Mustansiriyah University – College of science

Chemistry Department

Chromatography

For student of the fourth stage

By

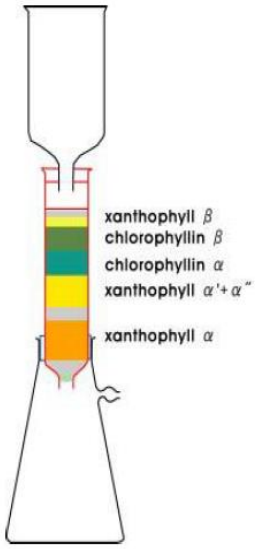
Assist. Prof. Dr. Amer Saleh Mahdi

Lecturer Dr. Ali Amer Waheb

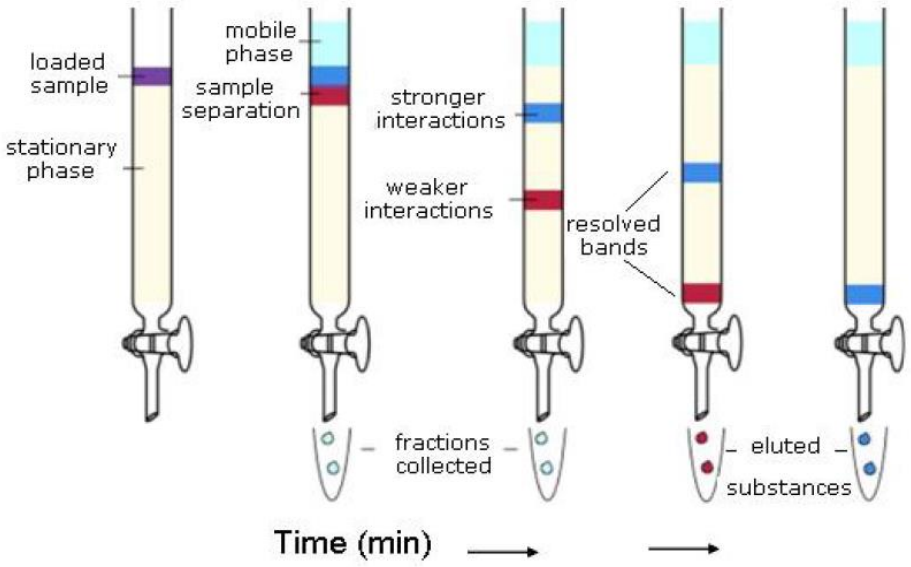
الكروماتوغرافيا Chromatography

الأساس النظري :

إن أصل كلمة كروماتوغرافيا باليوناني تعني كتابة الألوان وهي تمثل مجموعة من طرق الفصل التي اعتمدت في الاصل على سلسلة من التجارب التي قام بها العالم النباتي الروسي ميخائيل تسفيت حيث قام بإمرار مزيج ملون من مستخلص نباتي على مادة ممتزة هي كربونات الكالسيوم $CaCO_3$ معبأة في عمود حيث ظهرت المركبات الملونة مفصولة في نهاية العمود وتم عزلها في أواني مستقلة في أزمان مختلفة وهذه التسمية امتدت إلى كل أنواع الكروماتوجرافيا حتى الغير ملونة منها.



ومن الممكن تتبع عملية الفصل مع الوقت ، وذلك بالنظر إلى الشكل التالي:



تعتبر تقنية الكروماتوجرافيا إحدى التقنيات التحليلية التي تستخدم لفصل وتقدير مزيج من مركبات كيميائية مختلفة بالاستناد إلى تغييرات وتأثيرات فيزيائية وتتكون هذه التقنية من طورين طور متحرك يدعى mobile phase وطورثابت يدعى stationary phase تتم العملية بإذابة المزيج المراد فصل مكوناته في الطور المتحرك ومن ثم إمرار الطور المتحرك مع مكوناته من أعلى العمود المعبأ بالطور الثابت واستلام المركبات ألمفصولة أسفل العمود بازمان مختلفة .

وتتم توزيع المادة المراد فصلها بين الطورين المتحرك والثابت أما باختلاف قابلية الذوبان أو باختلاف الامتزاز أو القطبية أو درجة التأين أو الاختلاف بالحجوم . الطور المتحرك أما أن يكون غاز خامل كما في تقنية كروموتوغرافيا الغاز(GC) أو مادة سائلة مكونة من مذيب واحد أو عدة مذيبات بنسب معينة شرط ان تكون مركبات المزيج (النموذج) ذائبة به بشكل تام كما في تقنية كروموتوغرافيا السائل (LC).

انواع تقنيه الكروماتوغرافيا : توجد عده تصنيفات لتقنيه الكروماتوغرافيا

1- على اساس المبادئ التي تعمل عليها .

a- كروماتوغرافيا الامتزاز– adsorption Chromatography

b- كروماتوغرافيا التوزيع -Partition Chromatography

c- كروماتوغرافيا التبادل الايوني - Ion exchange chromatography

d- كروماتوغرافيا الاستثناء او الاستبعاد - exclusion Size Chromatography

2- على اساس الشكل الهندسي للتقنيه.

a- كروماتوغرافيا العمود Column Chromatography

b- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin layer Chromatography

c- كروماتوغرافيا الورقة paper Chromatography

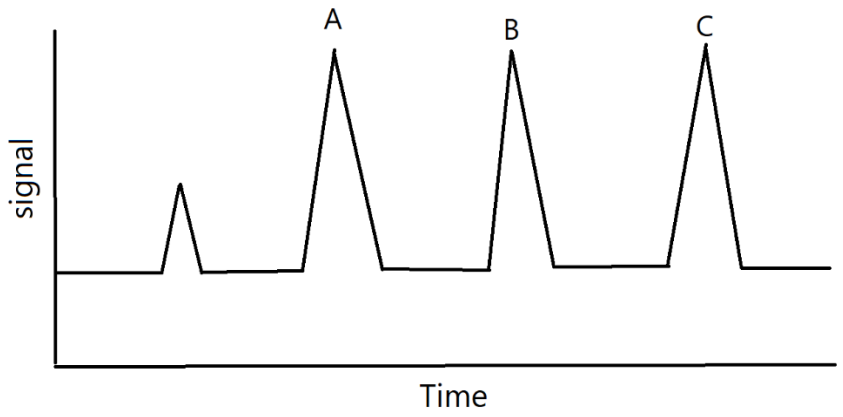
الطور الثابت (Stationary phase) وهو اما ان يكون صلب او سائل مثبت على دعامة صلبة ويوضع عادة في عمود(Column) او يطلى على لوح من البلا ستيك او الزجاج او قطعة من الورق .

الطور المتحرك(mobile phase) وهو اما سائل او غاز يمر خلال الطور الثابت وعادة ينقل مكونات (مزيج) المواد المراد تحليلها

وتأتي أهمية الكروماتوغرافية بالدرجة الاولى في استخدامها لطرق تحليلية لتعيين المركبات الداخلة في مزيج ما من الناحية النوعية والكمية.

a- كروماتوغرافيا الامتزاز– adsorption Chromatography

في هذة التقنية يكون الطور الثابت مادة صلبة تمتلك فعالية سطحية على شكل قوى جزيئية بسبب كون جزيئات المادة الصلبة تمتلك قوة مختلفة مثل قوى فاندرفالز وقوة كهربائية قطبية وقوة اخرى في حالة توازن مع بعضها البعض ولكن نرى ان الجزيئات التي تكون على سطح المادة الصلبة لها توازنات قوى مع الطبقات الداخلية فقط و تكون مفتوحة من الناحية السطحية الامر الذي يعطي للاسطح فعالية كيميائية وفيزيائية نتيجة هذه القوة ومنها قابلية الامتزاز السطحي الذي نراه واضح في المواد الصلبة التي تستخدم في تقنية الكروماتوغرافيا ومن هذه المواد المستخدمة كطور ثابت الالومينا والسليكا والسليكا جيل ميكانيكية عمل الامتزاز السطحي يحصل عند امرار الطور المتحرك على الطور الثابت وتكون مكونات المزيج المراد فصلها والذائبة في الطور المتحرك يحصل تأثر على شكل امتزاز بين مكونات المزيج الذائبة في الطور المتحرك والطور الثابت بشكل متفاوت مثل المركب A يتاثر بنسبة 10% والمركبة B بنسبة 50% والمركب C بنسبة 90% فالمركب الذي يتاثر بنسبة اكبر سيتاخر بالخروج من العمود ويكون زمن احتجازه كبير و يخرج في نهاية الحقنة والذي تأثره قليل يخرج من العمود بسرعة ويكون في بداية الحقنة يكون شكل مخطط التحليل كالاتي :

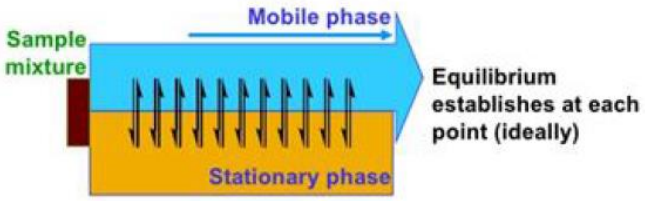


b- كروماتوغرافيا التجزئة Partition Chromatography-

في هذا النوع من الكروموتوغرافيا يكون الطور الثابت سائل مسنود على مسند صلب وفي كلا النوعين كروموتوغرافيا الامتزاز والتجزئة يخضعان لعملية توزيع المكونات بين الطورين وهي عملية ديناميكية فكل جزيئة من جزيئات المكون تمر عادة بسرعة الى الخلف والى الامام بين الطورين وهذا الانتقال يصل بسرعة الى حالة التوازن ويحصل التوازن عند تساوي الطاقة الحرة لجزيئات المكون بين الطورين وان نشوء حالة التوازن تخضع لقانون نرنست

$$Kd = \frac{C_S}{C_m}$$

حيث Kd معامل التوزيع Distribution coefficient و Cm , Cs هي تراكيز المكون في الطورين الثابت والمتحرك على التوالي.



فإذا كان Kd كبير جدا فإن المكون يبقى في الطور الثابت لفترة أطول ويتحرك ببطء شديد اما اذا كان Kd صغير فإن المكون يكون في الطور المتحرك وسرعته نفس سرعة الطور المتحرك أي يتحرك بسرعة . واذا تم التعبير عن عامل الاعاقة بعدد الجزيئات سيكون

$$R = \frac{\mathrm{Mm}}{\mathrm{Mm} + \mathrm{Ms}}$$

حيث : R عامل الاعاقة النسبي : Mm كتلة المكون في الطور المتحرك وMm كتلة المكون في الطور الثابت

ويمكن التعبير عن الكتلة بالتركيز مضروبا في حجم الطور تكون العلاقة

$$\mathrm{R} = \frac{\mathrm{Cm} \times \mathrm{Vm}}{\mathrm{CsVs} + \mathrm{CmVm}}$$

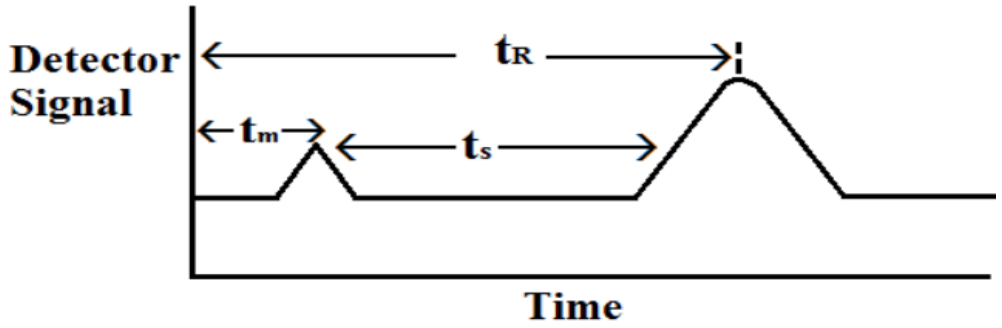
واذا كان سرعة الطور المتحرك f يمكن الوصول الى معدل سرعة المكون (النموذج)

$$\mathrm{f} * [\frac{1}{1 + Kd\frac{Vs}{Vm}}]$$

وبما ان سرعة الطور المتحرك ثابت وان Vs/Vm هي الاخرى ثابت فإن المتغير الوحيد الذي يقرر انتقال مكون من المكونات هو معامل التوزيع Kd فإذا كان Kd للمكون A يختلف عن Kd للمكون B فان B , A سينتقلان بسرعة مختلفة وان المكون الاكثر مكوثا (احتجازا) في الطور الثابت هو الذي يملك Kd اعلى ويعبر عن المكوث في الطور الثابت بزمن الاحتجاز Retention time وان الاختلاف في زمن الاحتجاز يؤدي الى خروج متتابع للمكونات المفصولة من الطور الثابت حسب معامل توزيع كل منهما وعلى هذا الاساس المكون الذي له Kd اصغر هو الذي يخرج أولا من الطور الثابت ويمكن التعبير عن زمن الاحتجاز بالعلاقة

$$\mathrm{t}R = tm + ts$$

حيث ts : فترة احتجاز المادة في الطور الثابت tm : الزمن الميت : Dead time وهي الفترة الزمنية التي يحتاجها الطور المتحرك للمرور خلال الطور الثابت بدون إعاقة حيث ان tR زمن االحتجاز الكلي Retention timeويعرف زمن الاحتجاز هو دالة التشخيص النوعي في اغلب الطرق الكروماتوغرافية ويمثل الفترة الزمنية منذ حقن المادة في الجهاز وحتى وصولها الى الكاشف



العوامل المؤثرة على زمن الاحتجاز

- معدل جريان الطور المتحرك.
- نوع الطور الثابت .
- التداخالت بين الطور الثابت والمادة المراد فصلها .
- درجة حرارة العمود .
- طول العمود .
- نوع الطور المتحرك .
- ويعبر عن حجم الطور المتحرك اللازم لاخراج المادة من الطور الثابت بحجم الاحتجاز Retention volume ويرمز لها V_R ويعبر عنها $V_R = F \times t_R$ حيث F تمثل سرعة الطور المتحرك
- **كفاءة الفصل الكروماتوغرافي** هناك نظريتان تناولت تفسير اهم العوامل التي تزيد كفاءة الفصل التحليلي وهي
- **Plate theory : نظرية الصفائح**
- **Rate theory : نظرية السرعة**

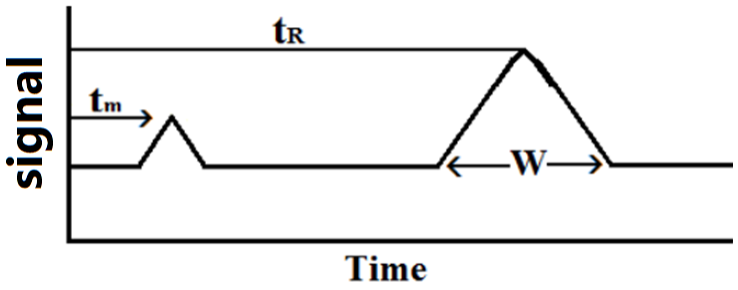
نظرية الصفائح Plate theory

تتضمن النظرية ان العمود الكروماتوغرافي يحتوي على عدد كبير من القطع المتشابهة او الصفائح النظرية وفي كل منها يتم التوازن وقد افترضت النظرية ان العملية الكروماتوغرافية هي عملية مستمرة وليس عمليات متقطعة وكلما زادت عدد الصفائح النظرية كانت الذروات اضيق وقريبة للوصول الى

السلوك المثالي وقد افترضت النظرية معادلات رياضية لحساب عدد الصفائح النظرية وموضحة ان العمود الكروماتوغرافي اشبه الى برج التقطير وتحسب عدد الصفائح النظرية بالعلاقة التالية

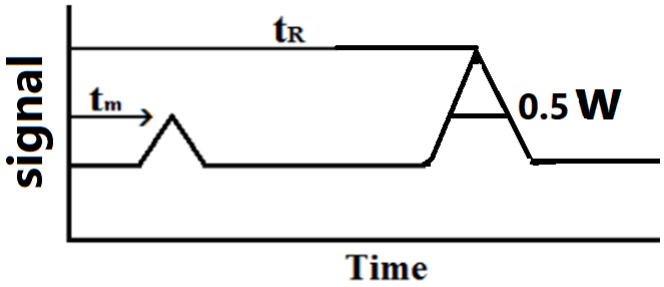
$$N = 16 \left(t_R / w \right)^2$$

حيث : N عدد الصفائح النظرية وtR زمن الاحتجاز : Wعرض القمة



ويمكن حساب N من العلاقة التالية

$$N = 5.54 \left(tR / 0.5w \right)^2$$



ويمكن تحديد كفاءة الفصل (كفاءة العمود) من خلال العلاقة التالية

$$H = HETP = L/N$$

حيث تمثل : L طول العمود : N , عدد الصفائح النظرية : HETP الارتفاع المكافئ للصفيحة النظرية وهو اختصار High equivalent theatrical plates وهناك طريقتان لزيادة كفاءة الفصل من خلال زيادة طول العمود و زيادة عدد الصفائح النظرية في وحدة واحدة من وحدات طول العمود.

س1- حسب نظرية الصفائح هل تتاثر قيمة H ارتفاع الصفيحة النظرية مع تغيرسرعة الطور المتحرك؟ ولماذا ؟

مثال : مخطط كروماتوغرام لمكونين A , B زمن الاحتجاز لـ A 5 دقيقة و لـ B 6 دقيقة وعرض القمة 0.100 A دقيقة , 0.1171 B دقيقة , احسب عدد الصفائح النظرية لعمود الفصل واذا كان طول العمود 25 سم , احسب HETP

$$N_A = 16 \left(t_R / w_A \right)^2 = 16 \left(5 / 0.1 \right)^2 = 4.00 \times 10^4$$

$$N_B = 16 \left(t_R / w_B \right)^2 = 16 \left(6 / 0.1171 \right)^2 = 4.20 \times 10^4$$

$$HETP = L / N = 25 / 4.10 \times 10^4 = 6.1 \times 10^4 \text{ cm}$$

- نظرية السرعة :Rate theory

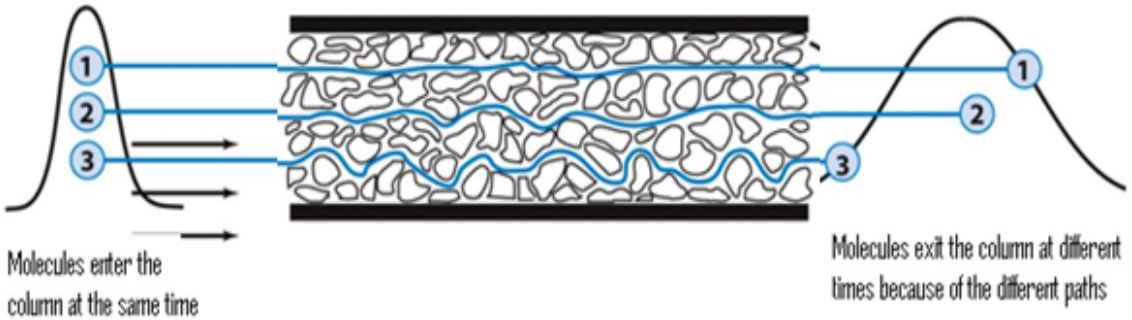
قام عدد من الباحثين البولنديين العاملين في مجال النفط الى اشتقاق معادلة بين قيمة H وسرعة الطور المتحرك سميت بمعادلة فان دميتر Van Demeter Equation ادناه صيغة هذه المعادلة

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

حيثμ سرعة الطور المتحرك و C , B , A ثوابت

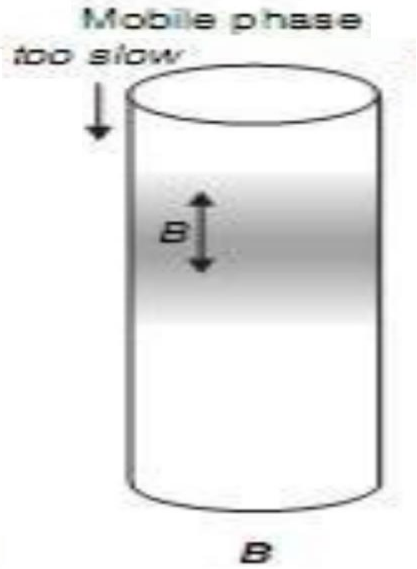
الثابت A يعبر عن الـ eddy diffusion وتعنى الانتشار الدوامي

ويكون على شكل دوامات ومسارات عشوائية والطرق الغير متساوية التي يسلكها الطور المتحرك وكذلك يعبر عن العشوائية للجزيئات في العمود التي يمكن ان تشير الى ان الجزيئات بخط مستقيم او تسير بخط كثير التموج أي هناك حركة عشوائية تؤثر على قيمة H وكما موضح بالرسم ادناه



الثابت B الانتشار الطولى او الانتشار الجزيئى Molecular diffusion or Longitudinal diffusion

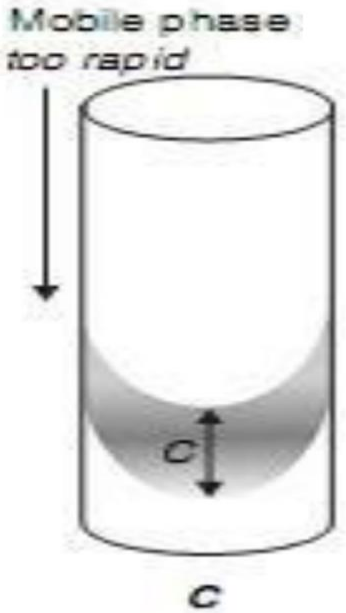
هذا الثابت له علاقة بالانتشار الطولي أي على امتداد العمود وتكون حركة الانتشار اما الى الاعلى او الاسفل ويظهر هذا التأثير بشكل واضح في تقنية الـ GC عندما يكون الطور المتحرك غاز اما عندما يكون الطور المتحرك سائل تقنية LC يكون قيمة الانتشار الطولي صفرا كما موضح بالرسم ادناه

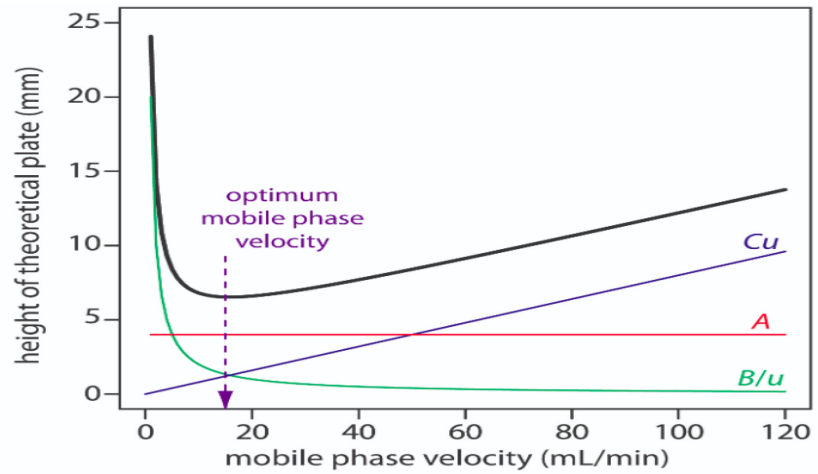


أي ان B / μ المساهمة في الانتشار على امتداد العمود

انتقال الكتلة فى الطور المتحرك (C) mass transfer in mobile phase

هذا الثابت والذي يمثل الحد الثالث من المعادلة يعتمد على حجم الحبيبات ويتناسب مع مربع قطر الحبيبات





الرسم اعلاه يوضح العلاقة بين العوامل الثلاثة مع السرعة الخطية وكفاءة الفصل التي من خلالها يمكننا حساب السرعة المثالية للطور المتحرك التي تعطينا اكفأ فصل للمكونات المراد فصلها . من خلال معادلة فان ديمتر ويمكن ان تكون العلاقة عند استخدام السرعة المثالية

$$H_{minimum} = A + 2\sqrt{BC}$$

س2- ماهي الخطوات العملية لايجاد قيمة $H_{minimum}$ لعمود كروموتوغرافي ؟ استخدم النظريتين لايجاد الحل.

Resolution التفريقية او درجة الفصل او قدرة الفصل :

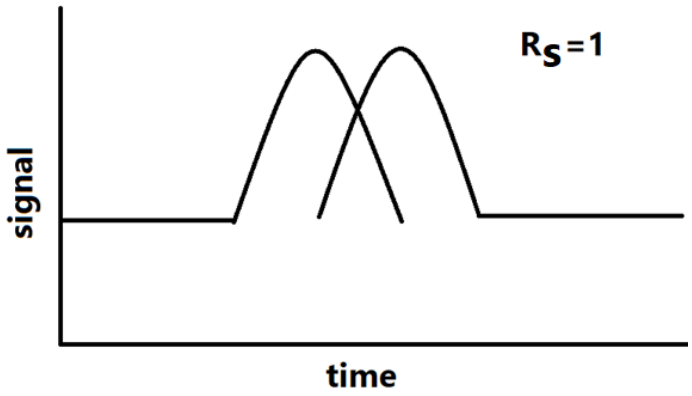
من الاهداف المهمة والرئيسية لعملية الفصل هو قدرة الفصل لمركبات ذات صفات متشابهة ويعني هذا المصطلح فصل مكونات النموذج بشكل ذروات قمم واضحة منفصلة عن بعضها البعض بفاصلة زمنية مناسبة يضاف الى ذلك شكل الذروة وتجانسها وقد تم وضع معادلة لحساب درجة الفصل وهي كالاتي

$$R_S = \frac{2(tR_2 - tR_1)}{W_1 + W_2}$$

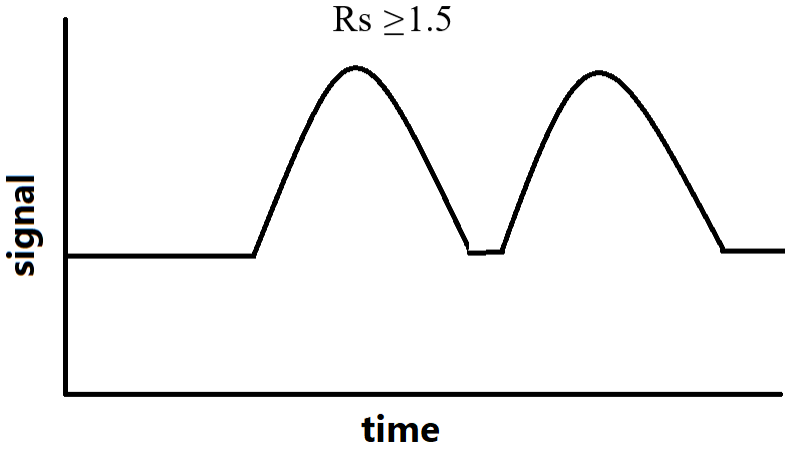
حيث : RS قدرة الفصل : tR2 زمن احتجاز المادة الثانية : tR1 زمن احتجاز المادة الاولى

W2 , W1 عرض القمتين للمادة الاولى والثانية

عندما تكون قيمة Rs = 1 فان الفصل غير جيد ويكون فيه تداخل over lapping



عندما تكون قيمة $Rs \geq 1.5$ فان الفصل جيد



ويمكن تحسين قدرة الفصل من خلال زيادة طول العمود لزيادة عدد الصفائح النظرية وتحسين عرض القمة ومن

العوامل المؤثرة على عرض القمة(الحزمة)

- حجم الدقائق للطور الثابت Particle size
- سمك طبقة الطور الثابت thickness
- لزوجة الطور المتحرك viscosity
- درجة حرارة العمود Temperature
- السرعة الخطية للطور المتحرك Liner velocity

تحليل الكروموتوغرام (مخطط الحقنة)

من الكروموتوغرام في تقنية الكروموتوغرافيا نحصل على نوعين من التحليل

- **تحليل نوعي qualitative analysis**

من المعلومات التي نحصل عليها من الكروموتوغرام يمكننا التعرف على المادة المحللة من خلال حقن نموذج قياسي (standard solution) للمادة المراد تحليلها ومن ثم نحقن النموذج المجهول فاذا ظهرت قمة في الحالتين لها نفس زمن الاحتجاز tR هذا يدل على ان المادة موجودة في النموذج المجهول وللتاكد نغير الظروف من سرعة الطور المتحرك او درجة الحرارة فاذا ظهرت نفس النتيجة يتاكد لدينا ان المادة المراد تحليلها موجودة في النموذج المجهول بنسبة تاكد 99%

- **تحليل كمي quantitative analysis**

بعد التاكد من وجود المادة المراد تحليلها في النموذج المجهول نستطيع ان نقدر كميتها من خلال حساب ارتفاع القمة او مساحة القمة ومقارنتها مع منحني المعايرة ومن ثم استخراج التركيز بصورة كمية حيث

$$A = \frac{1}{2}\, hw$$

- A مساحة القمة (Area)
- h ارتفاع القمة (height)
- W عرض القمة (width)

يحسب مساحة القمة من خلال طريقة حساب مساحة المثلث او بالطريقة التكاملية

استخدامات الكروموتوغرافيا :

تستخدم للتقديرات النوعية والكمية للمركبات الكيمياوية

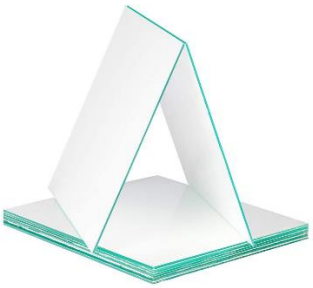
تستخدم في تنقية المركبات الموجودة ضمن مزيج بطريقة الفصل

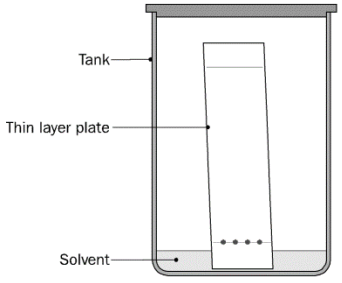
تستخدم في دراسة سرعة التفاعلات الكيميائية

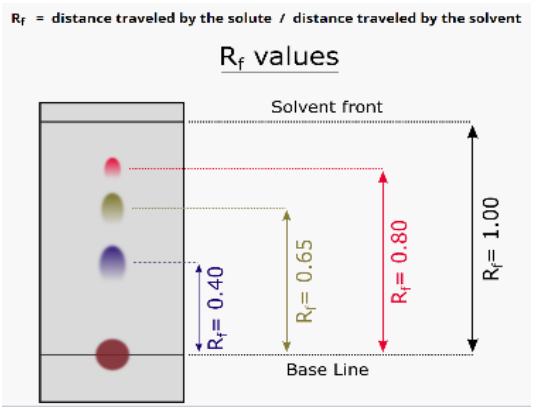
تستخدم في تقدير المركبات الموجودة بكميات ضئيلة (trace amount)

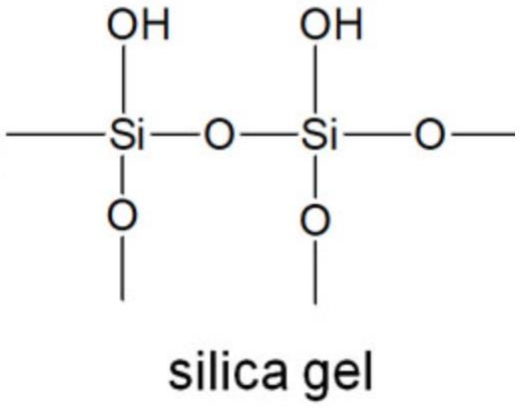
- **كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography**

هي احدى انواع الكروموتوغرافيا تتم عملية الفصل من خلال طبقة رقيقة من الطور الثابت المطلية على لوح مصنوع من الالمنيوم اوالزجاج او البلاستيك والية الفصل تستند الى الامتزاز او التبادل الايوني والشائع هو الامتزاز . وفي الغالب يكون الطور الثابت عبارة عن السليكا جيل









تتم عملية التحليل باستخدام شريط TLC (صفيحة المنيوم او زجاج كما وضحنا اعلاه) بوضع الشريط في حوض يحتوي على مذيب او مزيج من المذيبات بنسب معينة كطور متحرك ويتم وضع النموذج على شكل نقاط باستخدام انبوب شعري بمستوى اعلى بقليل من مستوى سطح الطور المتحرك ويترك الحوض بعد تغطيته لفترة زمنية تمتد من دقائق الى ساعة اوساعتين حسب سرعة حركة الطور المتحرك وتتم مراقبة حركة الطور المتحرك الى حين وصوله الى قرب نهاية اللوح العلوية عندها يتم رفع الشريط من الحوض ويترك قليلا ليجف ومن ثم نقوم باظهار البقع التي تمثل مكونات المزيج باستخدام كواشف كيميائية او ضوئية مثل الاشعة فوق البنفسجية عند اطوال موجية مناسبة . ان الدالة النوعية في هذا النوع من الكروموتوغرافيا هو عامل الاعاقة Rf ويعبر عنه بقسمة المسافة التي قطعتها المادة (المكون المحلل) على المسافة التي قطعها الطور المتحرك (المذيب)

$$Rf = \frac{\text{المسافة التي يقطعها النموذج}}{\text{المسافة التي يقطعها الطور المتحرك}}$$

علما ان قيم Rf لاتتجاوز الواحد الصحيح وقيمته تعتمد على معامل التوزيع(K_D) للمادة بين الطورين ومواصفات الطور المتحرك .

ان تقنية ال TLC لها مميزات منها

- تعطي جودة فصل مشابهه للطرق الاخرى .
- تعتبر طريقة بسيطة وسريعة ولاتحتاج كمياة كبيرة من النموذج.
- استخدامات واسعة منها استخدامها في مجال التحضير والحصول على مواد بنقاوة عالية في حالة زيادة حجم المنظومة .
- طريقة بسيطة ولاتحتاج الى تقنيات واجهزة معقدة .
-

- **كروموتوغرافيا الورق paper chromatography**

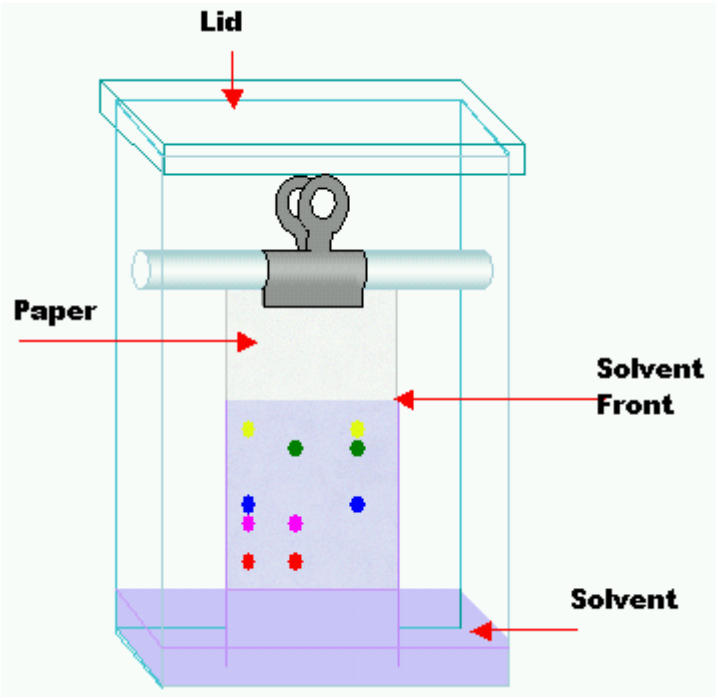
في هذا النوع من الكروماتوغرافيا يتم الفصل للمركبات باستخدام طورين هما:

الطور المتحرك ويكون سائل

والطور الثابت ويكون في الغالب سائل أيضاً محمول على الألياف السليلوزية للورقة

نقسم هذه الطريقة إلى قسمين حسب اتجاه سريان المذيب على الورقة إلى:

- أ- الطريقة التصاعدية Ascending حيث يتجة سريان المذيب من أسفل إلى اعلي
- ب- الطريقة التنازلية Descending حيث يتجة سريان المذيب من أعلى إلى أسفل الورقة
- تفصل مكونات المخاليط على أساس اختلاف معامل التوزيع.
- يكون الوسط المتحرك إما مذيب واحد أو خليط من المذيبات.
- تستعمل أشرطة ورق كروماتوجرافيا.



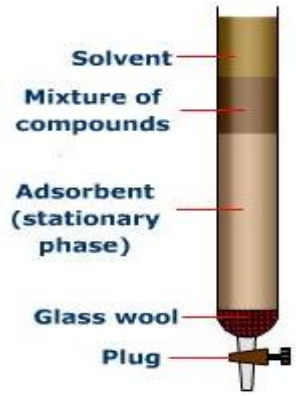
يتحرك الوسط الثابت خلال الوسط المتحرك بإحدى الطرق التالية:

- الخاصية الشعرية.
- من مركز الدائرة إلى محيطها.
- الجاذبية الأرضية.
- يسمى الشكل الناتج بعد ترك الورقة لتجف كروماتوجرام.
- تسمى المسافة التي يقطعها المكون **(Rf)** .معامل الإعاقة
-

كروموتوغرافيا العمود column chromatography :

العمود الكروماتوغرافي يتراوح طول العمود الكروماتوغرافي والذي غالبا ما يكون من الزجاج في الطرق الكروماتوغرافية التقليدية ما بين (10–30 cm) بقطر (1 cm) أو أكثر. نجد انه لابد من السريان المتجانس خلال العمود. المسافة التي ينتشر من خلالها المذاب في الطور المتحرك في مستوى الجسيمات. يسير الطور المتحرك من العمود بفعل الجاذبية أو بفعل ضغط منخفض ويعتمد معدل سريانه على حجم حبيبات الطور الساكن وعلى قطر العمود ولزوجة الطور المتحرك وقطبيته على وضع الصمام الموجود في نهاية العمود وفي أغلب الحالات يفضل أن يكون هذا المعدل في حدود (1مل /دقيقة) ويوضع في نهاية العمود كمية من الصوف الزجاجي أو القطن الطبي لمنع خروج الطور الساكن من العمود .وهناك نوعين من الأعمدة:

1. **أعمدة محشوة** Packed Column **:**وهي عبارة عن أنابيب معدنية من الفولاذ غير القابل للصدأ أو النيكل أو الألمنيوم أو الزجاج أو التيفلون وتنتج من قبل شركات معروفة.
2. **أعمدة فارغة** Empty Column **:**وهي عبارة عن أعمدة من الزجاج أو الفولاذ تعبأ عادة في المخبر قبيل الاستخدام.



عمود كروموتوغرافي

الطور الساكن (الصلب -الثابت)

هو عبارة عن مادة قطبية ذات خواص امتزازية جيدة وتعتبر الألومينيا وهلام السيليكاجيل من أكثر المواد استخداماً على الرغم من أن هناك العديد من المواد التي يمكن استخدامها كطور ساكن مثل الفحم - كربونات الكالسيوم - النشاء ومسحوق السليلوز.

الطور المتحرك

ان مهمة الطور المتحرك لا تنحصر في نقل المكونات عبر العمود فقط بل إن له تأثير على معامل التوزع وذلك يعتمد على قوة إذابته بالإضافة إلى ذوبان المكونات في الطور المتحرك فإن هناك تنافس بين تلك المكونات وجزيئات الطور المتحرك على الامتزاز على سطح الطور الساكن. ويشترط في المذيب لكي يستخدم كطور متحرك:

- أن لا يخرج المكونات من العمود بسرعة لأن ذلك يؤدي إلى عدم فصلها.
- ألا تكون سرعة التمليص بطيئة لأن ذلك يؤدي إلى الحصول على أزمان استبقاء طويلة.