الكروماتوغرافيا Chromatography

الكروماتوغرافيا Chromatography

هي الأسم العام للتقنيات التي يتم فيها الفصل الفيزيائي لأثنين أو أكثر من المركبات في مزيج .

تستعمل طرق الفصل الكروماتوغرافي من أجل فصل مزيج والتعرف على هوية مكوناته (التحليل الكيفي) وتحديد محتوى هذه المركبات في المزيج (التحليل الكمي) وهو ما يعرف بالكروماتوغرافيا التحليلية .

الكروماتوغرافيا : كلمة يونانية الأصل مؤلفة من كلمتين: chroma وتعني اللون أو الأصباغ و Graphy وتعني الكتابة أو التصوير أو الطباعة , والكلمة بشكل عام تعني الطباعة اللونية أو الكتابة اللونية أو الرسم اللوني .إلا أن هذه الطريقة تتبع الآن بنجاح في فصل جميع المواد غير الملونة من مزائجها الصلبة أو السائلة أو الغازية.

مبدأ الفصل : تعتمد عمليات الفصل الكروماتوغرافي على اختلاف توزع مكونات المادة المراد فصلها بين طورين:

الأول : يسمى بالطور الثابت Stationary phase وهو إما مادة صلبة أو سائل ,وهو يمارس فعل الاحتجاز والتأخير , وعادة تستخدم السيليكا (أوكسيد السيلكون) أو الألومينا (أوكسيد الألمنيوم) .

الثاني : يسمى بالطور المتحرك Mobile phase وهو إما سائل أو غاز , يحمل النموذج المراد فصله ويمر من خلال السطح الخارجي للطور الثابت ويسمى بالحامل لأنه ينقل مكونات المادة عبر العمود.

تصنيف الطرق الكروماتوغرافية Classification of Chromatography Methods:

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

يمكن تصنيف الطرائق الكروماتوغرافية إعتماداً على:

التصنيف الأول : التصنيف المعتمد على طبيعة الأطوار المستخدمة:

- **كروماتوغرافيا سائلة صلبة Liquid – Solid Chromatography (LSC)**
- **كروماتوغرافيا سائلة سائلة Liquid – Liquid Chromatography (LC)**
- **كروماتوغرافيا غاز صلب Gas – Solid Chromatography (GSC)**
- **كروماتوغرافيا غاز سائل Gas – Liquid Chromatography (GLC)**

التصنيف الثاني : التصنيف المعتمد على آلية الفصل:

- **كروماتوغرافيا الإدمصاص(Adsorption) .**

يتكون الطور الثابت من مادة صلبة مثل السيليكا أو الألومينا والتي تكون نسبة مساحة سطحها إلى حجمها كبيرة كما أن سطحها ذو نشاط كيميائي , وتعبأ المادة الصلبة في عمود يمر خلاله الطور المتحرك الذي هو عبارة عن سائل.

- **كروماتوغرافيا التجزئة أو التوزيع. (Partition)**

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 لا يمتزجان) .

- **كروماتوغرافيا التبادل الإيوني (Ion-exchange) .**

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 البوليستارين المحتوي على مكونات أيونية (زمر فعالة) مثل مجموعات الكربوكسيل أو السلفوهيدريل أو مجموعات الأمونيوم في المبادل الإيوني , حيث يمكن أن تتبادل المكونات الايونية 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

إذا تضمن هذا التبادل تبادلا للايونات السالبة فتسمى العملية ب anion-exchange والعملية التي يتم فيها تبادل للايونات الموجبة تعرف بcation-exchange

ثالثا : التصنيف المعتمد على تقنية الفصل:

كروماتوغرافيا الورقة Paper Chromatography

كروماتوغرافيا الرقيقةالطبقة Thin layer Chromatography

كروماتوغرافيا الأعمدة Column Chromatography

أ. كروماتوغرافيا السائل ذوالكفاءة العاليةHPLC

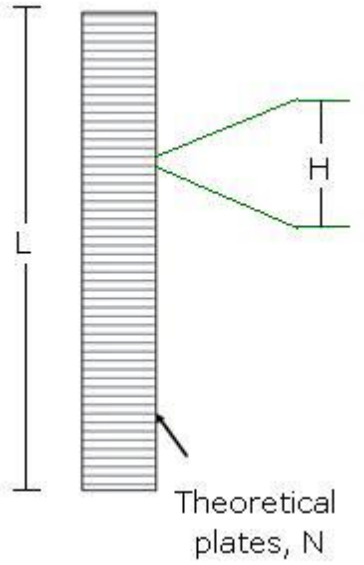
ب. كروماتوغرافيا الغاز GC

ت. كروماتوغرافيا الأيونات IC

نظرية الفصل الكروماتوغرافي: هناك نظرية تبين عملية الفصل الكروماتوغرافي:

نظرية الصفيحة Plate theory

تفترض هذه النظرية تقسيم عمود الفصل إلى صفائح أو أجزاء ، متساوية في الارتفاع أرتفاع كل منها H وفي كل صفيحة من تلك الصفائح تحدث عملية تجزئة للمادة .



فكلما سارت المادة مسافة أطول في العمود فأنها تتعرض لعمليات تجزئة أكثر ويتوقف عددها على عدد الصفائح التي مرت بها فكلما كانت H قليلة كلما زادت عدد الصفائح في المسافة المحددة (بحسب طول العمود) وبالتالي تزداد كفاءة الفصل.

ويمكن القول ان كفاءة الفصل (N) تعتمد على عدد الصفائح في العمود ويمكن الحصول على كفاءة الفصل من خلال العلاقـــــة:

$$N=L/H$$

حيث N عدد الصفائح وهو عدد افتراضي لأن العمود غير مقسم الى صفائح حقيقية)

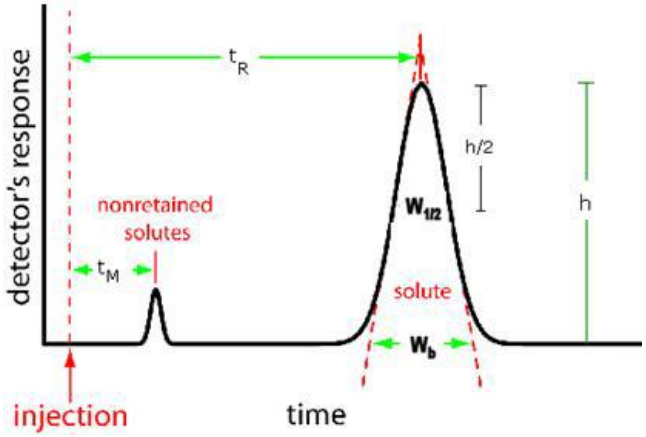
L طول العمود H ارتفاع الصفيحة

حققت هذه النظرية نجاحا باهرا في تفسير عملية الفصل الأ انها لم تستطيع ان تفسر لماذا نحصل على اشارات عريضة أو مذيلة أو رفيعة أي انها لم تفسر أتساع الأشارة.

وهناك طريقتان لزيادة كفاءة الفصل من خلال:
- **زيادة طول العمود**
- **زيادة عدد الصفائح النظرية في وحدة واحدة من طول العمود**

زمن الأحتباس (زمن البقاء) Retention time

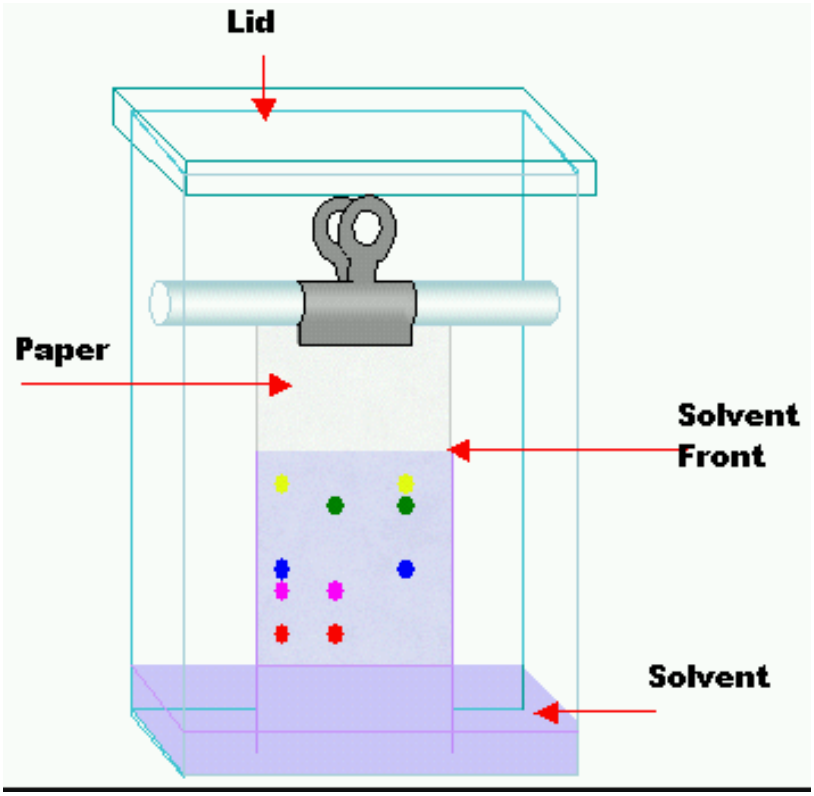
الزمن الذي تستغرقة الحزمة للظهور ويقاس هذا الزمن من النقطة التي يبدا فيها المذاب بالتحرك خلال العمود أو بداية حقن النموذج لحين ظهور أعلى استجابة للمكشاف.



تقنيات الفصل الكروماتوغرافي

كروماتوغرافيا الورقة 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 أساسا على ورقة الترشيح وورقة الترشيح نفسها تعمل فقط كدعامة صلبة . أما الطور المتحرك فهو مذيب عضوي لا يمتزج بالماء.



توضع كميات صغيرة من العينات المختلفة بوساطة ميكروماصة (10 – 200 µg) أو أنبوب شعري على خط مرسوم في بداية الورقة بحيث تبدو العينات على هيئة بقع على هذا الخط وبعد ذلك تغمس بداية الورقة في المذيب (الطور المتحرك) في جو مغلق وذلك للحفاظ على جو مشبع ببخار الطور المتحرك.

التحليل النوعي في كروماتوغرافيا الورقة 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 يكون ألوانا مع المواد المفصولة وذلك لتوضيح مكان كل مادة على الورقة, أو باستخدام الأشعة فوق البنفسجية.
ثم نحسب قيمة معامل الأنسيابية retardation factor لكل مكون (نموذج) ونقارنه مع قيمة معامل الأنسيابية للمادة القياسية والتي خضعت لنفس شروط الفصل التي خضعت لها العينة كنوع الورق ونوع الطور المتحرك وتركيبه وزمن الفصل:

معامل الأنسيابية (R_f) = المسافة التي تقطعها المادة / المسافة التي يقطعها الطور المتحرك (المذيب)

ويستفاد من تقنية كروماتوغرافيا الورق في تشخيص المركبات العضوية فقط ، حيث يمكن معرفة قيمة عامل الأنسيابية للمركبات ، ومن ثم مقارنته مع عامل الإعاقة للمركب القياسي المعروف الهوية فإذا تطابق كان المركب مماثل للمركب القياسي أي إن عامل الإعاقة هو مقياس لسرعة حركة المكون نسبة إلى الطور المتحرك . ويتم قياس المسافة اعتبار من خط الابتداء، أي من مركز البقعة.

التحليل الكمي في الكروماتوغرافيا الورقية Quantitative analysis in PC : بعد تحديد مكان البقعة يمكن إجراء التحليل الكمي بقص البقعة واستخلاصها بمحل مناسب ثم تحديد التركيز بالطرائق الطيفية.

أساسيات كروماتوغرافيا الورقة

- **تفصل مكونات المخاليط على أساس اختلاف معامل التوزيع.**
- **يكون الوسط المتحرك إما مذيب واحد أو خليط من المذيبات٠ .**

يتحرك الوسط الثابت خلال الوسط المتحرك بإحدى الطرق التالية٠ : الخاصية الشعرية أو الجاذبية الأرضية.

المذيبات المستخدمة في كروماتوغرافيا الورقة:

كحول البيوتانول المشبع بحامض الهيدروكلوريك

استيل أسيتون المشبع بالماء

حامض الخليك الثلجي الحاوي على 5% من كحول الميثانول

اثيل - مثيل كيتون.

كحول الميثانول.