الفصل باستخدام طرائق الكروماتوغرافيا

Separation by Chromatographic Methods

تعريف الكروماتوغرافيا
Description of Chromatography

- أوضحت التجارب التي أجريت منذ العام 1903 أنه بالإمكان الاستفادة من ظواهر الادمصاص من أجل فصل مكونات بعض الأمزجة، ولكن لم يتضح هذا الأمر بالشكل المعروف إلا عام 1906 عندما فصل العالم النباتي الروسي TSWEET الأصبغة النباتية، ومنذ ذلك الحين وحتى الآن يطلق على طريقة الفصل هذه اسم الكروماتوغرافيا Chromatography.
- استخدم العالم تسويت عموداً من الزجاج يحوي فحمات الكالسيوم المطحونة بشكل ناعم ثم أدخل إلى العمود مزيجاً لأصبغة نباتية (الكلوروفيل والكسانتوفيل) المستخلصة بإيتر البترول، فلاحظ تثبتها على قمة عمود فحمات الكالسيوم، وبإمرار إثير البترول على العمود لاحظ هجره الأصبغة من الأعلى إلى الأسفل مع انفصالها عن بعضها بسبب تمتع كل صباغ بسرعة هجرة خاصة به.
- ومنذ ذلك الحين سميت الطريقة chromatography وهي ما أطلقه سويت على هذه العملية بعد انفصال الأصبغة وإعادة استخلاصها Elution بشكل اصطفائي وذلك بفك الادمصاص Desorption، وكذلك تسمية الطور الثابت stationary phaseوالطور المتحركmobile Phase.

- ومنذ ذلك الحين وقد عرفت طرائق الكروماتوغرافيا بأنها:

-طرائق فصل تعتمد على فصل مكونات العينة المراد فصلها بالاعتماد على توزعها بين طورين: طور ثابت (stationary phase) و طور متحرك (mobile phase).

- مهما اختلفت الآلية التي يتم فيها الفصل في طرائق الكروماتوغرافيا إلا أن جميع هذه الطرائق تشترك في أن المادة تصل إلى حالة من التوازن في توزعها بين الطورين الثابت والمتحرك.

- كلما ازداد التأثير المتبادل (interaction) بين المادة المراد فصلها والطور الثابت كلما غادرت عمود الفصل ببطء أكثر

تصنيف طرائق الكروماتوغرافيا
Classification of Chromatographic Methods

-يتم تصنيف طرائق الكروماتوغرافيا تبعاً لعدة معايير:

أ- حسب طبيعة الطور الثابت والمتحرك:

1- الكروماتوغرافيا سائل – سائل (liquid-liquid chromatography) يكون الطور الثابت والمتحرك في هذا النوع من الكروماتوغراقيا سائلين

2- الكروماتوغرافيا سائل – صلب (liquid- solid chromatography): يكون الطور الثابت في هذا النوع طوراً صلباً بينما يكون الطور المتحرك سائلاً

3- الكروماتوغرافيا غاز- صلب (gas- solid chromatography): يكون الطور الثابت فيها صلباً والطور المتحرك غازياً

4- الكروماتوغرافيا غاز- سائل(gas – liquid chromatography):يكون الطور الثابت فيها سائلاً والطور المتحرك غازياً

ب- حسب الحامل للطور الثابت:

تقسم طرائق الكروماتوغرافيا حسب الحامل للطور الثابت إلى:

1- كروماتوغرافيا العمود coloumn chromatography: حيث يُحمَل الطور الثابت ضمن عمود اسطواني من الزجاج أو من البلاستيك أو من الستانلس ستيل

2- كروماتوغرافيا الورق paper chromatography: يحمل الطور الثابت في هذه الطريقة على سطح من السيللولوز وذلك بترطيبه بالطور السائل الثابت.

3-كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة(Thin layer chromatography (TLC:
يكون الطور الثابت في هذه الحالة مادة صلبة مفروشة بشكل مسطح على صفيحة من الزجاج أو البلاستيك أو أوراق الألمنيوم بحيث تشكل طبقة بسماكة تتراوح بين (0.2 – 0.5) مم ويمكن أن تكون المادة الصلبة من هلامة السيليس أو الألومين أو الراتنجات المبادلة للشوارد.

ج- حسب الآلية التي يتم بها الفصل:

في هذا النوع من التصنيف تقسم الطرائق الكروماتوغرافية حسب الآلية التي يتم فيها الوصول لحالة التوازن في التوزع بين الطورين الثابت المتحرك. وآلية التوازن يتم التحكم فيها حسب طبيعة الطور الثابت المستخدم.

وحسب ماسبق تصنف طرائق الكروماتوغرافيا إلى:

- 1- كروماتوغرافيا الادمصاص (Adsorption Chromatography)
2 – كروماتوغرافيا التوزع (Partition Chromatography)
3- كروماتوغرافيا تبادل الشوارد (Ion Exchange Chromatography)
4- كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي (Size Exclusion Chromatography

كروماتوغرافيا الادمصاص
Adsorption Chromatography

- يكون الطور الثابت في هذا النوع من الكروماتوغرافيا مادة صلبة ذات طبيعة ادمصاصية (adsorbent) وتكون آلية فصل مكونات العينة معتمدة على الادمصاص (adsorption) وفك الادمصاص (desorption).

- يمكن للطور المتحرك أن يكون سائل فنكون بصدد الكروماتوغرافيا من نمط سائل – صلب (liquid-solid chromatography).

-يمكن للطور المتحرك أن يكون غازياً فنكون بصدد الكروماتوغرافيا من نمط غاز – صلب (gas-solid chromatography).

- مثال على كروماتوغرافيا الادمصاص نذكر كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (thin layer chromatography).

كروماتوغرافيا التوزع Partition Chromatography

-يكون الطور الثابت مادة سائلة محمولة على صلب خامل, أما الطور المتحرك فيمكن أن يكون سائلاً فنكون بصدد كروماتوغرافيا سائل- سائل (liquid-liquid chromatography) أو يكون غازياً فنكون بصدد كروماتوغرافيا غاز- سائل (gas – liquid chromatography).

- تعد كروماتوغرافيا الورق مثالاً على كروماتوغرافيا التوزع حيث يكون الطور الثابت سائلاً محمولاً على الورق ويكون الطور المتحرك سائلاً

-تصنف كروماتوغرافيا التوزع حسب قطبية الطور الثابت والمتحرك إلى نوعين رئيسين:

-1- كروماتوغرافيا التوزع بالطور العادي: normal phase chromatography: حيث يكون الطور الثابت قطبياً والطور المتحرك غير قطبي فيتم الاحتفاظ بالمواد القطبية وقتاً أطول بينما تغادر المواد غير القطبية العمود بسرعة.

2- كروماتوغرافيا التوزع بالطور العكوس: reversed phase chromatography: حيث يكون الطور الثابت غير قطبي والطور المتحرك قطبي فتغادر المواد القطبية العمود بسرعة بينما يتم الاحتفاظ بالمواد غير القطبية وقتاً أطول.

كروماتوغرافيا التبادل الشاردي Ion Exchange Chromatography

- يكون الطور الثابت مبادل شوارد كاتيوني أو أنيوني ويكون الطور المتحرك سائلاً ويتم تثبت المواد بآلية تبادل الشوارد حتى الوصول إلى حالة التوازن.

كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي Size Exclusion Chromatography

-يكون الطور الثابت بنية مسامية تشبه المنخل, ويعتمد الفصل على قدرة مكونات العينة على اختراق البنية المسامية وذلك حسب حجم جزيئات مكونات العينة وشكلها.

- لاتستطيع الجزيئات الكبيرة اختراق المسامات لذا تغادر العمود بسرعة من الفراغات بين حبيبات البنية المنخلية أما الجزيئات متوسطة الحجم فتعلق على جدار الحبيبات وتخرج في المرحلة التالية. أما الجزيئات الصغيرة فتدخل لداخل الحبيبات وتغادر متأخرة

-تقسم كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي إلى قسمين:

- الترشيح على الهلام gel filtration: يكون الطور الثابت بنية منخلية محبة للماء hydrophillic يتم فصل المركبات القطبية عليها. أما الطور المتحرك فهو محلول وقاء.

- اختراق الهلام gel permeation: يكون الطور الثابت بنية منخلية محبة

Dr. Rida Amin

محبة للدسم hydrophobic, أما الطور المتحرك فهو محل عضوي غالباً مايكوت التتراهيدروفوران.

- حد الاستبعاد: هو حجم الجزيئة التي تدخل البنية المنخلية وتتأخر كثيراً ولاتغادر.

كروماتوغرافيا العمود Column Chromatography

- يستخدم في هذه الطريقة أعمدة أبعادها كما يلي : 30 – 100 سم طولاً و 10 – 50 مم قطراً. تملأ هذه الأعمدة بأطوار ثابتة أبعاد حبيباتها من 50-200 ميكرون.

- يملأ العمود بالطور الثابت ثم يوضع حجم من العينة المراد فصلها في أعلى العمود ويمرر الطور المتحرك من أعلى العمود طيلة عملية الفصل ويجمع من أسفل العمود حاملاً معه المواد المفصولة ليتم تحريها.

- يتم تثبت مكونات العينة على الطور الثابت بدرجات مختلفة حسب قطبيتها.

- يتم تقييم عملية الفصل بحساب معامل التوزع (partition constant) distribution constant K_c أو K_D (distribution coefficient)

$$\mathbf{K_c} = \frac{\mathbf{[X]_s}}{\mathbf{[X]_m}} = \frac{C_s}{C_m} \qquad \mathbf{(1)}$$

كفاءة الفصل على العمود Theory of Column Efficiency

-يتم التعبير عن كفاءة الفصل على العمود بعدد الطبقات النظرية (theoretical plats) للطور الثابت في العمود.

- تعرف الطبقة النظرية بأنها مرحلة توازن منفردة لتوزع مكونات العينة بين الطورين الثابت والمتحرك

- ارتفاع الطبقة النظرية يعطى بالعلاقة:

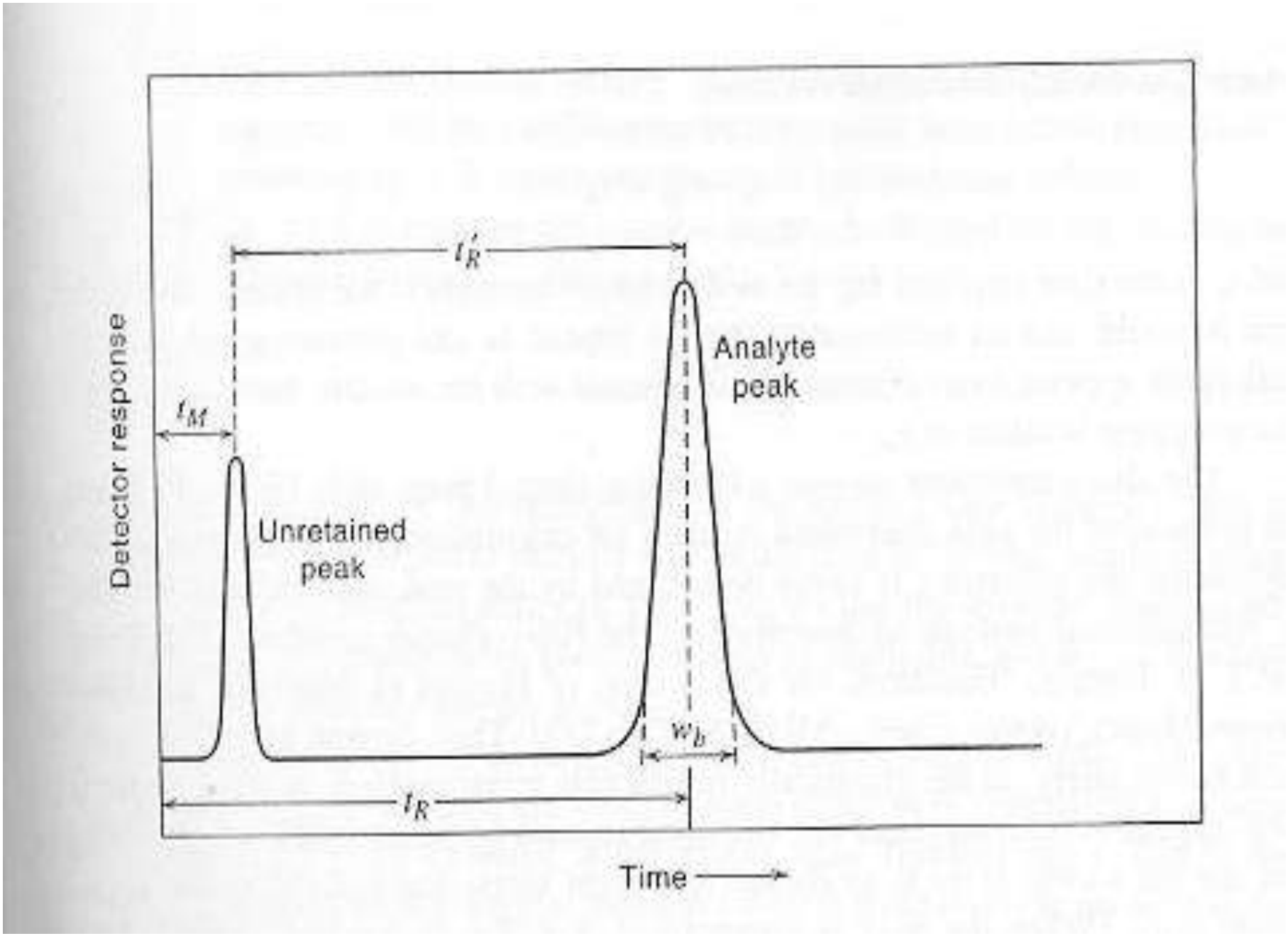
$$HETP = \frac{L}{N}$$

- حيث L طول العمود

-N عدد الطبقات النظرية

-أما عدد الطبقات النظرية فيحسب من العلاقة:

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


Detector response
t'_R
Analyte peak
t_M
Unretained peak
w_b
t_R
Time

الكروماتوغرام chromatogram: هو مخطط بياني يمثل نتائج فصل مكونات العينة وهو مكون من مجموعة من القمم تتحدد مواقعها بزمن الاحتفاظ ويتناسب ارتفاعها أو المساحة المحصورة تحتها طرداً مع تركيز المادة المفصولة.

-زمن الاحتباس t_R retention time: هو الزمن الفاصل بين لحظة حقن العينة في جهاز الفصل ومغادرتها عمود الفصل بأعلى تركيز لها.

-الزمن الميت t_M dead time: ه غالباً مايحمل الطور المتحرك مواد لايتم الاحتفاظ بها وهي مواد تغادر عمود الفصل أولاً وتظهر القمة العائدة لهذه المواد أولاً ويدعى الزمن الفاصل بين لحظة حقن العينة في عمود الفصل وظهور قمة المواد التي لم يتم الاحتفاظ بها بالزمن الميت dead time t_M

-سرعة هجرةالمادة على عمود الفصل v: تحسب سرعة هجرة المادة على العمود من العلاقة:

$$V = \frac{L}{t_R} \qquad (3)$$

سرعة الطور المتحرك u: تحسب من العلاقة:

$$u = \frac{L}{t_m} \qquad (4)$$

العلاقة بين سرعة هجرة المادة على العمود وثابتة التوزع
The Relationship between Migration Rate and Partition Constant

- لإيجادعلاقة بين سرعة هجرة المادة وثابتة توزعها يمكن اعتبار سرعة هجرة المادة كجزء من سرعة الطور المتحرك وتعطى بالعلاقة:

$$V = u \times \textit{fraction of time solute spends in mobile phase}$$

Fraction يعبر عن عدد مولات المادة في الطور المتحرك مقسوماً على العدد الكلي من مولات المادة

$$V = u \times \frac{moles\ of\ \ solute\ in\ mobile\ \ phase}{total\ \ moles\ of\ \ solute}$$

$$V = u \times \frac{C_m V_m}{C_m V_m + C_s V_s} = u \times \frac{1}{1 + C_s V_s / C_m V_m}$$

$$V = u \times \frac{1}{1 + K V_s / V_m} \qquad (5)$$

معامل القدرة على الفصل The Capacity Factor

- يعد معامل القدرة على الفصل معياراً تجريبياً هاماً يعبر عن سرعة هجرة المادة على عمود الفصل فبالنسبة للمادة A يعبر عنه بالعلاقة:

$$K'_A = \frac{K_A V_s}{V_m} \qquad (6)$$

- حيث K_A يمثل معامل التوزع للمادة A . بتعويض المعادلة رقم 6 بالمعادلة رقم 5 نحصل على:

$$V = u \times \frac{1}{1 + K'_A} \qquad (7)$$

لكي نتمكن من حساب K'_A من مخطط الفصل نقوم بتعويض قيمة المعادلة رقم 3 و4 في المعادلة رقم7:

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_m} \times \frac{1}{1+K'_A} \qquad (8)$$

وبإعادة ترتيب المعادلة نحصل على قيمة K'_A من المعادلة التالية:

$$K'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} \qquad (9)$$

- عندما تكون قيمة K'_A قريبة من 1 فإن المادة سيتم فك ارتباطها بالطور الثابت بسرعة rapid elutionبحيث يصعب تحديد زمن الاحتفاظ بها
- عندما تكون قيمة K'_A أكبر من 20 فإن زمن فك ارتباطها مع الطور الثابت سيكون طويلاً
- إن الفصل المثالي لمادة يحدث عندما تكون قيمة K'_A بين 1-5

The Selectivity Factor معامل الانتقائية

- يعرف معامل الانتقائية لعمود *selectivity factor α* بالنسبة للمادتين Aو B بالعلاقة:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \qquad (10)$$

- حيث يمثل K_B معامل التوزع للمادة Bالتي يتم الاحتفاظ بها أكثر ويمثل K_A معامل التوزع للمادة A التي يتم الاحتفاظ بها أقل. وبالتالي فإن قيمة α دائماً أكبر من 1
- إذا استبدلنا قيمة المعادلة 6 ومماثلتها بالنسبة للمادة B بالمعادلة رقم 10نحصل على المعادلة التالية:

$$\alpha = \frac{K'_B}{K'_A} \qquad (11)$$

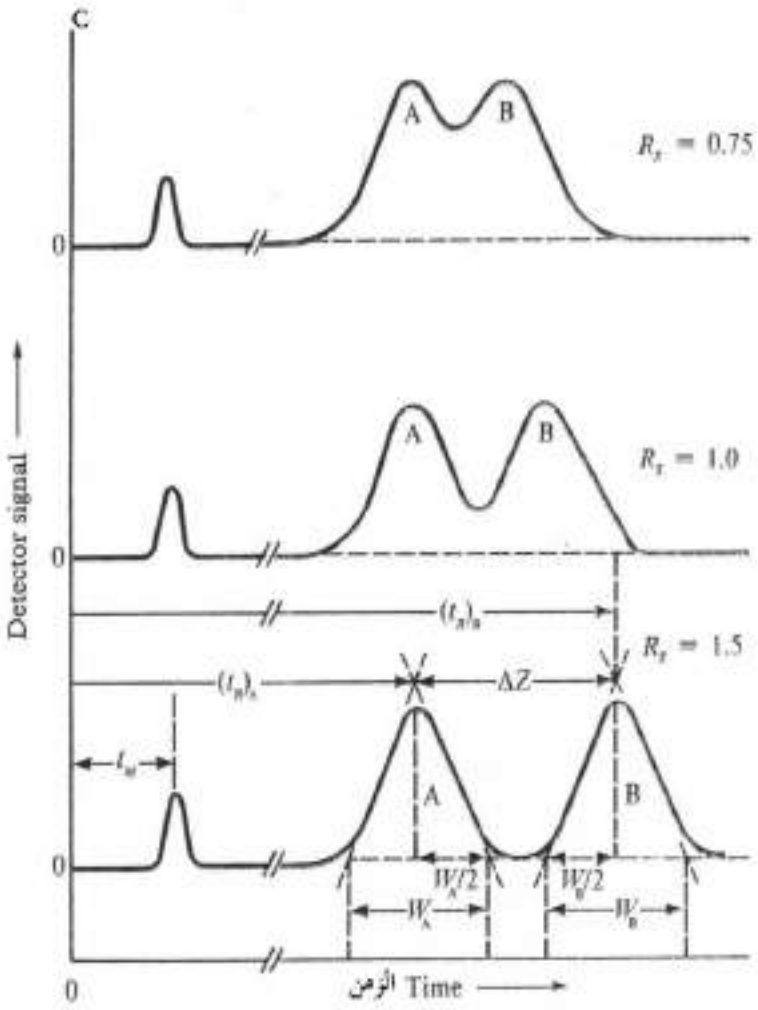
- إذا استبدلنا المعادلة رقم 9 لكلا المادتين بالمعادلة رقم 11 نحصل على معادلة تمكننا من حساب α من مخطط الفصل:

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

Column Resolution الميز

- هو المقياس الكمي الذي يعبر عن قدرة عمود أو جهاز الفصل على فصل مادتين بدقة. فبالنسبة لفصل المادتين A و B يعطى الميز بالعلاقة:

$$R_s = \frac{2\Delta t_R}{W_A + W_B}$$


C
A
B
R_s = 0.75
0
A
B
R_s = 1.0
0
$(t_R)_B$
R_s = 1.5
$(t_R)_A$
ΔZ
t_M
A
B
$W_A/2$
$W_B/2$
W_A
W_B
0
0
Detector signal
الزمن Time

مثال

- تم الحصول على المعلومات التالية لدى فصل مزيج من المركبات بوساطة ال GLC على عمود طوله 3 م

Compound	t_R (min)	W
Air	1.50	-
A	10	0.76
B	12	0.82
c	14	1.06

1- احسب معدل عدد الطبقات النظرية

2- احسب معامل القدرة للمادة B

3- احسب سرعة الطور المتحرك

4- احسب معامل الانتقائية للمادتين B , C

5- احسب الميز (resolution)