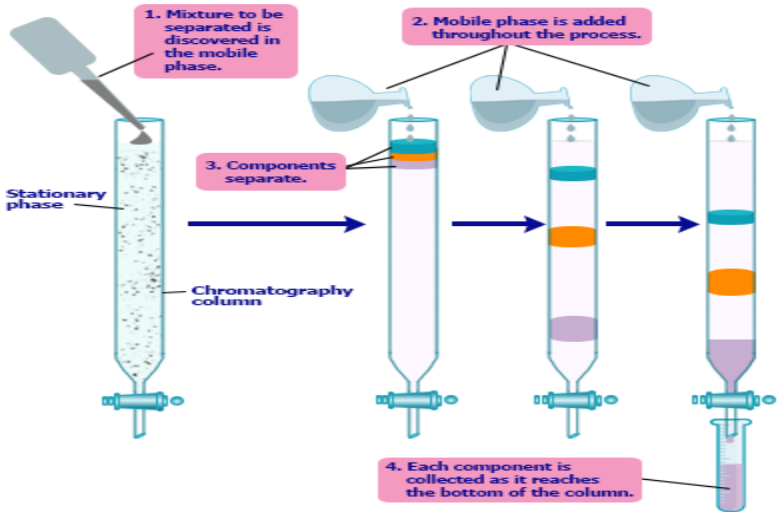
# الفصل باستخدام طرائق الكروماتوغرافيا

## تعريف الكروماتوغرافيا:

إن أول من استخدم طرائق الفصل الكروماتوغرافي هو العالم النباتي الروسي مخائيل تسويت TSWEET عام 1906 باستخدام عمود من الزجاج يحوي كربونات الكالسيوم المطحونة بشكل ناعم ثم أدخل إلى العمود مزيج لأصبغة نباتية ( الكلوروفيل والمواد الأخرى المنحلة ) المستخلصة بإيتر البترول، فلاحظ تثبتها على قمة عمود كربونات الكالسيوم ولكن بعد إضافة كميات إضافية من المذيب (إيتر البترول) حدث انفصال المواد الملونة في عدة نطاقات بألوان مختلفة وعلى طول العمود، أي تمت هجره الأصبغة من الأعلى إلى الأسفل مع انفصالها عن بعضها بسبب تمتع كل صباغ بسرعة هجرة خاصة به. سميت هذه العملية بالكروماتوغرافيا.

- مهما اختلفت الآلية التي تمت فيها عملية الفصل بالطرائق الكروماتوغرافية إلا أن جميع هذه الطرائق تشترك في أن المادة تصل إلى حالة من التوازن في توزعها بين طورين أحدهما ساكن ويسمى الطور الثابت وهو إما أن يكون صلب أو سائل مثبت على دعامة صلبة والآخر يسمى الطور المتحرك الذي يتحرك من خلال الطور الساكن وهو إما أن يكون سائل أو غاز **ويسمى بالحامل carrier** لأنه ينقل مكونات العينة عبر العمود وأحيانا يسمى **بالمخرج eluent** لأنه يخرج المواد من العمود كما تسمى عملية التحريك المواد عبر العمود بالتخريج elution وتتحرك المواد بسرع مختلفة تعتمد على ميل المواد للبقاء في الطور الثابت أو في الطور المتحرك، أي تتعلق سرعة الانتشار بنسبة توزع مكونات العينة المدروسة.




تلعب عملية تحضير الطور الثابت دوراً أساسيا في نجاح أو فشل عملية الفصل ففي بعض الأحيان يحضر هذا الطور بمزج حبيبات المادة الخاملة الصلبة مع سائل خامل وتملأ في عمود زجاجي أو توزع على سطح مستو، وفي حالات أخرى تستخدم المادة الصلبة فقط كطور ثابت بسبب قدرتها الامتزازية الكبيرة للمواد المذابة .فعند تحرك الطور السائل داخل العمود تأخذ

مكونات العينة المختلفة على العمود نطاقات مختلفة يتعلق كل نطاق بقدرة المكون الامتزازية على سطح الطور الصلب( الساكن )وبتركيز هذا المكون.

**تصنيف الطرائق الكروماتوغرافية:**

**يتم تصنيف الطرائق الكروماتوغرافية وفق ما يلي:**

**ا- حسب طبيعة الطور المتحرك:**

- إذا كان الطور المتحرك غازاً سميت الكروماتوغرافيا الغازية Gas chromatography
- إذا كان الطور المتحرك سائلاً سميت الكروماتوغرافيا السائلة Liquid chromatography

**ب - حسب الآلية التي تتم بها عملية الفصل:**

في هذا النوع من التصنيف تقسم الطرائق الكروماتوغرافية حسب الآلية التي يتم فيها الوصول لحالة التوازن في التوزع بين الطور ين الثابت والمتحرك .

وحسب ماسبق تصنف طرائق الكروماتوغرافيا إلى:

1- الكروماتوغرافيا الامتزازية أو الادمصاصية (Adsorption Chromatography)

2 - الكروماتوغرافيا التوزيعية أو التجزيئية (Partition Chromatography )

3- الكروماوغرافيا التبادل الشاردي ( الأيوني) (Ion Exchange Chromatography)

4- الكروماتوغرافيا المنخلية أوكروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي Size Exclusion Chromatography

**ج - حسب تقنية الفصل:**

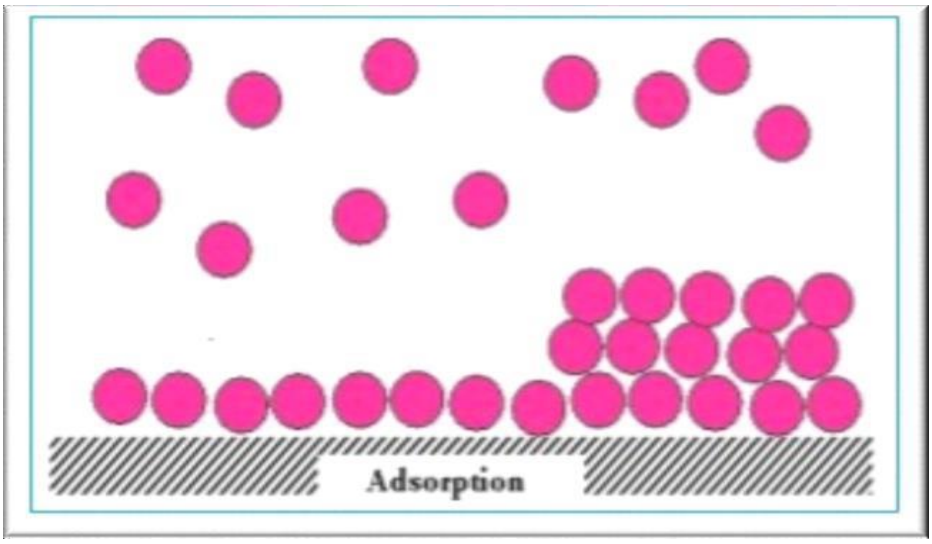
**1- كروماتوغرافيا الأعمدة ( column chromatography )** وهي تعتمد على وجود الطور الثابت ضمن أعمدة مصنوعة من الفولاذ الغير قابل للصدأ وفي بعض الحالات مصنوعة من الزجاج وهي تسمى أعمدة مملوءة (Packed column) ، غير أن هناك أعمدة فارغة ذات قطر داخلي صغير جداً وغير مملوءة بالطور الثابت وتدعى بالأعمدة الشعرية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

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

- الكروماتوغرافيا الورقية ( paper chromatography)
- الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ( Thin layer chromatography)
- كروماتوغرافيا الرحلان الكهربائي (Electrophoresis)

### 1 - طريقة كروماتوغرافيا الادمصاص (طريقة الكروماتوغرافيا الامتزازية)

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




**إن آلية فصل مكونات العينة تعتمد على** مدى قوة امتزاز( التصاق )المادة على سطح الطور الثابت الصلب بحيث أن المادة التي تمتز بقوة سوف تتأخر بالخروج( أي تمكث مدة أطول في العمود ) بينما المادة ذات الامتزاز الأقل تخرج من العمود في وقت مبكر وهكذا يتم فصل المواد عن بعضها ولهذا يمكن القول إن الطرائق الكروماتوغرافية التي يكون فيها الطور الثابت عبارة عن مادة صلبة تعتمد على الامتزاز ولذلك **تسمى بالطريقة الكروماتوغرافية الامتزازية Adsorption chromatography.**

- 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).

### 2- طريقة الكروماتوغرافيا التوزيعية (Partition Chromatography)

يكون الطور الثابت المستخدم عبارة عن طبقة رقيقة من السائل مثبتة على سطح مادة صلبة مسامية وخاملة أما الطور المتحرك فيمكن أن يكون عبارة عن سائل آخر فنكون بصدد الكروماتوغرافيا من نمط سائل – سائل (liquid- liquid chromatography). أو يكون غازياً فنكون بصدد الكروماتوغرافيا من نمط غاز – سائل (gas- liquid chromatography).

إن فصل المواد عن بعضها في هذه الطريقة يعتمد على مقدار انحلال( ذوبان )المادة في الطور الثابت بحيث أن المادة التي تذوب بشكل أكبر تتأخر أكثر في الخروج من العمود وعلى العكس المادة التي لا تحبذ الذوبان في الطور الثابت تخرج من العمود في وقت مبكر وبسرعة ولهذا

يطلق على الطرائق الكروماتوغرافية التي يكون فيها الطور الثابت عبارة عن سائل **بالطرائق الكروماتوغرافية التجزيئية partition chromatography**

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

1- كروماتوغرافيا التوزع بالطور العادي: 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: حيث يكون الطور الثابت غير قطبي والطور المتحرك قطبي فتغادر المواد القطبية بسرعة بينما يتم الاحتفاظ بالمواد غير القطبية وقتاً أطول.

### 3 - طريقة الكروماتوغرافيا التبادل الشاردي( الأيوني) Ion Exchange : Chromatography

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

والمواد المستخدمة لعملية الفصل الشاردي هي عبارة عن حبيبات بوليميرية دقيقة وصلبة محملة بشوارد يمكن أن تستبدل مع شوارد أخرى موجودة في العينة المدروسة .

تستخدم لفصل العناصر الانتقالية كما تستخدم لفصل الأحماض الأمينية.

### 4 - كروماتوغرافيا الترشيح على الهلام ( الكروماتوغرافيا المنخلية أو 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 الاسبعاد الحجمي إلى قسمين:

- الترشيح على الهلام gel filtration: يكون الطور الثابت بنية منخلية محبة للماء hydrophilic يتم فصل المركبات القطبية عليها.

- اختراق الهلام gel permeation يكون الطور الثابت بنية منخلية محبة للدسم hydrophobic.

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

### 5 - طريقة الكروماتوغرافيا المستوية:

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

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

### مزايا الطرائق الكروماتوغرافية:

- ❖ يمكن إتمام الفصل الكروماتوغرافي بكفاءة عالية حينما تفشل طرائق الفصل الأخرى في فصل المواد المعقدة .وسبب ذلك أي فرق في قوى الامتزاز أو التجزئة يتضاعف كثيراً عند مرور العينة داخل النظام الكروماتوغرافي.
- ❖ لا تسبب الطرائق الكروماتوغرافية تفكك المواد المراد فصلها بمعنى أن المادة بعد فصلها يمكن الحصول عليها في حالتها الأصلية.
- ❖ استخدام كميات قليلة جداً من العينة كاف لإنجاز الفصل أو التحليل( عدة ميكروليترات ).
- ❖ في الطرائق الكروماتوغرفية الورقية والطبقة الرقيقة تكون التكلفة منخفضة.

### الأسس النظرية لطرائق الفصل الكروماتوغرافي:

ولنبدأ بتصور مقطع صغير لعمود كروماتوغرافي حيث نجد أن جزيئات المادة المراد فصلها إما أن تكون عالقة في الطور الثابت وفي هذه الحالة تبقى المادة في العمود ولا تسير إلى الأسفل ولا تتقدم خلال العمود وإما أن توجد في الطور المتحرك وفي هذه الحالة تسير جزئيات المادة مع العمود بنفس سرعة الطور المتحرك وبالتالي فإن وظيفة الطور المتحرك حمل ونقل المواد عبر العمود ولهذا يسمى بالحامل أما وظيفة الطور الثابت منع المواد من المرور عبر العمود عن طريق استبقائها بطرائق عديدة مثل الامتزاز أو التبادل.

### 1 - معامل التوزع:

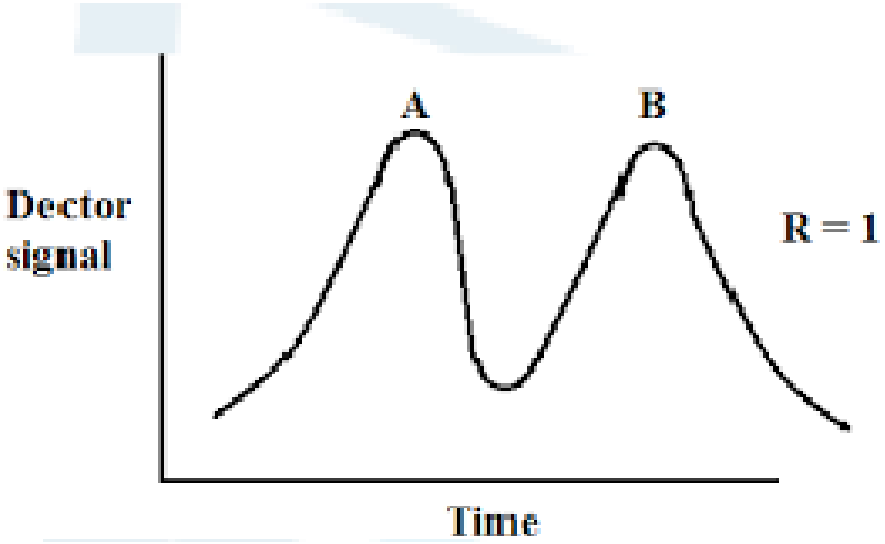
إن توزع جزئيات المادة المراد فصلها بين الطورين الثابت والمتحرك يعبر عنه بدلالة ثابت يسمى معامل التوزع وفق العلاقة: $D = \frac{C_S}{C_M}$

حيث تعبر $C_S$ عن تركيز المادة في الطور الثابت و $C_M$ تركيز نفس المادة في الطور المتحرك .ويصلح معامل التوزع لجميع أنواع الفصل( امتزاز، تبادل أيوني والتجزيئي) وقيمته

تحدد تواجد المادة في الطورين .فعندما يأخذ معامل التوزع قيمة كبيرة هذا يعني أن أغلب جزئيات المادة توجد في الطور الثابت مقارنة مع الطور المتحرك ونتيجة لذلك يتأخر خروجها من العمود

## 2- فعالية الفصل Efficiency of Separation

تتعلق عملية فصل المركبات بوساطة الكروماتوغرافيا بعاملين أساسيين، أحدهما يمثل الاختلاف في زمن التملص (الاستبقاء) (elution time) بين المناطق، فكلما كان الفاصل الزمني أطول، كان فصل المركبات أفضل. وثانيهما ينحصر في عرض القمم (peaks)، فكلما كانت القمم أعرض، كانت عملية الفصل أسوأ.




## 3- التفريق أو درجة الفصل (التباين):

تبدي المادة المذابة المتحركة عبر العمود الكروماتوغرافي انتشاراً على شكل تابع غوص ذي انحراف قياسي. كلما كان تغلغل المادة المذابة عبر العمود كبيراً، أصبحت العصابة أو القمة أكثر عرضاً.

تتعلق القياسات العامة لعرض القمة بما يلي:

(1) النطاق (المسافة) $w_{1/2}$ المقيس عند منتصف طول القمة، الذي تساوي نصف ارتفاع قمة العصابة.

(2) قيمة w، التي تمثل المسافة بين نقطتي تلاقي المماسين المنحدرين على العصابة

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

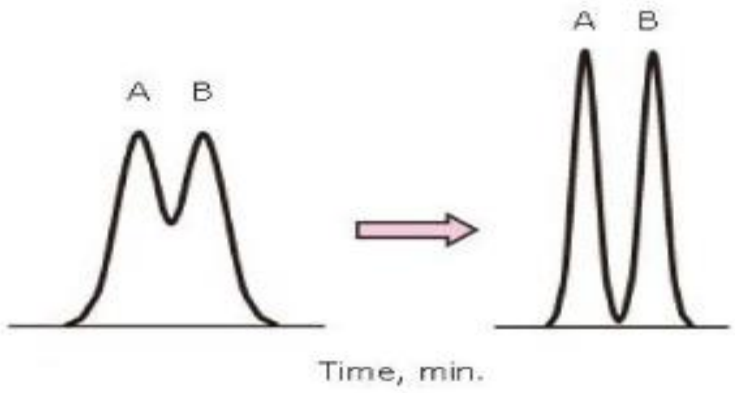
ويمكن التعبير عن تفريق عصابتين إحداهما عن الأخرى في الكروماتوغرافيا بالعلاقة التالية:

$$(\text{resolution}) = \frac{\Delta t}{w} = \frac{\Delta V}{w}$$

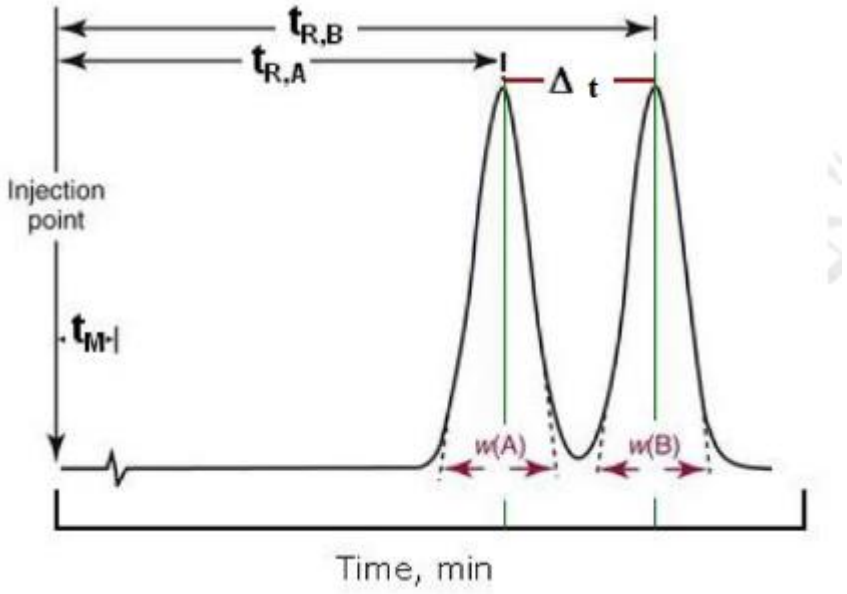
$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad \text{أو}$$

حيث تمثل $\Delta t$ أو $\Delta V$ المسافة الفاصلة بين عصابتين (في واحدة الزمن أو الحجم)، أما w فتمثل العرض المتوسط للعصابتين.

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




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



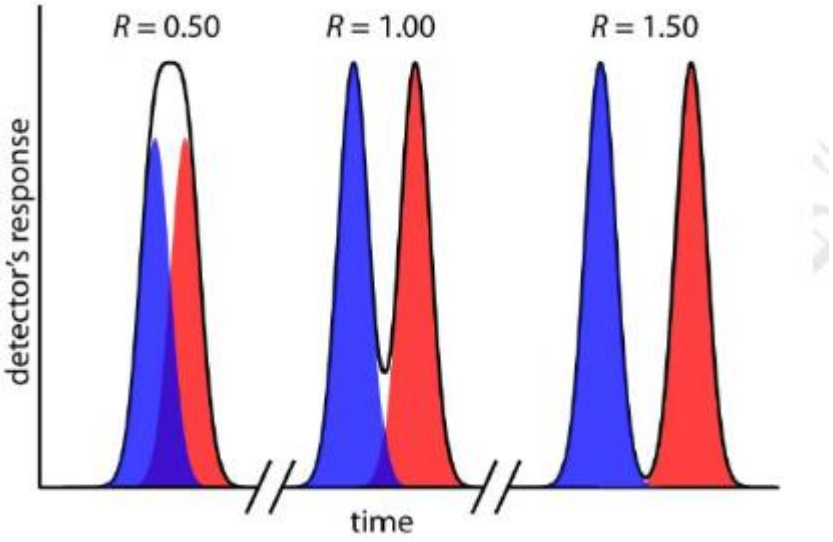
- عندما تكون قيمة درجة الفصل R> 1.5 عندها يكون الفصل ممتاز ولا يوجد تداخل.

- اذا كانت قيمة درجة الفصل 1.5> R> 1 عندها يكون الفصل جيد ولايوجد تداخل.

- إذا كانت قيمة درجة الفصل R= 1 عندها يكون الفصل مقبول ويوجد تداخل بنسبة 2% إلا أن ذلك لا يؤثر على عملية التحليل.

- إذا كانت قيمة درجة الفصلR< 1 عندها يكون الفصل سيء ويوجد تداخل بنسبة

%(50-70)




**يمكن تحسين درجة الفصل من خلال تحقيق الشروط الآتية:**

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

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

3- التقليل من عرض السن الكروماتوغرافي من خلال:

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

## 4- الانتشار Diffusion :

يزداد عرض قمة المادة المذابة في أثناء حركتها عبر العمود الكروماتوغرافي. وتحقق القمة الضيقة (الحادة) جداً، المطبقة عند مدخل العمود، الحالة المثالية، وفي حالات أقل مثالية، تصبح القمة غير متناظرة.

يُعدّ الانتشار أحد الأسباب الأساسية لتعريض القمة.

ويمثل معامل الانتشار مقياساً للسرعة التي تتحرك بها العينة بصورة عشوائية، من منطقة ذات تركيز مرتفع إلى منطقة ذات تركيز منخفض. ان الانتشار التلقائي للمادة المذابة يوضح عبر مستوٍ ذي تدرج تركيزي مساو dc/dx. يُطلق على عدد المولات التي تَعبُر كل متر مربع في الثانية اسم التدفق(flux) ويُرمز إليه بالرمز J، ويتناسب مع التدرج التركيزي:

$$\text{flux}\left(\frac{mol}{m^2 s}\right) = J = -D\frac{dc}{dx}$$

يُدعى ثابت التناسب (D) معامل الانتشار

حيث نُلاحظ أن الانتشار في السوائل أبطأ بـ $10^4$ مرات من الانتشار في الغازات

## 5- كفاءة الفصل على العمود ( ارتفاع الصفائح):

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

يمكن تحسين قدرة العمود على فصل المركبات في المزائج بوساطة تقليل ارتفاع الصفيحة، نلاحظ أن العمود الفعال يتمتع بصفائح نظرية أكثر مما هو عند العمود غير الفعال. وتمتلك المواد المذابة المختلفة التي تعبر العمود نفسه ارتفاعات صفائحية مختلفة، لأنها تمتلك معاملات انتشار مختلفة. حيث يتأرجح ارتفاع الصفيحة من0.1 mm~إلى 1 mm في الكروماتوغرافيا الغازية، بينما يبلغ حوالي10 µm ~ في طريقة كروماتوغرافيا السائلة.

إذا تحركت المادة المذابة على مسافة x بسرعة تدفق خطي $u_x$ (m/s) فإن الزمن اللازم لعبور العمود يساوي $t= x/ u_x$.

يمثل ارتفاع الصفيحة الطول أو المسافة $\sigma^2/x$ ، حيث σ الانحراف القياسي لقمة غوص، x المسافة المقطوعة عبر العمود. فمن أجل المادة المذابة المتملصة من العمود ذي الطولL، يمثل عدد الصفائح النظرية (N)، في داخل العمود، الطولL مقسوماً على ارتفاع الصفيحة:

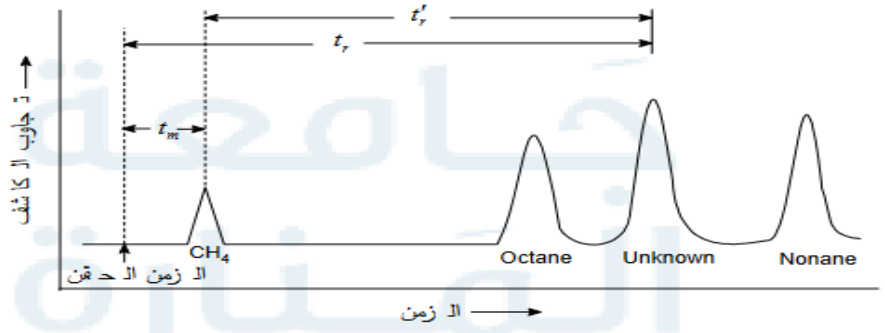
$$N=\frac{L}{H}=\frac{L.X}{\sigma^2}=\frac{L^2}{\sigma^2}=\frac{16L^2}{W^2}$$

لأن x = L و σ = w/4 في هذه العبارة تأخذ w واحدة الطول، وعدد الصفائح بدون واحدة .
وإذا عبرنا عنL و W (أو σ ) بواحدة الزمن بدلا من الطول، فإن N أيضاً يتمثل بدون واحدة .
ويمكن بالتالي استنتاج العبارة الأكثر ملاءمة من أجل N بالشكل الآتي:

$$N= =\frac{16t^2}{W^2}=\frac{t^2}{\sigma^2}$$

## 5-الكروماتوغرام: Chromatogram

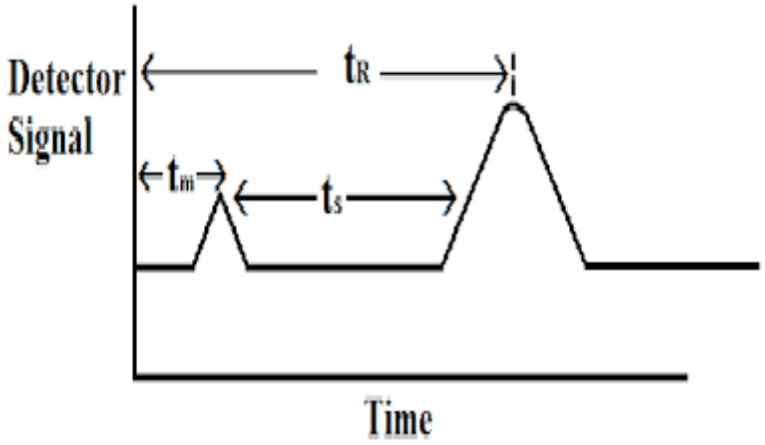
يمكن اكتشاف المواد المذابة المتملصة من العمود الكروماتوغرافي ، بوساطة الكواشف المختلفة. يمثل الكروماتوغرام مخططاً، يوضح علاقة الكاشف كتابع لزمن الإمتلاص. يمثل زمن الاحتفاظ $t_r$ من أجل كل مركب الزمن اللازم لإمتلاص قمة ما، من لحظة الحقن، حتى ظهور رأس القمة. وهو مرتبط بحجم الاحتفاظ retention Volume، $V_r$ الذي يمثل حجم الطور المتحرك اللازم لإمتلاص قمة ما من لحظة الحقن وحتى ظهور رأس قمة الامتلاص




مخطط الكروماتوغرافيا الغازية الذي يبين قياس أزمنة الاحتفاظ.

أما الزمن اللازم لخروج مركب لا يملك أية ألفة للعمود، من لحظة الحقن حتى ظهور رأس القمة فيرمز إليه بالرمز $t_m$

ويعرف زمن الاحتفاظ المعّدل (adjusted retention time) من أجل المادة المنحلة، بأنه الزمن الإضافي اللازم لكي تعبر المادة المنحلة طول العمود كما هو واضح بالشكل




## 6- زمن مكوث المادة في الطور المتحرك :

هو الزمن الفاصل بين لحظة حقن العينة في جهاز الفصل ومغادرتها عمود الفصل بأعلى تركيز لها. ويمكن حساب الزمن الذي تمضيه المادة محمولة على الطور المتحرك من خلال ارتباط هذا الزمن بنسبة كمية المادة في الطور المتحرك إلى كمية في كلا الطورين:

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

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

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

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

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

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

**يسمى K معامل السعة( عامل الاستبقاء، معامل المكوث).**

## 7- معدل جريان المادة في الطور المتحرك:

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

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

**يتعلق معدل تدفق أي جزيء ضمن العمود الكروماتوغرافي بما يلي:**

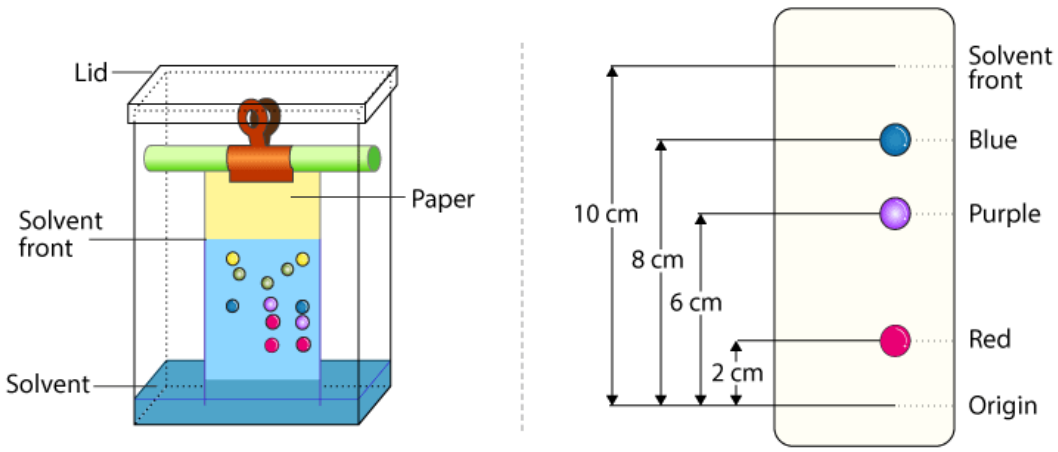
- بسرعة الطور المتحرك وهي سرعة ثابتة لجميع مكونات العينة.

- بالنسبة بين حجم الطور الثابت والمتحرك وهي ثابتة لجميع مكونات العينة.

- بمعامل التوزع وهو يختلف من مادة إلى أخرى وبناءاً على هذا الاختلاف يتم فصل المواد عن بعضها البعض

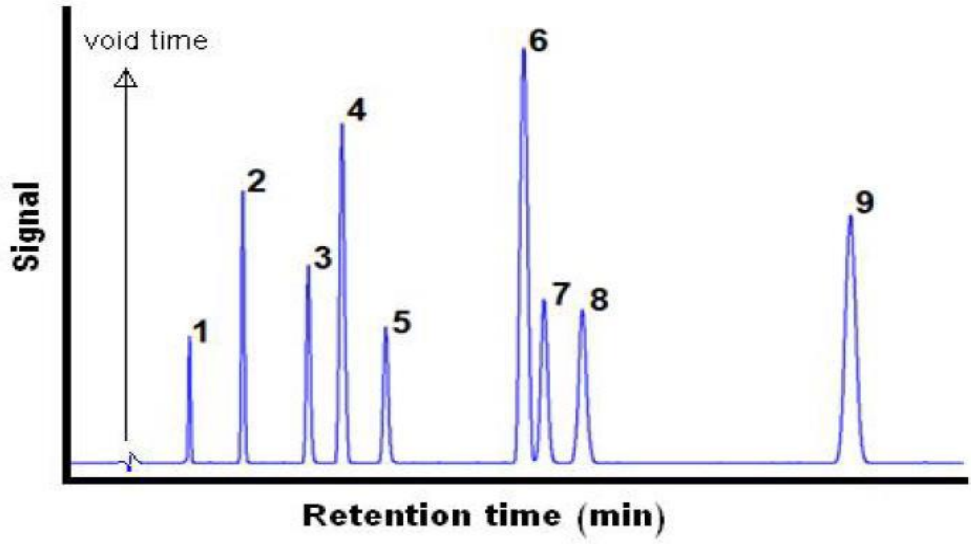
## ويوجد طريقتين لإنهاء التحليل وهما:

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




**الطريقة الثانية :** يتم إخراج مكونات العينة من العمود بواسطة الطور المتحرك حيث تخرج على دفعات وفي أزمنة مختلفة تبعا لمعامل التوزع ويتم تحليل كل مكون مباشرة بعد خروجه من العمود بواسطة المقدر( الكاشف detector ) مناسب يوضع في نهاية العمود.

وعند رسم العلاقة بين استجابة المقدر وزمن احتفاظ المواد التي يتم فصلها عبر العمود نحصل على ما يسمى بالكروماتوغرام chromatogram




## 8- زمن الاحتفاظ( الاستبقاء) :

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

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

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

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

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

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

$t_M$ : الزمن الميت غالباً مايحمل الطور المتحرك مواد لايتم الاحتفاظ بها وهي 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

**وتصبح العلاقة:**

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

## 9- حجم الاحتفاظ:

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

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

$$V_R = t_R.F$$

نعوض قيمة زمن الاحتفاظ $t_R$ وتصبح العلاقة:

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

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

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

أو تكتب:

$$V_R = V_M + D\,V_S$$

حيث أن $V_M$ تدل على حجم الطور المتحرك الموجود في العمود عند أي لحظة وهو

يمثل حجم الفراغ الموجود في العمود وهو لا يتعلق بالطور الثابت.

## 10- الاحتفاظ النسبي:

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

لذلك لابد من إجراء مقارنة بين زمن الاحتفاظ لمادة ما يطلب فصلها باستخدام العمود الكروماتوغرافي ضمن شروط محددة مع زمن احتفاظ نفس المادة القياسية والنقية وبنفس الشروط حيث يطرح منها الزمن الميت $t_M$:

$$\beta=\frac{t_R-t_M}{t^{\star}_R-t_M}=\frac{V_R-V_M}{V^{\star}_R-V_M}$$

$t^{\star}_R$ زمن احتفاظ المادة القياسية النقية.

$V^{\star}_R$ حجم احتفاظ المادة القياسية والنقية.

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

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

مسألة:

لدينا عمود كروماتوغر افي له الخصائص الآتية:

| | |
|---|---|
| طول العمود | 24.7 Cm |
| سرعة الجريان | 0.313 ml/min |
| $V_M$ | 1.37ml |
| $V_S$ | 0.164ml |

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

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

والمطلوب احسب:

1-عدد الطبقات النظرية لكل قمة مركب.

2- ارتفاع المكافئ للطبقة النظرية.

3- درجة الفصل للمكونين B وC.

4- زمن الاحتفاظ النسبي للمادة B بالنسبة للمادة C.

5- حجم الاحتفاظ للمادة A.

الحل:

1- حساب عدد الطبقات النظرية من العلاقة: $N = (\frac{4t_R}{w})^2$

للمادة A: $N = (\frac{4x5.4}{0.41})^2$

N= 2775.4907

للمادة B: $N = (\frac{4x13.3}{1.07})^2$

N= 2472.0412

للمادة C: $N = (\frac{4x14.1}{1.16})^2$

N= 2363.9714

2- الارتفاع المكافئ لطبقة نظرية:

$N_{av}$= 2537.1677

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

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

$$H = 0.009735cm$$

3- حساب درجة الفصل للمكونين B وC:

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

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

$$R = 0.7174$$

4- يحسب زمن االحتفاظ النسبي من العالقة:

$$\beta = \frac{t_{R.B} - t_M}{t_{R.c} - t_M}$$

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

$$\boldsymbol{\beta =} 0.927$$

هنا لا يمكن إجراء عملية الفصل وفق هذه الشروط.

5- حجم احتفاظ المادة A:

$$V_R = V_M + D\, V_S$$

لكن يمكن حساب معامل التوزع D للمادةA من العلاقة:

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

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

$$D = 6.1978$$

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

$$V_R = 2.3864ml$$

المشكلة العامة في الفصل الكروماتوغرافي:

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

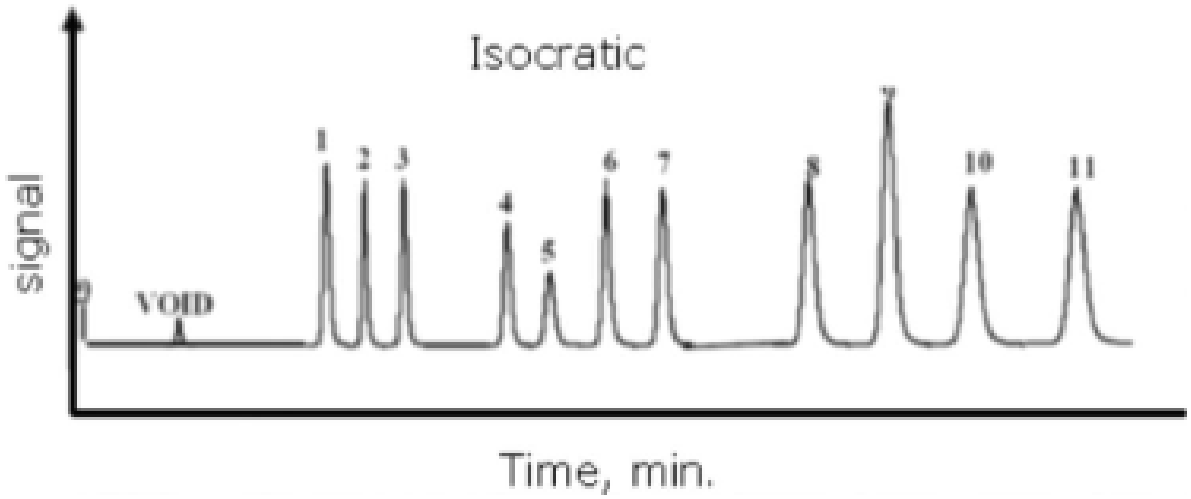
- أن تتم عملية الفصل في أقل وقت ممكن.

- أن تكون جميع المكونات مفصولة عن بعضها البعض بكفاءة عالية.

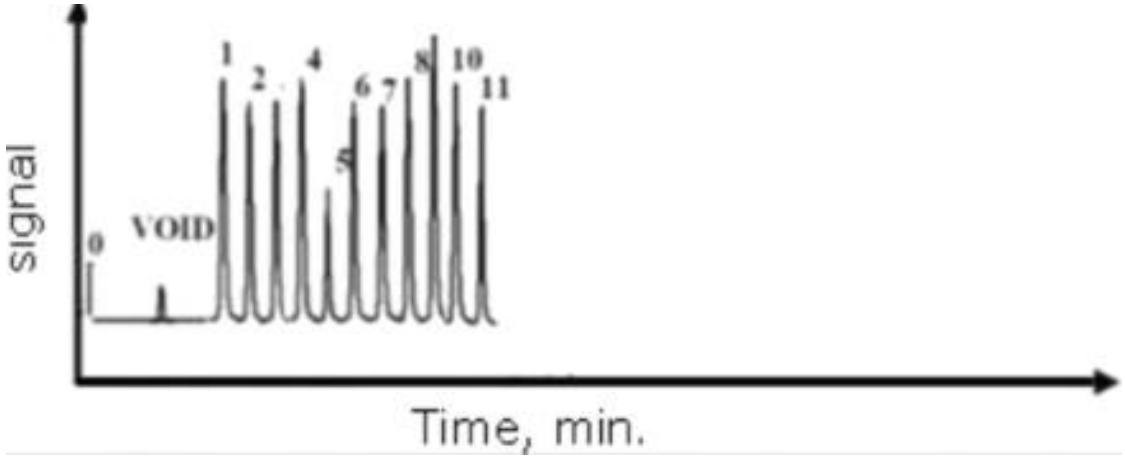
- أن يكون اتساع peaks (القمةالكروماتوغرافية) أقل ما يمكن وبالذات للمواد التي تخرج متأخرة.

لكن ما يحث فعلياً يتلخص بالاتي:

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




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

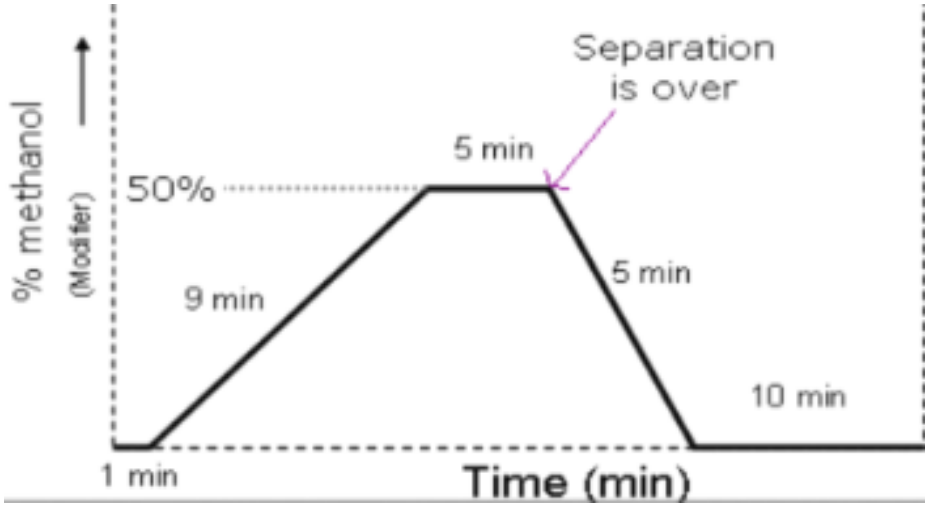


لكن كيف يمكن الوصول إلى عملية الفصل التي تعطي النتيجة المطلوبة:

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

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

مثال:تطبيق برنامج التعديل الآتي:




في هذا البرنامج نستخدم طور متحرك يحوي على الميتانول بنسبة معينة وذلك دقيقة واحدة ثم نبدأ بزيادة نسبة الميتانول ليصل إلى50% خلال 9 دقائق ونحافظ على هذه النسبة مدة 5 دقائق ثم نعود إلى التركيب الأصلي للطور المتحرك خلال 5 دقائق وأخيراً نستمر في ضخ الطور المتحرك مدة 10 دقائق وذلك لإعادة حالة العمود وخصائصه إلى الحالة الأصلية.

ملاحظات:

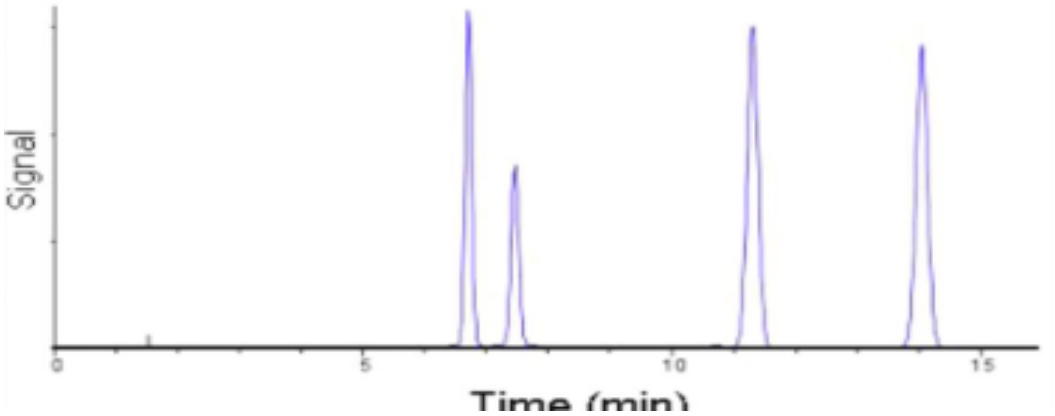
- يجدر الإشارة إلى أنه أحياناً يحدث انحدار في خط القاعة(خط الأساس)عند تعديل تركيب الطور المتحرك. مما يستدعي تحديد ذلك عن طريق تنفيذ برنامج التعديل دون حقن العينة أولاً ومن ثم يتم طرح الكروماتوغرام الناتج من كروماتوغرام العينة وبذلك يتم تصحيح خط الأساس.

- يجب الانتباه إلى طبيعة المواد العضوية المعدلة للطور المتحرك إذ يجب أن تكون منحلة (ذائبة) فيه بشكل تام عند النسب المستخدمة وأيضاً يجب أن يكون الطور المتحرك المعدل قادر على إذابة العينة.

- يفضل أن تتم عملية تعديل تدريجياً وذلك حتى يتم الخلط متجانساً.

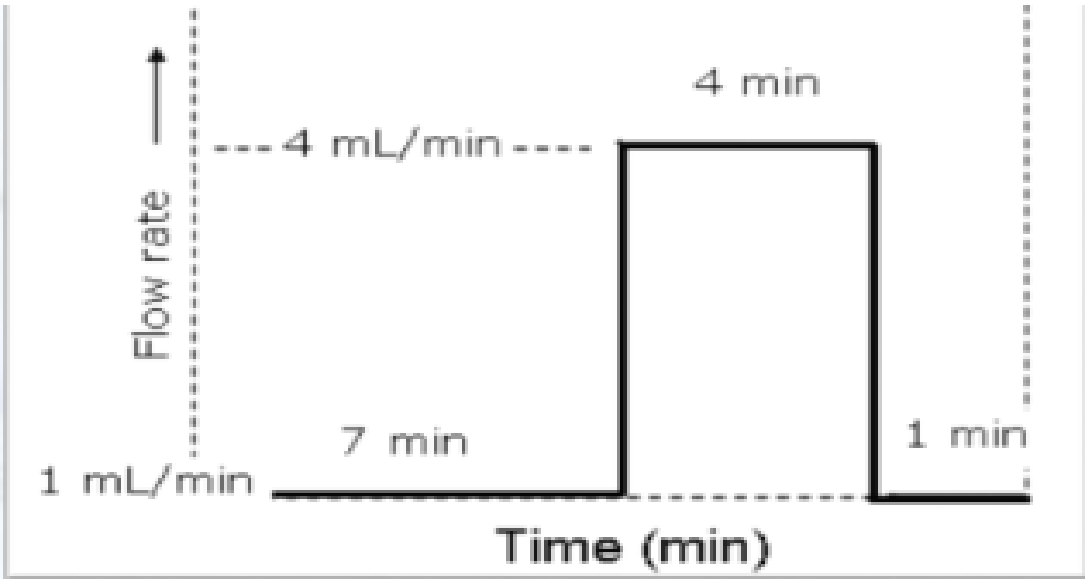
- في بعض الأحيان يتم تعديل سرعة الطور المتحرك لإجبار peaks المتناظرة والمتأخرة على الخروج مبكراً أو ما يسمى programming flow rate.

مثال: لدينا الكروماتوغرام الآتي:

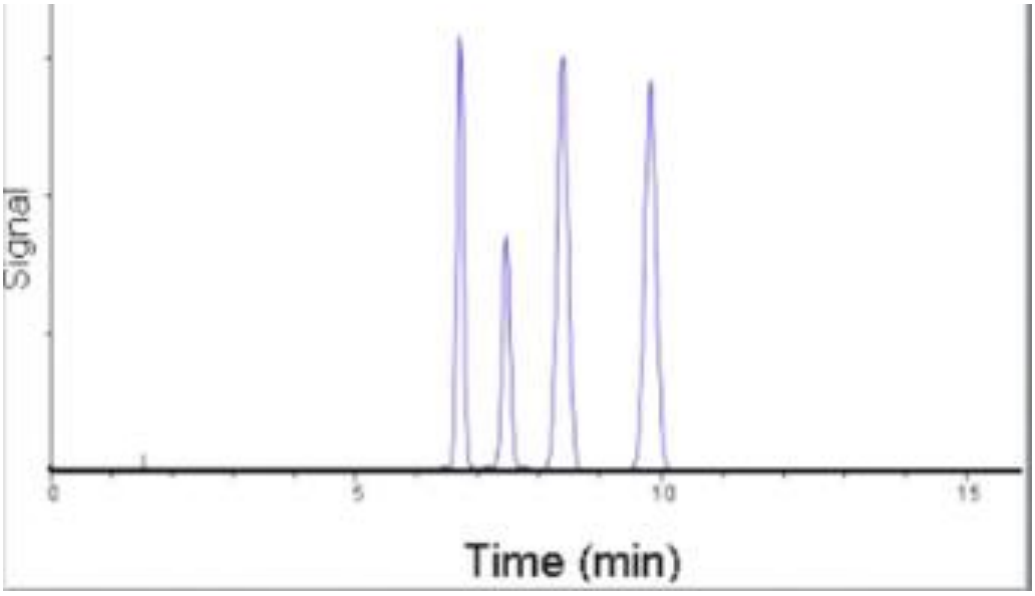



حيث نلاحظ أن المركبين الثالث والرابع يأخذان وقتاً طويلاً للخروج من العمود يمكن تقليصه

باستخدام برنامج تعديل سرعة الطور المتحرك كما في الشكل الآتي:

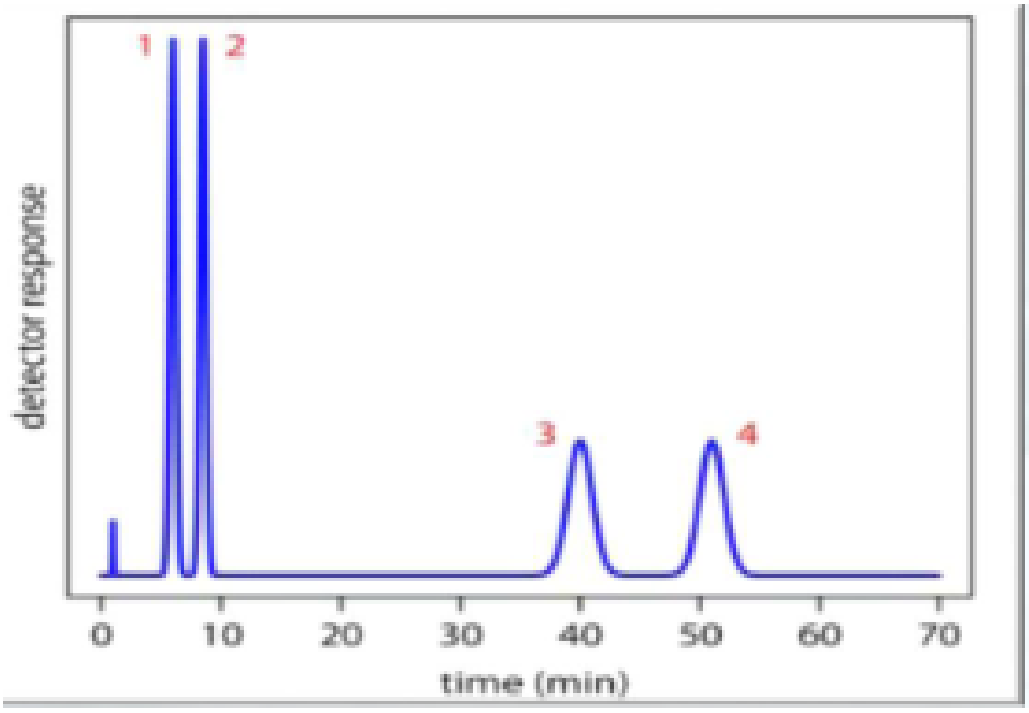



وعند تطبيق البرنامج نحصل على الكروماتوغرام الآتي حيث تم تقليص الزمن بشكل كبير:



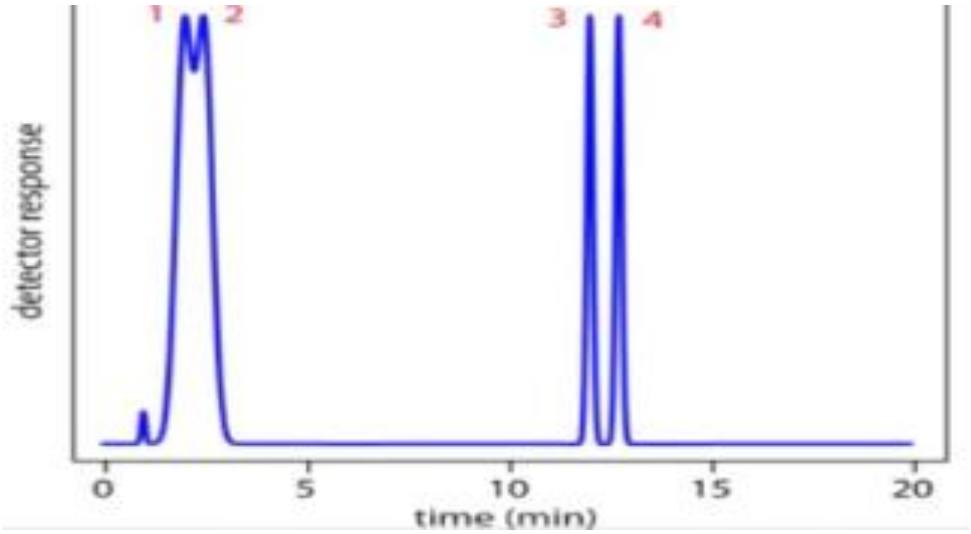

في حال الكروماتوغرافيا الغازية إن العامل الوحيد المستخدم في تحسين عملية الفصل وتقليل زمن خروج المواد هو درجة الحرارة.

مثال: لنفرض أننا حصلنا على الكروماتوغرام الآتي باستخدام الكروماتوغرافيا الغازية عند درجة الحرارة 150 Ċ:



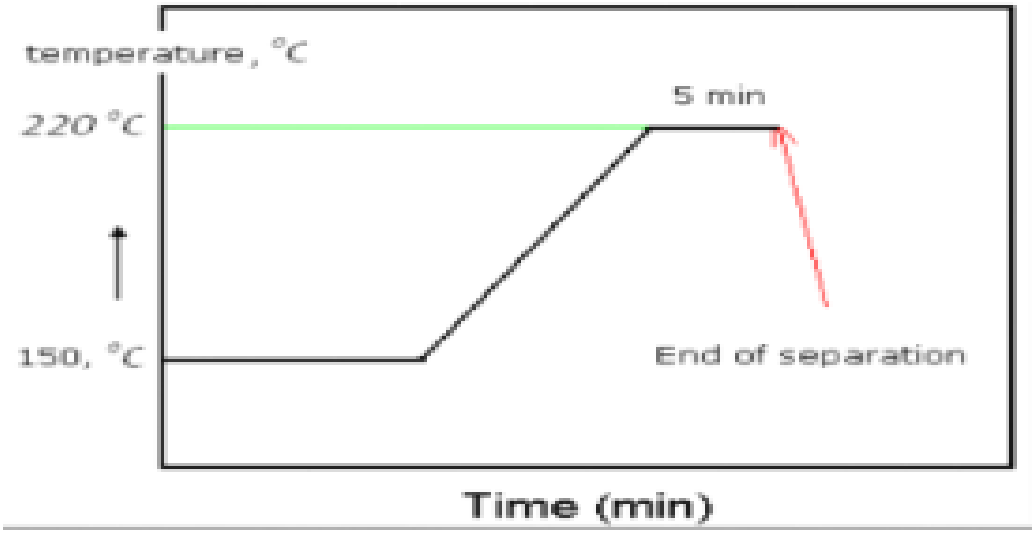

حيث نجد أن المركبين1و2 مفصولان بشكل جيد بينما 3و4 تكونpeaksعريضة ويخرجان بعد زمن طويل.

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

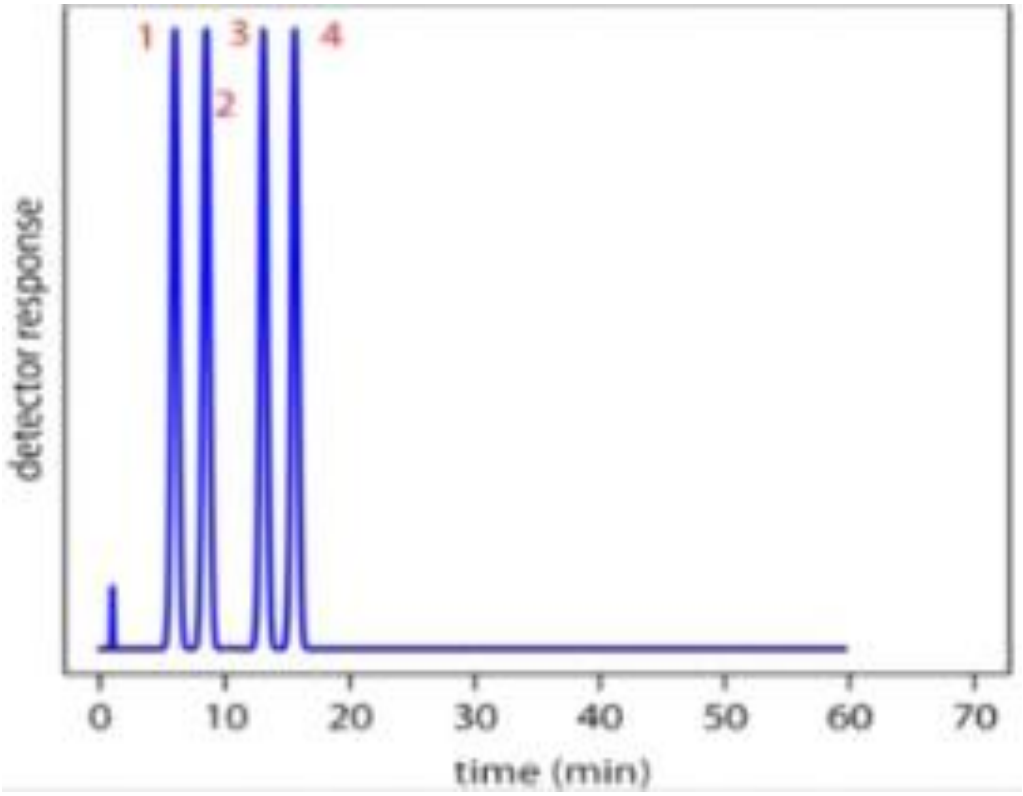



حيث نلاحظ أن الفصل بين المركبين1و2 أصبح سيئاً بينما تحسنت عملية فصل المركبين3 و4.

ويتم ذلك باستخدام برنامج التدرج الحراري (تعديل درجة الحرارة للوصول إلى عملية فصل أفضل) حيث عند البداية تم استخدام درجة الحرارة 150 Ċ لمدة 10 دقائق فحصلنا على فصل جيد للمركبين1و2 ومن ثم نزيد درجة الحرارة إلى220 Ċ بمعدل 20 درجة في الدقيقة ولمدة 5 دقائق عندها نحصل على فصل جيد للمركبين3و4 أي أننا نصمم برنامج الفصل كما في الشكل الآتي:




وبالتالي نحصل على الكروماتوغرام الأتي:




حيث تمت عملية الفصل بشكل جيد للمركبات الأربعة باستخدام برنامج يسمى

(temperature programming gas chromatography (TPGC