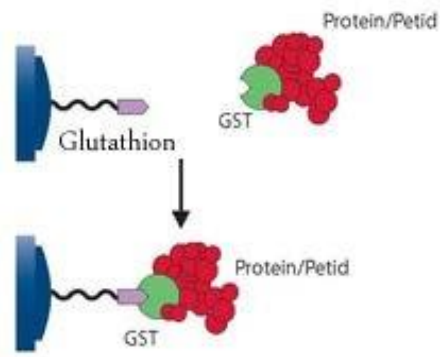
العوامل نحو إضعاف التفاعلات النوعية بين جزيئات البروتين والروابط سوف تحررجزيئات البروتين من الطور الثابت ، كما أن الآلية موضحة في الشكل التالي:



الشكل (5): آلية الفصل في كروماتوغرافيا الإلفة

إن ارتباط مرتبطة الهلام (الطور الثابت) يجب أن يكون ثابتاً تحت شروط التجربة، وتفاعل روابط العينة مع المرتبطات يجب أن يكون نوعياً ولكن عكوساً (reversible) .

ولكي لا يحدث تداخل أو ادمصاص للمرتبطات يجب أن نباعد بين الهلام والمرتبطات بوساطة مجموعة من الروابط الموضحة بالشكل رقم (6) :



الشكل (6): آلية الارتباط في كروماتوغرافيا الإلفة

التفاعلات النوعية بين المرتبطات وجزيئات البروتين غالبا تنسب إلى مفهوم القفل والمفتاح (key and lock) وهذه التقنية تعتمد على الترتيب الصحيح للمجموعات .

4 - 3 - تصنيف الكروماتوغرافيا :

يمكن أن تصنف الكروماتوغرافيا وفقاً لطرق عديدة لكن بشل عام تصنف حسب نوعية الطور المتحرك وحسب نوعية الطور الثابت ولندرس كل منهما بشيئ من التفصيل .

4 -3 - 1 - تصنيف الكروماتوغرافيا حسب الطور المتحرك

تصنف الكروماتوغرافيا حسب الطور المتحرك كما يلي :

1 - إذا كان الطور المتحرك غازاً سميت الكروماتوغرافيا الغازية Gas chromatography .

2 - إذا كان الطور المتحرك سائلاً سميت الكروماتوغرافيا السائلة Liquid chromatography.

4 - 3 - 2 - تصنيف الكروماتوغرافيا حسب نوعية الطور الثابت

تصنف الكروماتوغرافيا حسب نوعية الطور الثابت إلى نوعين وهما :

1 - كروماتوغرافيا الأعمدة (Column chromatography) وهي تعتمد على وجود الطور الثابت ضمن أعمدة مصنوعة من الفولاذ الغير قابل للصدأ وفي بعض الحالات مصنوعة من الزجاج وهي تسمى أعمدة مملوءة (Packed column)، غير أن هناك أعمدة فارغة ذات قطر داخلي صغير جداً وغير مملوءة بالطور الثابت وتدعى بالأعمدة الشعرية (Capillary column) .

2 - كروماتوغرافيا المستوية (Plane chromatography) وتتمثل بوجود الطور الثابت على سطح ما ، ومنها

-الكروماتوغرافيا الورقية (Paper chromatography)

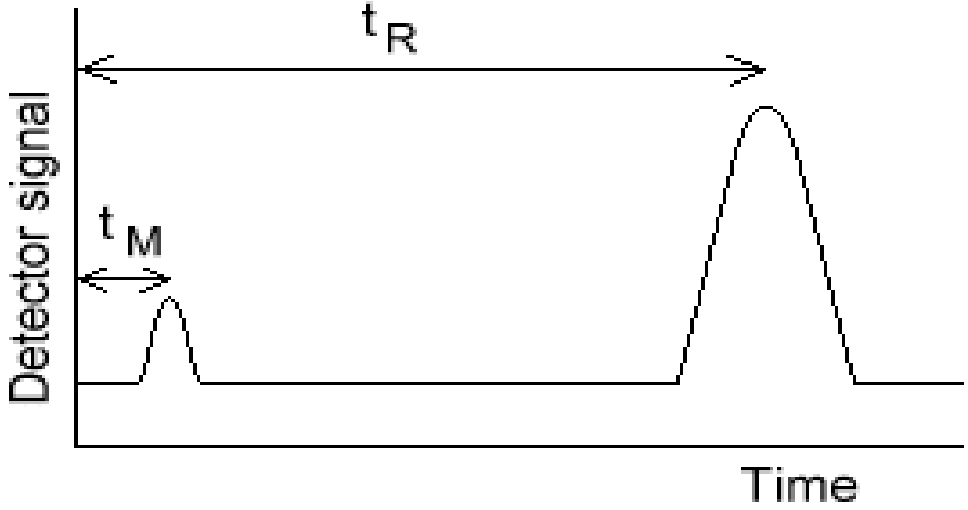
- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Thin layer chromatography)

- كروماتوغرافيا الرحلان الكهربائي (Electrophoresis).

4-4- بعض المقادير المستخدمة في الـ (HPLC) :

1- **زمن الاحتباس (الاحتفاظ)** ***Retention Time***

وهو يمثل الزمن اللازم لخروج المكون من لحظة الحقن حتى ذروة القمة ويرمز له عادة t_R لاحظ الشكل رقم (7) الذي يوضح ذلك والرسم الناتج عن التحليل يسمى **كروماتوغرام** وهو مخطط بياني يمثل فصل مكونات العينة الناتجة عن التحليل حيث تتحدد عليه أزمنة الفصل (مواقع القمم) ومساحة القمم التي تتناسب طرداً مع تركيز المادة المفصولة.



الشكل (7): كروماتوغرام يوضح زمن الاحتفاظ

وفي الكروماتوغرافيا الغازية غالباً ما يطبق مفهوم زمن الاحتفاظ المختزل t'_R لمكون حيث يطرح من زمن الاحتفاظ t_R الزمن الميت t_M

$$t'_R = t_R - t_M$$

حيث أن t_M يمثل الزمن اللازم لخروج مركب لا يحتجز (الزمن الميت) من لحظة الحقن حتى ذروة القمة.

2- حجم (الاحتفاظ) أو الاستبقاء

يعتقد أنه من الأنسب قياس حجم الطور المتحرك المطلوب لتخليص مكونات العينة من العمود أي إخراج المادة من العمود وهو ما يدعى بحجم الاستبقاء ، وإذا فرضنا أن سرعة السريان الحجمية أو معدل سرعة التدفق F ثابتة فإنه يمكننا حساب حجم المكوث (V_R) بالعلاقة :

$$\text{Volume} = \text{Time X Flow Rate}$$

$$V_R(ml) = t_R(min) \text{ X } F(ml/min)$$

3- الانتقائية

يسمح هذا المقدار بتقدير مدى اختلاف في الاحتفاظ لمكونين موافقين لقمتين متجاورتين

$$\alpha = (t_{R2}-t_M) / (t_{R1}-t_M)$$

ولكي يكون هناك فصل جيد بين المكونين المتجاورين يجب أن تكون قيمة الانتقائية أكبر من الواحد.

4- كفاءة العمود الكروماتوغرافي

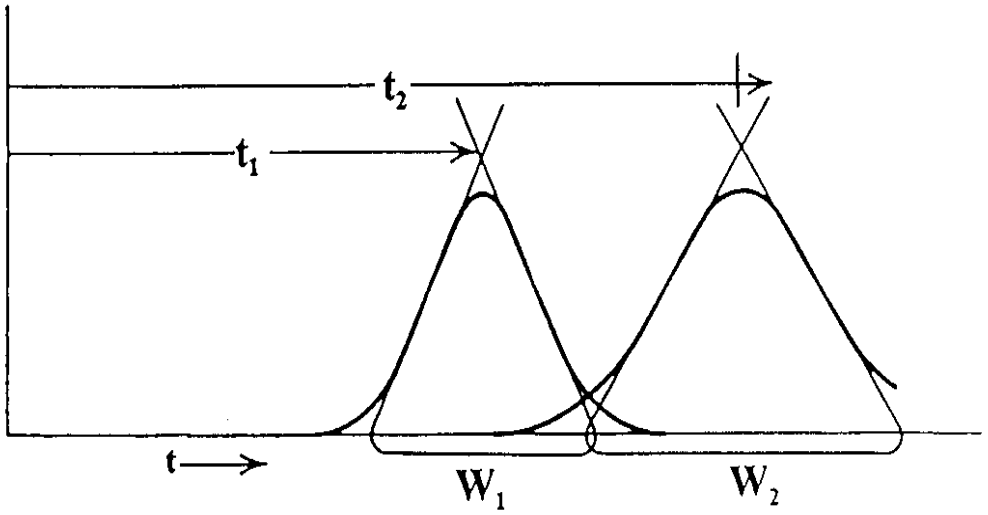
تتحدد كفاءة العمود بالمقادير التالية:

- عدد الصفائح النظرية : Total number of theoretical Plates

حيث يعتبر العمود كأنه يحتوي على صفائح أو شرائح نظرية (N) بداخله وعليها تتم عملية الفصل وكلما كان عددها أكبر كان العمود أفضل، وتحسب عدد الصفائح من العلاقة التالية:

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

حيث أن : t_R يمثل زمن الاحتفاظ .
W_b يمثل عرض القمة عند خط الاساس.
لاحظ الشكل التالي الذي يوضح المقادير السابقة.



الشكل (8): كروماتوغرام زمن الاحتفاظ وعرض القمة عند خط الاساس

- الارتفاع المكافئ لشريحة نظرية :

Height Equivalent to one theoretical Plate

ويرمز له بالرمز (H) وكلما كانت قيمته أقل كان العمود أفضل وتحسب من العلاقة التالية:

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

L = length of column (mm)
N = number of theoretical plates

- العلاقة بين سرعة الطور المتحرك والارتفاع المكافئ لصفيحة نظرية:

حاول الكثير من الباحثين الربط بين الارتفاع المكافئ لصفيحة نظرية (H) وسرعة الطور المتحرك (u) ولقد توصل العالم فان ديميتر (Van Deemter) إلى العلاقة التالية والتي سميت باسمه :

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

حيث :

H : الارتفاع المكافئ لصفيحة نظرية

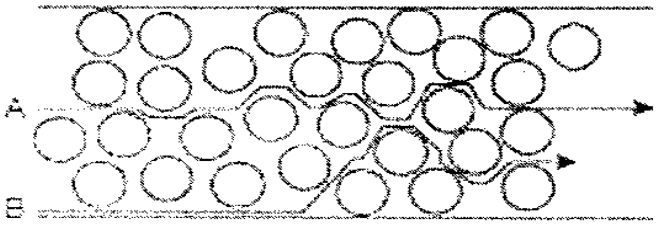
u : السرعة الخطية للطور المتحرك

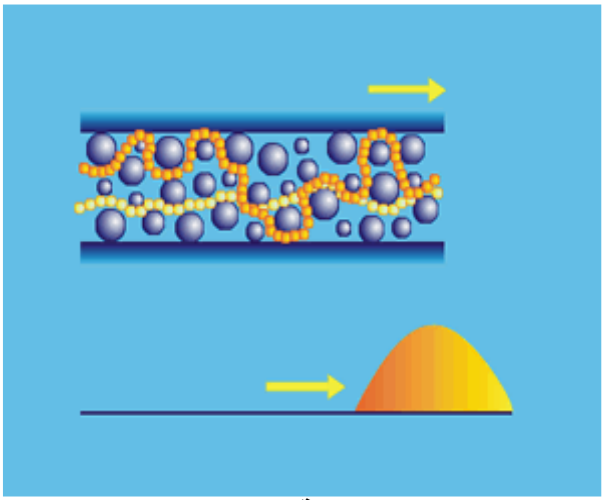
A , B , C ثوابت تتعلق بنوع العمود والطور الثابت.

ولتحديد كيف يمكن تخفيض قيمة الارتفاع المكافئ لصفيحة نظرية (H) يجب معرفة العوامل التي تساهم في تكبير قيمة (H) أي تعريض القمة الكروماتوغرافية. لذلك لابد من دراسة الثوابت الثلاثة السابقة.

1- الحد (A) : أو تعدد المسالك Multiple Paths

حيث الثابت A يمثل المساهمة في تعريض القمة الكروماتوغرافية بسبب الانتشار المضطرب للحلالة في الطور المتحرك أي تعدد المسارات أو المسالك (Multiple Paths) والذي يسمى أيضاً (Eddy Diffusion) بالتالي تخرج من العمود أجزاء من العينة بالتتابع حسب الطريق المسلوك كما هو موضح في الشكل رقم (9) .





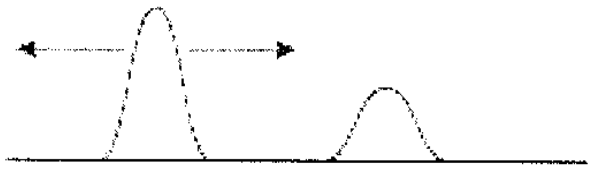
الشكل (9): انتشار القمة من خلال مسالك متعددة

حيث الاختلاف في حجم الحبيبات للطور الثابت وعدم جودة انتظام تعبئة العمود يؤدي إلى زيادة هذا الحد.

2- الحد (B) : الانتشار الطولاني Longitudinal Diffusion

تنتج المساهمة الثانية في تعريض القمة الكروماتوغرافية عن الانتشار الطولاني للحلالة في الطور المتحرك، حيث يزداد الانتشار بتناقص سرعة الطور المتحرك وتستمر ظاهرة الانتشار حتى إذا كانت سرعة الطور المتحرك مساوية للصفر لأن جزيئات الحلالة تستمر بالحركة بشكل ثابت منتشرة عبر الطور المتحرك.

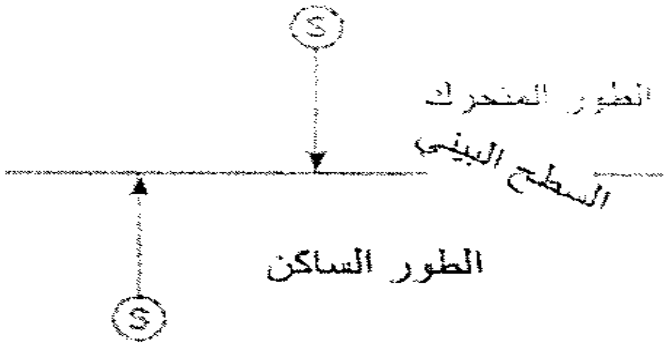
بما أن تركيز الحلالة يكون أعظمياً عند مركز القمة الكروماتوغرافية فسوف يتم تعريض هذه القمة تلقائياً بشكل بطيء بسبب انتشار الجزيئات من التركيز العالي داخل منطقة القمة إلى التركيز المنخفض على طرفيها أي للحواف الأمامية والخلفية للقمة، وهذا التعريض بالانتشار يدعى الانتشار الطولاني لأن الانتشار يحصل على طول محور العمود أثناء عبور الحلالة خلال العمود بواسطة تدفق الطور المتحرك ، ويكون الناتج هو زيادة عرض القمة. كما هو موضح في الشكل التالي:



الشكل (10): الانتشار الطولاني للحلالة

3- الحد (C) : مقاومة نقل الكتلة Mass Transfer Resistance

ينجم العامل الأخير في تعريض القمة الكروماتوغرافية عن الزمن المحدد اللازم لجزيئة الحلالة للإنتشار عبر الطور الساكن والطور المتحرك، يحدث الفصل الكروماتوغرافي نتيجة أن الحلالات تتحرك ما بين الطورين الساكن والمتحرك. فمن أجل حلالة تتحرك من طور الى آخر ينبغي عليها أولاً أن تنتشر في السطح البيني المشترك ما بين الطورين وبالتالي تتعرض الحلالة إلى ما يعرف بمقاومة الكتلة كما هو موضح في الشكل التالي :

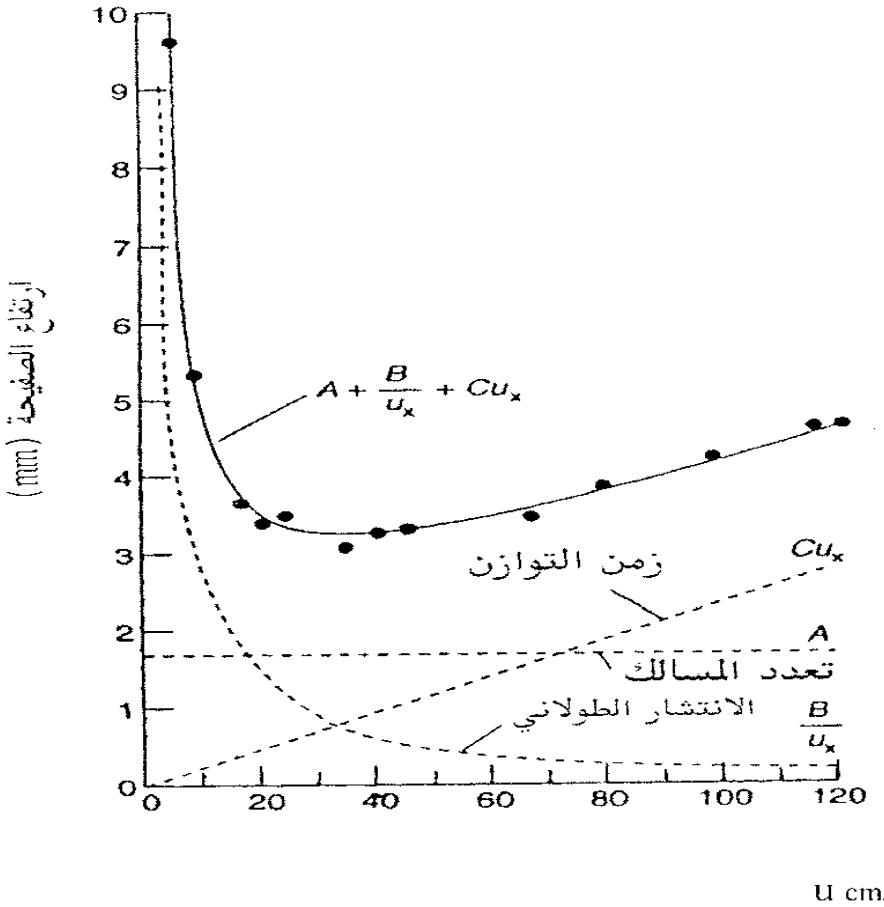


الشكل (11): انتشار الحلالة في السطح البيني ما بين الطورين

تأتي المساهمة في تعريض القمة الكروماتوغرافية عندما تكون حركة الحلالة باتجاه السطح البيني ليست بالسرعة الكافية للحفاظ على توزع متوازن للحلالة ما بين الطورين. لذا تتحرك جزيئات الحلالة في الطور المتحرك في العمود لفترة أكبر عما هو متوقع قبل الوصول الى الطور الساكن، ومن ناحية أخرى جزيئات الحلالة في الطور الساكن تأخذ زمن أكبر مما هو متوقع للعبور للطور المتحرك، أي عدم تحقق التوازن ما بين الطورين.

إن العامل المساهم لمقاومة نقل الكتلة في إرتفاع الصفيحة النظرية يكون أصغر ما يمكن عند السرعات البطيئة للطور المتحرك (ذلك لأن السرعات العالية تمنع الحلالة من الوصول الى حالة التوازن ما بين الطورين) وعند استخدام مواد تعبئة للعمود بأقطار صغيرة وكذلك طور ساكن شديد الرقة (فيلمي القوام).

تشير علاقة فان ديميتر (Van Deemter) إلى أن تعريض القمة الكروماتوغرافية غير متعلق بالسرعة الخطية للطور المتحرك في الحد الأول (A) ، بينما يتناسب عكسياً مع السرعة الخطية في الحد الثاني (B) ، كما يتناسب خطياً مع السرعة الخطية في الحد الثالث (C).لكن تساهم الحدود الثلاثة في تعريض القمة الكروماوتوغرافية. لاحظ الشكل (12) الذي يوضح ذلك بيانياً.



الشكل (12): الشكل البياني لعلاقة فان ديميتر (Van Deemter)

- معامل التفريق أو التباين : Resolution

وهو يحدد كفاءة العمود لفصل مكونين متجاورين ويحسب من العلاقة التالية:

$$Rs = \frac{(t_2 - t_1)}{\frac{1}{2}(t_{w1} + t_{w2})}$$

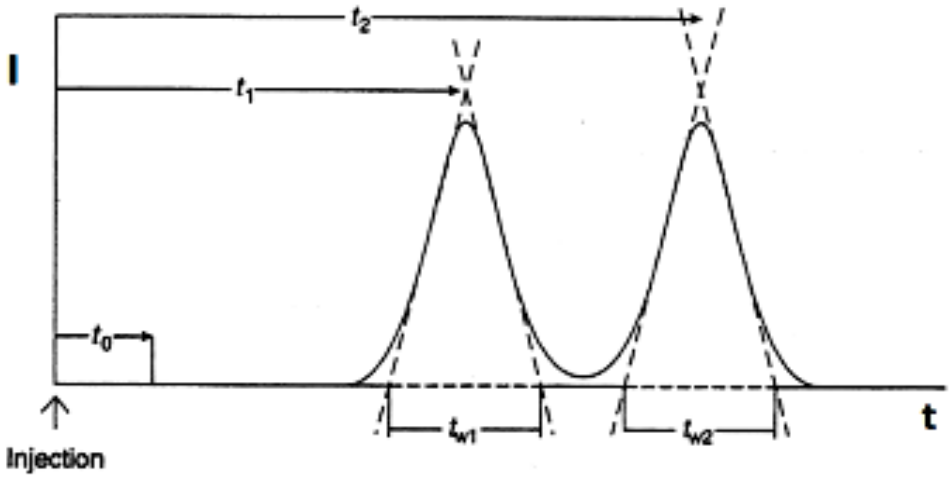
حيث أن :

Rs يمثل معامل التفريق أو التباين

t_1 و t_2 يمثلان أزمنة الاحتفاظ للمكون الأول والثاني على الترتيب

t_{w1} و t_{w2} يمثلان عرض القمة عند خط الأساس للمكون الأول والثاني على الترتيب.

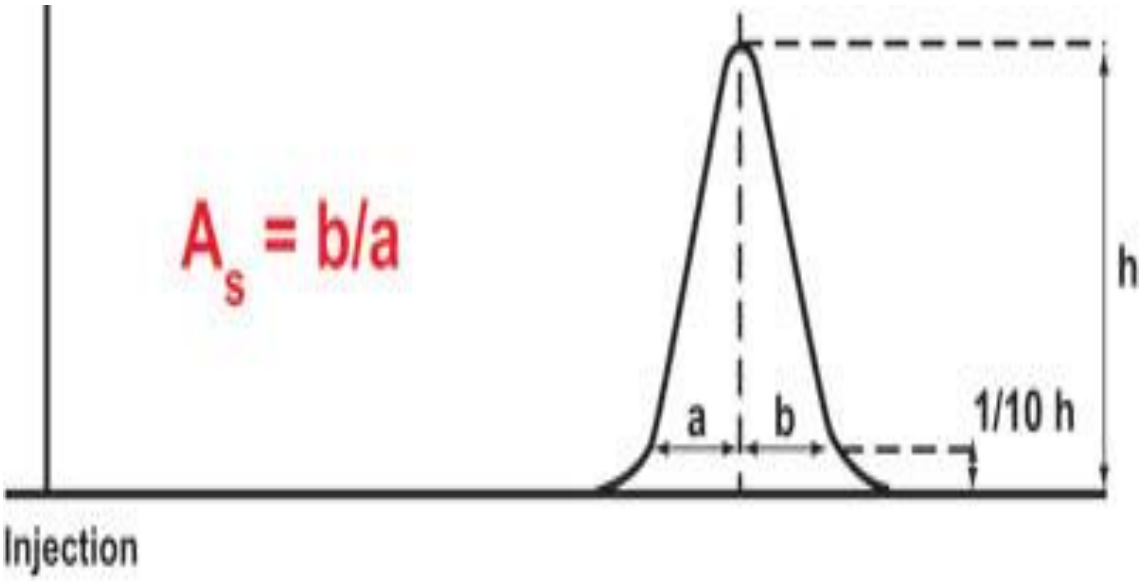
وعندما تكون قيمة Rs أكبر من 1.5 يكون الفصل بين القمتين مقبول ،أما إذا كانت القيمة أصغر يحصل تداخل بين القمتين. لاحظ الشكل رقم (13) الذي يوضح ذلك.



الشكل (13): كروماتوغرام يوضح طريقة حساب معامل التفريق

ـعامل اللاتناظر Asymmetry factor

يبين هذا العامل مدى تناظر القمة الكروماتوغرافية (البيك) كما في الشكل رقم (14)



الشكل (14): عامل اللاتناظر

ويعرف عامل اللاتناظر Asymmetry factor (As) بعامل التذنب أو التذييل ويرمز له أيضاً بالرمز Tailing factor (Tf) يحسب من العلاقة :

$$A_s = b/a$$

حيث :

a : تمثل عرض القمة من بدايتها حتى ذروة القمة وذلك عند ارتفاع 10% منها.

b : تمثل عرض القمة من نهايتها حتى ذروة القمة وذلك عند ارتفاع 10% منها.

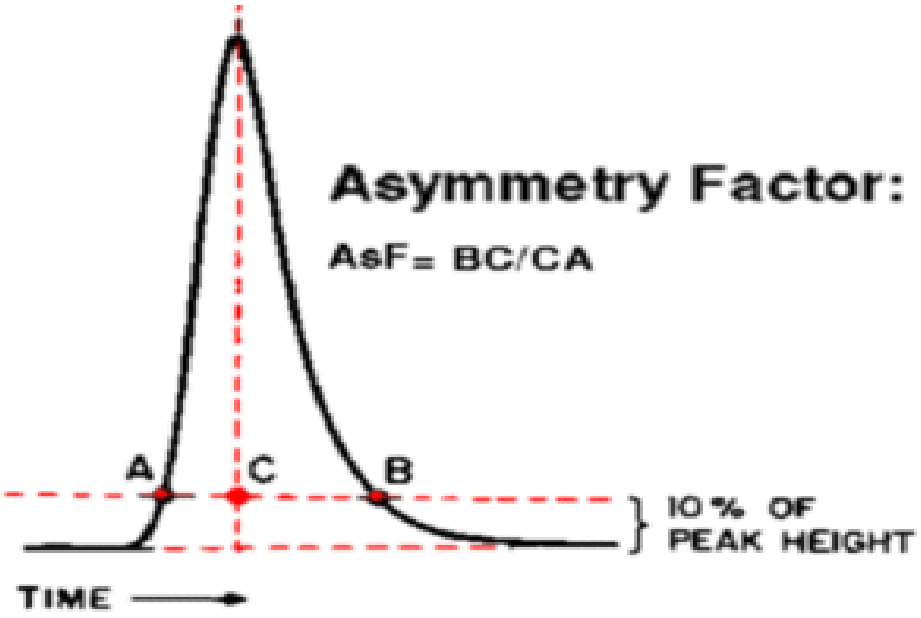
وهناك ثلاث قيم لعامل اللاتناظر وهما :

1- عندما تكون قيمة $A_s = 1$:

يقال عن القمة متناظرة (Symmetry Peak) كما هي الحالة في الشكل السابق.

2- عندما تكون قيمة $A_s > 1$:

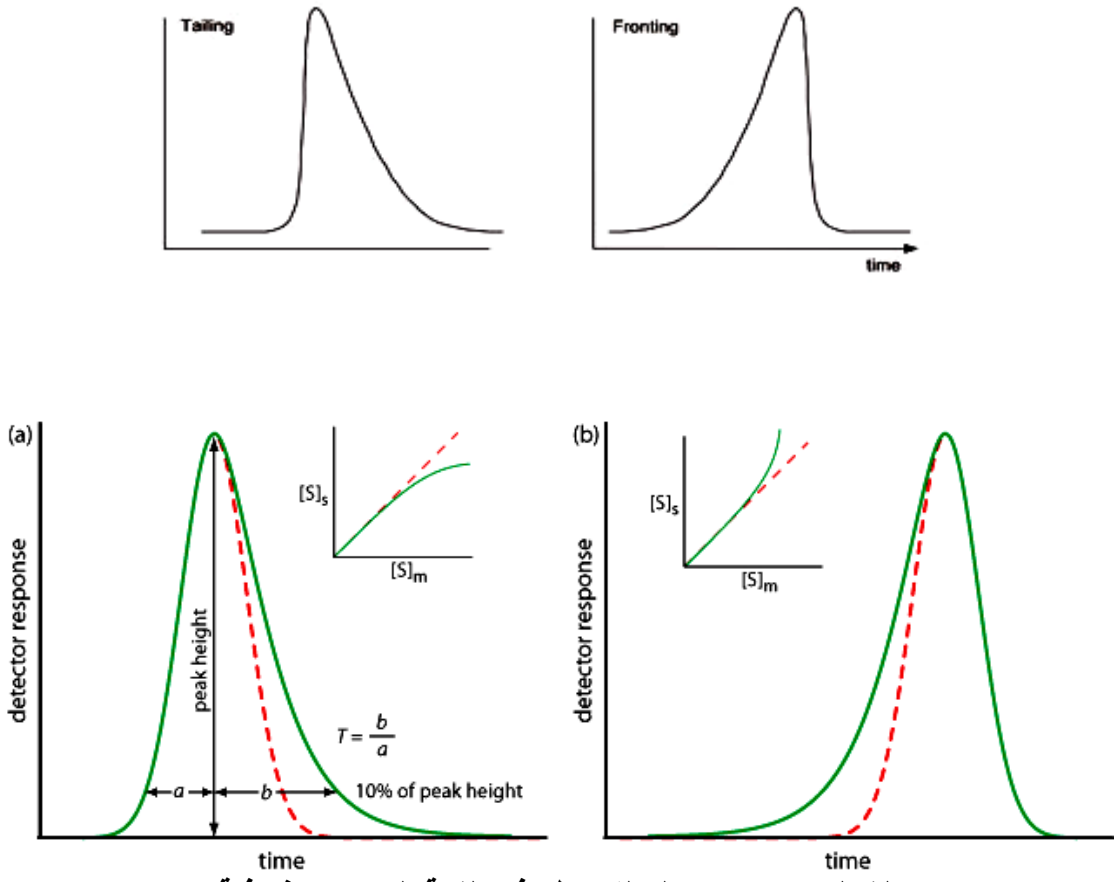
يقال عن القمة أنها غير متناظرة (Asymmetry Peak) وتمتلك القمة ظاهرة التذنب أو الذيل (Tf) Tailing Factor حيث تكون نهاية القمة متأثرة بعدم التناظر وأغلبية القمم الكروماتوغرافية تمتلك ظاهرة التذنب ،كما هي في الشكل رقم (15) التالي :



الشكل (15): عامل التذنب Tailing Factor

3- عندما تكون قيمة $A_s < 1$:

يقال عن القمة أنها غير متناظرة (Asymmetry Peak) وتمتلك القمة ظاهرة الجبهي (Fronting Factor) حيث تكون بداية القمة متأثرة بعدم التناظر.لاحظ الشكل رقم (16) الذي يوضح عامل اللاتناظر في القمة الكروماتوغرافية .



الشكل (16) : عامل اللاتناظر في القمة الكروماتوغرافية

(Fronting Factor +Tailing Factor)

4-5- مزايا الطرائق الكروماتوغرافية:

- يمكن إتمام الفصل الكروماتوغرافي بكفاءة عالية حينما تفشل طرق الفصل الأخرى في فصل المواد المعقدة . وسبب ذلك أن أي فرق في قوى الادمصاص أو التجزئة يتضاعف

كثيرا عند مرور العينة داخل النظام الكروماتوغرافي.

- لاتسبب الطرق الكروماتوغرافية تفكك المواد المراد فصلها بمعنى أن المادة بعد فصلها يمكن الحصول عليها في حالتها الأصلية.
- استخدام كميات قليلة جداً من العينة كافٍ لإنجاز الفصل أو التحليل (عدة ميكروليترات)
- التكلفة المنخفضة وبخاصة في حالة كروماتوغرافيا الورقية والطبقة الرقيقة.

4-6- اختيار الطريقة المناسبة لفصل مادة ما:

هناك بعض الإرشادات التقريبية التي تساعد في اختيار الجملة الكروماتوغرافية المناسبة والجدول التالي يبين طريقة الفصل الكروماتوغرافي المناسبة لنوع العينات.

الجدول (1): يبين طريقة الفصل الكروماتوغرافي المناسبة لنوع العينات.

طبيعة المواد المراد فصلها	الطريقة المناسبة
مواد متشابهة في الخواص الكيميائية	كروماتوغرافيا التجزئة
مواد مختلفة في الخواص الكيميائية	كروماتوغرافيا الإدمصاص
مواد طيارة	كروماتوغرافيا غازية
مواد غير طيارة	كروماتوغرافيا سائلة HPLC
مواد متأينة وغير عضوية	كروماتوغرافيا التبادل الإيوني أو المستوية
مواد متأينة من مواد غير متأينة	كروماتوغرافيا التبادل الإيوني
مواد بيولوجية ومركبات ذات وزن جزيئي عالي	الكروماتوغرافيا المنخلية GPC و كروماتوغرافيا الإلفة

الفصل الخامس

الكروماتوغرافيا المستوية
Plane Chromatography

5-1- المقدمة:

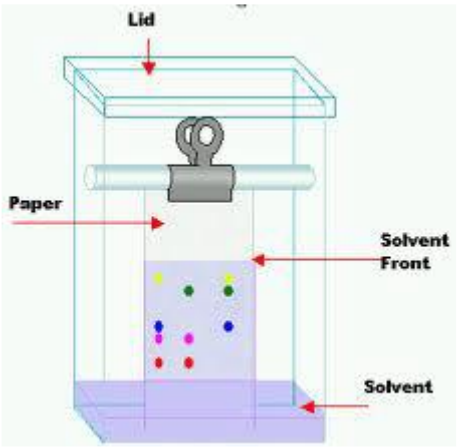
يوجد نوعين من الكروماتوغرافيا المستوية : إحداهما تسمى بالكروماتوغرافيا الورقية والأخرى تسمى بكروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة والطريقتين متشابهتين تماما باستثناء أن كروماتوغرافيا الورق تعمل بآلية التجزئة (سائل - سائل) أما كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة فتعمل بآلية الإدمصاص (صلب - سائل).

في الطرق الكروماتوغرافية المستوية يتم إجراء عمليات الفصل الكروماتوغرافي على سطح مستو بدلا من استخدام عمودا معبأ ، وهذه الطرق كما سنرى بسيطة ولكن ذات كفاءة وحساسية عاليتين ولندرس كل طريقة على حدة.

5-2- الكروماتوغرافيا الورقية :Paper Chromatography

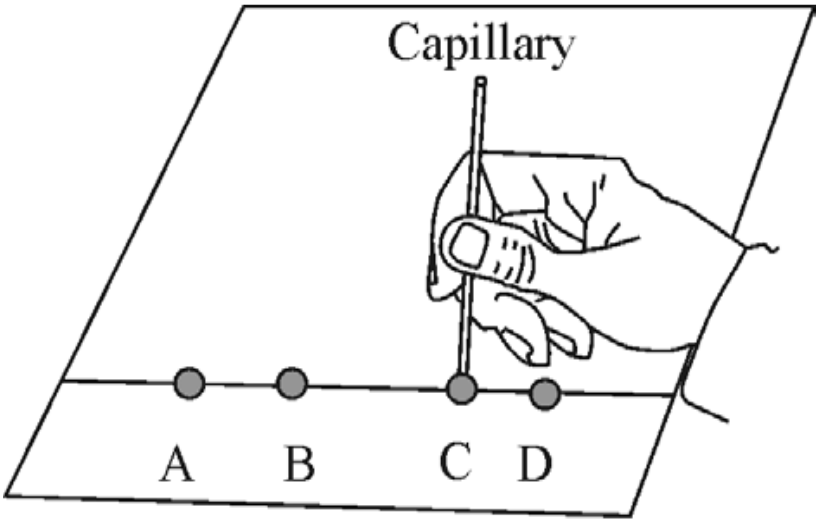
هي نوع خاص من الكروماتوغرافيا السائلة–السائلة حيث أن الطور الثابت عبارة عن الماء الموجود في بنية الورقة (السيليلوز) إذاً الطور الثابت سائل وهو الماء المحيط بالسيليلوز مثبت أساساً على ورقة الترشيح وورقة الترشيح نفسها تعمل فقط كدعامة صلبة . أما الطور المتحرك فهو مذيب عضوي لا يمتزج بالماء ، وإذا تمت معالجة الورقة بإدخال مجموعات أمينو أو مجموعات كربوكسي أوغيرها من المجموعات القطبية فيمكن عندئذ استخدام الماء

أو استخدام مذيب يمتزج مع الماء كطور متحرك لاحظ الشكل التالي الذي يوضح عملية الفصل على ورقة كروماتوغرافية.



الشكل(1): عملية الفصل على ورقة كروماتوغرافية

توضع كميات صغيرة من العينات المختلفة بوساطة ميكروماصة (10– 200 µg) على خط مرسوم في بداية الورقة بحيث تبدو العينات على هيئة بقع على هذا الخط لاحظ الشكل رقم (2) كيفية وضع العينات على الطبقة الرقيقة وبعد ذلك تغمس بداية الورقة في المذيب (الطور المتحرك) في جو مغلق وذلك للحفاظ على جو مشبع ببخار الطور المتحرك .



(a)

الشكل(2): كيفية وضع العينات على الطبقة الرقيقة

يمكن إجراء عملية الفصل بطريقة الفصل أحادي الاتجاه وإذا كانت البقع متجاورة يمكن أن نلجأ للفصل ثنائي الاتجاه.

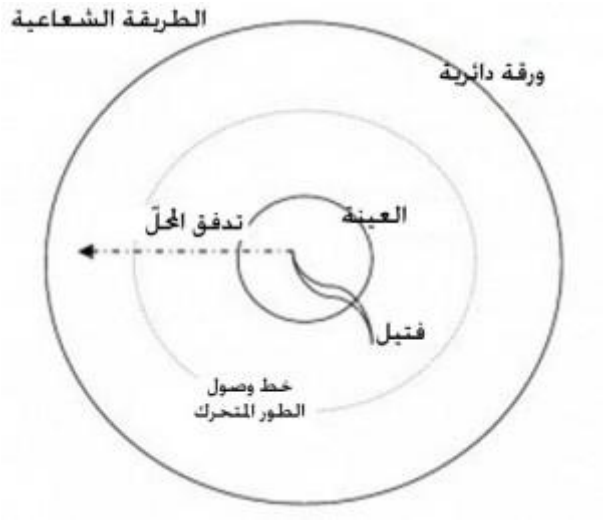
1-الفصل أحادي الاتجاه : Mono-Dimension Separation

يمكن أن يتم سريان الطور المتحرك خلال الورقة ماراً ببقع العينات بثلاث طرق :

1- طريقة مرور الطور المتحرك صاعدا خلال الورقة من أسفل إلى أعلى (ascending solvent) وفيها يوضع طرف الورقة القريب من بقع العينات في إناء خاص يحتوي الطور المتحرك ، فيرتفع المذيب بالخاصة الشعرية للورقة (عكس اتجاه قوة الجاذبية) حاملا معه مكونات العينات بسرعات متفاوتة . وتتوقف عملية الفصل بمجرد وصول المذيب إلى الطرف العلوي للورقة وهي الطريقة الأكثر إستخداما.

2- طريقة مرور المذيب هابطاً خلال الورقة من أعلى إلى أسفل (descending solvent) وفيها يوضع طرف الورقة القريب من العينات في إناء موجود أعلى وعاء الفصل فيتحرك المذيب عبر الورقة بالخاصة الشعرية وقوة الجاذبية حاملا معه مكونات العينة بسرعات متفاوتة .

3- طريقة انتشار المذيب أفقيا (Horizontal Technique) تستخدم في هذه الطريقة ورقة دائرية وتوضع العينة في مركزها ويتم دخول الطور المتحرك إلى مركز الورقة فيتحرك المذيب في الورقة على شكل دائري وذلك بالخاصية الشعرية للورقة كما في الشكل التالي:

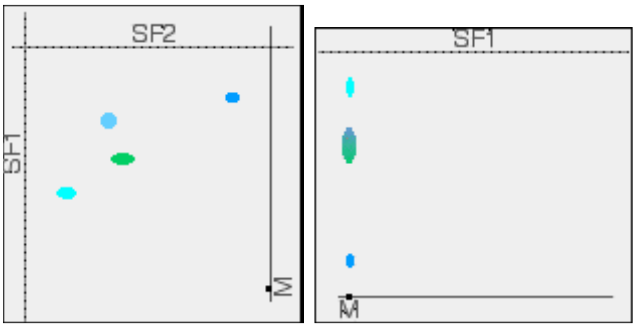


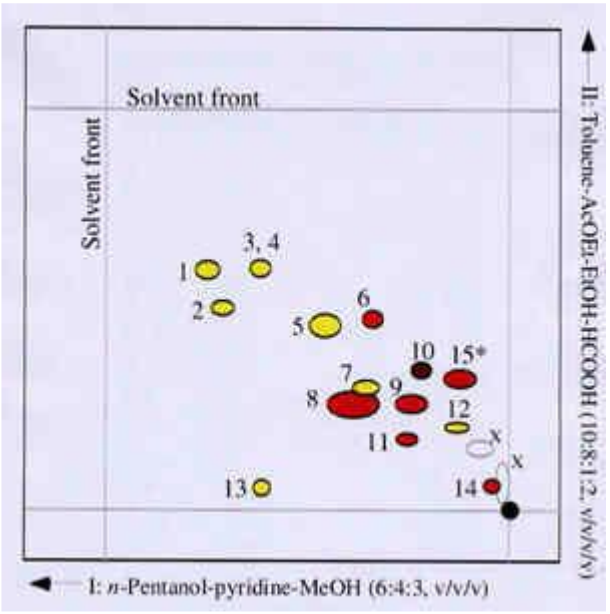
الشكل(3): كروماتوغرافيا الورقية الدائرية

2- الفصل ثنائي الأبعاد : Two-dimensional Separation

نلجأ لهذه الطريقة في حالة فصل المزائج المعقدة حيث يصعب فصل جميع مكونات المزيج بطور متحرك واحد فقط ، لذلك يتم الفصل أولاً في اتجاه معين للورقة وباستخدام مذيب معين.

وبعد ذلك يتبخر هذا المذيب وتدار الورقة بزاوية 90 درجة ثم يستخدم مذيب آخر لإتمام عملية الفصل كما في الشكلين التاليين:





الشكل (4): الفصل ثنائي البعد

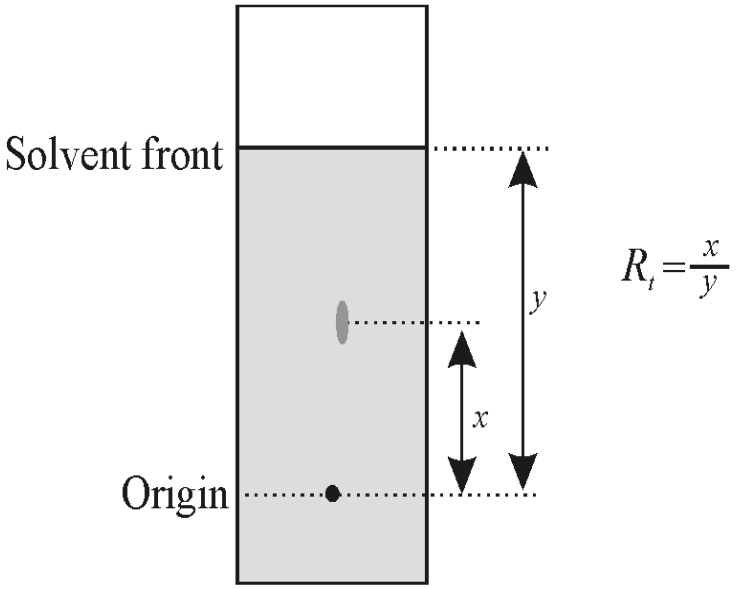
5-3-التحليل النوعي في الكروماتوغرافيا الورقية Qualitative analysis in PC

أثناء تحرك الطور المتحرك (المذيب) تتوزع مكونات العينة بين الطورين الثابت والمتحرك ولهذا فهي تسير في سرعات مختلفة عبر الورقة تبعا لذلك التوزيع .
بعد إنتهاء عملية الفصل نفتش عن موقع البقع المفصولة وهي مرحلة إظهار البقع عن طريق رش الورقة بكاشف يشكل ألواناً مع المواد المفصولة وذلك لتوضيح مكان كل مادة على الورقة ، أو باستخدام الأشعة فوق البنفسجية ويتم رسم البقع المفصولة بوساطة قلم رصاص للتمكن من تحديد مركز البقعة ثم نحسب قيمة معامل التأخير(Retardation factor) Rf لكل مكون ونقارنه مع قيمة عامل التأخير للمادة الشاهدة والتي خضعت لنفس شروط الفصل التي خضعت لها العينة كنوع الورق ونوع الطور المتحرك وتركيبه وزمن الفصل حيث :

معامل التأخير = المسافة التي تقطعها المادة / المسافة التي يقطعها الطور المتحرك :

$$R=X/Y$$

X حيث المسافة المقاسة من خط البداية حتى مركز البقعة بالسنتيمتر
Y المسافة المقاسة من خط البداية حتى خط الجبهة (خط نهاية الطور المتحرك) بالسنتيمتر.لاحظ الشكل رقم (5) يوضح كيفية حساب قيمة Rf في الكروماتوغرافيا الورقية.



الشكل (5): كيفية حساب قيمة Rf في الكروماتوغرافيا الورقية

من الواضح أن Rf تقابل معامل التوزيع K_D في الطرق الكروماتوغرافية الأخرى ، كما أن قيمة R_f لايمكن أن تتعدى الواحد.

5-4- التحليل الكمي في الكروماتوغرافيا الورقية Quantitative analysis in PC

بعد تحديد مكان البقعة يمكن إجراء التحليل الكمي من خلال :

1- قص البقعة واستخلاها بمحل مناسب ثم تحديد التركيز بالطرائق الطيفية .

2- يمكن إجراء التحليل الكمي أيضا بعد تحديد مكان البقعة بمعالجة الورقة بكاشف مناسب يسمح بتلوينها ، ثم تحديد سطح البقعة الذي يتناسب طردا كمية المادة أو تركيزها.

ويمكن الإستعانة بجدول للمذيبات ورتب بحسب القوة القطبية لهذه المذيبات على طبقة لسيليكاجل وعلى طبقة الألومينا (Eluotropic Series) لاحظ الجدولين التاليين:

الجدول (1): يوضح القوة القطبية لهذه المذيبات على طبقة الألومينا (Eluotropic Series)

Eluotropic Series for Alumina	
Solvent	**Solvent strength**
n- Pentane	0.00
Hexane	0.01
Cyclohexane	0.04
Carbon tetrachloride	0.18
Toluene	0.29
Chloroform	0.40
Methylene chloride	0.42
Tetrahydrofuran	0.45
Acetone	0.56
Ethyl acctate	0.58
Aniline	0.62
Acetonitrile	0.65
Ethonol	0.88
Methanol	0.95
Acetic acid	large

الجدول (2): يوضح القوة القطبية لهذه المذيبات على طبقة السيليكاجل (Eluotropic Series)

Eluotropic Series for Silica gel	
Solvent	**Solvent strength**
bentan	0.00
hexan	0.01
carbon tetrachloride	0.18
toluene	0.22
chloroforme	0.29
dichloromethane	0.30
diethyl ether	0.43
ethyl acetate	0.48
acetone	0.53
n-propanol	0.60
methanol	0.70
water	large

5-5- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin- Layer Chromatography

5-5-1- المقدمة:

تستخدم كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة في عمليات الفصل السريع وفي تحليل المواد كماً ونوعاً ويعود ذلك للأسباب التالية :

1 . بساطة الطريقة وعدم الحاجة إلى أجهزة معقدة .

2 . إمكانية الوصول إلى جودة الفصل نفسها التي تعطي الطرق الكروماتوغرافية الأخرى.

3 . إمكانية الوصول إلى فصل انتقائي باستخدام كواشف خاصة .

5-5-2- المبدأ العام لكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة :

تتم عملية الفصل الكروماتوغرافي باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على طبقة رقيقة من الطور الثابت المفروش (المثبت) على ألواح مصنوعة من الزجاج أو البلاستيك أو المعدن.

ومن أكثر المواد التي تستعمل كطور ثابت هي السيليكاجيل (silica gel) أو السيليكاجيل المعدل كيميائياً أو الألومينا AL_2O_3 أو السيليللوز الذي يستعمل في الكروماتوغرافيا الورقية كما تستخدم بعض المركبات كالبولي أميد ومشتقاته ومبادلات أيونية أيضاً .

وأكثر المواد المستعملة في التحليل الكروماتوغرافي كطور ثابت هو السيليكاجيل وله عدة أنواع ولنذكر منها :

1 . سيليكاجيل ذو حبيبات رقيقة Silica gel H.

2 . سيليكاجيل يحتوي على 13 % كبريتات الكالسيوم Silica gel G .

3 . سيليكاجيل مضاف إليه دليل فلورة Silica gel GF .

4 . سيليكاجيل يحتوي عل 5 % كبريتات الكالسيوم Silica gel R .

5 . سيليكاجيل مضاف إليه دليل غير عضوي مفلور Silica gel D5 .

6 . سيليكاجيل يحتوي على النشاء كمادة لاصقة Silica gel DF5 .

حيث تتحكم أقطار جزيئات الطور الثابت في كفاءة الفصل فمثلاً الطبقات التي تمتلك أقطار حبيبات السيليكاجيل ما بين 1- 5 ميكرون تؤدي إلى فصل أفضل من الجزيئات الكبيرة الأقطار والتي تؤدي إلى فصل غير جيد .

ويستخدم عادة في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة كطور متحرك محل مناسب أو مزيج من المحلات المناسبة لعملية الفصل .

ومبدأ التحليل في هذه الطريقة يشابه تماماً الأنواع الأخرى من الكروماتوغرافيا حيث يعتمد على توزع المادة بين طورين ، طور متحرك يمارس فعل الجر على المركبات المراد تحليلها وطور ثابت يمارس فعل الإعاقة (التأخير أو الاحتفاظ) على المركبات وباختلاف المعاملين السابقين على مكونات العينة يؤدي فصل المكونات عن بعضها بعضاً نتيجة انتقالها بسرعات مختلفة .ولابد من الإشارة إلى أن آلية الفصل في هذا النوع من التحليل يعتمد بشكل كبير على ظاهرة الامتزاز والتي هي شائعة جداً في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة .

5-5-3- خطوات التحليل بكروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة :

1 . تجهيز ألواح الطبقة الرقيقة

توجد عدة طرق لتحضير الطبقة الرقيقة حيث يتم انتقاء الطور الثايت المراد استعماله ولنفرض أنه السيليكاجيل ، حيث يخلط السيليكاحيل مع بعض المواد الأخرى المراد إضافتها لتحسين أداء الطور الثابت .

فمثلاً يضاف إلى مكونات الطور الثابت كمية من المواد المفلورة التي تتفلور عند تسليط الضوء عليها مما يسهل عملية كشف المواد المفصولة بسهولة ، ثم يتم إضافة المواد اللاصقة وتمد على اللوح بحيث تمتلك نفس السماكة ويوجد طرائق عديدة لتحميل الطبقة الرقيقة على اللوح ومن هذه الطرق:

1 . طريقة المد : حيث يتم خلط المكونات التي تؤلف الطور الثابت مع المواد اللاصقة وتمد بشكل متناسق أي بنفس السماكة على اللوح ثم يترك ليجف .

2 . طريقة الصب : يتم صب الطور الثابت على اللوح المستعمل بشكل قالب .

3 . طريقة الغمر : يتم غمر اللوح في محلول من المادة المازة (الطور الثابت) لفترة زمنية من ثم يخرج اللوح ويترك ليجف .

4 . طرقة الرش : احياناً يرش الطور الثابت على لوح بشكل منتظم ومتجانس السماكة ومن ثم يترك ليجف .

في كثير من الأحيان يتم شراء ألواح الطبقات الرقيقة من بعض الشركات المنتجة وهي تأتي مصنعة وجاهزة للاستعمال ، وهي بجودة عالية وبانواع مختلفة مما يسهل عملية إجراء التحليل باستخدام الطبقة الرقيقة .

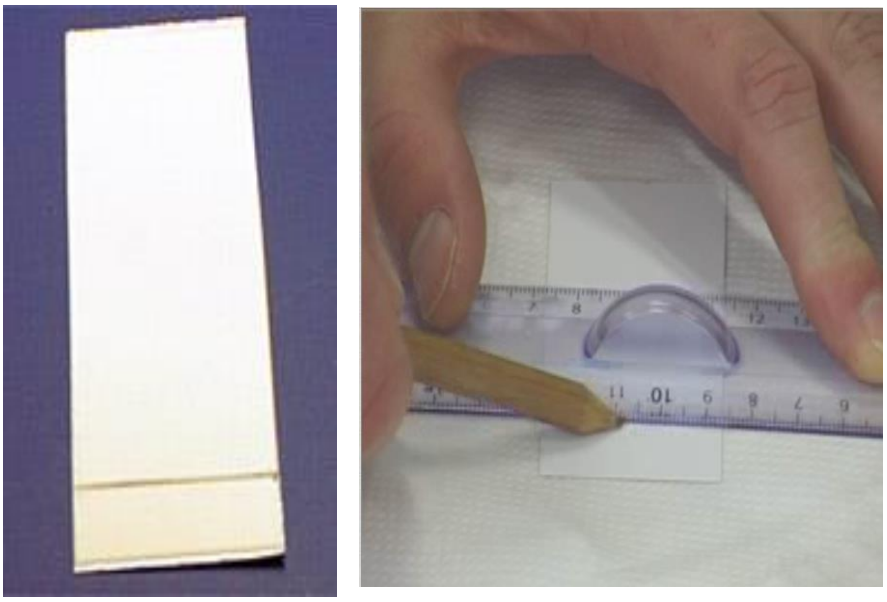
2 . اختيار الطور المتحرك

يعتمد اختيار الطور المتحرك على نوعية المواد المراد فصلها فمنها القطبية العالية مثل محاليل الحموض المعدنية ومنها الأطوار الغير قطبية مثل الإيتر والكلوروفورم والبنزين وهي من المحلات التي تستخدم بصورة واسعة لفصل العديد من المركبات .

وجرت العادة يتم استعمال طور متحرك غير قطبي عندما يتم استعمال طور ثابت قطبي ، ويتم استعمال طور متحرك قطبي عند استعمال طور ثابت غير قطبي . واحياناً يستعمل مزيج من المحلات بغية تحسين الفصل بين مكونات العينة .

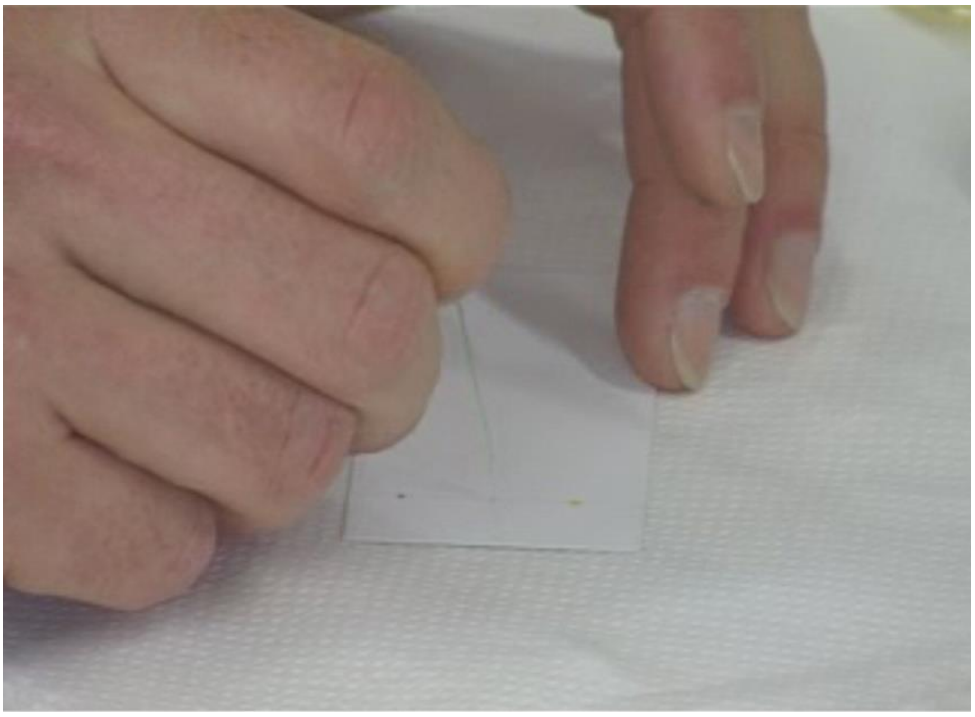
3 . وضع العينة على الطبقة الرقيقة

قبل وضع العينة على اللوح يتم رسم خط البداية Start line (ويسمى أحياناً خط المنشأ Origin line) على بعد 2 سم من الحافة السفلية للشريحة أو اللوح وذلك باستخدام مسطرة وقلم رصاص ، لاحظ الشكل رقم (5) الذي يوضح ذلك .



الشكل (5) : طريقة رسم خط البداية على الطبقة الرقيقة

ثم يتم وضع حجم معين في حدود من 5 . 20 ميكروليتر من العينة التي تركيزها بحدود 0.1 . 5 % حجماً بواسطة إبرة مكروية أو ماصة مكروية على خط البدء الذي يبعد 2 سم عن الحافة السفلية للشريحة ويتم وضع العينة على شكل بقعة ، حيث ينبغي ألا يزيد قطر البقعة عن 1 سم ، وللمحافظة على بقاء البقعة صغيرة توضع العينة بأحجام صغيرة ثم يتم الانتظار حتى الجفاف ويعاد مرة أخرى وضع حجم آخر من العينة وينتظر ثانية حتى تجف البقعة . لاحظ الشكل رقم (6) الذي يوضح طريقة وضع العينة على خط البداية باستعمال انبوب شعري .

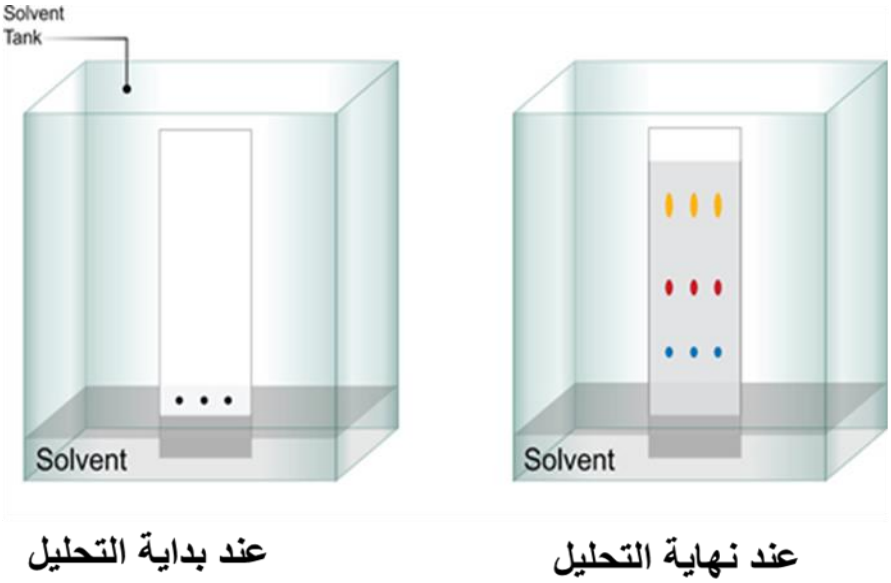


الشكل (6) : طريقة وضع العينة على خط البداية

4 . إجراء التحليل بالطبقة الرقيقة

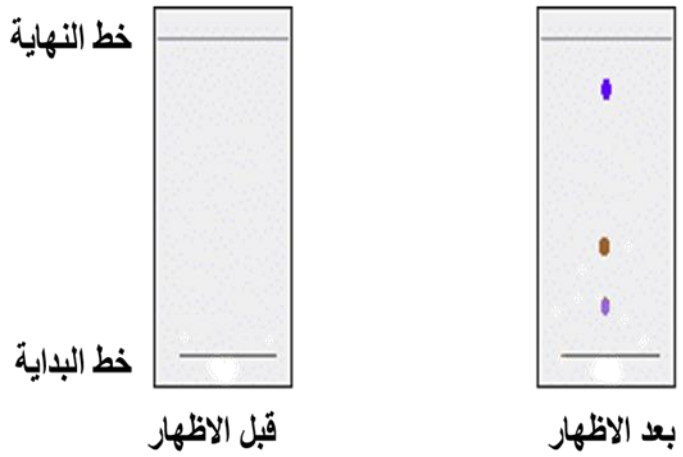
بعد جفاف البقعة تغمس الشريحة في حوض يحتوي على الطور المتحرك الذي يكون ارتفاع مستوى سطح السائل فيه لايتجاوز 1سم أي يجب أن يكون مستوى سطح الطور المتحرك في الحوض أقل من ارتفاع خط البداية المرسوم على الطبقة الرقيقة وفي حال البقعة لامست سطح السائل سوف تنتشر ضمن الطور المتحرك وبالتالي سوف تنحل مكونات البقعة ضمنه وهذا ما يؤدي إلى فشل عملية التحليل تماماً.

من ثم يتم إغلاق الحوض والانتظار، وبعد وقت قصير يبدأ الطور المتحرك في الانتقال نحو الأعلى (وفق الخاصة الشعرية) جاراً البقعة التي تحتوي على مكونات العينة ويبدأ فصل المكونات حسب قدرة الامتزاز على سطح الطور الثابت وينتج عن ذلك فصل بقع المزيج إلى عدة بقع . لاحظ الشكل (7) الذي يوضح طريقة إجراء التحليل بالطبقة الرقيقة .



الشكل رقم (7) : طريقة إجراء التحليل في كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة

وعندما تقترب جبهة المحل من نهاية اللوح بحدود 2 سم يخرج اللوح من الحوض ويرسم بقلم رصاص خط النهاية (المكان الذي وصل إليه الطور المتحرك) ، لاحظ الشكل رقم (8) الذي يوضح خط البداية وخط النهاية . من ثم يترك اللوح الزجاجي حتى يجف تلقائياً في درجة حرارة الغرفة أو يمكن وضعه في فرن درجة حرارته لا تتجاوز ^{o}C 105 وذلك حتى يجف .



الشكل رقم (8) يوضح خط البداية وخط النهاية على الصفحية الكروماتوغرافية

5 . تظهير البقع

عندما تكون البقع المفصولة ملونة يمكن رؤيتها بسهولة بالعين المجردة وهذا يسهل بشكل عام معرفة المسافة التي قطعها كل مكون من العينة كما يمكن تحديد مساحة هذا المكون على الطبقة الرقيقة .

أما إذا كانت مكونات العينة غير ملونة (أي غير مرئية) بالتالي هنا يجب ايجاد وسيلة حتى يتم إظهار البقع وهناك طرائق متعددة لإظهارها نذكر منها :

1 . استخدام كواشف كيميائية :

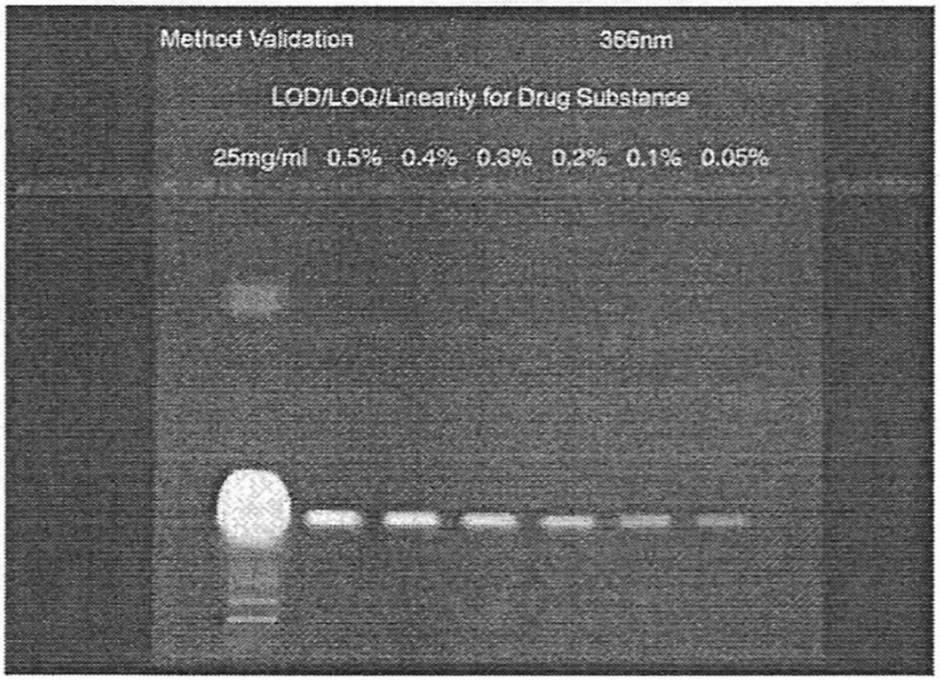
هنا يتم رش الصفيحة بمادة كيميائية على شكل رذاذ ونتيجة تفاعل الرذاذ مع المكون تتلون البقعة أي ينتج لوناً خاصاً نتيجة اتحاد المكون مع رذاذ المادة الكاشفة . فمثلاً يتم استخدام اليود للكشف عن النشاء الذي يعطي لوناً أزرق للبقعة الخاصة بالنشاء .

2 . استخدام الأشعة فوق البنفسجية :

لإظهار البقع يتم استخدام في كثير من الحالات جهاز الأشعة فوق البنفسجية . حيث يتم وضع الصفيحة المراد إظهار مكوناتها ضمن جهاز الكشف ويشغل الجهاز فيضيئ مصباح الأشعة فوق البنفسجية بأطوال موجات مختلفة فتظهر المكونات بشكل بقع براقة ساطعة على الصفيحة لاحظ الشكل رقم (9) الذي يوضح جهاز إظهار البقع الذي يعمل في مجال

الأشعة فوق البنفسجية والشكل رقم (10) يوضح المركبات المفصولة كما تبدو بعد إظهارها في الجهاز.

الشكل (9) : جهاز إظهار البقع الذي يعمل في مجال الأشعة فوق البنفسجية



الشكل (10) مركبات مفصولة بتراكيز مختلفة كما تبدو بعد إظهارها في جهاز الأشعة فوق البنفسجية

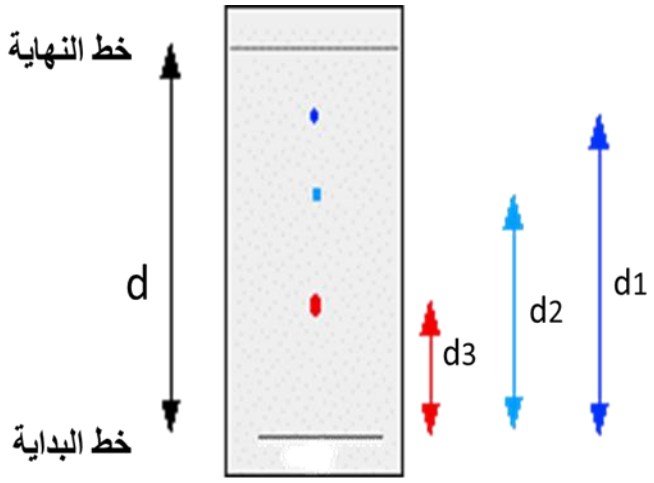
وهناك بعض الطبقات الرقيقة التي تم أثناء تصنيعها إضافة مادة متألقة إلى الطور الثابت وهي تسبب أثناء إظهارها للمكونات المفصولة في الأجهزة إخماد التألق (Quenching fluorescence) أي ستظهر المواد المفصولة على هيئة بقع سوداء على الصفيحة عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية .

6 . التقدير الكيفي والكمي

أ . التقدير الكيفي :

غالباً ما يتم في كروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة وضع بقعة العينة المجهولة مع بقعة المادة القياسية (Standard) جنباً إلى جنب على صفيحة التحليل وبذلك يتم التحليل الكيفي من خلال المقارنة بما يعرف معامل التأخير (Retardation factor) والذي يرمز له R_f والذي يعرف على أنه يمثل النسبة ما بين المسافة التي قطعها المكون على المسافة التي قطعها المحل (الطور المحرك) .لاحظ العلاقة التالية والشكل رقم (11) الذي يوضح طريقة حساب معامل التأخير .

$$R_f = \frac{\text{المسافة التي قطعها المكون}}{\text{المسافة التي قطعها المحل}}$$



الشكل (11) : طريقة حساب معامل التأخير R_f

حيث يحسب معامل التأخير للمكون الأول $R_{f,1}$ من العلاقة :

$$R_{f,1} = \frac{d1}{d}$$

حيث يحسب معامل التأخير للمكون الثاني $R_{f,2}$ من العلاقة :

$$R_{f,2} = \frac{d2}{d}$$

حيث يحسب معامل التأخير للمكون الثالث $R_{f,3,}$ من العلاقة:

$$R_{f,3} = \frac{d3}{d}$$

حيث **d** تمثل المسافة التي قطعها الطور المتحرك . بينما $\mathbf{d_1}$ ، $\mathbf{d_2}$ ، $\mathbf{d_3}$ تمثل المسافة التي قطعها كل من المكون الأول والمكون الثاني والمكون الثالث على الترتيب .
ومن مقارنة قيم ال R_f لمكونات العينة مع قيم ال R_f للمواد القياسية يتم التعرف على نوعية المكونات .

ب . التقدير الكمي :

لإجراء التحليل الكمي هناك طرائق عديدة يمكن اللجوء إليها ولندرس منها :

1 . طريقة المقارنة البصرية :

يتم من خلال مقارنة الكثافة الضوئية للمكون المدروس مع الكثافة الضوئية للمادة القياسية.

2 . طريقة حساب مساحة سطح البقعة :

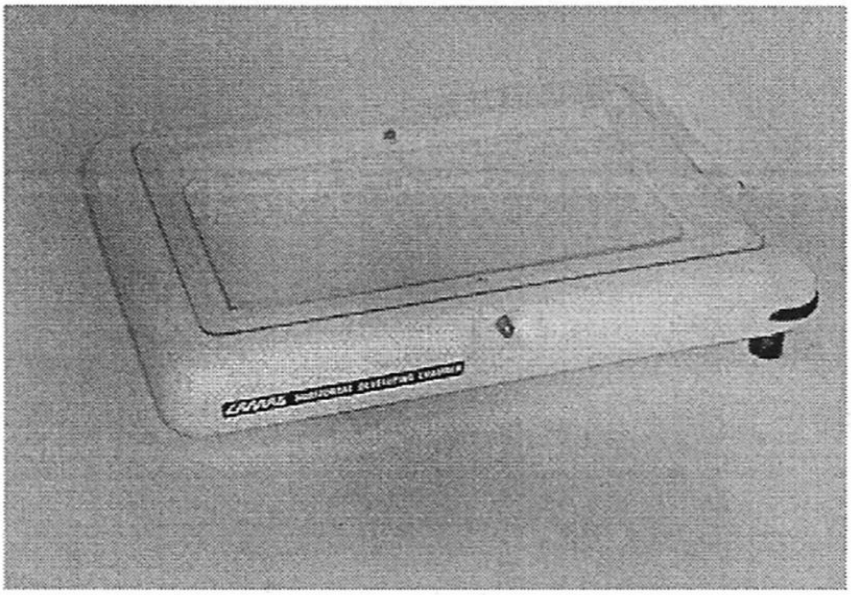
حيث يقارن مساحة سطح البقعة للمكون المفصول مع مساحة سطح البقعة للمادة القياسية المعلومة التركيز.

3 . طريقة الاستخلاص :

يتم في هذه الحالة قشط البقعة المفصولة بواسطة ألة حادة وتوضع في وعاء زجاجي وتذوب في محل مناسب وترشح للتخلص من الطور الثابت . ومن ثم يتم إجراء التحليل الكمي بإحدى الطرق التحليلية المعروفة كالتحليل الحجمي أو الطيفي أو أي طريقة أخرى يمكن تحديد تركيز المادة المدروسة فيها .

4 . طرائق أخرى :

هناك طرائق أخرى حديثة تعتمد على مقارنة البقعة المفصولة مع مواد قياسية معلومة التركيز باستعمال بعض الأجهزة الأخرى كما هي الحال في أجهزة المسح الطيفي الحديثة كما في الشكل (12) . حيث يتم استعمال هذه الأجهزة لتحديد المواد كمياً عن طريق قياس الكثافة الضوئية للبقعة عن طريق المسح الضوئي ومقارنته مع مادة قياسية وغالباً ما يتم وصل هذه الأجهزة مع الكومبيوتر لتخزين القيم التي تم الحصول عليها .



الشكل (12): ماسح ضوئي لقياس الكثافة الضوئية Densitometer

الفصل السادس

الكروماتوغرافيا الغازية

Gas Chromatography

6-1- مقدمة : Introduction

تستخدم تقنية الكروماتوغرافيا الغازية لفصل المركبات الطيارة بواسطة طور متحرك غازي يمر خلال الطور الثابت وعندما يكون الطور الثابت صلبا فإننا عندئذ نتكلم عن

الكوماتوغرافيا غاز – صلب الإمتزاز G.S.C يعتمد هذا النوع من الكروماتوغرافيا على خواص الامتزاز لمواد حشوة العمود المستخدمة لفصل العينات وبشكل خاص الغازات .إن مواد حشو العمود الشائعة الإستعمال هي السيليكاجل والفحم وإذا كان الطور الثابت سائلاً فإننا عندئذ نتكلم عن كروماتوغرافيا غاز – سائل G.L.C تنتشر المادة السائلة كطبقة رقيقة على مادة صلبة خاملة ويعتمد مبدأ الفصل على توزيع العينة ضمن وخارج الطبقة السائلة. إن مجال الأطوار السائلة الواسع وتحملها لدرجات الحرارة التي قد تصل إلى 400 درجة مئوية يجعل G.L.C أكثر أهمية وأكثر انتشاراً .

يجب أن تكون المركبات المراد فصلها أو تحليلها منحلة في الطور المتحرك وبالتالي أن تكون إما غازاً أو سائلاً في حالنها البخارية مما يتطلب أن تكون المركبات شديدة التطاير عند درجات حرارة العمود حتى يتمكن الطور المتحرك من جرها وبالنتيجة لا يمكن أن نطبق

هذه الطريقة إلا على المركبات القابلة للتطاير دون أن يطرأ عليها أي تغير كيميائي .

تصلح طريقة الفصل الكروماتوغرافي للغازات لفصل مخاليط تصل كمياتها إلى عدة

ميكروغرامات وذلك بتمرير العينة في الحالة البخارية عبر عمود فصل يحتوي على وسط ثابت سائل أو مادة صلبة ، فتتحرك مكوناتها بسرعات متفاوتة تبعا لدرجة غليانها أو ذوبانيتها أو إدمصاصها . ويستخدم في هذا النمط الكروماتوغرافي وسط متحرك غازي وتدخل العينة عمود الفصل في الحالة الغازية أيضا ومن هنا جاءت تسمية هذه الطريقة بكروماتوغرافيا الغاز .

6-2- مبدأ الكروماتوغرافيا الغازية :

يمر الغاز الحامل من اسطوانة مضغوطة خلال منظم الضغط الذي يتحكم في معدل سريان الغاز الحامل ويتم حقن العينة بوساطة إبرة حقن من خلال فتحة الحقن إذا كانت سائلة أو بوساطة صمام خاص إذا كانت العينة غازية ، وينفل الغاز الحامل مكونات العينة عبر العمود

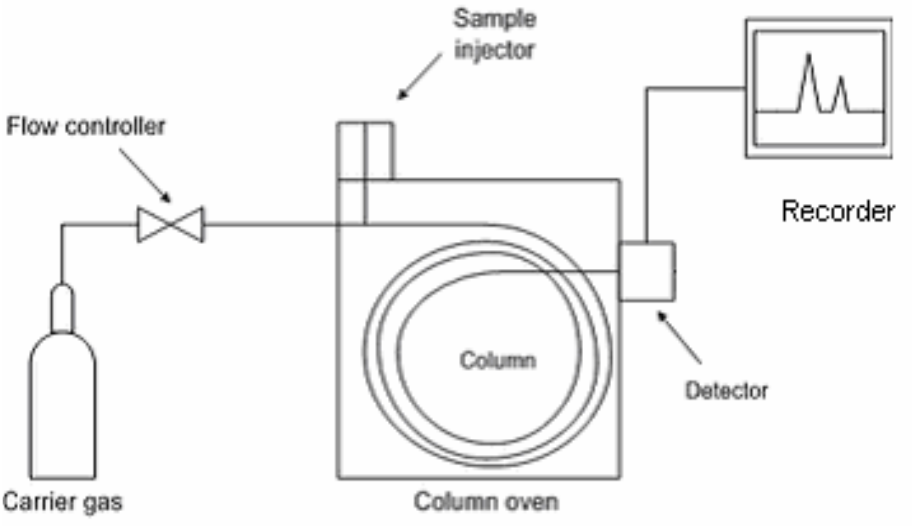
حيث يتم فصلها عن بعضها بناء على اختلاف معاملات توزيعها بين الغاز الحامل والطور

والطور الثابت كما هو الحال في الطرق الكروماتوغرافية الأخرى ثم تمر المكونات المفصولة الواحد تلو الآخر عبر الكاشف الذي يستجيب لكل مكون حسب تركيزه ويتصل بالكاشف مسجل

أوكومبيوتر يقوم بتسجيل استجابة الكاشف على هيئة قمة أو Peak.

6-3- مكونات جهاز الكروماتوغرافيا الغازية :

يتضمن الشكل التالي مخططاً توضيحياً لجهاز الكروماتوغرافيا الغازية والذي يتألف من ثلاث وحدات : وحدة إدخال العينة ووحدة الفصل ووحدة الكشف، لاحظ الشكل رقم (1).



الشكل (1): مخطط لجهاز الكروماتوغرافيا الغازية

6-4- الغاز الحامل : Carrier Gas

يجب أن يكون الغاز الحامل خاملا كيميائيا تحت الظروف العادية من ضغط ودرجة حرارة ، ويعتبر الهيليوم والهيدروجين والنتروجين والآرغون من أنسب الغازات في هذا المجال نظراً لتوفرها ورخص ثمنها وقلة الأضرار الناتجة عن استخدامهما باستثناء الهيدروجين القابل للاشتعال والذي يحتاج إلى اتخاذ احتياطات خاصة عند استعماله . وحيث أن هذه الغازات خاملة كيميائيا لهذا لا يحتمل حدوث أي تفاعل بينهما وبين جزيئات المكونات المراد فصلها إلا إذا كان ضغط الغاز المستخدم عالياً ، وبالتالي فان معامل التوزيع للمادة يعتمد بشكل كلي على درجة تطايرها من الطور الثابت .

يجب أن يكون معدل تدفق الغاز ثابتا عند درجة حرارة معينة ويجب أن يتمتع الغاز الحامل بالصفات التالية :

1- خامل كيميائيا لتجنب التأثير المتبادل مع العينة أو المذيب.

2- قادر على خفض الإنتشار الغازي في العمود للحد الأدنى .

3- متوفر ونقي تماما .

4- قليل التكاليف.

5- مناسب للكاشف المستخدم.

فمثلا يستخدم مع كاشف التوصيل الحراري غاز الهيدروجين أو الهيليوم بينما يستخدم غاز النتروجين مع كاشف التأين اللهبي .

يمرر الطور المتحرك أو الغاز الحامل Carrier gas مباشرة من إسطوانة الغاز المستخدم عبر منظم خافض للضغط بحيث يتراوح الضغط ما بين 10-50 (Psi) وبمعدل سريان خلال العمود في حدود 10-100 مل /دقيقة حسب قطر العمود. وللتنظيم الدقيق لضغط الغاز وسرعته يستخدم صمام إبري مناسب needle- valve أو منظم للسرعات mass flow controller ومن مميزات منظم السرعات أنه يحافظ على سرعة سريان ثابتة للغاز حتى في حالة إزدياد درجة الحرارة أثناء عملية الفصل ، بينما الصمام الإبرى لا يمكنه توفير ذلك . وكقاعدة عامة يتم تخليص الغاز الحامل من الماء أو أي شوائب أخرى قبل مروره بعمود الفصل .

6-5- نظام حقن العينة في الجهاز Sample injection system

يتم حقن محلول العينة عن طريق أنبوبة الحقن التي تحتوي على سدادة مطاطية بحيث تنفتح عند غرز الحاقن وتغلق عند سحبها، و يجب أن تدخل العينة إلى العمود دفعة واحدة على أن تكون درجة حرارة الفرن عالية بحيث نضمن تبخر العينة فوراً عند حقنها، كما يجب أن تتم عملية الحقن بسرعة حتى تتبخر العينة مع بعضها بدلاً من انتشارها على نطاق واسع ، وإن أسهل طريقة لإدخال العينات الصلبة هي على شكل محلول في مذيب لا يؤثر

على العينة المراد تحليلها ويتم إدخال العينات السائلة والغازية بواسطة إبرة حقن كما ذكرنا . وتعتمد كمية العينة المحقونة على سعة العمود وعلى حساسية الكاشف، فمثلاً بالنسبة للعمود العادي نستخدم (1 – 10 µl) من العينة السائلة أو (1-10 ml) من العينة الغازية أما بالنسبة للأعمدة الشعرية فكمية المادة المحقونة بحدود ($10^{-2} – 10^{-3}$ µl) من العينة .

إ ن معدل سريان الغاز خلال العمود المعبأ أسرع إذا ما قورن بمعدل سريان السائل ولهذا فان الكروماتوغرافيا الغازية أسرع بكثير من طرق الكروماتوغرافيا السائلة باستثناء الكروماتوغرافيا ذات الضغط العالي السريعة.

وبالنسبة **للمذيب** المستخدم في حل العينة الصلبة لحقنها في الجهاز فيجب أن يتمتع **بالصفات التالية :**

– يجب أن تبدي العينات عوامل توزع مختلفة.

– يجب أن تكون العينات ذات درجات ذوبانية مقبولة في المذيب.

– يجب أن يكون الضغط البخاري للمذيب عند درجة حرارة التشغيل شبه معدومة .

أما بالنسبة **لدرجة حرارة** عمل الجهاز يجب أن تحقق ما يلي :

– درجة حرارة وحدة الحقن يجب أن تكون عالية لدرجة أنها تستطيع تبخير العينة بشكل سريع .

– درجة حرارة العمود يجب أن تكون مرتفعة بشكل كاف.

– درجة حرارة الكاشف المستخدم والتوصيلات بين مخرج العمود والكاشف يجب أن تكون عالية بشكل كاف حتى تمنع تكثف العينة أو الطور السائل.

6-6 العمود الكروماتوغرافي : Column Chromatography

يعتبر عمود الفصل القلب النابض في أي جهاز للفصل الكروماتوغرافي وفيه تتم عملية الفصل كاملة حيث يثبت العمود داخل فرن مغلق عند درجة الحرارة المناسبة.

ويوجد نوعين من الأعمدة المستخدمة **أحداهما : يسمى العمود المعبأ Packed Column** التقليدي الذي يملأ بحبيبات المادة الصلبة المطلية بطبقة رقيقة من السائل الثابت ويصنع غالباً من الحديد الصلب ، قطره الخارجي بحدود 3-10 mm ويتراوح طوله من 1-20m وبالنسبة للمواد التي تتفاعل مع الحديد الصلب أو تمتز على سطحه مثل مبيدات الحشرات فيستخدم لها عمود من الزجاج بدلا من العمود المعدني. لاحظ الشكل رقم (2) يوضح العمود المعبأ في الكروماتوغرافيا الغازية.

الشكل (2): يوضح العمود المعبأ في الكروماتوغرافيا الغازية

أما النوع الثاني فيسمى بالأعمدة الشعرية Cappillary Columns وهي عبارة عن أنبوب طويل 25-100 m من الزجاج غالبا أو من المعدن أحيانا ذو قطر خارجي – 0.2 1.2mm أو أصغر . والأعمدة الشعرية غير معبأة ولكن يطلى على سطحها الداخلي طبقة رقيقة من الطور الثابت وهي ذات كفاءة عالية نظرا لكبر طولها وبالتالي عدد الصفائح النظرية بحدود (50.0000–100.000).

ولهذا تستخدم لفصل العينات المعقدة التركيب . كما أن معدل سريان الغاز الحامل في الشعرية 4-10 ml/min أسرع مقارنة بالأعمدة المعبأة كما أن ضغط الغاز أقل أيضاً.

لاحظ الشكل رقم (3) يوضح العمود الشعري في الكروماتوغرافيا الغازية.

الشكل (3): العمود الشعري في الكروماتوغرافيا الغازية

نظرا لطول العمود سواء المعبأ أو الشعري فانه غالبا يلف حتى لا يشغل حيزاً واسعاً.
-بالنسبة للعينات التي تحتوي على 10-20 مكون فان العمود المعبأ كافٍ لفصلها إلا إذا كان بعض هذه المكونات متشابهة جدا في التركيب الكيميائي ، أما العينات الأكثر تعقيداً من ذلك فيستخدم لها عموداً شعرياً حيث يمكن فصل 100 مكون أو أكثر بوساطته.

يشترط في العمود المعبأ أن يكون الطور الثابت ثابتاً حرارياً وغير متطاير عند درجة الحرارة المستخدمة وأن لا يتفاعل مع مكونات العينة . كما يجب أن تتم التعبئة بشكلٍ محكم باستخدام حبيبات صغيرة الحجم وذات شكل منتظم من الدعامة الصلبة . نظرا لطول العمود الشعري أو الأعمدة الشعرية فان القمم أو الأبياك الناتجة تكون ضيقة وحادة ومرتفعة ولهذا يفضل في هذه الحالات قياس ارتفاع القمة بدلا من قياس مساحتها كدالة لتركيز المادة . أما في الأعمدة المعبأة فان القمة تكون عادة عريضة ولذا تقاس المساحة بدلا من الارتفاع .
وعلى الرغم من طول الأعمدة الشعرية فان مساحة سطح الطور الثابت المعرض فيها أقل وبالتالي سعتها أيضاً أقل مقارنة بالأعمدة المعبأة لهذا لابد أن تكون كمية العينة المحللة صغيرة جدا μl 10^{-3}-10^{-2} وذلك حتى لا يتشبع العمود ، ويمكن تحقيق ذلك بواسطة الحقن المجزأ Split Injection والمقصود بذلك أن جزءاً صغيراً فقط من كمية العينة المحقونة يدخل إلى العمود الشعري والباقي يخرج إلى الجو خارج الجهاز . ونظرا لأنه لا يوجد مقاومة لسريان الغاز في الأنابيب الشعرية غير المعبأة لذا يمكن أن تكون بأي طول مرغوب أما في الأنابيب المعبأة فان العبوة الداخلية للعمود سوف تقاوم سريان الغاز لهذا لا يمكن أن نستخدم عمودا معبأ طويلاً لأن عملية الفصل سوف تستغرق وقتا طويلا في هذه الحالة ، أما فيما يتعلق بارتفاع الطبقة النظرية (H) فان كفاءة العمود الشعري مشابهة للعمود المعبأ.
وخلاصة لما سبق نقول أن العمود المعبأ أكثر سعة وأرخص وأسهل استعمالاً ويدوم مدة

أطول ويناسب أغلب التحاليل . أما بالنسبة للأعمدة الشعرية فنظرا لأنها غير معبأة فأنه لا توجد مقاومة لسريان الغاز ويمكن جعلها طويلة جدا لهذا تستخدم لفصل العينات المعقدة التي تحتوي على العديد من المكونات لكونها أكثر كفاءة وقدرة على الفصل .

6-7- متحريات الكروماتوغرافيا الغازية : Detectors

لابد لعملية الفصل الكروماتوغرافي من أن تنتهي بمعلومات عن هوية المكونات المفصولة وتركيزها وهذه مهمة الكاشف الموصول في جهاز الكروماتوغرافيا الغازية بعد العمود على التسلسل لأن وظيفة الكاشف أن يكشف المادة عندما تخرج من العمود فيعطي استجابة معينة تتناسب مع تركيز تلك المادة في الغاز الحامل . هناك العديد من الكواشف التي يمكن استخدامها في الكروماتوغرافيا الغازية إلا أن اختيار نوع الكاشف يعتمد على عدة عوامل مثل نوع الحساسية المطلوبة وفيما إذا كان الغرض تقدير جميع المكونات أو مجموعة معينة منها فقط ، حيث أن بعض الكواشف غير انتقائية وتستخدم لقياس جميع المواد أما البعض الآخر فيمتاز بانتقائية جيدة لذا لا يمكن استخدامها إلا عند فصل مركبات معينة كما سنرى، وبشكل عام يتميز المتحري المثالي بمايلي :

1- سرعة الإستجابة لكل تغير في تركيز المكونات المختلفة في العينة .
2- حساسية عالية وثابتة أثناء عملية الفصل .
3- الإستجابة للتغير في التركيز عبارة عن علاقة خطية .

توجد أغلب المواد المراد فصلها على هيئة تراكيز مخففة (ممددة) لهذا يشترط في الكاشف أن يكون حساساً ، كما أن القمم الحادة قد تمر عبر الكاشف في أقل من ثانية واحدة ولهذا لابد أن تكون استجابته سريعة، ويجب أن لا يستجيب الكاشف للغاز الحامل وإنما للمكونات

الموجود ة فيه فقط . ويتم تسخين الكاشف عن درجة حرارة ملائمة وذلك حتى لا تتكثف المواد المفصولة ، ويفضل الكاشف الثابت الذي تكون العلاقة بين إستجابته وتركيز المادة علاقة خطية ضمن مجال واسع من التركيز وجميع الكواشف المستخدمة تعتمد على قياس خاصية فيزيائية مثل التوصيل الحراري أو تأين اللهب أي أن الكاشف يقيس المواد بناءً على مدى تأثيرها على الخواص الفيزيائية للغاز الحامل .

وتجدر الإشارة إلى أن الغاز الحامل يمر عبر الكاشف في مسار خاص قبل حقن العينة وفصل المكونات فان الغاز الحامل ومعه المكونات المفصولة يمر عبر مسار آخر داخل الكاشف والغرض من ذلك هو أن الكاشف يقوم بطرح إستجابة الغاز الحامل النقي من إستجابة الغاز المحمل بالمكونات تماما كما هو الحال في جهاز الطيف ذو النظام ثنائي الحزمة Photodiode array detectors كما أن ذلك يلغي تأثير التغيرات التي قد تحدث لدرجة الحرارة أو الضغط أو ...

وبالرغم من وجود العديد من الكواشف المختلفة الصالحة للإستعمال في أجهزة الفصل الكروماتوغرافي للغازات إلا أن أكثر الكواشف إستخداماً هي التي تعتمد على قياس الناقلية الحرارية وعلى التأين باللهب والألتقاط (الأسر) الألكتروني (electron capture).

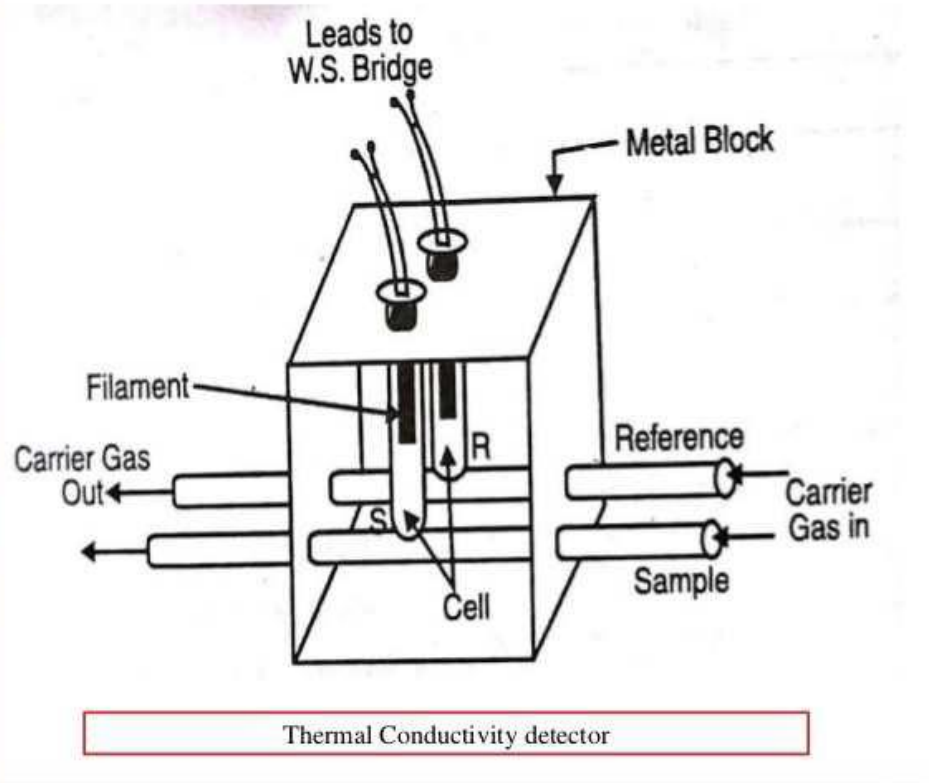
6-7-1 متحري الناقلية الحرارية : Thermal conductivity detector (TCD)

يعتمد هذا المتحري على أن هناك سلك ساخن يفقد حرارته بمعدل يعتمد على التوصيل الحراري أو الناقلية الحرارية للغاز المحيط به ويعتمد التوصيل الحراري للغاز على تركيبه وبدلاً من قياس حرارة السلك كدالة للتوصيل الحراري للغاز الحامل نقيس مقاومة السلك والتي تتناسب طردا مع درجة حرارته (كلما قل التوصيل الحراري للغاز الحامل تزداد حرارة السلك وبالتالي تزداد مقاومته) .

يذكر أن هذا الكاشف غير انتقائي لذلك هو مناسب لتقدير جميع المركبات ويمتاز بعلاقة خطية عبر مجال لابأس به من التركيز . ومن عيوبه أنه يتأثر بتغيرات طفيفة في درجة الحرارة أو معدل السريان .

أي يعتبر متحري النافلية الحرارية متحرياً عاماً يتحسس لجميع المواد.

والشكل رقم (4) يوضح المخطط العام لمتحري الناقلية الحرارية.

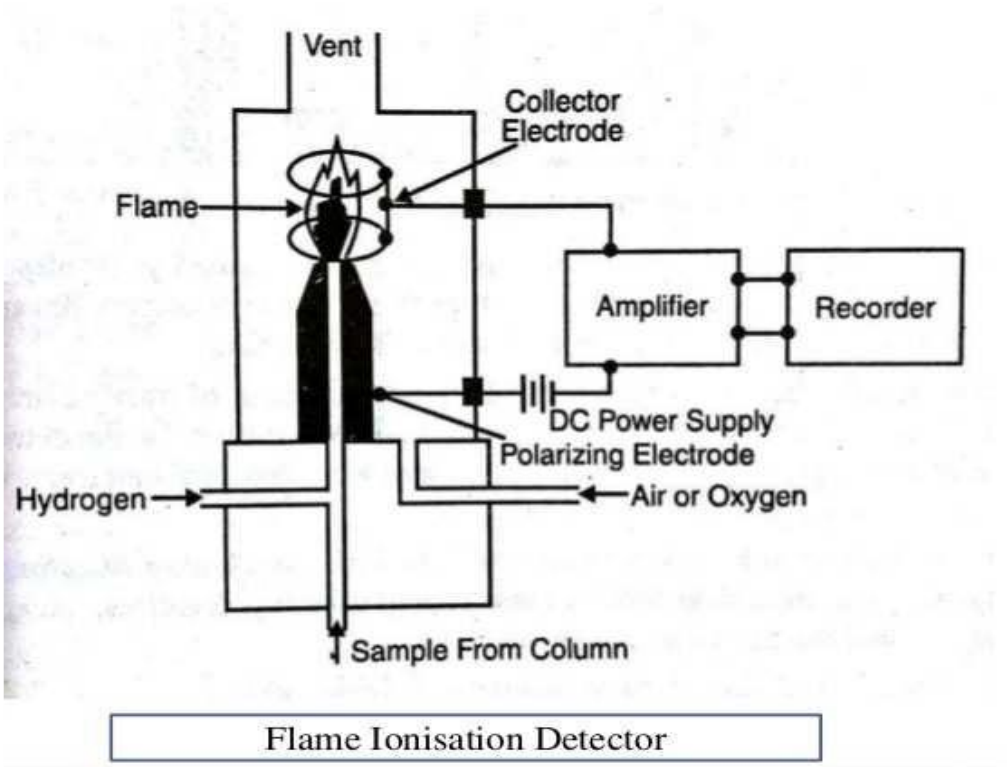


الشكل (4): المخطط العام لمتحري الناقلية الحرارية.

6-7-2- متحري تأين اللهب : flame ionization detector (FID)

تعتمد فكرة متحري تأين اللهب على أن أغلب المركبات العضوية تتأين في اللهب.

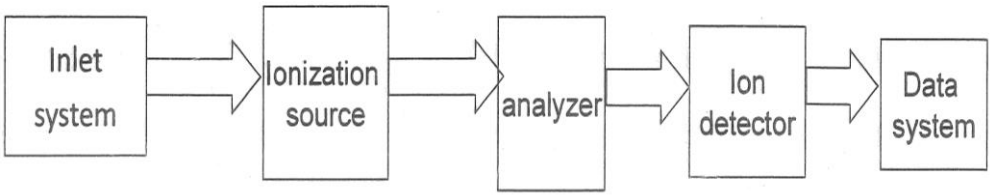
ويتكون هذا الكاشف من موقد صغير يحتوي على الهيدروجين والهواء أو الأكسجين حيث يحاط اللهب بقطبين مختلفي الشحنة ، والفرق في الجهد بينهما بحدود 200 فولت وعندما يمر الغاز الحامل المحمل بالمركبات العضوية خلال اللهب تتأين تلك المركبات ويمر نتيجة لذلك تيار كهربائي بين القطبين حيث تتناسب شدة هذا التيار مع كمية المادة المتأينة . إن حساسية هذا الكاشف ممتازة (في مجال النانوغرام) وأكثر حساسية بألف مرة من كاشف التوصيل الحراري كما أن العلاقة بين استجابته والتركيز خطية في مدى واسع من التركيز. والشكل التالي يوضح مخطط متحري تأين اللهب.



الشكل (5): متحري تأين اللهب

6-7-3- متحري طيف الكتلة : Mass Spectrophotometre (GC/MS)

أدخل نظام جديد لجهاز الكروماتوغرافيا الغازية وهو وحدة تعيين الكتلة حيث يتم من خلال هذا الجهاز تعيين المكونات الناتجة بعد عملية الفصل والتي تحوي أيونات موجبة الشحنة وسالبة الشحنة يقوم هذا الجهاز بعملية فصل هذان المكونان كل على حده كل الكتل المتشابهة تتجمع في طرف واحد ومن ثم يتم التفريق بينها أوتقسيمها حسب الشحنه حيث أنه من الممكن وجود أكثر من مادة لها نفس الكتلة ولكن تختلف في شحناتها وبذلك يمكن عن طريق معرفة كتلة وشحنة كل من هذه المواد يمكن التعرف عليها بسهولة. والشكل التالي يوضح مخطط متحري طيف الكتلة مدمج مع جهاز الكروماتوغرافيا الغازية ويطلق عليه اسم GC/MS .



الشكل(6): يوضح مخطط متحري طيف الكتلة مع جهاز الكروماتوغرافيا الغازية

6-7-4- متحرى اللاقط الالكتروني

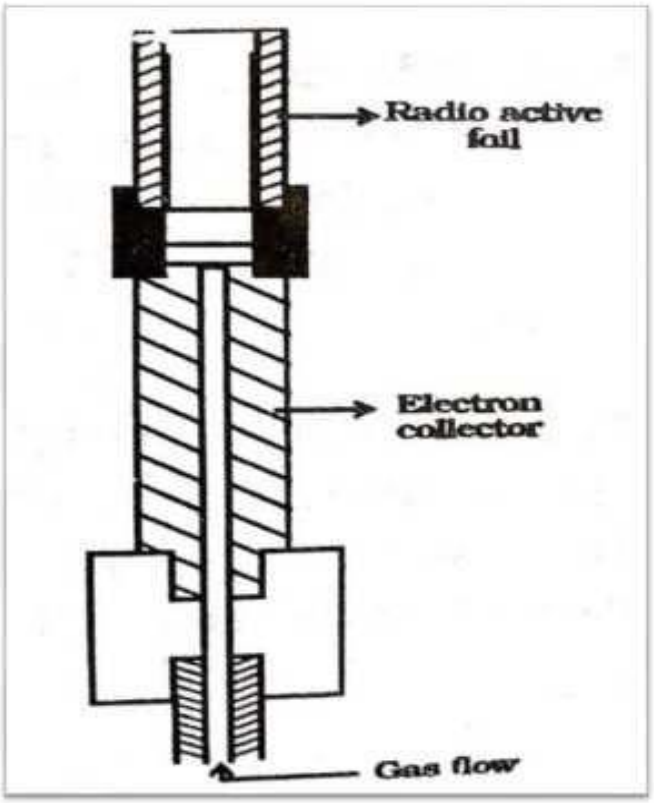
يشترط في المادة المراد تحريها بوساطه هذا المتحري ان تتمتع بحواص كهربائية تمكنها من تتبيت الكترون والتحول إلى شاردة سالبه.

يتألف هدا المتحري من خليه معدنيه مصنوعه من معدن غير قابل للصدأ، يكون الكاتود في هذه الخلية مغطى بمادة مشعة تعطي اشعة B غالبا ما تكون Ni^{63} وظيفتها إصدار اشعه

التي تصدم جزيئات الغاز الداخلة إلى خليه المتحري مما يؤدي إلى تحرير الالكترونات منها فتتشكل سيالة من الالكترونات تتجه من الكاثود باتجاه الأنود مسببة تيار شدته ثابتة.

وعندما تدخل المواد المفصولة المحبة للالكترونات لخلية المتحري تقوم بتثبيت الالكترونات مما يسبب في تناقص شدة التيار المار في خلية المتحري وهذا التناقص يتناسب طرداً مع تركيز المادة المفصولة.

والشكل التالي يوضح مخطط متحري اللاقط الالكتروني.



Electron Capture Detector

الشكل (7): يوضح مخطط متحري اللاقط الالكتروني

6-8- تأثير الحرارة : Temperature effect

يوجد ثلاثة أجزاء في جهاز الكروماتوغرافيا الغازية لابد من التحكم بدرجة حرارتها :

أ – الجزء الذي يحقن عن طريق محلول العينة حيث أن معدل تبخر العينة يعتمد على درجة

حرارة ذلك الجزء ونظراً لأنه يفضل أن يكون معدل تبخر العينة أسرع ما يمكن وذلك حتى يتم تقديم العينة الى العمود في حجم صغير لتلافي انتشارها مما يؤدي إلى تحسين الفصل .

لذا تثبت درجة حرارة جزء الحقن عند درجة عالية تعتمد على مدى الثبات الحراري لمكونات العينة (درجة غليان المكون + $T= 50\ ^0C$) في الغالب .

ب – يجب أن يتم التحكم في درجة حرارة المتحري وجعله ساخناً وذلك لمنع تكثف المكونات داخله ونظراً لأن حساسية كاشف التوصيل الحراري تقل بزيادة درجة الحرارة لذا لابد من ايجاد الحرارة الملائمة والتي تكون أعلى قليلاً من درجة حرارة العمود .

ج – تؤثر درجة حرارة العمود بشكل كبير على درجة الاستبقاء ودرجة الفصل بين المكونات فعند درجة الحرارة العالية نجد أن المكونات تمضي معظم وقتها في الغاز الحامل نظراً لقلة ذوبانها في الطور السائل الثابت عند درجة الحرارة العالية . وتحت هذه الظروف تخرج المكونات من العمود بسرعة عالية وقريبة من بعضها أي أن درجة فصلها ضعيفة ، وعند درجة الحرارة المنخفضة نجد أن المكونات تمضي معظم وقتها في الطور السائل الثابت ولهذا تستغرق وقتاً طويلاً في الخروج من العمود ، وعندما تخرج المكونات من العمود تكون متباعدة عن بعضها أي أن درجة الفصل جيدة ولكن على حساب الزمن الطويل كما أنه في هذه الحالة تفقد الحساسية نظرا للانتشار الذي يؤدي إلى الحصول على قمة عريضة ومنبسطة .

عند الرغبة في فصل مكونات خليط (بعضها ذات درجة غليان عالية وبعضها ذات درجات غليان منخفضة فإننا إذا ثبتنا درجة حرارة العمود (isotherm) عند الدرجة الملائمة لفصل المكونات ذات درجة الغليان المنخفضة فان ذلك سيجعل عملية فصل المكونات ذات درجة الغليان العالية تستغرق وقتا طويلاً مما يؤدي الى تكون قمم عريضة متداخلة ، ولهذا يفضل برمجة درجة الحرارة (gradient) بحيث تزداد بشكل خطي مع الزمن وبالمعدل المطلوب مما يجعل المكونات ذات درجة الغليان المنخفضة تنفصل عن بعضها بشكل جيد عند درجات الحرارة المنخفضة بينما تنفصل المكونات ذات درجات الغليان العالية عند درجات الحرارة العالية للعمود وفي زمن معقول وبدرجة فصل جيدة . كما أن شكل الكروماتوغرام يكون أفضل والقمم منفصلة تماما بالبرمجة مهما كان عدد المكونات في العينة .

6-9- التحليل الكيفي في الكروماتوغرافيا الغازية : Qualitative analysis

يمكن الكشف عن نوع المركبات المفصولة عن طريق مقارنة زمن الاستبقاء أو الحجز t_R للقمة الناتجة عن المركب بزمن استبقاء مادة قياسية منه مقاسة تحت نفس الظروف ، وإذا كانت العينة مجهولة فيستخدم جهاز كروماتوغرافيا غازية موصولة على جهاز التحليل الطيفي الكتلي (GC/MS) وفي هذا الجهاز تذهب المكونات بعد فصلها على العمود الكروماتوغرافي الغازي إلى جهاز طيف الكتلة مباشرة حيث يتم الكشف عن كل مكون (كما ذكرنا سابقاً) ولهذا الجهاز مقدرة كبيرة على التحليل الكيفي والكمي للعينات المعقدة جداً والتي قد تحتوي على المئات من المركبات .

6-10- التحليل الكمي في الكروماتوغرافيا الغازية : Quantitative analysis

يفضل في التحليل الكمي قياس ارتفاع القمة إذا كان عالية وضيقة كما يفضل قياس مساحتها إذا كان عريضة ومنبسطة، وفي كلتا الحالتين نجد أن ارتفاع القمة أو مساحتها تتناسب طردا مع التركيز . ويمكن تطبيق طريقة منحني التعيير القياسي أو طريقة الإضافة القياسية إلا أنه نظراً لأن العوامل المؤثرة على ارتفاع أو مساحة القمة كثيرة ويصعب التحكم بها لذا يفضل استخدام طريقة المادة القياسية الداخلية internal standard method ويمكن قياس مساحة القمة إما بطريقة تقريبية وذلك عن طريق المثلث وذلك كما في حساب مساحة المثلث(نصف القاعدة في الارتفا ع) أو عن طريق قطع القمة بمقص ثم وزنها أو عن طريق استخدام الكومبيوتر الذي يقوم بهذه العمليات كاملة .

الفصل السابع

كروماتوغرافيا العمود

Columnar Chromatography

7-1- مقدمة : Introduction

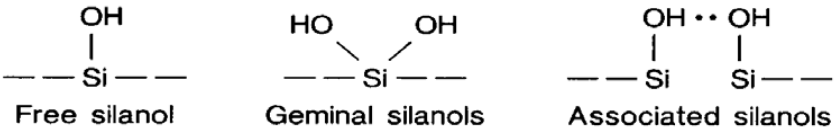
يشمل هذا النوع من الطرق كما يدل الإسم على جميع الطرق الكروماتوغرافية التي يستخدم فيها عمود ، ويكون الطور المتحرك عبارة عن سائل . هذه الطرق مناسبة لفصل المواد ذات الجزيئات الكبيرة أو المواد الإيونية أو المواد غير الثابتة حرارياً (التي تتفكك عند تبخيرها) يتراوح طول العمود والذي غالبا ما يكون من الزجاج في الطرق الكروماتوغرافية التقليدية مابين10-30 سم بقطر يساوي 1 سم أو أكثر ، يعبأ بحبيبات الطور الثابت ويسير الطور المتحرك عبر العمود بفعل الجاذبية ويعتمد معدل سريانه على حجم حبيبات الطور الصلب وعلى قطر العمود ولزوجة الطور المتحرك وقطبيته وفي أغلب الحالات يفضل أن يكون هذا المعدل بحدود 1 مل / دقيقة . ويوضع في نهاية العمود كمية من الصوف الزجاجي لمنع خروج الطور الثابت من العمود كما يمكن في بعض الحالات استخدام السحاحة كعمود كروماتوغرافي . والشكل التالي يوضح العمود الكروماتوغرافي التقليدي.

الشكل (1): يوضح العمود الكروماتوغرافي التقليدي

7-2- الطور الثابت الصلب : Solid-Stationary Phase

الطور الثابت عبارة عن مادة قطبية ذات خواص امتزازية جيدة وتعتبر الألومينا وهلام السيليكا من أكثر المواد استخداما على الرغم من أن هناك العديد من المواد التي يمكن استخدامها كطور ثابت مثل الفحم وكربونات الكالسيوم والنشاء ومسحوق السيليلوز وغيرها . وتعتمد قوة الامتزاز على النشاط الكيميائي لسطح المادة المازة وعلى مساحة سطها كما تجدر الإشارة إلى أن امتزاز المواد يعتمد على درجة قطبيتها وكلما زادت قطبية المادة كلما زادت قوة امتزازها على سطح الطور الصلب القطبي وقل ذوبانها في الطور المتحرك الأقل قطبية أو غير القطبي .

وتجدر الاشارة إلى أن حبيبات هلام السيليكا تحتوي على مجموعات هيدروروكسيل على سطحها والتي سوف ترتبط بالمواد القطبية برابطة هيدروجينية (إمتزاز) كما أن الألومينا أيضا تحتوي على مجموعات هيدروكسيل أو ذرات أوكسجين مما يجعلها قطبية . لاحظ الصيغ التالية:



7-3- الطور المتحرك السائل : Liquid-Mobile Phase

إن مهمة الطور المتحرك لا تنحصر في نقل المكونات عبر العمود فقط بل إن له تأثير على معامل التوزيع وذلك يعتمد على قوة إذابته وبالإضافة إلى ذوبان المكونات في الطور المتحرك فان هناك تنافس بين تلك المكونات وجزيئات الطور المتحرك على الامتزاز على سطح الطور الثابت الصلب . ويشترط في المذيب لكي يستخدم كطور متحرك أن لا تخرج المكونات من العمود بسرعة لأن ذلك لن يؤدي إلى فصلها ، كما يجب أن لا تكون سرعة الفصل بطيئة لأن ذلك يؤدي إلى الحصول على أزمنة حجز طويلة.

ويوجد العديد من المذيبات التي يمكن استخدامها كطور متحرك وفيما يلي نرتب بعضها حسب قطبيتها :

رابع كلوريد الكربون < التولوين < البنزين < الكلوروفورم < الايثر < الأسيتون <

الايتانول < الماء .

وفي بعض الحالات يستخدم خليط من هذه المذيبات كطور متحرك ، ويفضل أن تكون قطبية الطور المتحرك أقل من قطبية الطور الثابت للسبب الموضح سابقاً . تجدر الإشارة إلى أنه في كل من الكروماتوغرافيا السائلة–الصلبة والسائلة–السائلة يتم فصل المواد بناء على قطبيتها ولهذا يستخدم أولاً سائل متحرك أقل قطبية من الطور الثابت ثم تزداد قطبية السائل المتحرك شيئا فشيئا وذلك بخلطه بمذيبات أخرى أو استبدال المذيب المتحرك بمذيب آخر أعلى قطبية وبهذا الشكل يتم ظهور المواد الواحدة تلو الأخرى حسب قطبيتها.

4–7 الطور الثابت السائل : Liquid-Stationary Phase

في هذه الطريقة التي تسمى أحيانا بالكروماتوغرافيا الذوبانية أو التجزيئية يكون

الطور الثابت عبارة عن سائل مدعم على مادة صلبة خاملة مثل هلام السيليكا أو مسحوق السيليلوز.

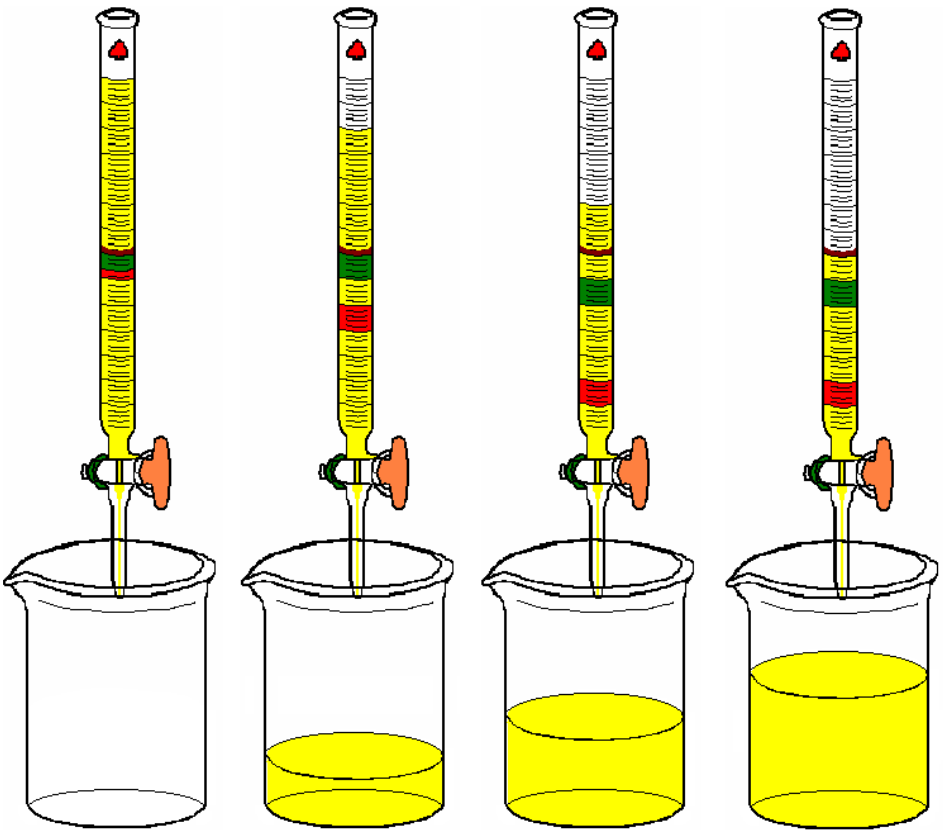
أما الطور المتحرك فهو سائل آخر . تمر المواد عبر العمود بسرعات مختلفة تعتمد على مدى ذوبان المادة في كل من الطورين الثابت والمتحرك .

هناك العديد من السوائل مثل الماء والكحولات والهيدروكربونات المختلفة التي

يمكن استخدامها كطور ثابت أو متحرك وبشرط أن لا يمتزج السائل الثابت بالطور المتحرك ، وإلا فان الطور الثابت سوف يذوب في الطور المتحرك ويخرج معه. وغالبا ما يكون السائل الثابت أعلى قطبية من السائل المتحرك إلا أنه في بعض الحالات وخاصة عند فصل المواد غير القطبية يفضل أن يكون السائل الثابت غير قطبياً. نذكر بأن المواد بأن المواد القطبية تذوب في المذيبات القطبية وبالعكس حسب القاعدة الكيميائية الشبيه يحل شبيهه.

7-5- تحليل المواد المفصولة :

يتم جمع المحلول (المستخلص) الخارج من نهاية العمود على دفعات في أنابيب اختبار، بعد ذلك يتم تحليل المواد الموجودة في كل دفعة من الدفعات باستخدام طرق تحليل كلاسيكية مثل التحليل الحجمي أو الطيفي . لاحظ الشكل يظهر عملية فصل مكونات عينة باستخدام عمود كروماتوغرافي.



الشكل (2): يظهر عملية فصل مكونات عينة باستخدام عمود كروماتوغرافي

تستغرق الطرق الكروماتوغرافية السائلة التقليدية زمنا طويلاً نظراً لأن سرعة سريان

الطور المتحرك المناسبة لمثل هذه الطرق عادة ما تكون بطيئة ، إلا أن الوضع قد تغير بعد اكتشاف طرق الكروماتوغرافيا السائلة ذات الضغط العالي حيث أصبحت عملية الفصل سريعة ومنافسة لطرق الكروماتوغرافيا الغازية . ويمكن القول بشكل عام أن هذه الطرق مناسبة لفصل كميات من المواد تتراوح بين ميكروغرام إلى غرام عن طريق تمريرها على عمود يحتوي على طور ثابت ويتم الفصل فيه وفق إحدى الآليات التالية :

1- الإدمصاص (adsorption) وفيه تدمص مكونات العينة بصورة إختيارية أو إنتقائية على سطح الطور الثابت .

2- التوزيع أو التجزئة (partition): وفيه تتوزع مكونات العينة بين الطور المتحرك السائل وطبقة السائل الرقيقة المحملة على دعامة صلبة .

3- الإستبدال الإيوني (ion exchange): وفيه تستبدل المكونات الإيونية في العينة بأيونات لها نفس الشحنة موجودة على سطح الطور الثابت المالئ لعمود الفصل . وهذا الإستبدال الإيوني يتم بطريقة اختيارية وينتج عنه إعاقة أو حجز لبعض مكونات العينة حيث يسهل فصلها.

4- الهلام (gel): وفيه يملأ عمود الفصل بمادة هلامية مسامية تسمح بمرور جزيئات ذات حجوم جزيئية محددة من خلالها.

7-6- الكروماتوغرافيا الشاردية (الأيونية): Ion Chromatography

تتألف الأطوار الثابتة في كروماتوغرافيا التبادل الشاردي من جسيمات راتنجية صلبة تملك مواقع ربط شاردية موجبة أو سالبة مرتبطة بالطور الثابت . يتم تبادل الشوارد ذات الشحنة المعاكسة الموجودة في الطور المتحرك مع الشوارد الموجودة على السطح (للطور الثابت).

تحوي الراتنجات المُبادِلة للشوارد الموجبة (كاتيونات) مجموعات وظيفية مرتبطة تساهمياً ومشحونة سلبياً ، بينما تملك الراتنجات المُبادِلة للشوارد السالبة (أنيونات) مجموعات وظيفية مشحونة إيجابياً . عندما تكون المجموعات الوظيفية المشحونة هي أنيون سلفوني ، عندئذ تدعى بمُبادِل قوي للشوارد الموجبة تحوي الراتنجات الضعيفة المبادلة للشوارد السالبة مجموعات وظيفية مثل : كربوكسي ميتيل ، أو فوسفات ، أو سلفو ألكيل. إذا كانت هذه الوظائف موجودة على سطح الطور الثابت فقط ، فإن طريقة تبادل الشوارد هي الطريقة الوحيدة الممكنة للفصل .

عندما تفُصَل الشوارد على هذه الصورة وبشكل خاص في فصل الشوارد اللاعضوية أو أنيونات صغيرة لحمض عضوي ، عندئذ تدُعى هذه الطريقة بالكروماتوغرافيا الشاردية.

إن معظم الأطوار الثابتة المستعملة في الكروماتوغرافيا الشاردية . تستخدم راتنجات تحوي متماثر مشارَك بين بولي ستيرين و دي فينيل البنزن. إن هذه الأطوار الثابتة تملك pH ذات ثباتية عالية يمكن أن تحتمل الحموض والأسس القوية .

يمكن عبر إستخدام الفصل المعتمد على الكروماتوغرافيا الشاردية وإستخدام الكشف عن الناقلية ، أن نكشف عن شوارد سالبة لاعضوية مثل الهاليدات ، والفوسفات ، والنتريت ، والنترات ، والتيوسيانات ، والكبريتات ، وكاتيونات عديدة متضمنة شوارد العناصر الإنتقالية،

عندئذ فإنه يمكن قياس الكمية والكشف بواسطة مقياس الناقلية. من الأمثلة على ذلك : تحديد الشوارد في ماء البحر ، أو ماء الصنبور ، أو ماء الجداول في التحاليل البيئية . ويمكن باستخدام أجهزة الكشف أن نتحرى عن كميات تبلغ أجزاء بالبليون للشوارد المعدنية . إن القياس الدقيق لكمية الشوارد المعدنية ممكن نتيجة استخدام المحاليل العيارية اللاعضوية والتي تكون جاهزة للاستعمال ومتوفرة تجاريا.ً

تستخدَم كروماتوغرافيا التبادل الشاردي بشكل واسع في تحليل البروتينات ، والبروتينات السكرية ، والببتيدات ، ومركبات أخرى ذات وزن جزيئي مرتفع. تملك هذه المركبات العضوية شحنة على سطح ضخم تتصرف مثل الأنيونات المشحونة ، لذلك تكون قابلة للفصل بطريقة تبادل الشوارد . لفصل نيكليوتيدات ذات بنية جزيئية مشابهة ، فإنه تؤخذ بعين الاعتبار الاختلافات في مجموعات الفوسفات الموجودة في النيكليوتيدات المتنوعة ، كما تؤخذ الاختلافات في خصائصها الرابطة بعين الاعتبار أيضاً. بالإضافة إلى ذلك ، فإنه تسُتخدَم لفصل البروتينات الراتنجية ذات السيليكا ، أو راتنجات ذات متماثر أكريلي ، أو أطوار السيللوز المرتبط cellulose bonded phases أو الديكسترانات . وللمحافظة على الفعالية الحيوية خلال الفصل ، فإنه تسُتخدَم أعمدة تم صبها يدوياً مسبقاً ومعبأة بمواد مُبادِلة للشوارد . إن تدفق الطور المتحرك باتجاه الجاذبية الأرضية في درجات حرارة منخفضة ،هو القاعدة في هذا النوع من الفصل ، لذلك فإنه لم يعد يسُتخدَم كل من كروماتوغرافيا التبادل الشاردي والكروماتوغرافيا الشاردية بشكل مرادف.

الفصل الثامن

الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

1-8 مقدمة:

إن الكروماتوغرافيا Chromatography هي تقنية لفصل مكونات مزيج ما كل على حده وذلك على طورين إحداهما ثابت والآخر متحرك، وتعد الكروماتوغرافيا السائلة من الطرائق المفضلة في التحليل الكيفي و الكمي بسبب الفصل الجيد لمكونات المزيج إضافة لموثوقية النتائج والكفاءة العالية. حيث تقدمت الكروماتوغرافية السائلة نتيجة تطبيق ضغط على الطور المتحرك لذلك كانت سابقاً تدعى الكروماتوغرافيا السائلة العالية الضغط

High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

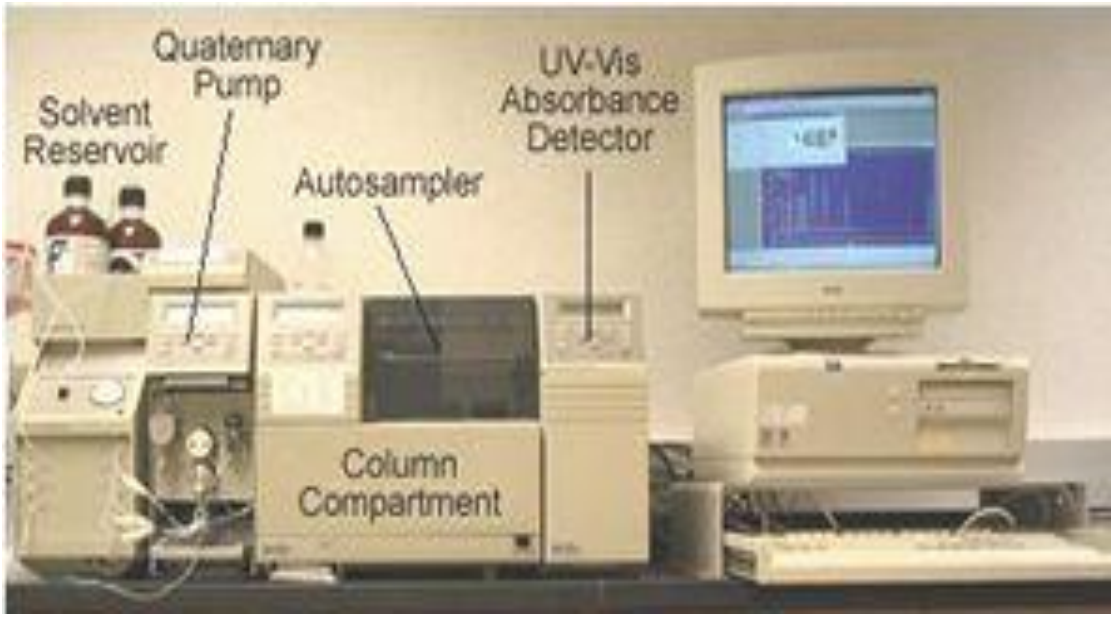
أما الآن وبعد تحسين طرق الفصل من خلال تصغير حجم جزيئات الطور الثابت واستخدام أعمدة ذات أطوال وأقطار صغيرة أصبحت تعرف تحت اسم الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء والتي يرمز لها :

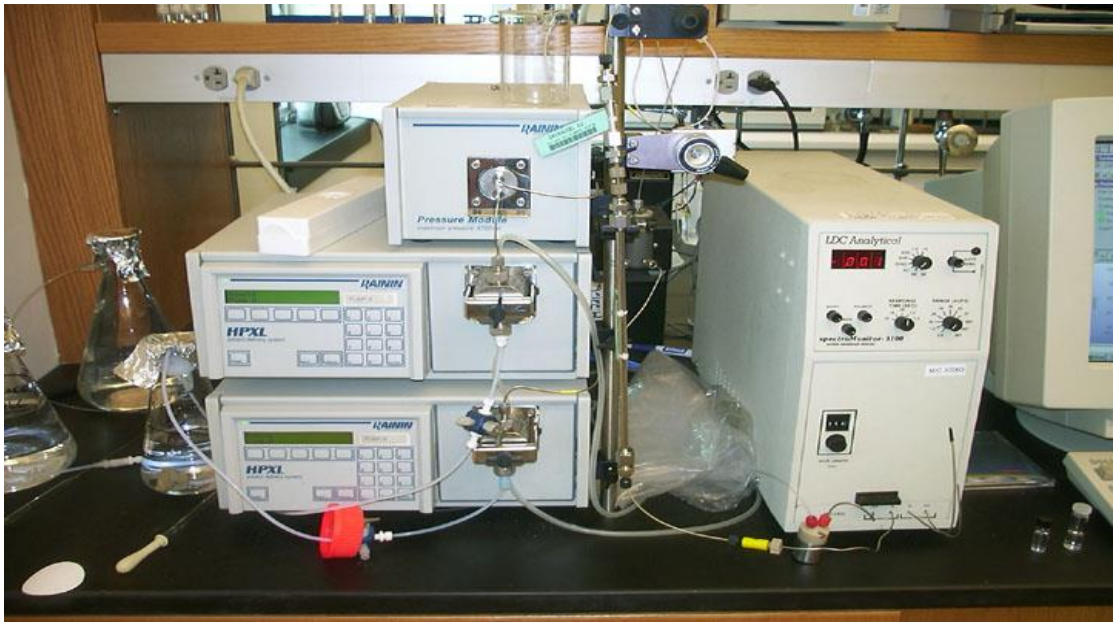
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

تعتمد الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء على إدخال العينة في سيل متتابع من سائل ما و هو ما يدعى بالطور المتحرك (mobile phase) ، و يسمح للعينة أن تجتاز طبقة العمود المملوء بمواد ذات أقطار صغيرة جداً ، مما يعطي سطح تماس كبير و هذا ما يدعى بالطور الثابت (stationary phase).

عندما تنتقل جزيئات الحلالة عبر العمود و ذلك عن طريق حركة الطور المتحرك فإنه يتم ادمصاص (امتزاز) المكون لبرهة من الزمن ومن ثم يتم نزع الامتزاز نتيجة جريان الطور المتحرك وجر جزيئات الحلالة (المذابات solutes) معه وهذه العملية تتم لآلاف المرات أو أكثر أثناء مرور الحلالة خلال الطور الثابت بشكل متزامن مع حركة الطور المتحرك و هذا يكون بتوازن ديناميكي.

وبسبب اختلاف عمليات التوازنات الديناميكية للجزيئات الذائبة المختلفة يؤدي إلى فصل مكونات المزيج. لاحظ أشكال اجهزة الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء الموجودة في الشكل رقم (1).

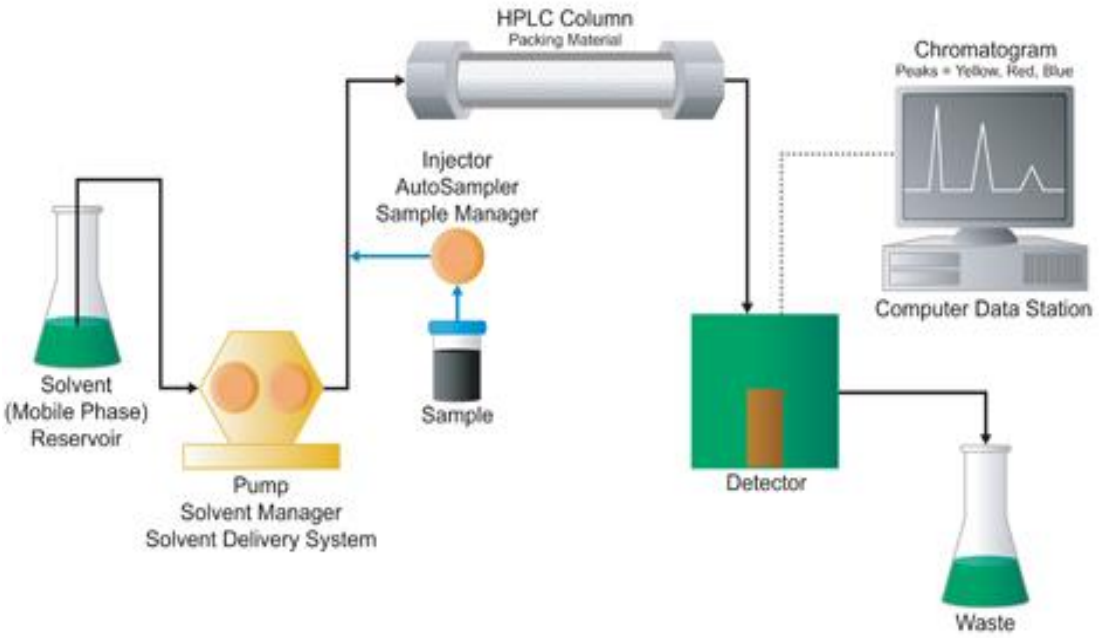




الشكل (1): أجهزة HPLC

2-8- المكونات الأساسية لأجهزة الـ HPLC :
(Basic Components of the Instrument)

يتألف جهاز الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء عادةً من خزان يحوي الطور المتحرك مع أنظمة معالجة هذا الطور، مضخة تقوم بامرار الطور المتحرك ، وحدة حقن العينات ، العمود الكروماتوغرافي ، مكاشف وفرن مع معالج للمعطيات والذي قد يكون راسماً أو حاسوباً ولندرس كل منها على حده .والشكل رقم (2) يمثل مخططاً توضيحياً لجهاز الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء.



الشكل (2) مخطط توضيحي لجهاز الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء

8–2–1– خزانات الطور المتحرك: Solvent Reservoir

تصنع هذه الخزانات من مادة الزجاج أو من الحديد غير قابل للصدأ (Stan less Steel) وفي الغالب تتراوح عدد الخزانات 1- 5 خزاناً ومتوسط السعة الكلية للخزانات 500ml وبعضها يصل سعته إلى لتر .

وتكون هذه الخزانات في العادة مزودة ببعض الوسائل التي تساعد على التخلص من الغازات الذائبة في المحاليل التي تظهر على شكل فقاعات هوائية تسبب في ظهور إشارات تحليلية غير مرغوب فيها مما قد يسبب خطأً في النتائج . ومن أكثر هذه الغازات O_2 , N_2 .

ويتم التخلص من هذه الغازات بعدة طرائق منها:

1- باستخدام نظام التفريغ عبر المضخات

2- باستخدام عملية التقطير

3- باستخدام أجهزة الأمواج فوق الصوتية

4- بإمرار تيار من غاز خامل منخفض الذوبانية

5- وأحياناً يتم تزويد هذه الخزانات بمرشحات وذلك للتخلص من أي مواد عالقة بالمحاليل ومنعها من الوصول إلى عمود الفصل .

8-2-2- أنظمة الضخ : Pumping Systems

تقوم أنظمة الضخ (المضخات) بتوصيل كميات من الطور المتحرك من خزان المحلات إلى العمود الكروماتوغرافي من خلال ضغط مرتفع .

تستخدم حالياَ العديد من المضخات الشائعة والتي يجب أن يتوفر فيها الشروط التالية:

1- أن تكون المضخة قادرة على إعطاء ضغط ملائم لنوع العمود المستخدم .

2- أن تكون المضخة خالية من الذبذبات أثناء دفعها للسوائل Pulse .

Free

3- أن تكون المضخة لها سرعة تدفق تتراوح بين 0.1- 10 ml/min للمضخات التحليلية أي يكون لها مدى واسع .

4- أن تكون لسرعة التدفق تكرارية عالية ، ونسبة الخطأ منخفضة .

5- أن تحتوى على مكونات مقاومة للتآكل ، خاصة ما يسمى بالمانعات Seals ، وأن تكون مصنوعة من الحديد غير القابل للصدأ أو من التفلون.

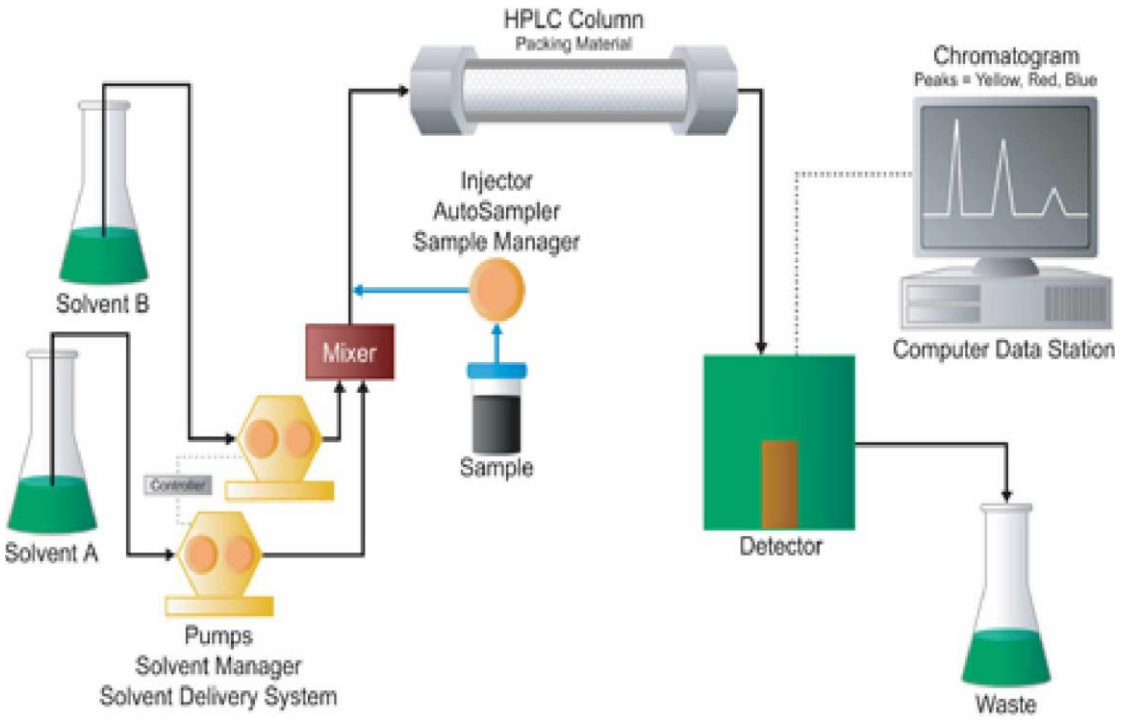
ويوجد حالياً نوعين من المضخات وهما:

-مضخة الامرار المتساوي (Isocratic pump)

هنا يتم استخدام طور متحرك مكون من محل واحد أو عدة محلات بنسب مزج ثابتة طول مدة الفصل ويستخدم نظام الفصل الامرار المتساوي في حال كانت المواد المراد فصلها ذات أزمنة احتفاظ متقاربة . والشكل رقم (2) هو يمثل أحد أنواع هذه المضخات.

-مضخة الامرار المتدرج (Gradient pump)

هنا يتم استخدام طور متحرك مكون من عدة محلات بنسب مزج متغيرة وفق جدول زمني محدد مسبقاً. يتم استخدام نظام التدرج بالمحلات اذا كانت المواد المراد فصلها ذات أزمنة احتفاظ متباعدة بالتالي يمكن تخفيض من زمن الاحتفاظ وإعطاء كفاءة أكبر في عملية الفصل. والشكل رقم (3) يمثل أحد أنواع هذه المضخات.



الشكل (3): جهاز الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء ذو الامرار المتدرج

8-2-3- نظام التحكم في التدفق والبرمجة Flow control & system Programming

هذه الأنظمة هي من المكونات الجانبية ،حيث توجد في الأجهزة الحديثة مكون خراجي يحتوي على بعض المعدات مثل الحاسب الآلي وظيفتها الأساسية التحكم والسيطرة على ثباتية العوامل الأساسية مثل سرعة التدفق ، الضغط ، اللزوجة ، ونسبة مزج الطور المتحرك.

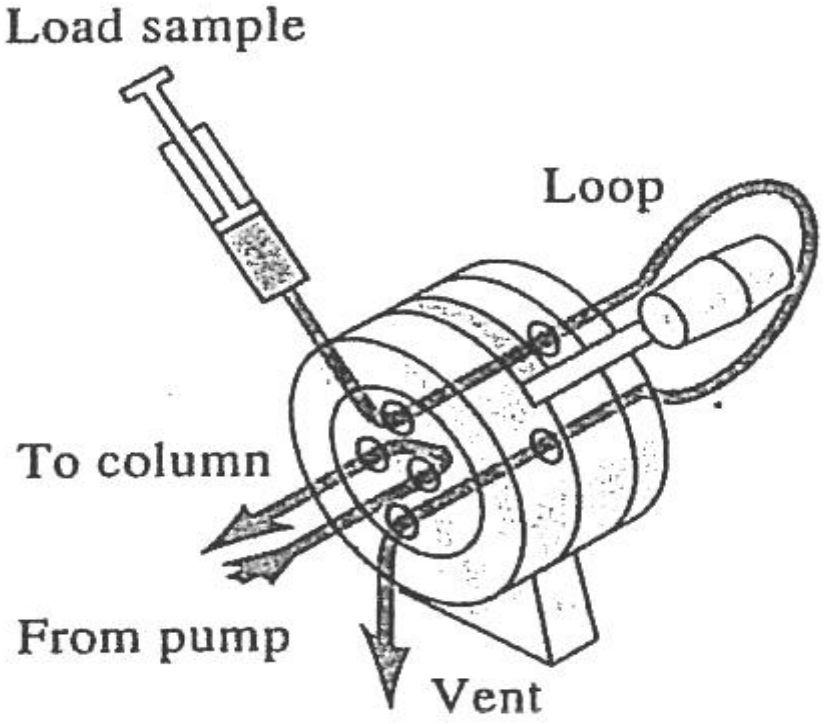
8-2-4- أنظمة حقن العينة : Sample Injection Systems

هذه الأنظمة هي التي تستعمل لإدخال العينة إلى العمود الكروماتوغرافي حيث تتحكم في إدخال العينة إلى الجهاز.

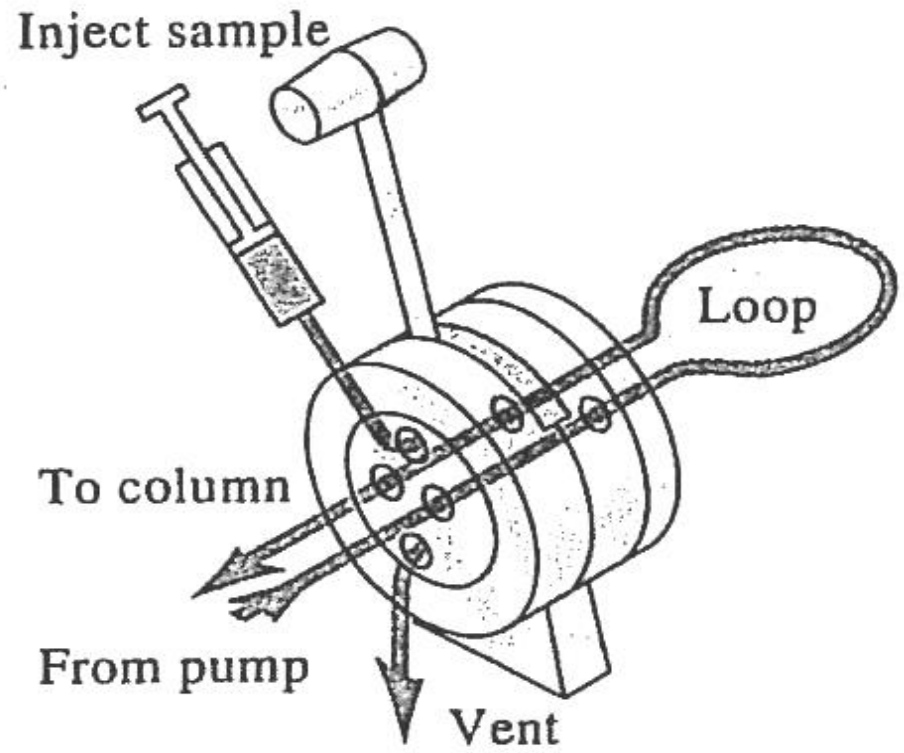
من أكثر الطرائق المستعملة هي نظام الحقن والذي يتم فيه استعمال نظام يسمى حلزون العينة (الأنشوطة) (Sampling Loop) وهذه الأنظمة تستخدم في الغالب أنشوطات حجمها يتراوح ما بين 0.5-500µl والأكثر استخداماً هي

20 µl .لاحظ الشكل رقم (4) الذي يوضح طريقة حقن العينة ضمن الأنشوطة . والشكل رقم (5) الذي يوضح طريقة تحميل العينة على العمود الكروماتوغرافي.

وهناك نظام الحقن الآلي (Auto Sampler) يستخدم في الأماكن التي تتطلب إجراء تحاليل روتينية بأعداد كبيرة وبشكل يومي .



الشكل (4) : طريقة حقن العينة ضمن الأنشوطة



الشكل (5) : طريقة تحميل العينة على العمود الكروماتوغرافي.

8-2-5- الأعمدة الكروماتوغرافية Columns

يمثل العمود الكروماتوغرافي القلب بالنسبة لجهاز التحليل الكروماتواغرافي ، ويصنع العمود عادة من مادة تتحمل الضغط وخاملة كيميائياً كالستانلس ستيل . ويمكن أن تصنع أحياناً من الزجاج السميك وفي حالة استخدام عمود زجاجي فإن المضخات المستخدمة لا يتجاوز ضغطها 6000 psi كما يجب أن تكون جدران الأعمدة الكروماتوغرافية مناسبة للمادة المستخدمة في حشوة العمود وذلك حتى لا يحدث تداخل ما بين جدران الأعمدة والحشوة

.

وتصنف الأعمدة تبعاً لغرض استخدامها إلى نوعين رئيسيين :

1-النوع الأول : الأعمدة التحليلية Analytical Columns

هي الأعمدة الأساسية التي تستخدم في التحليل ، وأطوالها تتراوح ما بين 10- 30cm ، تكون في العادة مستقيمة .تتميز الأعمدة التحليلية بقطر داخلي يتراوح ما بين 4-10mm وحديثاً تمكنت بعض المصانع من صنع أعمدة ذات كفاءة عالية ، فصنعت أعمدة لها أقطار تتراوح ما بين (2-4mm) وأصبح بالإمكان الحصول على طول ما بين 3-7.5 cm ويستهلك هذا النوع من الأعمدة كمية أقل من المذيب. والشكل التالي يوضح احدى أعمدة التحليل.

2-النوع الثاني : أعمدة الحماية Guard Columns

هذا النوع من الأعمدة يكون موقعه في العادة في جهاز HPLC قبل العمود التحليلي والفائدة الأساسية له حماية العمود التحليلي من التلوث ، ويقوم عمود الحماية بحجز بعض مكونات العينة أو الشوائب التي تمتز بشكل قوي ضمن العمود .

8-2-6- الفرن : Oven

يجري التحليل بصورة عامة في معظم أجهزة الـ HPLC عند درجة حرارة الغرفة ، لذا فإن مراقبة الحرارة ليست مهمة . لكن في بعض الحالات أو التطبيقات تتطلب درجة حرارة معينة ، فلابد من التأكد أن درجة الحرارة ثابتة

من أول التجربة حتى نهايتها لذلك يتطلب أحياناً وجود فرن للمحافظة على درجة حرارة ثابتة للعمود أثناء عملية التحليل .

8-2-7- متحريات الـ HPLC : Detectors

تكمن أهمية المكشاف أو المتحري بأنه يتحسس لمرور العينة من نهاية العمود ويسجلها على شكل إشارة ومن أهم المتحريات المستخدمة :

8-2-7-1- متحريات المجال المرئي وفوق البنفسجي : UV- Vis Detectors

تتميز هذه المتحريات بحساسيتها العالية كما أنها لا تتأثر بدرجة الحرارة وتقوم بتحديد المواد التي لها امتصاصية في المجال المرئي وفوق البنفسجي ويجب أن يكون الطور المتحرك المستخدم في عملية الفصل الكروماتوغرافي عديم الامتصاص ،

كما يستخدم في هذا النوع من الكواشف نوعين من المصابيح :

- مصباح الديتريوم : يستخدم في مجال الأشعة فوق البنفسجية ضمن المجال 200-400 نانومتر .

- مصباح التنغستن : يستخدم في المجال المرئي ضمن المجال 340-850نانومتر .

8-2-7-2- متحريات الفلورة : Fluorescence Detectors

تقوم هذه المتحريات بتعيين المركبات التي لها قابلية للفلورة وتتميز بحساسية عالية تفوق حساسية الكواشف التي تعمل في المجال فوق البنفسجي بحوالي 1000 مرة ويعتمد مبدأ عمل هذه الكواشف على إمرار الضوء عبر

الخلية عند طول موجة يسمى بطول موجة الإثارة بينما يتم إصدار هذا الضوء عند طول موجة أعلى يدعى بطول موجة الإصدار .

8-2-7-3- متحريات الالكتروكيميائية : Electrochemical Detectors

يستخدم هذا النوع من المتحريات في تعيين المواد القابلة للأكسدة والإرجاع وتتميز بحساسيتها العالية لكنها سريعة العطب اذا تركت دون عمل لفترة طويلة .

8-2-7-4- متحريات الأشعة تحت الحمراء : Infrared Detectors

يستخدم هذا النوع من المتحريات في تحديد المركبات التي تمتص في مجال الأشعة تحت الحمراء عند طول موجة واحد ويجب الانتباه إلى أن الطور المتحرك المستخدم لا يملك امتصاصية عند طول الموجة المطلوب.

8-2-7-5- متحريات قرينة الانكسار : Refractive Index Detectors

يعتمد مبدأ عمل هذا النوع من المتحريات على تمرير الطور المتحرك عبر خليتين الأولى خلية مقارنة يمر عبرها الطور المتحرك فقط والثانية خلية قياس يمر عبرها الطور المتحرك الحامل للعينة ويقوم الكاشف بالتحسس للفرق في قرينة الانكسار، وتتميز هذه الكواشف بحساسيتها المنخفضة إضافة لتأثرها بتغير درجة الحرارة .

8-2-7-6- متحريات مطيافية الكتلة : HPLC-MS

يعتمد هذا النوع من المتحريات على تقنيتين هما :

- تقنية توليد الأيونات بواسطة انفراغ تاجي تتخلى فيها الجزيئات عن أيوناتها وقد تتشكل أنيونات وتستخدم هذه التقنية من أجل الجزيئات غير القطبية والتي لا تتفكك حرارياً .

- تقنية توليد الأيونات بواسطة انفراغ كولوني باستخدام شحنة كهربائية صغيرة جداً وينتج عن ذلك أيونات أحادية الشحنة أو متعددة الشحنة وتعد هذه التقنية مناسبة للجزيئات الضخمة كالبولميرات .

ويجب أن **يتمتع المتحري المثالي بعدة ميزات** أهمها :

1-أن يكون ذو حساسية ملائمة للقياس المطلوب.

2-أن يكون ذو ثباتية جيدة وتكرارية عالية

3-أن يكون له مدى خطي طويل للمواد المقدرة.

4-أن يكون له زمن استجابة قصيرة ، ومستقلة عن سرعة التدفق

5- يمكن الاعتماد على النتائج ، وأن يكون سهل الاستخدام من قبل أشخاص غير مؤهلين بخبرة كافية .

6-أن يكون ذو استجابة عامة لمعظم العينات المقاسة ، أو أن يكون له استجابة انتقائية لمجموعة معينة من المواد

7-أن يكون غير متلف للعينة nondestructive.

8-أن يكون له حجم داخلي ، وذلك للتقليل من تعريض نطاق العينة .

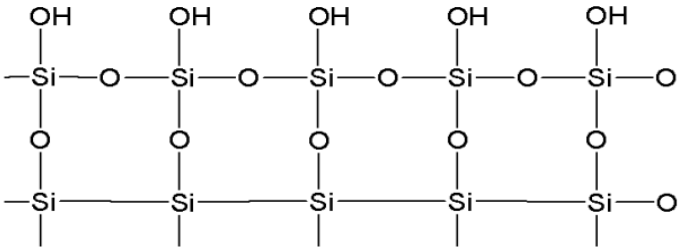
8-2-8- وحدة معالجة النتائج Data Processing

على الأغلب يستخدم كمبيوتر لهذا الشأن ، حيث يحتوي على البرمجيات الخاصة بجهاز الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء.

8-3- أنواع الكروماتوغرافية السائلة العالية الأداء

8-3-1- كروماتوغرافيا الطور العادي: Normal Phase chromatography

وفيه يكون الطور الثابت قطبي مثل سيلكاجل , silica gel (لاحظ الصيغة في الأسفل) والألومينا alumina والسيليت Celite أما الطور المتحرك فيكون غير قطبي مثل Hexane , dichloromethane; isopropanol; methanol



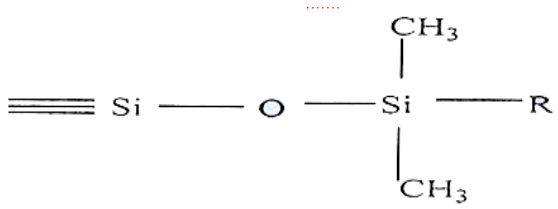
وهناك بعض الأطوار الثابتة الأخرى لاحظ الجدول رقم (1) الذي يوضح بعض الأطوار القطبية المطعمة .

الجدول (1) : بعض الأطوار القطبية المطعمة

Name	Structure	Application
Diol	$-(CH_2)_3\ OCH_2CH(OH)CH_2(OH)$	Surface modifying groups for silica packings used in SEC
Cyano	$-(CH_2)_3CN$	Partition or adsorption chromatography
Amino	$-(CH_2)_n\ NH_2$ $N = 3$ or 5	Adsorption, partition, or ion-exchange chromatography
Dimethyl-amino	$-(CH_2)_3N(CH_3)_2$	Ion-exchange chromatography
Diamino	$-(CH_2)_2NH(CH_2)_2\ NH_2$	Adsorption or ion-exchange chromatography

8-3-2- كروماتوغرافيا الطور المعكوس: Reversed Phase chromatography

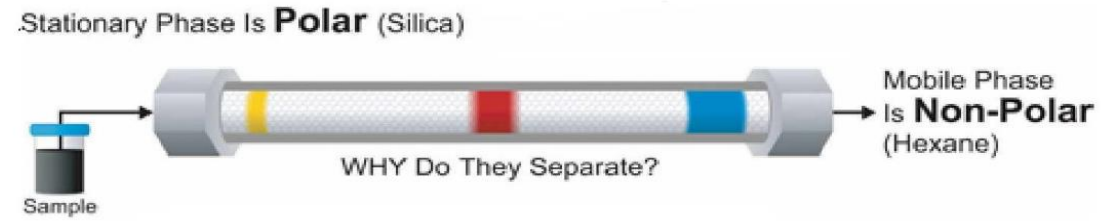
وفيه يكون الطور الثابت غير قطبي مثل أعمدة السيلكاجل المطعمة بسلسلة كربونية (لاحظ الصيغة التالية) والطور المتحرك قطبي مثل الماء والأسيتونتريل والميتانول.



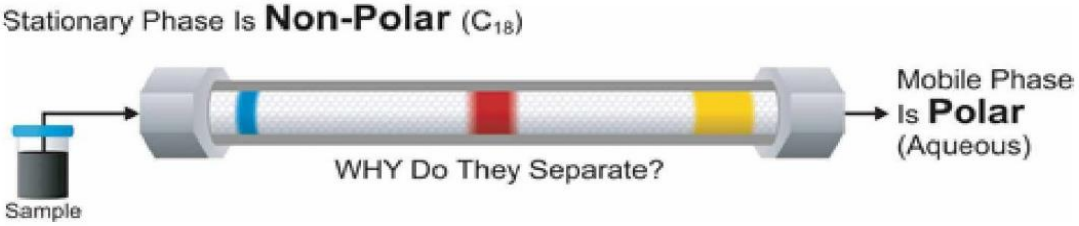
حيث R سلسلة كربونية مشبعة من C_1 إلى C_{22} . وأشهر هذه الأعمدة C_{18} (أو ما يعرف octadecylsilane ODS) و C_8 (أو ما يعرف octyl).

ولندرس تحليل مزيج مكون من ثلاث مركبات في الطريقتين السابقتين:

أي بطريقة كروماتوغرافيا الطور العادي ومن ثم بطريقة كروماتوغرافيا الطور المعكوس يلاحظ نتيجة اختلاف في القطبية بين الأطوار في الطريقتين السابقتين أن الفصل معكوس تماماً لاحظ الشكل رقم (6) الذي يوضح ذلك.



Normal-Phase Chromatography



Reversed Phase Chromatography

الشكل (6): طريقة فصل مزيج مكون من ثلاث مركبات

8-3-3- كروماتوغرافيا الأزواج الأيونية Ion –Pair Chromatography

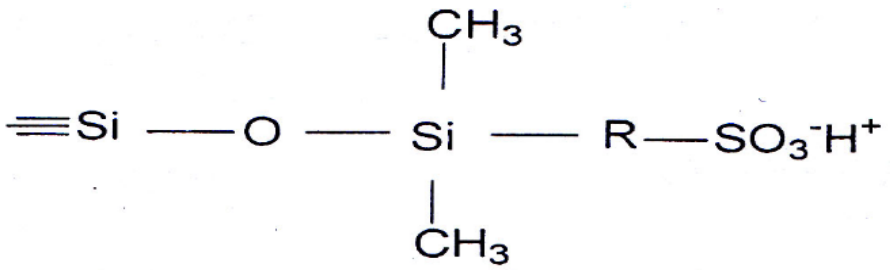
وهي تماثل تماماً كروماتوغرافيا الطور المعكوس لكن يحتوي الطور المتحرك على كاشف الكيل صوديوم سلفونات وجزر الألكيل يحتوي على سلسلة كربونية تتراوح ما بين C_5 إلى C_{10} حيث يشكل هذا الكاشف أزواج أيونية مع المواد المراد تحليليها .

8-3-4- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني Ion –exchange Chromatography

يحتوي هذا النوع من الأعمدة على نوعين من الطعوم :

- الطعوم التي يعتمد فيها الفصل على تبادل الكاتيونات

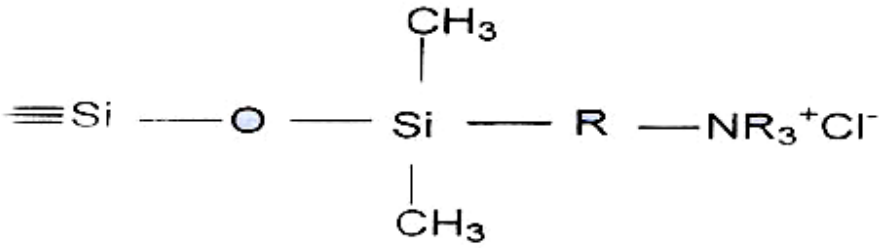
يحتوي هذا النوع من الأعمدة على طعوم قطبية لها الصيغة العامة التالية :



حيث R سلسلة كربونية مشبعة من C_3 ترتبط بالمجموعة الوظيفية $-SO_3^-H^+$.

- الطعوم التي يعتمد فيها الفصل على تبادل الأنيونات :

يحتوي هذا النوع من الأعمدة على طعوم قطبية لها الصيغة العامة التالية :



حيث R سلسلة كربونية مشبعة من C_3 .

8-4- التحليل الكيفي والكمي في الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء :
Qualitative and Quantitative Analysis in HPLC

8-4-1- التحليل الكيفي في الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء :
يتم إجراءالتحليل الكيفي انطلاقا من تحديد أزمنة الاحتفاظ أو حجوم الاحتفاظ للعينة المجهولة مقارنة مع العينات القياسية معلومة التركيز عند نفس شروط التجربة من طور ثابت وطورمتحرك وسرعة تدفق ودرجة حرارة .

8-4-2- التحليل الكمي في الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء :

يتم إجراء التحليل الكمي بعدة طرائق نذكر منها:

1- طريقة المقارنة : Comparative Method
نحضر محلولاً عيارياً واحداً لكل حلالة معلومة التركيز C ثم نحدد الارتفاع الموافق للقمة ولتكن h أو سطح القمة S .
وبعد معرفة فيمة الارتفاع h_x للعينة المدروسة أو السطح الموافق للقمة S_x يمكننا استنتاج التركيز المجهول للحلالة C_x انطلاقاً من العلاقة:

$$\frac{C_x}{C} = \frac{h_x}{h} = \frac{S_x}{S}$$

أي أن : $C_x = (h_x/h) \times C$

أو $C_x = (S_x/S) \times C$

2- طريقة المنحني العياري : Standards Curve Method

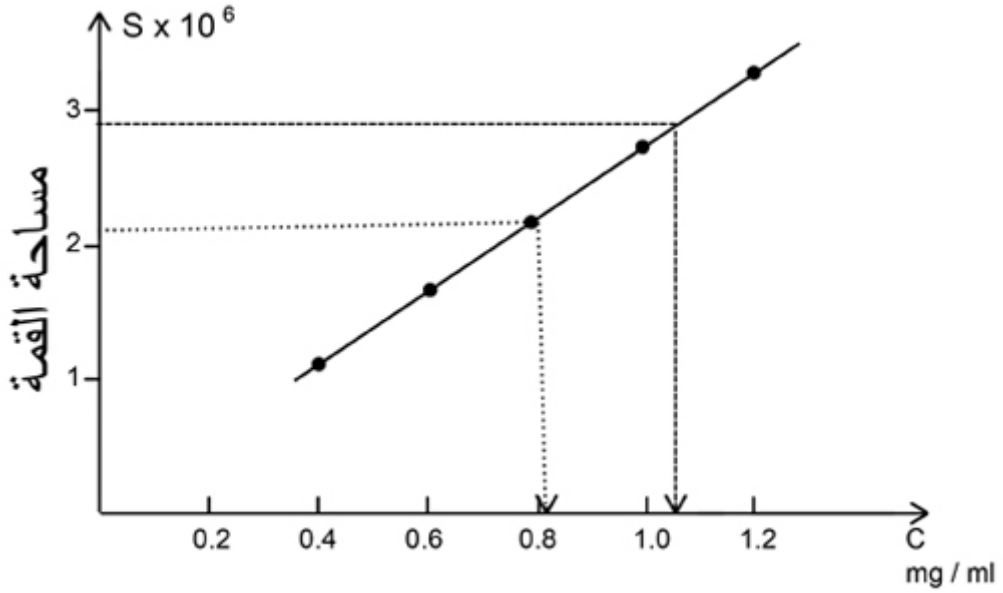
في هذه الطريقة نحضر عددا من المحاليل العيارية بتراكيز مختلفة معلومة لكل حلالة من حلالات المزيج .

لتكن تراكيز المحاليل العيارية هي:

$$C1 , C2 , C3, ……,Ci$$

$$S = f (C) \quad \text{أو} \quad h = f (C)$$

ونستنتج تركيز الحلالة المجهولة من معرفة hx أو السطح Sx الموافق للحلالة المدروسة ابتداءً من المنحني العياري (يجب اختيار قيم تراكيز المحاليل العيارية ضمن المجال الخطي) . يمكن رسم المنحني العياري للحلالة الثانية بنفس الطريقة لاحظ الشكل (7) .

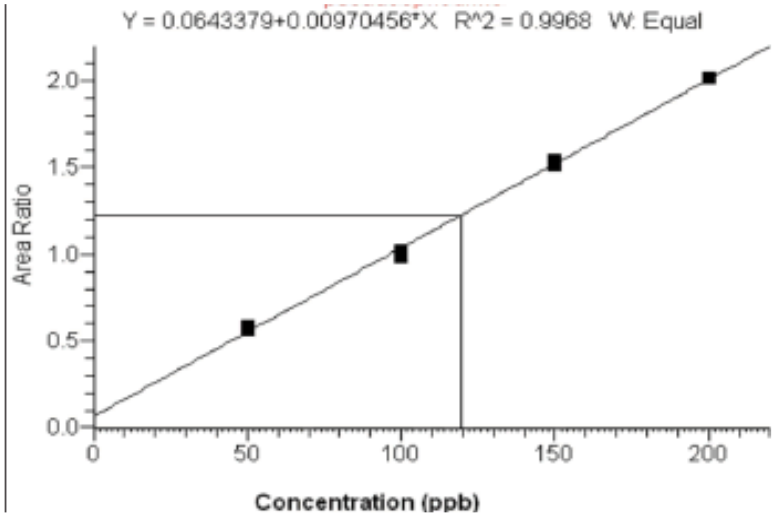


الشكل (7): المنحني العياري يعتمد مساحة القمة

3- طريقة المنحني العياري ذو العياري الداخلي : Internal Standard Method

يتم تحضير عددا من المحاليل العيارية بتراكيز مختلفة ومعلومة بدقة لكل حلالة ويضاف لكل محلول من هذه المحاليل وكذلك لمحلول العينة كمية محدد a من مركب جديد له زمن احتفاظ مجاور لزمن احتفاظ الحلالة يسمى بالعياري الداخلي (أي أن الكمية المضافة a متساوية في جميع المحاليل العيارية والعينة) .

نرسم المنحني العياري بين تراكيز المحاليل العيارية والارتفاع النسبي الموافق لقسمة الارتفاع hi للمحاليل العيارية على الارتفاع الموافق للعياري الداخلي ha أو السطح النسبي الموافق لقسمة السطوح الموافقة للمحاليل العياريةSiعلى السطح الموافق للعياري الداخلي Sa ثم نستنتج قيمة تركيز العينة المجهولة من معرفة النسبة ، hx/ha أو النسبة Sx/Sa والتي توافق قسمة الارتفاع أو السطح الموافق للعياري الداخلي ، كما في الشكل التالي:



الشكل (8): منحني عياري داخلي

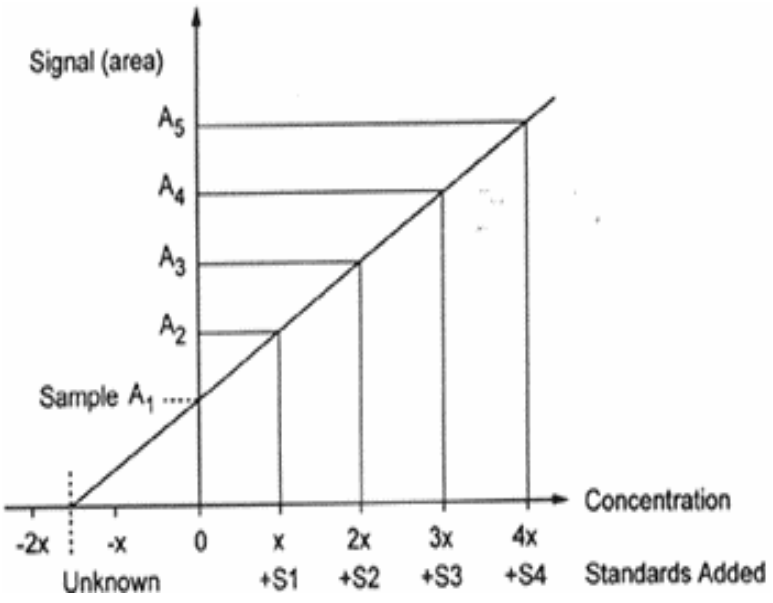
4- طريقة الإضافة القياسية: Standard addition method

تستخدم هذه الطريقة في الحالات التي يصعب فيها تحضير منحني أو خط تعيير قياسي بسبب عدم معرفة تركيب محلول العينة المراد تحليلها .

في هذه الطريقة يقاس امتصاص المحلول المجهول وليكن A ثم يضاف إلى نفس المحلول ، كمية معروفة من نفس المادة المراد تحليلها 'C ويقاس الامتصاص مرة ثانية ولتكن 'A . بناءً على قانون بيير يمكن إيجاد التركيز المجهول C من الصيغة التالية :

$$A/A' = C/(C + C')$$

كذلك يمكن إجراء إضافات على محلول العينة ويقاس الامتصاص بعد كل إضافة ثم ترسم العلاقة بين الامتصاص والكميات المضافة حيث نحصل على خط مستقيم وبتمديده يتقاطع مع محور التركيز ، فنحصل على التركيز المطلوب كما في الشكل (9) :



الشكل (9): التمثيل البياني لطريقة الإضافة القياسية

5-8- العناية بأعمدة الـ HPLC HPLC Column Care

1-التخزين الملائم للأعمدة Proper storage of HPLC columns

-عند تخزين العمود **لمدة قصيرة** خلال يوم واحد يمكن ترك المحل المستخدم ضمن العمود.

-عند تخزين العمود **لمدة متوسطة** بحيث لا تتجاوز الاسبوع يجب غسل العمود بالماء الخاص بـ HPLC (HPLC-Grade) لمنع نمو أي جرثومي.

-عند تخزين العمود **لمدة طويلة** أكثر من أسبوع يستعمل الماء مع الاسيتونتريل بنسبة 20% إلى 80% حجماً على الترتيب.

2- زمن توازن العمود Equilibration time

عند تبديل الطور المتحرك أو البدء في عملية تحليل جديدة يجب غسل العمود الكروماتوغرافي بالطور المتحرك الجديد بما يعادل 20 مرة من حجم العمود وذلك حتى يحدث توازن للعمود وتكون فعاليته جيدة والجدول رقم (2) يوضح الزمن والحجم اللازمين لتوازن العمود.

الجدول (2): الزمن والحجم اللازمين لتوازن العمود.

أبعاد العمود Column dimension	حجم العمود Column volume [ml]	معدل التدفق Flow rate [ml/min]	زمن التوازن Equilibration time [min]
250 x 4.6 mm	2.91	1.00	58
150 x 4.6 mm	1.74	1.00	35
100 x 4.6 mm	1.16	1.00	23
50 x 4.6 mm	0.58	1.00	12
250 x 4.0 mm	2.20	1.00	44
125 x 4.0 mm	1.10	1.00	22
250 x 2.0 mm	0.55	0.25	44
150 x 2.0 mm	0.33	0.25	26
50 x 2.0 mm	0.11	0.25	9

3- تنشيط الأعمدة Regeneration of a column

يعد تنشيط الأعمدة ضروري جداً للتخلص من بعض المواد الممتزة على الطور الثابت. حيث تؤدي عملية التنشيط إلى تطويل عمر العمود والمحافظة عليه بفاعلية جيدة وتختلف عملية التنشيط باختلاف نوعية حشوة العمود.

- تنشيط أعمدة الطور العكوس

Regeneration of RP (Reverse Phase) packings

ومن هذه الأعمدة:

RP- packings are C18, C8, C4, C1, C30, CN or Phenyl stationary phases.

وتتم عملية التنشيط كما يلي:

1-غسل العمود 20 مرة من حجمه بالماء

2-غسل العمود 20 مرة من حجمه بالاسيتونتريل

3-غسل العمود 5 مرات من حجمه بالايزوبروبانول

4-غسل العمود 20 مرة من حجمه بالهبتان

5-غسل العمود 5 مرات من حجمه بالايزوبروبانول

6-غسل العمود 20 مرة من حجمه بالاسيتونتريل

- تنشيط أعمدة الطور العادي

Regeneration of NP (Normal Phase) packings

ومن هذه الأعمدة:

NP-packings are Silica, Diol, Nitro and Amino stationary phases.

وتتم عملية التنشيط كما يلي:

1-غسل العمود 20 مرة من حجمه بالهبتان

2-غسل العمود 5 مرات من حجمه بالايزوبروبانول

3-غسل العمود 20 مرة من حجمه بالاسيتونتريل

4-غسل العمود 20 مرة من حجمه بالماء

5-غسل العمود 20 مرة من حجمه بالاسيتونتريل

6-غسل العمود 5 مرات من حجمه بالايزوبروبانول

7-غسل العمود 20 مرة من حجمه بالهبتان

- تنشيط أعمدة التبادل الأيوني

Regeneration of Ion Exchange Packings

وهي تتم لأعمدة التبادل الآنيوني والكاتيوني وتتم عملية التنشيط كما يلي:

1-غسل العمود 20 مرة من حجمه بنفس المحل لكن بتركيز مضاعف للمحلول الموقي.

2-غسل العمود بنفس الطريقة المتبعة أثناء تنشيط أعمدة الطور العكوس (Regeneration of RP packings) والمنوه عنها سابقاً.

3-غسل العمود 20 مرة من حجمه بالماء

4-تتم موازنة العمود بالشروط الأساسية المعتمدة للعمود.

6-8- تطبيقات على الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء Application of HPLC

مثال (1) :

تمت تطبيق تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء في معايرة مستحضر ميترونيدازول عيار 250 ملغ أقراص . إذا علمت أن الوزن الوسطي للحبة الواحدة هي W_1= 0.310 g وأن مساحة القمة (peak) لعينة وزنها W_2= 0.062 g هي (At) = 8107 ومساحة القمة للمحلول القياسي هي = (As) 8145 الذي تركيزه يساوي 0.05% والمطلوب ما يلي :

1- ما هو المحتوى الفعلي من الميترونيدازول في الحبة الواحدة

2- ما هي النسبة المئوي للميترونيدازول

الحل:

$$\text{Practical concentration} = \frac{\text{At} \times \% \times \text{W1}}{\text{As} \times \text{W2}}$$

$$\text{Practical concentration} = \frac{8107 \times 0.05 \times 0.31}{8145 \times 0.062} = 0.249 \text{ g}$$

$$P\% = \frac{practical\ concentration}{Theoretical\ concentration} \times 100$$

$$\text{P\%} = \frac{0.249}{0.250} \times 100 = 99.6\ \%$$

مثال (2) :

تم تحليل مستحضر يحتوي على كل من الأيبوبروفن والبارسيتامول بتقنية الـ HPLC فكان زمن الاحتفاظ لكل منهما 16.40 و 17.63 دقيقة على الترتيب وكان عرض القمة لكل منهما 1.11 و 1.21 دقيقة على الترتيب والمطلوب :

1-حساب معامل التفريق أو التباين

2-حساب عدد الصفائح النظرية الوسطية للعمود

3-حساب الارتفاع المكافئ لصفيحة نظرية

4-هل يوجد تداخل بين القمتين أم لا

1-حساب معامل التفريق أو التباين:

$$Rs = \frac{d}{\frac{1}{2}(w_1+w_2)}$$

$$Rs = \frac{17.63 - 16.40}{\frac{1}{2}(1.11+1.21)} = 1.06$$

2-حساب عدد الصفائح النظرية الوسطية للعمود:

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

$$N = 16\left(\frac{16.40}{1.11}\right)^2 = 3493 \quad \text{and} \quad N = 16\left(\frac{17.63}{1.21}\right)^2 = 3397$$

$$N_{av} = \frac{3493 + 3397}{2} = 3445 = 3.4 \times 10^3$$

3-حساب الارتفاع المكافئ لصفيحة نظرية:

$$H = \frac{L}{N} = \frac{30.0}{3445} = 8.7 \times 10^{-3}\,\text{cm}$$

4-هل يوجد تداخل بين القمتين أم لا:

نعم يوجد تداخل بين قمة الأيبوبروفن والباراسيتامول لأن قيمة معامل التفريق هي أقل من 1.5 أي أن (R_S <1.5).

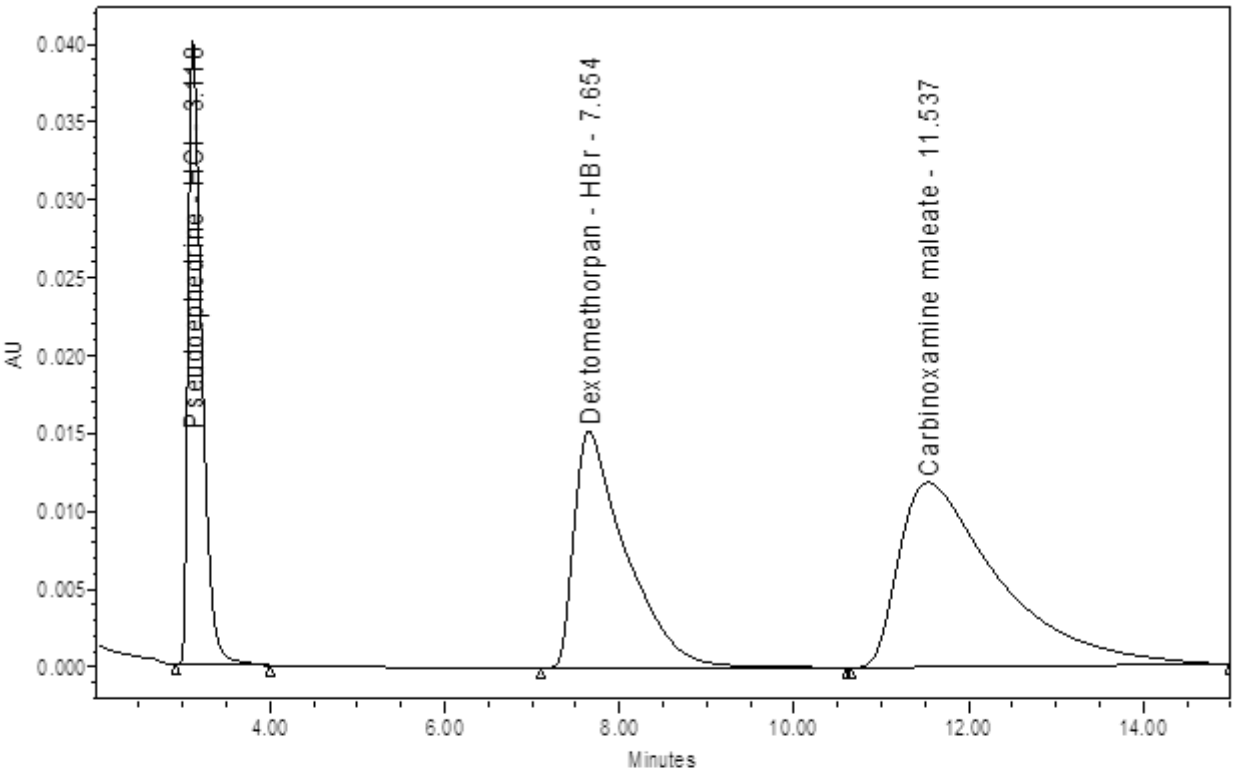
8-7- تحليل بعض المستحضرات الدوائية باستخدام الـ HPLC

8-7-1- تحليل مستحضر دوائي يحتوي على:

بسودوافدرين هيدروكلوريد Pseudoephedrine Hydrochloride ،
وديكستروميتورفان هيدروبروميد Dextromethorphan Hydrobromide
وكاربينوكسامين ماليئات carbinoxamine maleate

أثناء عملية التحليل تم تطبيق الشروط الكروماتوغرافية التالية :
ـ العمود المستخدم هو من السيليكا أو ما يعرف بالعمود L3 أبعاده (150 mm × 3.9 mm).
ـ درجة الحرارة المستخدمة هي درجة حرارة الغرفة .
ـ الكاشف المستخدم هو كاشف الأشعة فوق البنفسجية ويعمل عند طول الموجة 267 nm.
ـ زمن التحليل الكلي 15 دقيقة .
ـ حجم خلية الحقن 20 ميكروليتر .
ـ المحل المستخدم : لجميع العينات هو محلول من حمض كلور الماء تركيز (0.01 N) .
ـ الطور المتحرك المستخدم هو مزيج من [الإيتانول ـ محلول خلات الأمونيوم 0.05 M] بنسبة [15:85] على الترتيب .
ـ تدفق الطور المتحرك هو 1 مل /دقيقة .

والشكل رقم (10) يوضح الكروماتوغرام لهذا المستحضر.



	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	% Height	Amount	Units
1	Pseudoephedrine - HCl	3.118	435418	21.69	40089	59.71	1.203	mg / ml
2	Dextomethorpan - HBr	7.654	627780	31.28	15204	22.65	0.193	mg / ml
3	Carbinoxamine maleate	11.537	943849	47.03	11845	17.64	0.098	mg / ml

الشكل (10): يوضح الكروماتوغرام لهذا المستحضر.

8-7-2- تحليل مستحضر دوائي يحتوي على بعض الفيتامينات وهي:

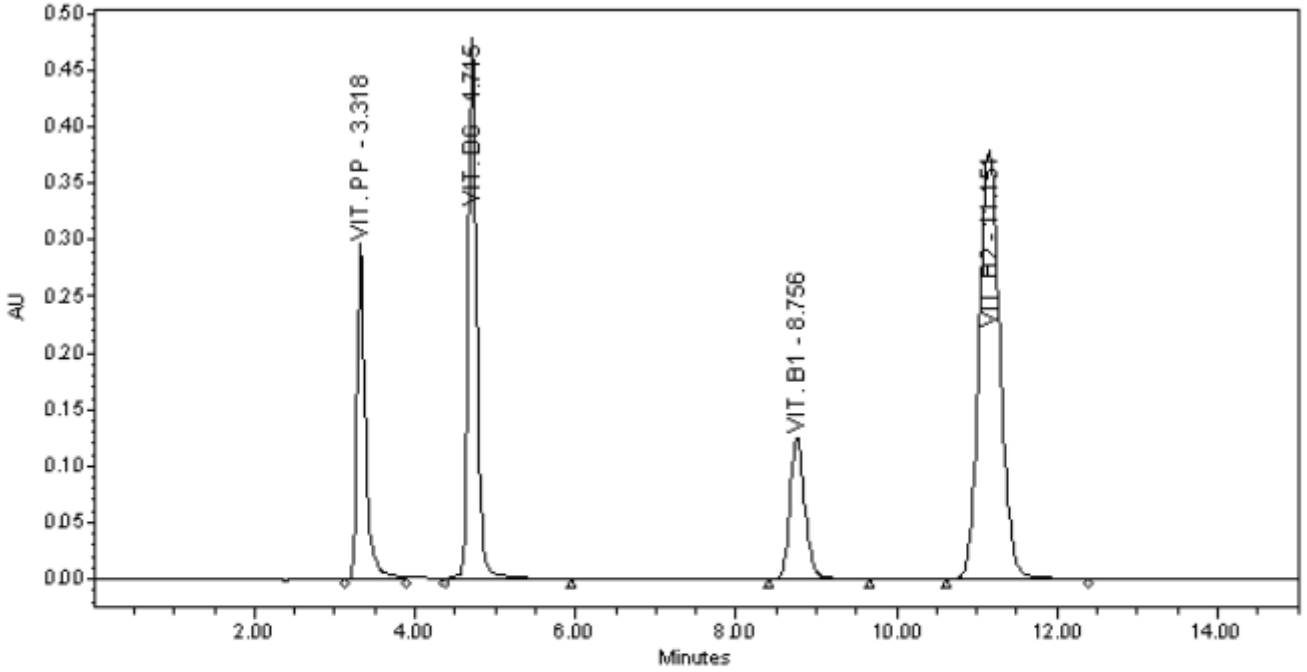
- نياسيناميد Niacinamide (vit.PP)
- بيريدوكسين هيدروكلوريد Pyridoxine Hydrochloride ($vit.B_6$)
- ريبوفلافين Riboflavin ($vit.B_2$)
- التيامين هيدروكلوريد Thiamine Hydrochloride (vit. B_1)

لقد تم تطبيق الشروط التالية في طريقة التحليل هذه:

- العمود المستخدم هو C18 او ما يعرف بـ L1 أبعاده (250× 4.6 mm)
- كاشف الأشعة فوق البنفسجية UV ويعمل عند طول الموجه 280= λ nm
- حجم خلية الحقن 20 µl.
- تدفق الطور المتحرك المستخدم هي 1ml/min .
- زمن التحليل الكلي بحدود 15 دقيقة .
- درجة الحرارة المستخدمة هي درجة حرارة الغرفة .
- المحل المستخدم هو مزيج من (ماء – اسيتونتريل – حمض الخل الثلجي) بنسبة (1:5:94)على الترتيب .

- الطور المتحرك المستخدم هو (ماء – ميتانول – حمض الخل الثلجي) بنسبة (1:27:72) على الترتيب والذي يحتوي في كل 100 مل منه على 140 مغ من 1- هتبان سلفونات الصوديوم ، وتم تعديل قيمة pH المحلول للطور المتحرك بإضافة محلول من هيدروكسيد الصوديوم تركيزه (2N) حتى قيمة pH= 5 ± 0.2

والشكل رقم (11) يوضح الكروماتوغرام لهذا المستحضر.



	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	% Height	Amount	Units
1	VIT. PP	3.318	2164957	15.27	295029	23.08	100.000	P%
2	VIT. B6	4.715	3587391	25.30	477473	37.36	100.000	P%
3	VIT. B1	8.756	1616889	11.40	125406	9.81	100.000	P%
4	VIT. B2	11.151	6810166	48.03	380217	29.75	100.000	P%

الشكل (11): كروماتوغرام لبعض الفيتامينات.

الفصل التاسع
الرحلان الكهربائي

Electrophoresis

9-1- مقدمة:

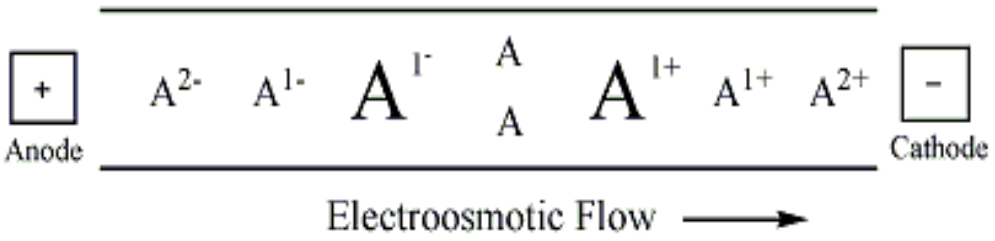
يعد الرحلان الكهربائي طريقة فصل تقوم على تفريق سرعة هجرة الأنواع المشحونة بتطبيق حقل كهربائي مستمر . ويرجع الفضل في هذه التقنية إلى الكيميائي السويدي آرن تسيلوس Arn Tiselius في الثلاثينات من القرن الماضي في دراسته لبروتينات المصل، وقد استحق جائزة نوبل في الكيمياء لذلك في العام 1948.

طبق الرحلان الكهربائي على المستوى الماكروي على العديد من مسائل الفصل الصعبة في الكيمياء التحليلية ، بما فيها الأنيونات اللاعضوية وكاتيوناتها والحموض الأمينية والعقاقير والفيتامينات والنكلوتيدات والبروتينات والحموض النووية وأنواع كثيرة غيرها. وتكمن المزية الرئيسة للرحلان الكهربائي في مقدرتها المتميزة في فصل الجزيئات الضخمة المشحونة ذات الأهمية في الأبحاث الطبية الحيوية والحيوية الكيميائية والصناعات الحيوية التقنية . فهي الطريقة المختارة لسنين عديدة خلت لفصل البروتينات (الأنزيمات والهرمونات والمضادات الحيوية) والحموض النووية (RNA,DNA) مع غياب ما يضاهيها في هذا الشأن. فمثلاً من أجل تسلسل DNA يحتاج إلى التمييز بين متعددة النكليوتيدات الطويلة السلسلة التي تحوي نحو 200 إلى 500 أساس ، لا يختلف الواحد عن الآخر إلا بنكليوتيد واحد فقط ، والرحلان الكهربائي هو التقنية الوحيدة التي تمتلك مثل هذه المقدرة على التفريق لمعالجة هذه المسألة. وبدون الرحلان الكهربائي لم يكن ممكناً إنشاء المصور الجيني البشري لأن DNA الإنسان يحتوي بعضاً من ثلاثة بلايين من النكليوتيدات.

9-2- مبدأ الرحلان الكهربائي

يقوم الفصل بالرحلان الكهربائي على حقن شريط صغير من العينة في محلول موق محتوى في أنبوب ضيق في وسط مسامي داعم مثلاً: من الورق أو من هلام نصف صلب، يطبق كمون عال عبر كامل طول منطقة الموقي باستخدام زوج من الإلكترودات عند طرفي الموقي، فيتسبب هذا الحقل في هجرة أيونات العينة باتجاه أحد الطرفين. تعتمد سرعة هجرة نوع معين على شحنته وحجمه ، وهكذا يعتمد الفصل على اختلاف نسبة الشحنة إلى الحجم للأنواع المشحونة في العينة المحللة. وكلما ازدادت هذه النسبة لأيون ما، كانت هجرته أسرع في الحقل الكهربائي.

لاحظ الشكل رقم (1) يوضح مخطط فصل المواد المشحونة والمعتدلة بالرحلان الكهربائي



الشكل (1): مخطط فصل المواد المشحونة والمعتدلة بالرحلان الكهربائي

9-3- مكونات جهاز الرحلان الكهربائي Instrument

يتألف الجهاز من الأقسام التالية:

1-مزود الطاقة
2-وحدة ادخال العينة
3-محلول موقي
4-وسط تتم عليه عملية التحليل (وسط الفصل)
5- متحري

1-مزود الطاقة

وهو يؤمن حقل كهربائي ثابت بين الكترودين كاثود وآنود.

2-وحدة ادخال العينات

لعل أكثر طرائق إدخال العينة شيوعاً هو الحقن الحركي الكهربائي والحقن بالضغط. ففي الحقن الكهربائي يزال أحد طرفي الأنبوب الشعري مع إلكتروده من حجرة المحلول الموقي ويوضعان في كأس صغير يحتوي العينة. يطبق عندئذ فولطاج فترة زمنية محددة فيتسبب بدخول العينة إلى الشعري بتضافر الهجرة الأيونية وجريان التناضح الكهربائي، يعاد بعدئذ طرف الشعري هذا مع الإلكترود إلى المحلول الموقي النظامي لإجراء الفصل.

3-المحلول الموقي

ومن المهام الرئيسة لاستخدام المحلول الموقي هو:

1-يحمل التيار المطبق
2-يمتلك قوة أيونية عالية
3-يحافظ على قيمة درجة الحموضة
4-يعطي قمم حادة أثناء عملية التحليل

4-وسط الفصل

ويوجد نوعين من الأوساط التي يتم عليها الفصل وهما:

1-الرحلان الكهربائي اللوحي أوالشريحي

2-الرحلان الكهربائي الشعري

وسيتم شرح كل منهما في فقرة أنماط الفصل.

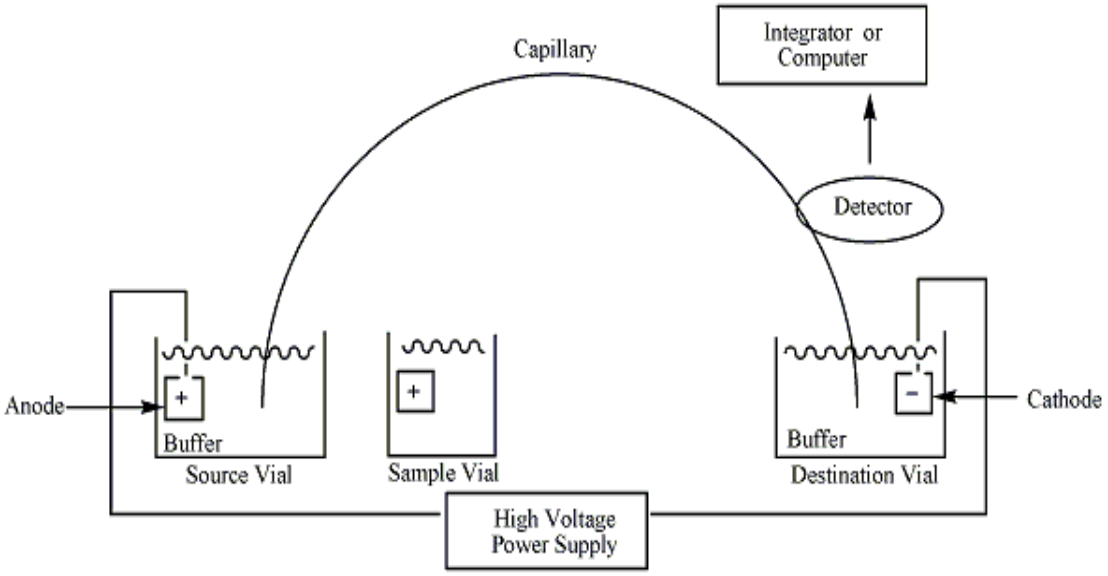
5-المتحري

هناك العديد من وحدات التحري المستعملة وهي نفس المتحريات المستعملة في الكروماتوغرافية السائلة العالية الأداء (HPLC) والجدول رقم (1) يوضح بعض هذه المتحريات.

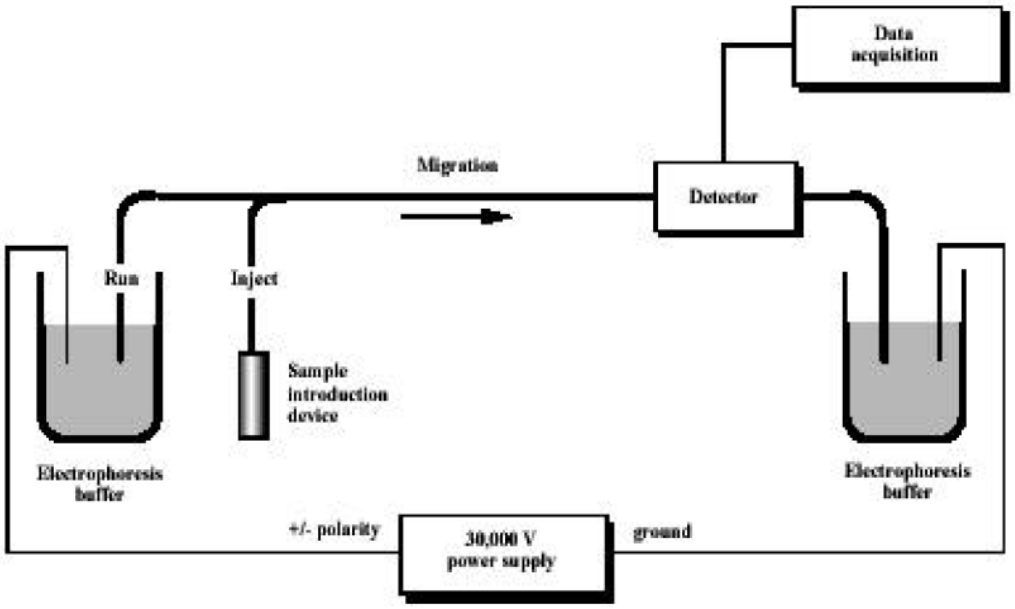
الجدول (1) : بعض المتحريات المستعملة في الرحلان الكهربائي

نمط المكشافات	حدود الكشف النموذجية بالأوتومول(attomoles)
مطيافية الامتصاص	1-1000
التفلور	1-0.01
العدسة الحرارية	10
رامان	1000
التألق الكيميائي	1-0.0001
مطيافية الكتلة	1-0.01
الناقلية	100
قياس الكمون	1
قياس التيار	0.1

وفي الشكلين رقم (2) ورقم (3) يوجد مخططان لجهاز الرحلان الكهربائي الشعري



الشكل (2) : مخطط لجهاز الرحلان الكهربائي الشعري



الشكل (3) : مخطط لجهاز الرحلان الكهربائي الشعري

4-9- أنماط الرحلان الكهربائي Types of electrophoresis

يأخذ الفصل بتقنية الرحلان الكهربائي في الوقت الحاضر واحداً من شكلين أساسيين : يدعى الأول: الرحلان الكهربائي اللوحي " الشريحي slab electrophoresis، ويدعى الآخر الرحلان الكهربائي الشعري capillary electrophoresis. فالأول هو الطريقة التقليدية التي استخدمت لسنين عديدة لفصل الأنواع الحيوية والحيوية الكيميائية المعقدة ذات الكتل الجزيئية الكبيرة. تجري عملية الفصل هنا على لوحة أو طبقة رقيقة مستوية من مادة هلامية مسامية نصف صلبة تحتوي محلولاً موقياً مائياً ضمن مساماتها، بعرض لايتجاوز بضع سنتمترات، وهي مثلها في ذلك مثل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، تستطيع فصل عدة عينات في آن واحد. تطبق العينات على شكل بقع أو شرائط على اللوحة ثم يطبق الحقل الكهربائي المستمر عبر اللوحة فترة زمنية محددة. وعند نهاية عمليات الفصل يوقف الحقل وتظهّر الأنواع المفصولة بالتلون بالطريقة ذاتها في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.

لعل الفصل بالرحلان الكهربائي اللوحي هو الأكثر استخداماً في فصل العينات الحيوية والحيوية الكيميائية. وتنتشر صور آلاف اللوحات المظهرة بهذه الطريقة في مجلات علوم الحياة المختصة. أما الرحلان الكهربائي الشعري، الذي يعد النسخة الآلية للرحلان الكهربائي، فقد تطور في منتصف الثمانينات إلى أواخرها من القرن الماضي، وأصبح أداة مهمة في كثير من مسائل الفصل التحليلية، وقد حل بنجاح ، في كثير من الحالات، محل الرحلان الكهربائي اللوحي، مع العديد من الإيجابيات التي نستعرضها في هذا الفصل.

وعادة ما يسمى الرحلان الكهربائي للشحنات الموجبة (كاتيونات)
Cataphoresis أي **الرحلان الكاتيوني** ، بينما يدعى الرحلان الكهربائي للشحنات السالبة (الآنيونات) **Anaphoresis** أي **الرحلان الآنيوني**.

9-5- بعض التطبيقات على الرحلان الكهربائي Application

لندرس بعض التطبيقات على الرحلان الكهربائي

9-5-1- طريقة الرحلان الكهربائي بواسطة الجل Gel Electrophoresis

لندرس الرحلان الكهربائي بواسطة جل الأجاروز للأحماض النووية والبروتين.

من المعروف أن لكل بروتين له شحنة كهر بائية خاصة وعلى هذا الأساس يتم القياس والتفريق بالرحلان الكهربائي electrophoresis ، ولإجراء الاختبار لابد من استخدام وسط خاص مثل الجل gel ، بعد ذلك تتحرك البروتينات فوق الجل كلُ حسب شحنته وقوته الكهربائية وبذلك يتم الفصل بين الأنواع المختلفة من البروتينات. وايضاً من الممكن قياس هذا الفصل والفرق بين البروتينات الذي يرتبط بأمراض معينة.

مثال: نقص في الالبومين وزيادة في الفا جلوبيولين 2 قد تشير إلى وجود نوبة قلبية ، ايضاً نقص في الالبومين و زيادة في جلوبيولين 2 و جاما جلوبيولين قد تشير إلى تليف كبدي وهكذا.

ومن ميزات هذه الطريقة :

- يعتبر الفصل الكهربائي بواسطة الجل من أكثر التقنيات استعمالاً لتحليل الأحماض النووية والبروتين.
- جل الأجاروز يستعمل غالباً لتحليل الحمض النووي DNA.
- الفصل الكهربائي بواسطة الجل يعمل على مبدأ فصل الجزيئات على الحركة داخل الجل تحت تأثير المجال الكهربائي لاحظ الشكل رقم (4).

- يستعمل الفصل الكهربائي بواسطة الجل لتحديد النواتج بعد عملية تضخيم DNA بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي.

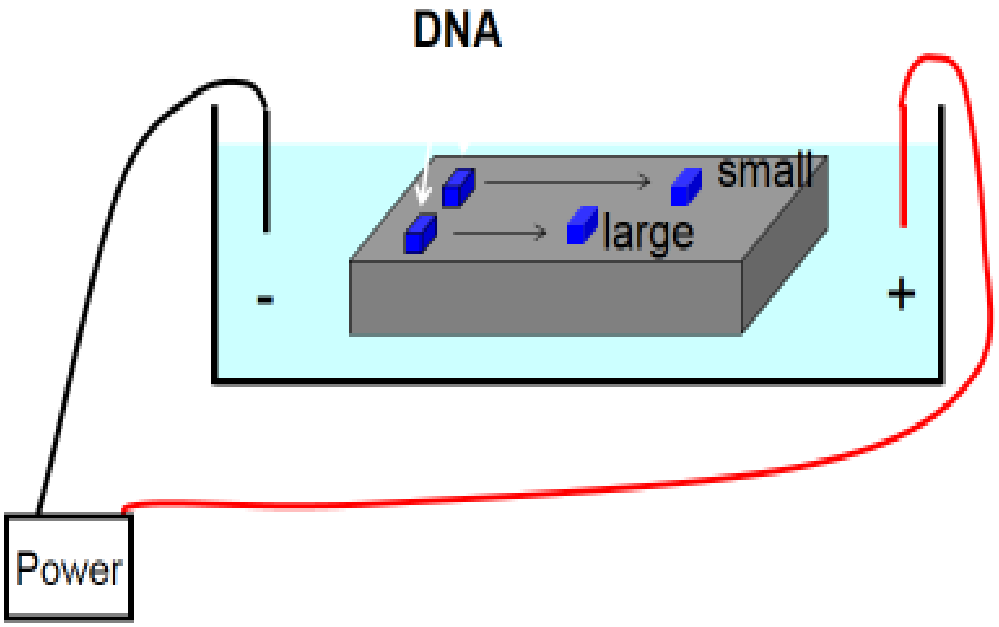
الرحلان الكهربائي للـ DNA سيتم نتيجة العوامل التالية:

1- قوة المجال الكهربي.

2- المحلول الموقي.

3- كثافة جل الأجاروز.

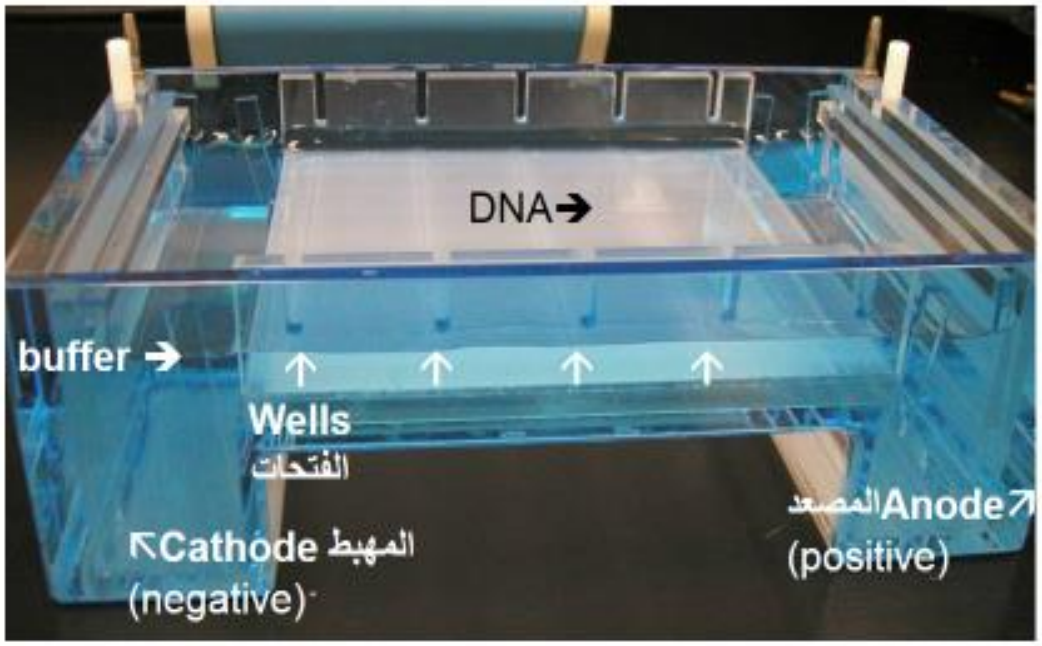
4- حجم الحمض النوويDNA. الأصغر حجماً هو الأسرع.



الشكل (4) : مخطط لجهاز الرحلان الكهربائي الهلامي

1- تحضير حوض الرحلان الكهربائي

نصب المحلول الموقي في حوض الرحلان الكهربائي حتى نغطي سطح الجل، ويجب التأكد من أن المحلول تغلغل داخل جميع الفتحات كما في الشكل رقم (5).



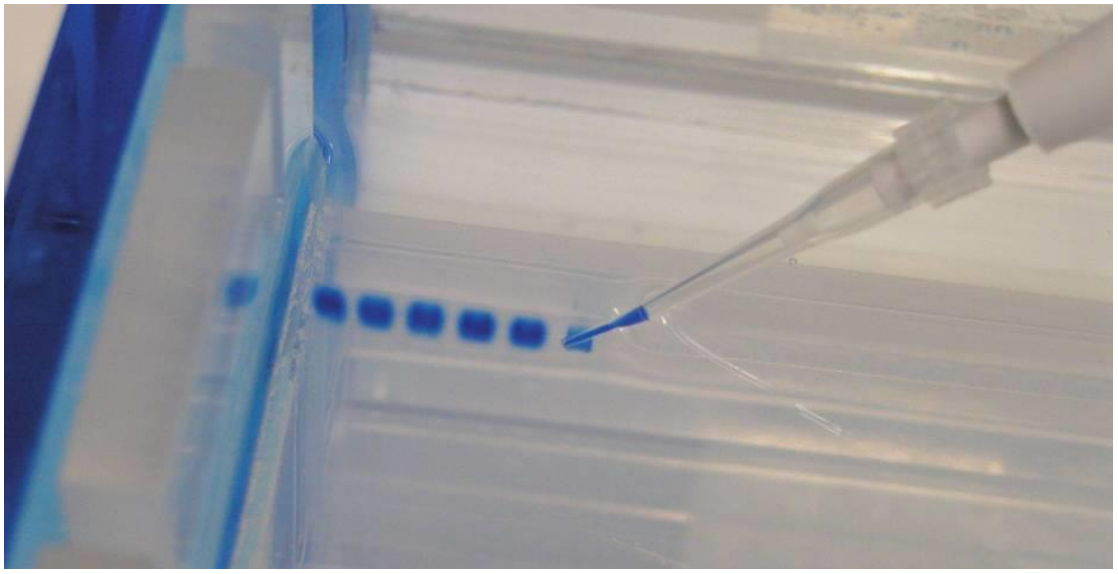
الشكل(5): المحلول الموقي في حوض الرحلان الكهربائي .

2- تحميل عينة الـ DNA على اللوح

عند تحميل عينة الدنا في الغالب نتبع الخطوات التالية:

- العينة تكون شفافة لذلك تمزج معها صبغة (3مايكروليتر صبغة + 5 مايكروليتر من العينة).

- تحمل العينة بحرص شديد بالماصة الإلكترونية داخل فتحات الجل كما في الشكل رقم (6).



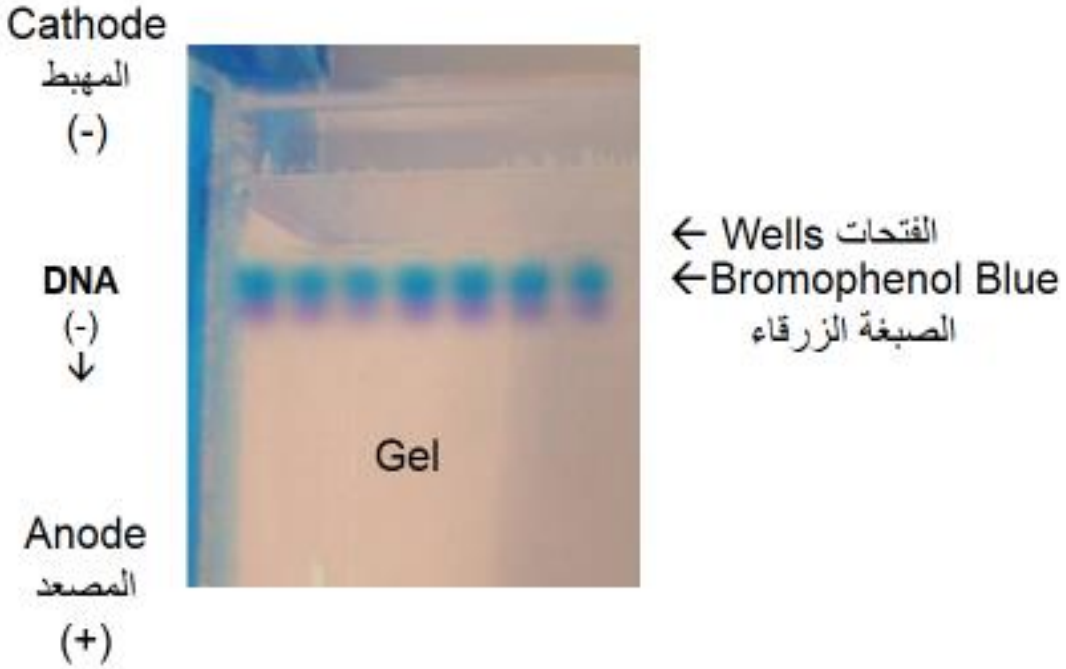
الشكل (6) : تحميل العينة على لوح الجل في جهاز الرحلان الكهربائي الهلامي

- يغطى حوض الرحلان بالغطاء الخاص بالجهاز مع مراعاة أن يكون كل قطب في محله .
- يتم وصل مصدر الطاقة.
- يلاحظ أن الـ DNA سوف يرحل أو يهاجر للقطب الموجب(المصعد) أي باتجاه السلك الأحمر لاحظ الشكل رقم (4) السابق الذي يوضح ذلك.

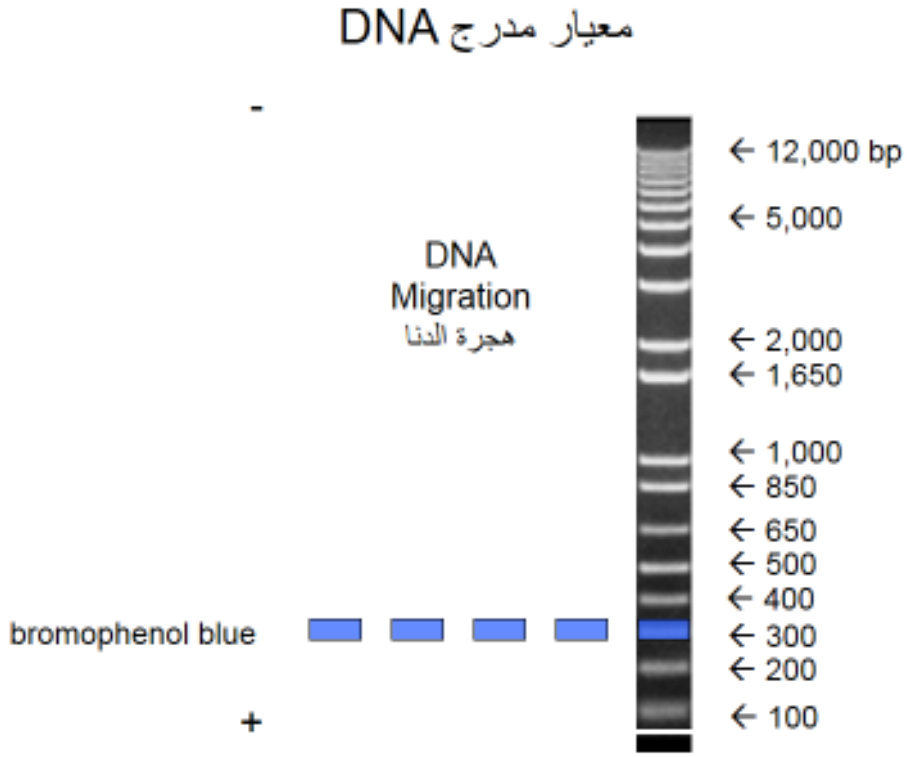
3- تشخيص النتائج

بعد إنجاز عملية التحليل نجد أن لوح الجل (الهلام) وعليه الجزيئات الـ DNA المفصولة كما هو موضح في الشكل (7).والشكل رقم(8) يوضح جزيئات الـ DNA المفصولة على لوح الجل مقارنة مع المعيار المدرج . والشكل رقم (9)

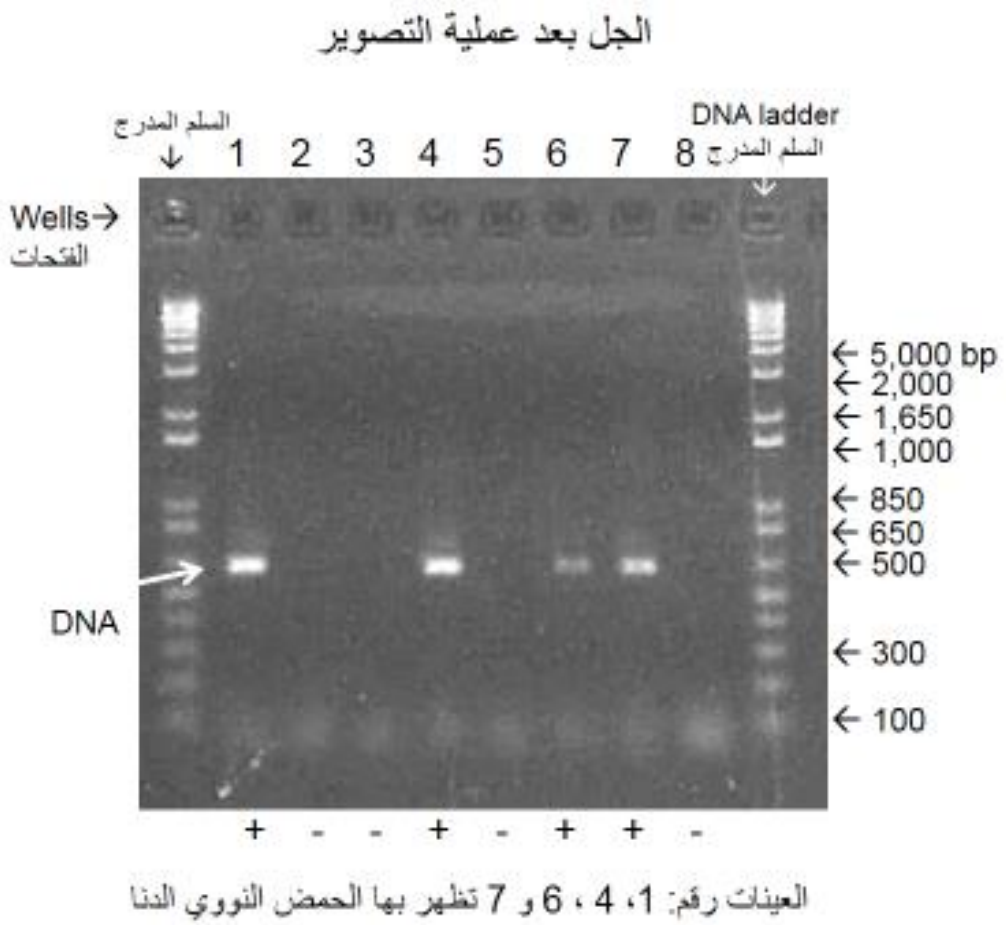
يوضح جزيئات الـ DNA المفصولة على لوح الجل بعد عملية التصوير حيث دائماً تتم المقارنة مع سلم معياري لمعرفة نوع وكمية المادة المدروسة.



الشكل (7) : جزيئات الـ DNA المفصولة على لوح الجل في جهاز الرحلان الكهربائي

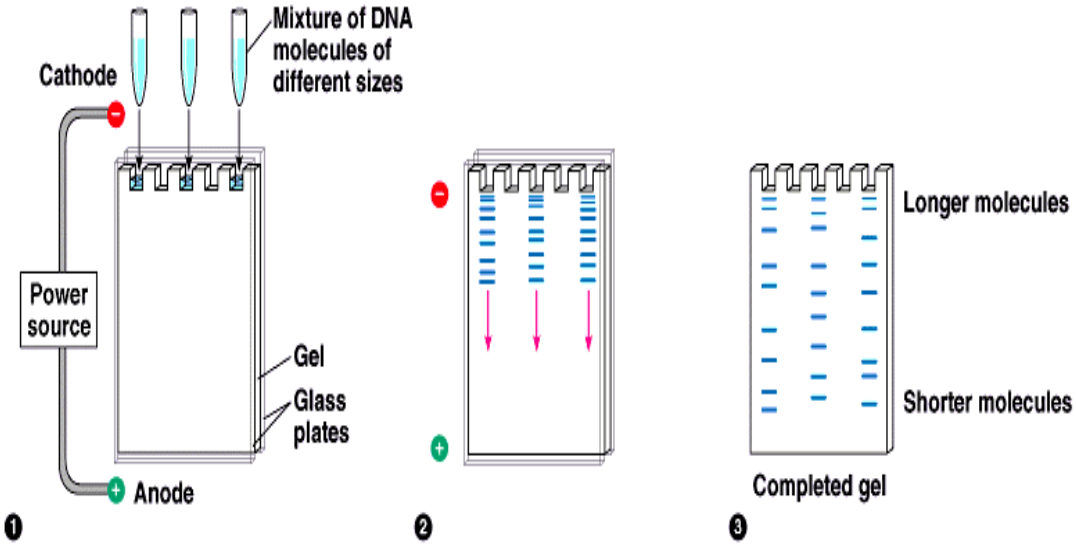


الشكل (8) : جزيئات الـ DNA المفصولة على لوح الجل مقارنة مع المعيار المدرج



الشكل رقم (9) : يوضح جزيئات الـ DNA المفصولة على لوح الجل بعد عملية التصوير.

ويمكن تلخيص عملية التحليل بالرحلان الكهربائي بطريقة الجل بالمخطط الموجود بالشكل رقم (10) وذلك ابتداءً من الرقم 1 وحتى الرقم 3 :



الشكل (10): مخطط الرحلان الكهربائي بواسطة الجل