الكروماتوغرافيا المستوية

في الكروماتوغرافية المستوية يتم إجراء عمليات الفصل الكروماتوغرافية على سطح مستو بدلاً من استخدام عمود معبأ. هذه الطرائق بسيطة ولكن ذات كفاءة وحساسية عاليتين.

ويوجد نوعين من الكروماتوغرافية المستوية إحداهما يسمى الكروماتوغرافية الورقية والآخر يسمى بالكروماتوغرافية ذات الطبقة الرقيقة.

1- الكروماتوغرافية الورقية paper chromatography:

يكون الطور الثابت سائل وهو غالباً الماء المحيط بالسيليلوز مثبت أساساً على دعامة وهي عبارة عن ورقة الترشيح. توضع كميات صغيرة من العينة المختلفة على خط يرسم في بداية الورقة بحيث تبدو العينات على شكل بقع على هذا الخط وبعد ذلك تغمس الورقة في المذيب المتحرك (الطور المتحرك) في جو مغلق (حجيرة كروماتوغرافية) وذلك حتى يصبح محيط الحجيرة مشبع ببخار المذيب المتحرك.

يتحرك المذيب إلى أعلى الورقة بفعل الخاصية الشعرية أو يتحرك إلى الأسفل بفعل الجاذبية إذا وضع المذيب أصلاً في أعلى الورقة أويتحرك أفقياً بفعل الانتشار،.وأثناء تحرك المذيب تتوزع مكونات العينة بين المذيب المتحرك والطور الثابت وبالتالي تتحرك المكونات بسرعات مختلفة عبر الورقة.

بالنسبة للطور المتحرك يمكن استخدام مذيب واحد أو مزيج من المذيبات العضوية. أما الطور الثابت فهو عبارة عن الماء الممتز على الورقة وفي هذه الحالة يستخدم مذيب عضوي كطور متحرك لا يمتزج مع الماء.

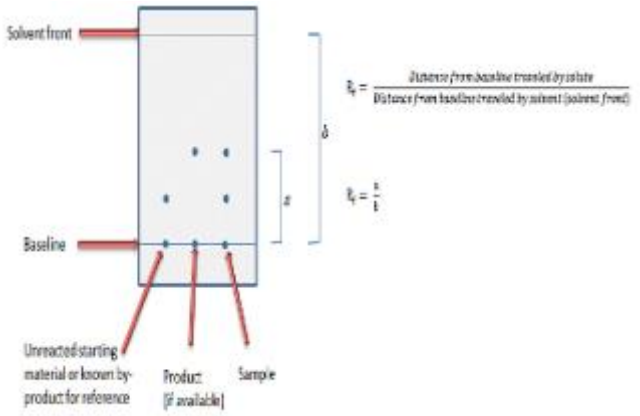
بعد فصل المواد عن بعضها على هيئة بقع يستخدم معامل التأخير R_f لوصف كل مادة تحت شروط معينة ويستخدم هذا المفهوم أيضاً في الكروماتوغرافية ذات الطبقة الرقيقة:

$$R_f = \frac{L_S}{L_M}$$

حيث: L_S المسافة التي تقطعها المادة على الورقة.

L_M: المسافة التي يقطعها المذيب المتحرك.

وتقاس عادة من مركز البقعة وقيمة R_f يجب ألا تتعدى الواحد وهي تقابل معامل التوزع D في الطرائق الكروماتوغرافية الأخرى. بعد ذلك يتم إظهار البقع عن طريق رش الورقة بكاشف طيفي يكون ألوان مع المواد المفصولة وذلك لتوضيح مكان كل مادة على الورقة. ويتم تقدير كل مادة كمياً إما على الورقة عن طريق قياس كمية الضوء المنعكس من كل بقعة أو عن طريق قطع كل بقعة على حدا ثم يتم تحليل كل مادة باستخدام طرائق التحليل المناسبة.



2- الكروماتوغرافية ذات الطبقة الرقيقة Thin-Layer Chromatoghraphy

مبدأ الفصل على طبقة رقيقة: تتميز هذه التقنية بفصلها المتفوق للمكونات وسرعة إجرائها مما هو عليه في الكروماتوغرافيا الورقية تستخدم في عمليات الفصل السريع وفي تحليل الكميات القليلة من المواد ويعود ذلك للأسباب الأتية:

١- بساطة الطريقة وعدم الحاجة إلى أجهزة معقدة (تكاليف منخفضة).

٢- إمكانية الوصول إلى جودة الفصل نفسها التي تعطيها الطرائق الكروماتوغرافية الآخرى.

٣- إمكانية الوصول إلى فصل انتقائي باستخدام كواشف أخرى.

٤- إمكانية التطبيق في مجال واسع من العينات.

٥- سرعة عملية التحليل وسهولة الاستخدام.

من عيوب الكروماتوغرافية الورقية أن ورق الترشيح غير متجانس التركيب كما أن عملية الفصل سيئة فيها بسبب تأثير الانتشار الجزيئي ودرجة الحرارة لهذا السبب يفضل استخدام الكروماتوغرافية ذات الطبقة الرقيقة، في هذه الطريقة يستعمل لوح زجاجي أو صفيحة صغيرة من البلاستيك تغطى بطبقة رقيقة (0.2-0.3 mm) من مادة مازة قطبية مثل الألومينا أو هلام السيليكا أو مسحوق السيليلوز. وهذه المادة قد تكون جافة أو مغطاة بطبقة من مذيب مناسب مثل الماء كما يمكن استخدام مبادل أيوني أو هلام كطور ثابت ويمكن استخدام أي مذيب مناسب كطور متحرك.إن ميكانيكية التوزع في هذه الطريقة تعتمد على الإمتزاز أو الذوبان التجزيئي أو التبادل الأيوني أو الاختلاف في حجم جزيئات المكونات.

الأطوار الثابتة المستخدمة في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

- الأطوار الثابتة المستخدمة في الـ TLC هي مساحيق ناعمة لمواد صلبة ذات طبيعة ادمصاصية تستطيع تثبيت المواد المفصولة بروابط الكهرباء الساكنة.

صفات المواد الادمصاصية وخواصها:

هنالك الكثير من المركبات الكيميائية ذات طبائع مختلفة ويمكن استخدامها كمواد ادمصاصية شرط أن تتمتع بخواص معينة:

1- عدم قابليتها للانحلال: يجب أن تكون هذه الصفة مطلقة بالنسبة إلى المحلات المستعملة كأطوار.

2-أن تتمتع بسطح نوعي كبير : يقصد بالسطح النوعي السطح الذي توفره واحدة الوزن من المادة المازة وهذا تابع لأبعاد حبيبات المسحوق ومسامية المادة، كما يفُضل دائماً الحصول على سطح تماس كبير مما يسمح بتثبيت جيد للمادة ومن ثم عملية فصل جيدة.

3- طبيعة المادة الادمصاصية: تتمتع المواد الادمصاصيةٌ بطبائع مختلفة فمنها المواد الادمصاصية المعدنية ومنها الفحم الفعال النباتي أو الفحم الفعال الحيواني، ومنها ما يكون على شكل أملاح مثل فوسفات وكربونات الكالسيوم إلخ...

تصنيف المركبات الادمصاصية حسب قدرتها الادمصاصية:

يمكن تقسيم المركبات المازة إلى ثلاث زم رئيسية وذلك حسب قدرتها الادمصاصية:

ضعيفة القدرة الادمصاصيةٌ مثل : السكروز، النشاء، التالك, السللوز

متوسطة القدرة الادمصاصية مثل :فوسفات الكالسيوم، كربونات الكالسيوم، كربونات المغنزيوم، كبريتات المغنزيوم.

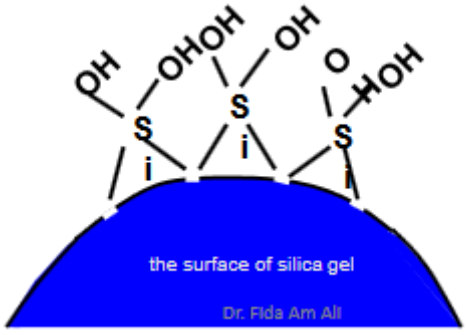
عالية القدرة الادمصاصية مثل : الألومين (Al_2o_3,nH_2O)، الفلوريدين Floredine وهو(سيليكات الألومنيوم المائية)، السيليكا، الفحم الفعال.

كما تصنف أشهر المركبات الادمصاصية حسب تزايد قدرتها الادمصاصية كما يلي وباتجاه السهم:

- سكروز
- سيللوز
- نشاء
- تالك
- كربونات الكالسيوم
- كبريتات الكالسيوم
- فسفات الكالسيوم
- Floresil كربونات المغنزيوم (الفلوريسيل)
- أوكسيد الكالسيوم
-الفلوريدين (سيليكات الألمنيوم المائية)
- السيليكا
- الفحم الفعال
- أوكسيد المغنزيوم
-الألومين

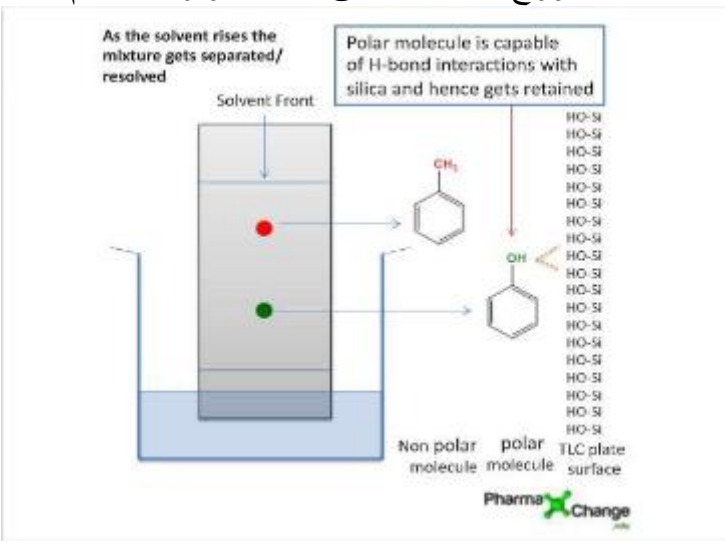
- يتمتع الألومين بقطبية عالية تعود إلى مجموعات الأوكسجين الموجودة في بنيته غير أن هذه القطبية العالية قد تجعله يحتفظ بالمواد القطبية ويمنعها من الهجرة مع الطور المتحرك. لذا يفضل إضعاف قطبيته بمعاملته بالكحول وأحياناً بحمض الخل. أما إذا لم يتم إضعاف قطبيته فيفضل استخدامه لفصل المواد ضعيفة القطبية.

- تعد السيليكا مادة قطبية وتعزى قطبيتها الى مجموعات السيلانول (Si-OH) الموجودة في بنيته والتي تشكل روابط هيدروجينية وروابط تجاذب كهربائي مع المركبات القطبية.



- يمكن للماء أن يدمص على سطح السيليكا فيمنع المواد القطبية من الارتباط معها ويبطل فعاليتها كمادة ذات طبيعة ادمصاصية لذا يجب تجفيف الصفائح لإعادة تفعيل القدرة الادمصاصية للسيليكا.

مثال عن ميكانيكية التوزع بالاعتماد على آلية الامتزاز باستخدام TLC:



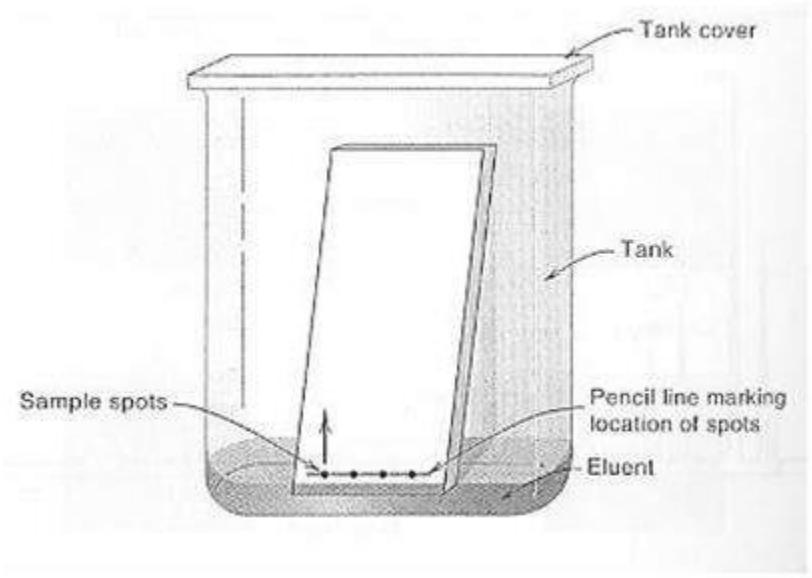
تظهر الفعالية الكروماتوغرافية (المفهوم الأساسي المستخدم على اتصال المادة المدروسة مع الجسم الدامص) الأكثر نوعية من خلال قوة الادمصاص المجموعات الوظيفية القطبية على المركبات (الأجسام) الدامصة القطبية التي تزداد وفق الترتيب الآتي:

$$- CH{=}CH- < -OCH_3 < -CO_2R < {=}C{=}O < -CHO < -SH < NH_2-$$

$$OH < -COOH-$$

وهنا أيضاً يتم الفصل في جو مغلق حتى يتشبع الجو ببخار المذيب المتحرك وذلك من أجل الحصول على تكرارية جيدة لقيم R_f لأن تبخر المذيب في جو مفتوح سيؤدي إلى زيادة L_S وتقليل L_M أي أن قيمة R_f سوف تزيد في هذه الحالة.

يفضل في هذه الطريقة أن تكون كمية العينة المحملة على صفيحة TLC في حدود 0.01-50 µg أي لا تكون كبيرة لأن ذلك يؤدي إلى إشباع للطور الثابت وبالتالي تتأخر المادة على الصفيحة وهذا يسمى التذليل (فصل غير جيد) ويصعب الفصل وأيضاً حتى نقلل من انتشار البقع وبالتالي نحصل على فصل جيد كما أن قيمة R_f تعتمد على كمية العينة غالباً تذاب العينة في 10 µl من مذيب متطاير وذلك لمنع انتشار البقعة.



يمكن إجراء عملية الإظهار في االكروماتوغرافيا الورقية والمستوية بعدة طرائق:

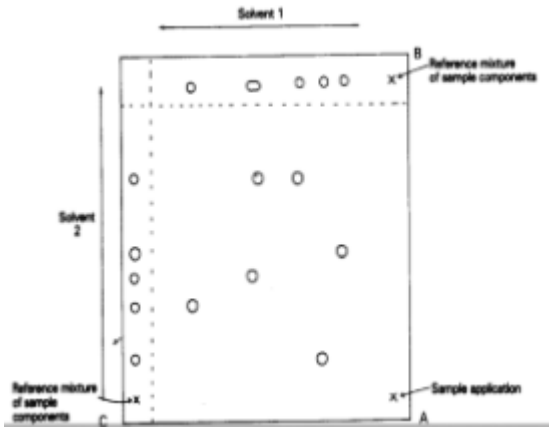
1- التقنية الصاعدة: في هذه الطريقة يتم مرور الطور المتحرك صاعداً خلال الورقة من أسفل إلى الأعلى وفيها يوضع طرف الورقة القريب من بقع العينات في حوض الإظهار يحتوي الطور المتحرك فيرتفع المذيب بفعل الخاصية الشعرية حامالاً معه مكونات العينات بسرعات متفاوتة وتتوقف عملية الفصل بمجرد وصول المذيب إلى الطرف العلوي للورقة وهي الطريقة الأكثر استخداماً.

2- التقنية النازلة: هنا يتم مرور المذيب هابطاً خلال الورقة من أعلى إلى أسفل وفيها يوضع طرف الورقة القريب من العينات في حوض الإظهار وهنا يتحرك المذيب عبر الورقة بالخاصية الشعرية وقوة الجاذبية حاملاً معه مكونات العينة بسرعات متفاوتة.

3- طريقة انتشار المذيب أفقياً: 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.

يمكن تحسين عملية الفصل باستخدام تقنية الإظهار ذو البعدين تستخدم عند وجود مجموعة من المركبات المتماثلة في بينتها وخصائصها الكيميائية مثل الحموض الأمينية التي تكون قيم متقاربة عند استخدام تقنية البعد الواحد وفي هذه الحالة تستخدم تقنية الإظهار ذات

البعدين التي يستخدم فيها طور متحرك ثاني حيث يتم أولاً الفصل في اتجاه معين على اللوح وبعد تبخر المذيب يدار اللوح بزاوية 90 Ċ ثم يستخدم مذيب آخر.



خطوات العمل بكروماتوغرافيا ذات الطبقة الرقيقة:

★تجهيز ألواح الطبقة الرقيقة.

★اختيار الوسط المتحرك المناسب.

★وضع العينة على لوح الطبقة الرقيقة.

★تظهير البقع المفصولة والتعرف على مكوناتها.

★حساب معامل التأخير R_f

1- تحضير الطبقة:

من أجل لوح زجاجي بأبعاد 20 cm ×20 نمزج 5g من السيليكاجيل مع 15ml من الماء المقطر في وعاء مجهز بسدادة ونخلط جيداً حتى يتم المزج على أن تتم هذه العملية خلال 60sec على الأكثر ثم يفرش هذا الخليط على اللوح بواسطة جهاز بسيط يمكن أن نحدد فيه سماكة الطبقة التي نريد فرشها (السماكة الأمثل 0.25 mm) تترك قليلاً ثم توضع في فرن C^o 110 لمدة 30 min لكي تجف وتتخلص من الرطوبة وتحفظ في مجفف لحين الإستخدام.

2- اختيار الطور المتحرك المناسب:

يعتمد اختيار المذيب على نوع المادة المراد فصلها وقد يكون ضرورياً اختيار عدة مذيبات لإجراء عملية الفصل حيث المذيب الذي له قطبية عالية يؤدي إلى تحريك البقع مع جبهة المذيب في حين المذيب غير القطبي لا يؤدي إلى تحريك البقع مع المذيب. ويمكن أن نستخدم عدد كبير من المحلات كأطوار متحركة ذلك بسبب تبخير المحل قبل إظهار البقع.

ولإختيار المذيب المناسب (الطور المتحرك) نقوم بما يلي:

تحضر طبقة الإدمصاص (سيليكاجيل مثلاً) ثم تضاف قطرة من مزيج العينة المراد فصلها في أحد المذيبات تترك القطرة حتى تجف ويلاحظ ما قد يتكون على طبقة الإدمصاص من دوائر ومدى تقارب هذه الدوائر حيث إذا كانت الدوائر متباعدة فإن هذا المذيب يمكن أن يكون هو الطور المتحرك المناسب أما إذا كانت الدوائر متقاربة معنى ذلك أن هذا المذيب لا يمكن استخدامه بمفرده في عملية الفصل وفي هذه الحالة تضاف إلى هذه القطرة التي جفت مكونة دوائر ضيقة قطرة من مذيب آخر يرى أنه قد يصلح لعملية الفصل (أكثر قطبية) والمذيب المناسب هو ذلك الذي يؤدي إلى اتساع في الدوائر المتكونة من القطرة الحاوية على مكونات المزيج.

وضع العينة:

- يرسم خطاً مستقيماً بقلم رصاص على بعد 1-2 cm من أحد أضلاع اللوح. ثم يتم وضع حجم معين في حدود 5-20 µl من العينة التي تركيزها يتراوح بين 0.1-5% بواسطة ماصة دقيقة (أنبوب شعري) على خط البداية .

- يجب أن تكون البقع أصغر مايمكن وينبغي ألا يزيد قطر البقعة عن3mm وللمحافظة على بقاء البقعة صغيرة توضع العينة بأحجام صغيرة عدة مرات مع التجفيف بعد كل إضافة. بعد تبخر المحل المستخدم في حل العينة.

- تغمس الطبقة الرقيقة داخل المذيب من الطرف القريب من خط البقعة بمنسوب أخفض من موقع العينة في حوض الفصل الحاوي على الطور المتحرك ثم يغلق الحوض بإحكام من أجل إشباع جوه ببخار الطور المتحرك.

- بعد قطع المحل مسافة كافية لفصل المزيج وقبل وصول الطور المتحرك إلى حافة الطبقة بحوالي 2cm نخرج الطبقة من الوعاء ونرسم خط بقلم الرصاص يدل على الارتفاع الذي وصل إليه الطور المتحرك وهو خط الجبهة ونجففها بتيار هوائي ليتم فيما بعد تحري نتائج الفصل.

الكشف عن المواد المفصولة (إظهار البقع):

يوجد نوعين لإظهار البقع الإظهار الكيميائي يعتمد على استخدام كواشف كيميائية والإظهار الفيزيائي مثل جهاز الأشعة فوق البنفسجية وجهاز الماسح الضوئي.

- إذا كانت البقع ملونة تكشف بالعين المجردة بعد مقارنة الـ R_f للمادة المفصولة مع الـ R_f للشواهد، وإذا كانت متألقة تكشف البقع بفحص تألقها بالأشعة فوق البنفسجية.

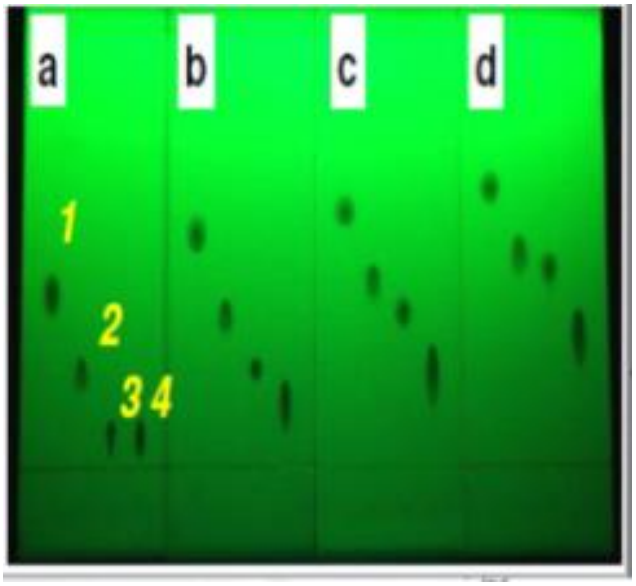
- ولكن إذا كانت غير ملونة عندها ترش الصفيحة بكاشف مولد للون يشكل معقداً ملوناً مع المواد المفصولة وبالتالي تبدو كبقع ملونة.

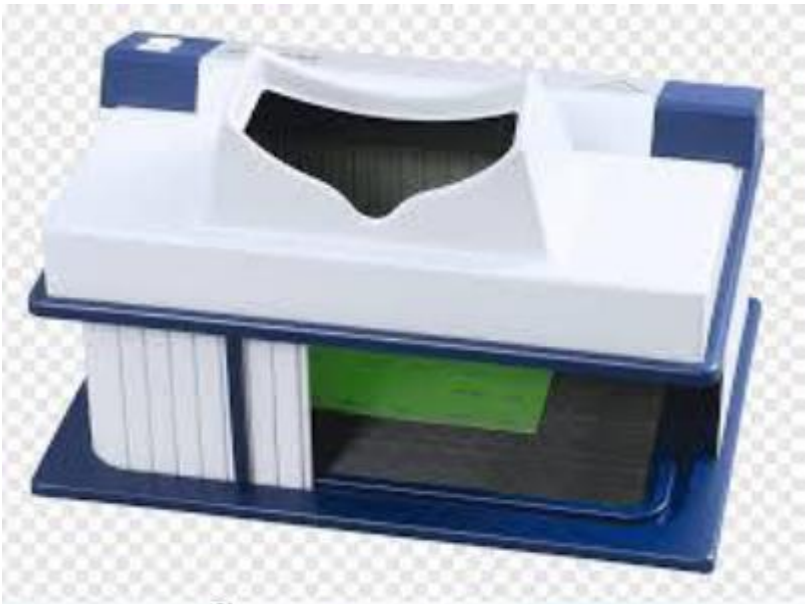
- إذا لم تكن البقع ملونة ولا يمكن تشكيل لوناً منها نقوم برذ الصفيحة بحلالة اليود حيث يستطيع اليود تلوين البقع إما بحلها كيميائياً أو بأكسدتها.

- إذا لم يكن كل ماسبق ممكناً نستخدم أطوار ثابتة مضاف لها صباغ متألق فبتعرض الصفيحة للأشعة فوق البنفسجية تظهر الصفيحة متألقة وينطفأ التألق في أماكن وجود البقع فتظهر بشكل دوائر عاتمة.

أمثلة عن الكواشف كاشف النانهدرين للحموض الأمينية وحمض الكبريت الذي يحرق المواد العضوية بالتسخين ويحولها إلى بقع سوداء لهذا لا يستعمل مع الكروماتوغرافية الورقية وإنما فقط مع الكرماتوغروافية ذات الطبقة الرقيقة نظراً لأنه يحرق الورقة.

كثير من المركبات العضوية تتألق عند إثارتها بالأشعة عند 254 nm لذلك يستخدم أجسام مازة (اللوح) تحوي مشعر فلورة التي تمتص عند 254 nm ثم تتألق وتصدر أشعتها عند نهاية الأخضر من الطيف وبعد الفصل يتم تسليط الأشعة فوق البنفسجية على اللوح عندها سوف يتألق كامل اللوح ويصبح لونه أخضر ما عدا البقع المفصولة التي تظهر بلون داكن وخلفية خضراء حيث يكون لها تأثير انطفائي.





جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV المستخدم لإظهار مكان بقع المواد

تطبيقات الكروماتوغرافية المستوية:

1- التحليل الكيفي:

يمكن تمييز مزيج من المكونات مثل مزيج مكون من عدة ملونات عن طريق مقارنة R_f لتلك المكونات مع قيم R_f للمواد القياسية تحت تأثير نفس الظروف أو عن طريق فصل المكونات والكشف بالطرائق الأخرى مثل التحليل الطيفي الكتلي أو طريقة الأشعة تحت الحمراء....

مثال: الكشف عن Caffeine باستخدام TLC حيث المذيب المتحرك عبارة عن مزيج من المذيبات.

Ethyl acetate/hexane/acetic acid (20/10/0.5, v/v/v)

واستخدم كاشفUVعند طول الموجة 254 nm وكاشف طيف الكتلة

2- التحليل الكمي:

إن دقة ومصداقية الطرائق الكروماتوغرافية المستوية ليست جيدة حيث يتراوح الخطأ ما بين 5-10% لذلك فإن استخدامها في التحليل الكمي محدود نسبياً إلا أنه يمكن عن طريق رسم العلاقة بين وزن المادة واللوغاريتم أو الجذر التربيعي لمساحة البقعة إيجاد التركيز التقريبي للمادة. كما يمكن تحليل المواد بالطرائق الطيفية أو الكيميائية.

ويوجد العديد من المواد التي يمكن فصلها باستخدام االكروماتوغرفية المستوية مثل الحموض الأمينية، الفيتامينات، السكريات والملونات الغذائية.