

الفصل العاشر

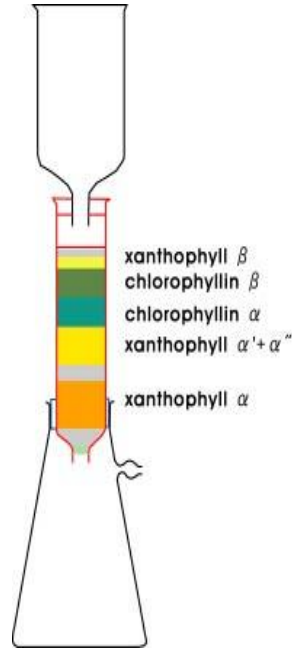
مقدمة في التحليل الكروماتوجرافي

تعتبر طرق الفصل الكيميائي من الطرق التحليلية الهامة ، والتي تستخدم للحصول على المواد المختلفة بصورة نقية ، دون وجود الشوائب العالقة بها ، وفي كثير من الأحيان تعتبر عملية الفصل جوهريّة عند الحاجة إلى عمل اختبارات أخرى على المادة النقية مثل الاختبارات الطيفية (IR, NMR, and mass spectrometry). كما أن الحصول على المادة النقية يجعل من السهل إجراء التحاليل الكمية عليها لمعرفة تركيزها. أي أن طرق الفصل الكيميائي مهمة للغاية سواء في التحليل الوصفي أو الكمي ، على حد سواء. وفي الواقع توجد عدة طرق يمكن إدراجها ضمن طرق الفصل الكيميائي ، مثل عمليات الترسيب المعروفة ، والترسيب الكهربائي ، وعمليات الاستخلاص بشتى أنواعها ، وال electrophoresis بأشكالها المختلفة ، وغير ذلك من الطرق. لكن ما نرغب في الحديث عنه يتعلق بنوع آخر من طرق الفصل ، ألا وهو الفصل الكروماتوجرافي.

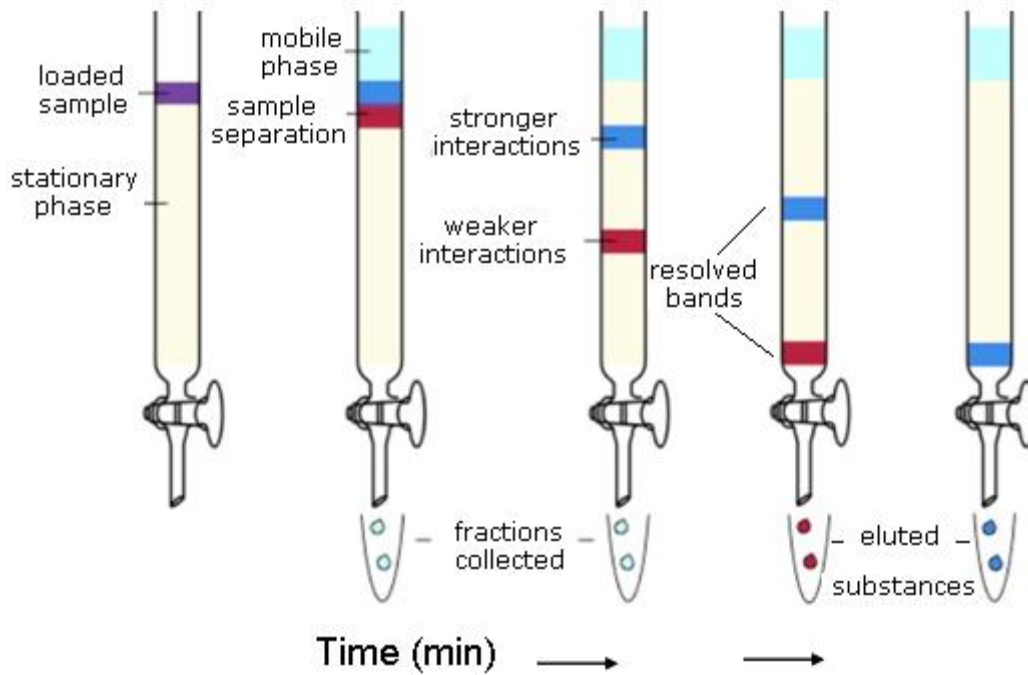
نشأة طرق الفصل الكروماتوجرافي

يرجع تاريخ تقنية الفصل الكيميائي إلى بدايات القرن العشرين ، حيث كان عالم النبات الروسي ميخائيل تسفت يحاول تنقية العصارة النباتية الخضراء المستخرجة من أوراق الأشجار ، وذلك باستخدام عمود زجاجي معبأ بحبيبات دقيقة من كربونات الكالسيوم (الوسط الثابت) ، حيث لاحظ بعد فترة من تنقيط المحلول (الوسط المتحرك) داخل العمود وجود مناطق محددة ومنفصلة بعضها عن بعض ، تختلف في اللون (أي أنها عبارة عن مواد مختلفة تم فصلها من مكونات العصارة الخضراء).

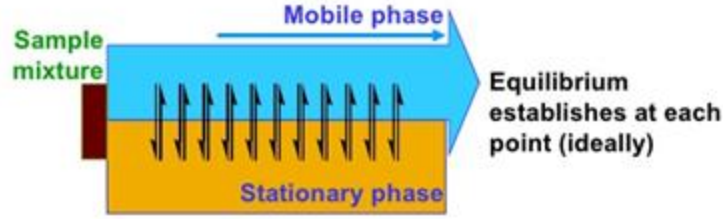
وقد أطلق Tswett على هذه التقنية الجديدة من تقنيات الفصل اسم كروماتوجرافي ، وذلك من اللاتينية chroma وتعني لون ، و graphein وتعني يكتب ، أو بمعنى آخر تقنية كتابة اللون (لأنه تمكن من تفكيك وفصل مكونات العصارة الخضراء إلى المكونات الملونة المكونة لها) ، وقد أصبح اسم التقنية كروماتوجرافي (chromatography) بغض النظر عما إذا كانت المواد المفصولة ملونة أم لا.



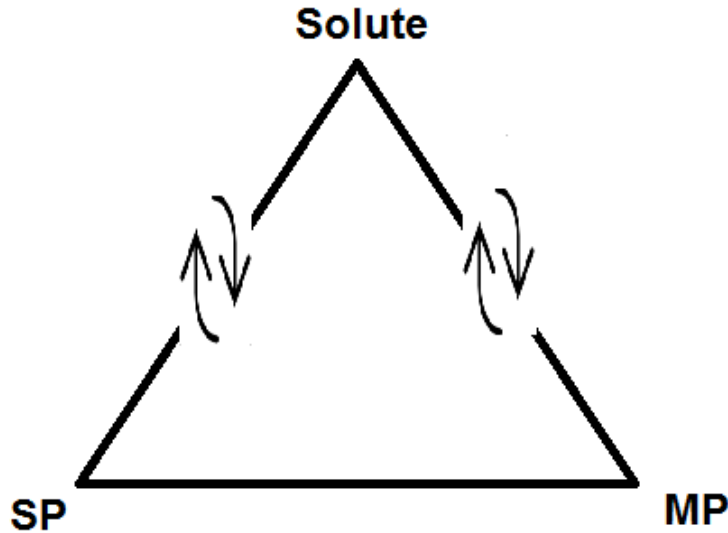
ومن الممكن تتبع عملية الفصل مع الوقت ، وذلك بالنظر إلى الشكل التالي :



إن نظرية عملية الفصل باستخدام الكروماتوجرافي يمكن ان تكون بسيطة ، وتتطلب وجود وسط ثابت (أو ما يسمى (stationary phase (SP) ، ووسط متحرك (أو ما يسمى (mobile phase (MP) ، ولكل منهما خصائصه التي تستخدم في عملية الفصل ، مثل القطبية ، أو القدرة على الإدمصاص (adsorption characteristics) ، أو قدرته على التبادل الأيوني (ion exchange characteristics) ، وما إلى ذلك من خصائص.



كما أن جوهر عملية الفصل تتعلق بمدى تشابه خصائص المادة المراد فصلها مع خصائص الوسط الثابت والمتحرك. ويمكن النظر إلى عملية الفصل على أنها تتكون من الزوايا الثلاثة لمثلث ، حيث يشكل الوسط الثابت أحد الزوايا ، بينما يشكل الوسط المتحرك الزاوية الثانية ، أما المادة المراد فصلها فتقع في الزاوية الثالثة ، كما في الشكل:



ويمكن تلخيص نظرية الفصل على أساس الشكل أعلاه ، وذلك بالقول أن المواد المراد فصلها تتفاوت (مثلاً) في قطبيتها ، بحيث أن بعضها قطبي وبعضها غير قطبي ، بينما البعض الآخر متوسط القطبية ، وأن خصائص الوسط الثابت يجب أن تكون مغايرة لخصائص الوسط المتحرك (أي إذا كان الوسط الثابت غير قطبي ، فالوسط المتحرك سيكون قطبياً بالضرورة). فإذا كان ال SP غير قطبي ، فهذا يعني أن قدرة المواد غير القطبية على الذوبان فيه والبقاء ملتصقة به تكون عالية ، وبالتالي تميل هذه المواد إلى البقاء فترة طويلة جداً في الوسط الثابت (أي longer retention time) ، وفترة قصيرة للغاية في الوسط المتحرك. أما المواد القطبية فعلى العكس تماماً ، حيث لا تميل تلك المواد إلى البقاء في الوسط الثابت (غير القطبي) وذلك لتتأثر خصائصهما ، حيث لا يمتزجان ، بينما تفضل تلك المواد القطبية البقاء

فترة أطول في الوسط المتحرك (أي lower retention time). أما المواد متوسطة القطبية فتتصرف بين الحالتين المذكورتين ، وتبقى في العمود فترة متوسطة. وبديهي إذاً أن تختلف المواد في قطبيتها إذا أردنا أن نستخدم هذه الخاصية كأساس لعملية الفصل.

ومن الممكن تفسير عمليات الفصل باستخدام خصائص أخرى كالادمصاص أو التبادل الأيوني ، باستخدام مفاهيم مناسبة ، كلها قائم على أساس مدى توافق خصائص المواد المختلفة المراد فصلها مع الوسطين الثابت والمتحرك ، ويجب أن نتذكر أنه كلما توافقت تلك الخصائص مع الوسط المتحرك (MP) أكثر ، كلما كان الزمن الذي تقضيه تلك المواد في العمود أقصر ، أي كلما غادرت العمود بسرعة ، والعكس صحيح.

إن تطور عمليات الفصل الكروماتوجرافي باستخدام وسط متحرك سائل ، تأخرت لعقود طويلة ، وذلك نظراً لأسباب سنأتي على ذكرها ومناقشتها فيما بعد. أما كروماتوجرافيا الغاز فقد تطورت بسرعة كبيرة بعد أن تم اقتراحها عام 1948-1952 ، حيث قامت عدة شركات بتصميم وتسويق أول جهاز يستخدم هذه التقنية عام 1955 ، في حين أن أجهزة كروماتوجرافيا السائل لم تظهر بشكل عملي إلا بعد ذلك بحوالي 15 عاماً ، بالرغم من أن التقنية معروفة منذ 1903 ، كما بينا سابقاً!!.

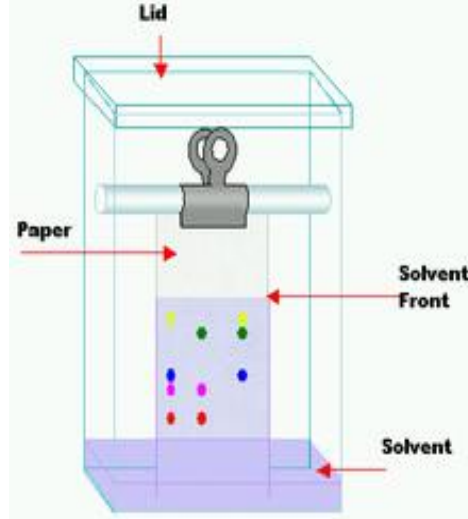
ومن المعروف اليوم أن هناك تقنيات متعددة تتفرع من تلك التقنيات الأساسية ، إلا أنه يمكن القول بأن تلك التقنيات وتسمياتها تقوم على استخدام الوسط المتحرك كأساس للتسمية ، وذلك كما يلي:

1. كروماتوجرافيا السائل (وفيها يكون الوسط المتحرك سائلاً)
2. كروماتوجرافيا الغاز (وفيها يكون الوسط المتحرك غازياً)
3. كروماتوجرافيا السوائل الحرجة (وفيها يكون الوسط المتحرك سائلاً تحت الظروف الحرجة من الضغط ودرجة الحرارة)

كما يظهر في الجدول التالي عدة تقنيات مشتقة من تلك التقنيات الأساسية ، ويظهر في التسمية الوسط المتحرك أولاً ، ويليه الوسط الثابت :

Classification	Technique	SP	Mechanism
Liquid Chromatography (LC) MP: Liquid	Liquid-liquid or partition chromatography	Liquid, adsorbed on a solid support Now rare	Partition between immiscible SP and MP
	Liquid bonded phase (bonded phase chromatography, BPC)	Liquid, chemically bonded to solid support	Partition between immiscible bonded SP and MP
	Liquid-solid chromatography (LSC), or adsorption chromatography	solid	adsorption
	Ion-exchange chromatography (IEC)	Ion-exchange resin	Ion-exchange
	Size exclusion chromatography (SEC)	Porous polymeric material	Size sieving
Gas Chromatography (GC) MP: Gas	Gas-liquid chromatography (GLC)	Liquid adsorbed on a solid support	partitioning
	Gas-bonded phase	Liquid, chemically bonded to solid support (or crosslinked)	partitioning
	Gas-solid chromatography (GSC)	solid	adsorption
Supercritical fluid chromatography (SCF) MP: SCF	Supercritical fluid chromatography (SCF)	Liquid, chemically bonded to solid support	partitioning

ومن الجدير بالذكر أن هناك تصنيفات أخرى ، مثل كروماتوجرافيا العمود (column chromatography) ، إذا كانت عملية الفصل تتم داخل عمود يحتوي على الوسط الثابت ، أو الكروماتوجرافيا المسطحة التي يكون فيها الوسط الثابت مثبتاً على سطح مستو من الورق أو الزجاج أو الألمنيوم أو غيره.



ومن أشهر أنواع الكروماتوجرافيا المسطحة ذلك المعروف بإسم كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة ((thin layer chromatography (TLC)) ، وفيه يتم تثبيت الوسط الثابت (حبيبات السيليكا أو الألومينا) على ألواح من الزجاج أو الألمنيوم.

الفصل باستخدام الكروماتوجرافي

تكون مكونات العينة المراد فصلها ذائبة بداية في الوسط المتحرك ، الذي يمر من خلال المسامات والأسطح الصلبة للوسط الثابت (كما هو الحال في ال liquid-solid and gas-solid chromatography) ، أو بالتلامس مع الوسط الثابت المرتبط بالحبيبات الصلبة (solid support) ، وفي أثناء ذلك - وحسب طبيعة ال solutes - يحدث نوع من التفاعل الفيزيائي (interaction) ، حيث من الممكن أن يكون التفاعل الفيزيائي بين ال solutes والوسط الثابت ، يتم عبر واحدة أو أكثر من الآليات التالية:

1. الادمصاص (adsorption): ويحدث بشكل أساسي في حالتي ال LSC و ال GSC.

2. التبادل الأيوني (ion exchange): ويحدث في ال IEC.

3. التجزئة (partitioning): وتحدث في الكروماتوجرافيا التي يكون الوسط الثابت فيها سائلاً (مرتبطاً بالحبيبات الصلبة).

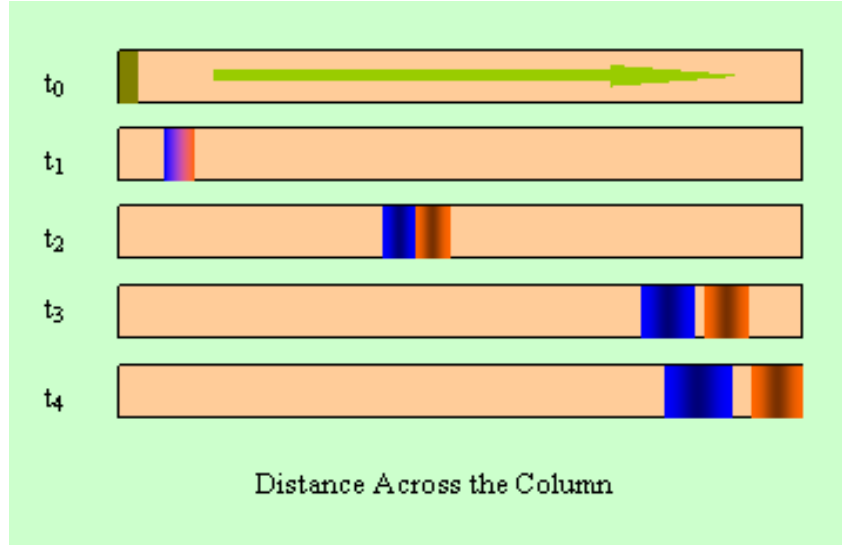
وتعتبر كروماتوجرافيا التبادل الأيوني مهمة في حالة الرغبة في فصل الأيونات المختلفة ، أما عمليات الفصل القائمة على أساس الادمصاص أو التجزئة فتستخدم في فصل المكونات الجزيئية المختلفة ، مع العلم ان معظم عمليات الفصل الكروماتوجرافي تقوم على استخدام التجزئة كأهم آلية من آليات التفريق بين الجزيئات المختلفة وفصلها ، ولهذا السبب ستكون تلك الآلية محور دراستنا التفصيلية ، وسنقوم باشتقاق المعادلات والعلاقات التي تحكم عملية الفصل القائمة على أساسها.

ومن الواضح ان الجزيئات التي تتشابه خصائصها مع خصائص الوسط الثابت ستميل بالضرورة إلى قضاء وقت أطول فيه (أي سيتأخر خروجها من العمود) ، وبالتالي فإن الوقت الذي ستقضيه في الوسط المتحرك سيكون أقل بكثير. ومن المهم أن نفهم أن الجزيئات التي تقضي كل وقتها (مثلاً) في الوسط المتحرك (أي أن خصائصها لا تتشابه مطلقاً مع خصائص الوسط الثابت) تخرج من العمود بزمن مساوٍ للزمن اللازم لمرور الوسط المتحرك فيه. وهذه النتيجة تقترح أن السبب الرئيسي لعملية الفصل إنما هو الهجرة التفاضلية للمكونات المختلفة خلال العمود (differential migration) ، وذلك حسب الوقت الذي يقضيه كل منها في الوسط المتحرك. ويسمى الزمن الذي تقضيه مادة معينة داخل العمود ، من لحظة حقنها حتى خروجها بزمن المكوث (retention time).

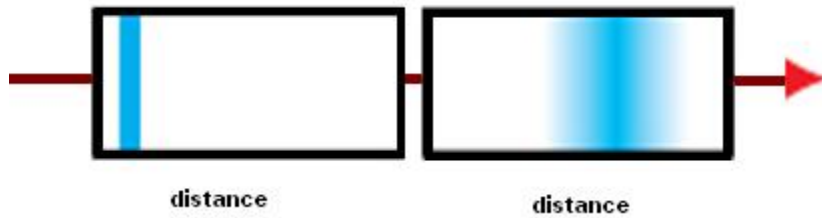
ومن الجدير بالذكر أن الجزيئات التي تقضي كل وقتها في الوسط المتحرك ، تتطلب وقتاً قصيراً جداً للخروج من العمود ، لا يعتمد على الجزيئات نفسها ، وإنما يتوقف على سرعة الوسط المتحرك (flow rate) وأيضاً على طول العمود ، وحجم الجزيئات ، ومساميتها. ويُطلق على هذا الزمن مصطلح الزمن غير المحسوب أو الضائع (void time) أو الزمن الميت (dead time).

لذلك يمكن القول أنه عند حقن عينة تحتوي على مواد مختلفة في عمود الفصل ، فإن تلك المواد تتقدم داخل العمود بسرعات مختلفة (للسبب التي ذكرناها أعلاه) ، أي تحدث هناك

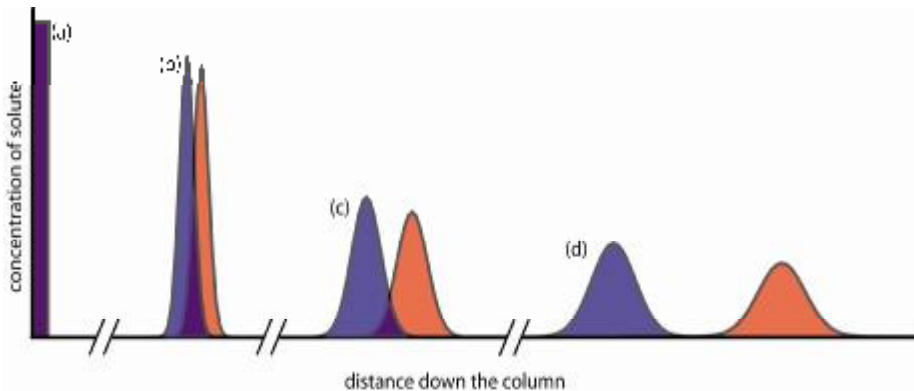
هجرة تفاضلية نتيجة اختلاف ذوبانية المكونات المختلفة في الوسط الثابت ، حيث تتباعد المسافات بين المكونات المختلفة كلما سارت الجزيئات أبعد في العمود:



كما أنه من الملاحظ (لأسباب سنبينها لاحقاً) أن منطقة كل مكون من المكونات تتسع مع الوقت أثناء انتقالها من بداية العمود إلى آخره ، مما يتسبب في تخفيفه (ويؤدي ذلك إلى اتساع ال حزمة جزيئات المادة ، أو ما يسمى band broadening).

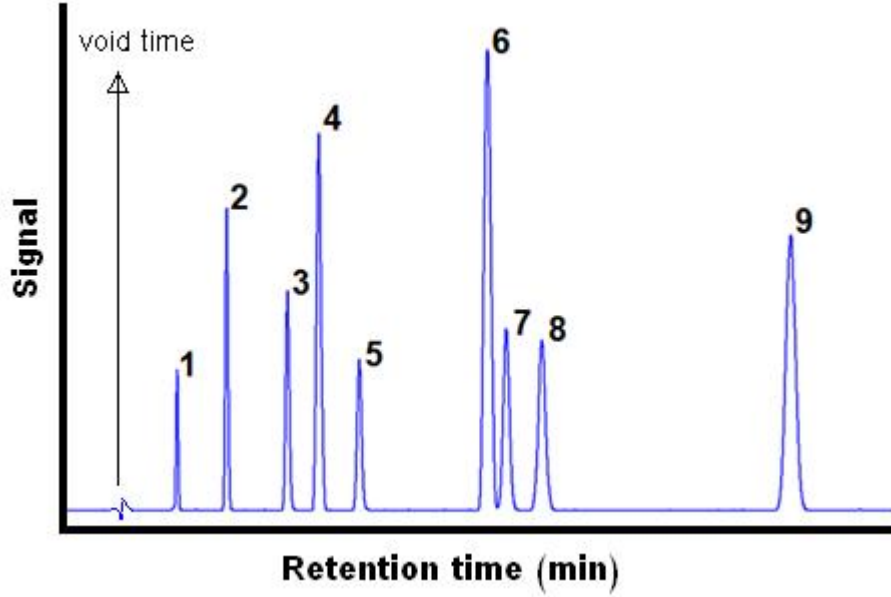


وهذا بدوره يؤدي إلى انتشار المكونات في مناطق واسعة من العمود ، وبالتالي يتسبب في تقليل عدد المكونات التي يمكن فصلها باستخدام ذلك العمود في كل عملية من عمليات الفصل.



الكروماتوجرام (The chromatogram)

عندما يتم رسم العلاقة بين زمن المكوث للمواد المختلفة التي تم فصلها في العمود ، مع الإشارة أو الاستجابة التي نحصل عليها من المكشاف ، فإن النتيجة هي شكل ، يسمى كروماتوجرام:



علمًا بأن الإشارة التي نحصل عليها تتوقف على نوع المكشاف ، ومن الممكن أن تكون إشارة امتصاص ، أو فلورة ، أو معامل انكسار ، أو تيار ، أو غيره من الخصائص التي يقيسها المكشاف. وفي كثير من الأحيان تظهر إشارة على خط الأساس (baseline) توضح قيمة الزمن غير المحسوب (void time) ، وهو الزمن الذي تقضيه أي مادة لا تمكث مطلقاً في الوسط الثابت (أي تقضي 100% من وقتها في الوسط المتحرك).

ومن الجدير بالذكر أن زمن مكوث كل مادة (retention time) في العمود يعتبر مؤشراً على ماهية المادة ، أي أنه يستخدم كدليل تتم الاستفادة منه في التحليل الوصفي (qualitative analysis) ، بغرض التعرف على المواد المختلفة ، أما شدة الإشارة (ارتفاع منحنى الإشارة ، أو مساحته) التي نحصل عليها فتستخدم في التحليل الكمي (quantitative analysis) ، حيث تتناسب الشدة مع التركيز. أي أن الكروماتوجرافي يمكن استخدامها

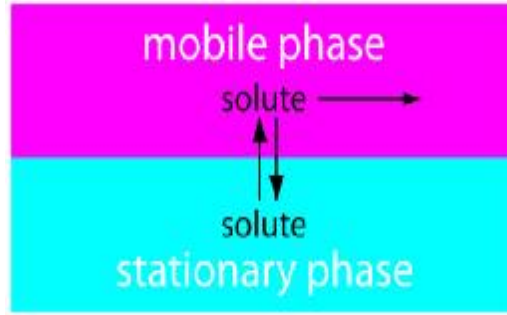
لأغراض التحليل الوصفي والكمي ، على حد سواء ، وإن كانت هناك بعض التفاصيل التي سنأتي على ذكرها لاحقاً.

ثابت التجزئة (Distribution constant)

عندما تتواجد مادة ما في وسط غير متجانس يتكون من محلولين لا يمتزجان (محلول مائي ومحلول كاره للماء (عضوي)) ، فإنه عند خلط المحلولين بشدة ، لفترة من الزمن ، تكفي لحدوث الاتزان ، فإن المادة المذكورة تتجزأ في الوسطين ، بمعنى أن جزءاً من تلك المادة سيتواجد في الوسط المائي ، بينما الجزء الآخر سيتواجد في الوسط العضوي. وتعتمد تراكيزات المادة في الوسطين على ثابت التجزئة (أو التوزيع) ، K ، حيث:

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

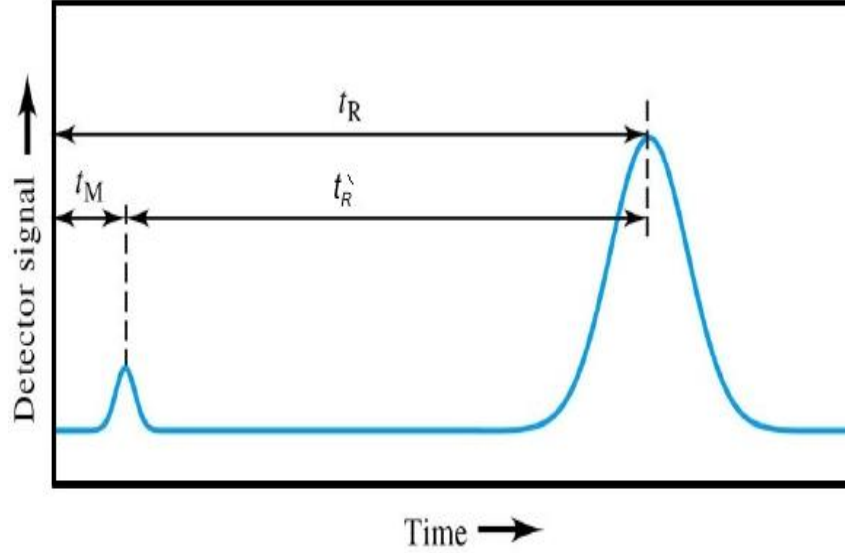
حيث C_S يعبر عن تركيز المادة في الوسط العضوي ، بينما C_M يعبر عن تركيز المادة في الوسط المائي. أو من الممكن في حديثنا عن الكروماتوجرافي القول بأن C_S يعبر عن تركيز المادة في الوسط الثابت ، بينما C_M يعبر عن تركيز المادة في الوسط المتحرك.



ومن البديهي أن ثابت التجزئة يتوقف على درجة الحرارة ، حيث انه ثابت إتزان ، وإن كنا لا نحصل حقيقة على اتزان فعلي في الكروماتوجرافي. أيضاً لا شك بأن المواد تتفاوت بشكل واسع في قيمة ثابت التجزئة لكل منها ، وهو ما يبرر عملية الفصل الكروماتوجرافي ، إضافة إلى أن قيمة هذا الثابت تتوقف بشكل كبير على طبيعة الوسط العضوي والمائي ، مما يجعل تعديل الوسط المائي (المتحرك) من أهم العوامل التي يمكن استخدامها لتحسين عملية الفصل (أي تغيير قيمة K).

العلاقة بين زمن المكوث وثابت التجزئة وعامل المكوث

في هذه الفقرة أحاول تبسيط اشتقاق معادلة توضح علاقة زمن مكوث المادة في العمود بثابت التجزئة الخاص بها ، ضمن الظروف المستخدمة. ولعمل ذلك دعونا ننظر إلى الكروماتوجرام التالي:



حيث t_R هو زمن المكوث ، t_R^x هو زمن المكوث المضبوط (أي زمن المكوث مطروحاً منه الزمن الضائع أو الميت ، ويطلق عليه (adjusted or corrected retention time) ، بينما t_M هو الزمن الضائع (أي الزمن الذي تقضيه مادة لا يحدث لها أي تداخل مع الوسط الثابت في العمود). ومن الممكن الآن تحديد معاني بعض التعريفات الهامة:

متوسط السرعة الخطية لجزيئات المادة داخل العمود ، \bar{V} :

$$\bar{V} = \frac{L}{t_R}$$

حيث L هو طول العمود. ومن المهم أن نلاحظ أننا عبرنا عن سرعة الجزيئات بالمتوسط ، إذ أن الجزيئات من نفس المادة تتفاوت سرعاتها داخل العمود بفعل عوامل مختلفة ، من أهمها هنا الانتشار ، وقرب تلك الجزيئات من مركز العمود ، أو قربها من سطحه ، أو اتباعها مسارات متعددة ومختلفة بحسب طريقة تعبئة العمود.

سرعة جزيئات الوسط المتحرك ، u :

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

حيث t_M هنا تعبر عن متوسط الزمن الذي يقضيه جزيء الوسط المتحرك كي يمر في العمود.

لكن ، من أجل أن يقطع جزيء المادة العمود ، يجب أن يتم حمله عبر الوسط المتحرك. فإن كان الجزيء يقضي كل وقته في الوسط المتحرك ، فسيسير داخل العمود بسرعة قدرها u ، وإن كان لا يقضي أي جزء من وقته في الوسط المتحرك ، فلن يخرج من العمود مطلقاً. أي أنه من الممكن القول أن متوسط سرعة الجزيئات داخل العمود ما هي إلا جزء من سرعة جزيئات الوسط المتحرك ، أو:

$$\bar{V} = u * \text{fraction of time solute spends in mobile phase}$$

كما أن هذا الجزء من الوقت الذي تقضيه الجزيئات في الوسط المتحرك ما هو إلا النسبة بين عدد المولات من تلك الجزيئات في الوسط المتحرك إلى عدد المولات الكلي ، أو:

$$\begin{aligned} & \text{fraction of time solute spends in mobile phase} \\ &= \frac{\text{moles of solute in mobile phase}}{\text{total moles of solute}} \end{aligned}$$

وعليه تصبح المعادلة:

$$\bar{V} = u * \frac{\text{moles of solute in mobile phase}}{\text{total moles of solute}}$$

وبالتعويض عن عدد المولات بالتركيز مضروباً في الحجم (باللتر) ، نحصل على المعادلة التالية:

$$\bar{V} = u * \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S}$$

والآن بقسمة البسط والمقام على $C_M V_M$ ، نحصل على النتيجة التالية:

$$\bar{V} = u * \frac{1}{1 + \left(\frac{C_S V_S}{C_M V_M}\right)}$$

أو أن:

$$\bar{V} = u * \frac{1}{1 + \left(K \frac{V_S}{V_M}\right)}$$

ومن الممكن أن نقوم بتعريف متغير جديد ، يطلق عليه مصطلح عامل المكوث (retention factor) أو عامل السعة (capacity factor) ، k' ، على أنه:

$$k' = \frac{C_S V_S}{C_M V_M}$$

وعليه تصبح معادلتنا كما يلي:

$$\bar{V} = u * \frac{1}{1 + k'}$$

والآن ، بالتعويض عن u ، و \bar{V} نحصل على المعادلة التالية:

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} * \frac{1}{1 + k'}$$

وبذلك نحصل على المعادلة النهائية التي تحكم العلاقة بين زمن المكوث وثابت التوزيع (معبراً عنه بمعامل المكوث):

$$t_R = t_M (1 + k')$$

وهي معادلة جوهرية ، وحجر أساس لاشتقاق العديد من المعادلات التي تحكم عمليات الفصل الكروماتوجرافي. ومن الممكن صياغة هذه المعادلة بشكل آخر ، لتصبح:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

أو ، يمكن القول أن:

$$k' = \frac{t_R'}{t_M}$$

لأننا رأينا سابقاً أن زمن المكوث المضبوط ما هو إلا زمن المكوث مطروحاً منه الزمن الضائع أو الميت:

$$t_R' = t_R - t_M$$

وسنرى لاحقاً أن قيمة k' يجب أن تكون ما بين 2-10 ، حيث أن القيم أقل من 2 تعني زمن مكوث قليل للغاية بالقرب من t_M ، أما قيم أكثر من 10 فيعني ذلك زمن مكوث طويل للغاية ، وسنحاول تبرير وتوضيح ذلك مستقبلاً ، عند حديثنا عن كفاءة الفصل وقدرة التمييز بين المواد المختلفة.

معامل الانتقائية (selectivity factor)

يمكن تعريف مصطلح معامل الانتقائية (α) بين مادتين موجودتين في العمود ، على أنه النسبة بين عامل المكوث للمادة المحبة للوسط الثابت (B ، زمن مكوث أطول) إلى عامل مكوث المادة المحبة أكثر للوسط المتحرك (A):

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

أو أنه يمكن القول أن:

$$\alpha = \frac{t_{R,B} - t_M}{t_{R,A} - t_M}$$

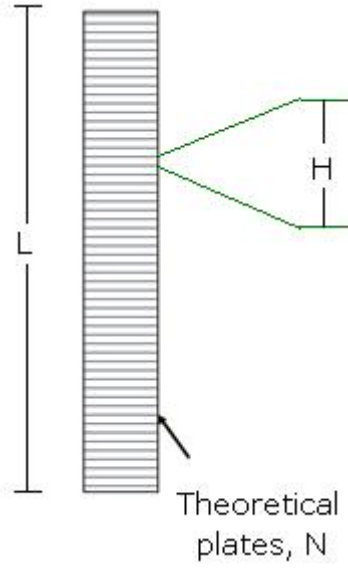
وحيث أن زمن مكوث المادة B أكبر من زمن مكوث المادة A ، فإن هذا يعني بالضرورة أن قيمة α يجب أن تكون أكبر من 1 ، للحصول على عملية فصل ، أما إذا كانت ($\alpha = 1$) فإن هذا يعني أنه لا يمكن إجراء عملية الفصل ضمن الظروف والقيود التي نعمل عندها.

نظرية الفصل الكروماتوجرافي

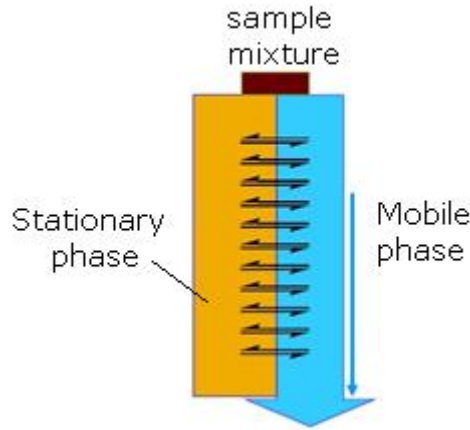
هناك نظريتان مشهورتان تبيينان كيف تتم عملية الفصل:

أولاً: نظرية الطبقات (plate theory)

تفترض هذه النظرية تقسيم عمود الفصل إلى طبقات أو أجزاء ، متساوية في الارتفاع ، إرتفاع كل منها H ، وفي كل طبقة من تلك الطبقات تحدث عملية تجزئة للمادة.



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



ويمكن القول أن كفاءة الفصل (N) تعتمد على عدد الطبقات في العمود ، وأنه يمكن الحصول على تلك الكفاءة (أو ذلك العدد) من العلاقة:

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

حيث N هي عدد الطبقات النظرية (وهو عدد نظري لأن العمود في الواقع ليس مقسماً إلى طبقات حقيقية) ، L هو طول العمود ، بينما H يعبر عن ارتفاع الطبقة النظرية (ويسمى الارتفاع المكافئ للطبقة النظرية ، أو *height equivalent to a theoretical plate (HETP)*).

إن تطبيق تلك النظرية ينجح نجاحاً باهراً في تفسير عملية الفصل ، إلا أنه بالضرورة يشير إلى أن شكل الإشارة التي سنحصل عليها يجب أن تكون متماثلة (*symmetric, Gaussian*) ، وهو ما لا نلاحظه في الواقع ، ولا ينطبق على جميع عمليات الفصل ، خاصة وأن هذه النظرية تقترض حدوث إيزان كامل في كل طبقة من طبقات العمود ، وهو أمر غير صحيح إطلاقاً. أيضاً ، لم تتمكن هذه النظرية من تفسير لماذا نحصل على إشارات عريضة أو مذيلة ، أو رفيعة ، أي أنها لم تفسر اتساع الإشارة عموماً. إلا أن هذه النظرية فسرت لماذا نحصل على عملية فصل أصلاً ، وقدمت صورة مبسطة لتلك العملية.

ومن الممكن الوصول إلى الاستنتاج أننا سنحصل على إشارة متماثلة (*symmetric peak*) لكل مادة يتم فصلها في العمود ، باستخدام نظرية الطبقات ، بالتناظر مع نظرية الاستخلاص باستخدام جهاز *Craig countercurrent apparatus*.

عندما يتم رج مذيب مائي ، يحتوي على المادة المراد فصلها ، مع مذيب عضوي كاره للماء (أي لا يمتزج معه) ، فإن المادة المراد فصلها تتجزأ بين المذيبين ، بحيث يتبقى في الوسط المائي جزءاً مساوياً ل q ، بينما يصبح في الوسط العضوي جزءاً مقداره p ، حيث يمكن القول أن:

$$p + q = 1$$

$$p = \frac{C_s}{C_s + C_M}$$

$$q = \frac{C_M}{C_S + C_M}$$

وحيث أن C_S هو تركيز المادة المراد فصلها في الوسط العضوي ، و C_M هو تركيز المادة المراد فصلها في الوسط المائي ، وحيث أن ثابت التجزئة (K) هو :

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

فإنه يمكن القول أن ثابت التجزئة أيضاً يساوي :

$$K = \frac{p}{q}$$

وبالتالي يمكن أن نتبع مآل المادة التي يتم حقنها في الطبقة الأولى من العمود (أي أن الجزء الموجود من المادة عند حقنها في الوسط الثابت في الطبقة الأولى = 1 ، أي كل المادة) ، بينما يتم انتقال جزء منها إلى الوسط المتحرك (p) عندما يمر الوسط المتحرك عبر تلك الطبقة ، وبذلك تنتقل تلك الكمية إلى الطبقة الثانية ، ويبقى من المادة جزءاً يساوي q في الوسط الثابت من الطبقة الأولى. وعند مرور وسط متحرك جديد على الطبقة الأولى فإن جزءاً من ال q الموجود بها (p من ال q ، أو pq) ينتقل إلى الوسط المتحرك ، بينما يتبقى في الطبقة الأولى q من ال q (أي q^2) ، وعند ذلك يحدث انتقال للطبقة التي تليها ، وهكذا. أما الجزء الذي كان موجوداً في الوسط المتحرك في الطبقة الثانية ، فإن جزءاً منه ينتقل إلى الوسط الثابت في الطبقة الثانية (q من p ، أو pq) ، بينما يبقى في الوسط المتحرك p من p ، أو p^2 ، والتي تنتقل إلى الطبقة الثالثة ، وتستمر العملية بهذا الشكل ، حتى يتم خروج المادة من العمود.

ومن الممكن فهم هذه النظرية بطريقة أفضل بتتبع الجداول التالية ، التي يمثل كل واحد منها عمليتا الانتقال والانتزان اللتان تحدثان للمادة في الوسطين المتحرك والثابت ، حيث ينقل الوسط المتحرك الجزء الذي يحمله إلى الطبقة التالية ، وبعدها يتجزأ ذلك مع الوسط الثابت الذي لا يحتوي أي جزء من المادة ، بينما يتجزأ الجزء الموجود في الطبقة الأولى بحيث يحمل الوسط المتحرك الجديد (النقي) جزءاً منها ، وهكذا. وفي الجدول الأول نلاحظ أنه بعد

المرور الأول للوسط المتحرك في الطبقة الأولى وبعد حدوث الاتزان في هذه الطبقة ، ينتقل الجزء p إلى الطبقة الثانية ، ويصبح جزء من المادة هو q موجوداً في الوسط الثابت من الطبقة الأولى، أي أن كل عملية تتطلب ثلاثة مراحل:

1. مرحلة إضافة وسط متحرك نقي إلى الطبقة الأولى
2. مرحلة اتزان المادة المراد فصلها ، بين الوسط المتحرك في جميع الطبقات مع الوسط الثابت ، وذلك بعد كل إضافة للوسط المتحرك الجديد
3. مرحلة انتقال الوسط المتحرك إلى الطبقة التالية ، ومن ثم حدوث الاتزان ، وتكرار العملية من جديد

رقم الطبقة	0	1	2	3
قبل الإيزان	0			
	1			
بعد الإيزان	P			
	q			

حيث نلاحظ أنه عند انتقال الوسط المتحرك إلى الطبقة الأولى (وقبل الاتزان في كلتا الطبقتين) ، أن:

$$(p + q)^1 = (p + q)$$

بعد المرور الأول للوسط المتحرك في الطبقة الأولى ، ينتقل الجزء p مع الجزء المتحرك إلى الطبقة الثانية ، بينما يبقى جزء مقداره q في الجزء الثابت من الطبقة الأولى ، وبلي ذلك الاتزان الذي يحصل لل q في الوسط الثابت من الطبقة الأولى مع الوسط المتحرك النقي الجديد ، وكذلك اتزان الجزء p في الوسط المتحرك من الطبقة الثانية مع الوسط الثابت فيها ، لنحصل على الجدول:

رقم الطبقة	0	1	2	3
قبل الإمتزان	0	p		
	q			
بعد الإمتزان	pq	p ²		
	q ²	pq		

وبعد الانتقال الثاني ، نحصل على الجدول التالي:

رقم الطبقة	0	1	2	3
قبل الإمتزان	0	pq	p ²	
	q ²	pq		
بعد الإمتزان	pq ²	2p ² q	p ³	
	q ³	2pq ²	p ² q	

حيث نلاحظ أنه بعد الانتقال (وقبل الاتزان في الطبقات المختلفة) نحصل على:

$$q^2 + 2pq + p^2 = (p + q)^2$$

وبعد الانتقال الثالث ، نحصل على الجدول التالي ، حيث نلاحظ أنه عند الانتقال (وقبل

الاتزان في الطبقات المختلفة) ، نحصل على:

$$q^3 + 3pq^2 + 3p^2q + p^3 = (p + q)^3$$

رقم الطبقة	0	1	2	3
قبل الإلتزان	0	pq^2	$2p^2q$	p^3
	q^3	$2pq^2$	p^2q	
بعد الإلتقال	q^3	$3pq^2$	$3p^2q$	p^3

وبعد الانتقال رقم n ، نحصل على الجدول التالي ، حيث نلاحظ أنه عند الإلتزان:

$$(p + q)^n$$

أي أنه من الممكن إيجاد المعادلة الرياضية التي بموجبها يمكن حساب الجزء من المادة الموجود في الوسط الثابت في أي طبقة (r) بعد عدد مقداره n من انتقالات الوسط المتحرك ، باعتبار أن ثابت التجزئة هو:

$$K = \frac{p}{q}$$

لنحصل على المعادلة الممثلة لذلك ، وهي على الصورة:

$$f_{n,r} = \frac{n!}{r!(n-r)!} p^r q^{n-r}$$

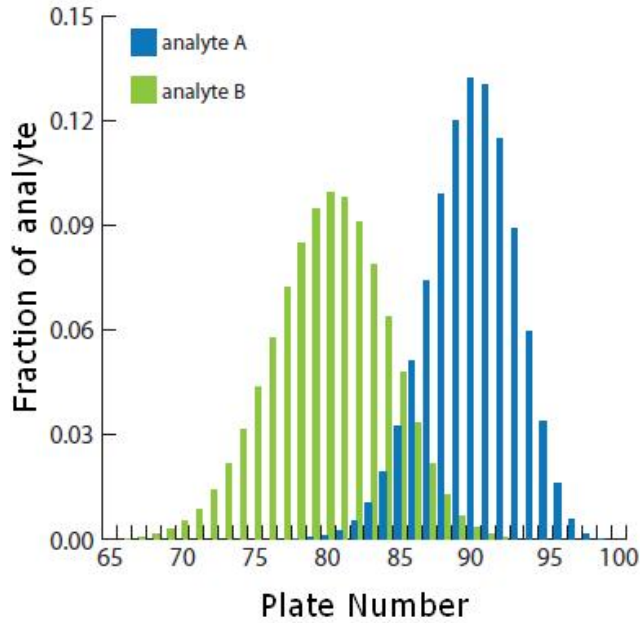
وكذلك ، من الممكن التعبير عن نفس المعادلة باستخدام ثابت التجزئة ، وذلك في العلاقة:

$$f_{n,r} = \frac{n!}{r!(n-r)!} * \frac{K^r}{(K+1)^n}$$

حيث أن:

$$p = \frac{K}{K+1} \text{ and } q = \frac{1}{K+1}$$

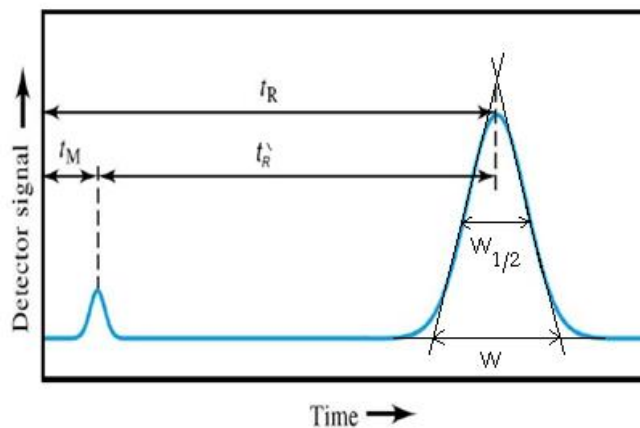
ومن الواضح في مثل هذه الحالات أنه كلما كان الفرق بين ثابت الاتزان لمادتين أكبر ، كلما كانت عملية الفصل أكفأ وأسهل ، كما أن نظرية الطبقات قدمت - وبشكل ممتاز - لما يمكن تسميته الرابط بين عمليات الفصل باستخدام الاستخلاص المتكرر ، والكروماتوجرافيا الحديثة.



وبتطبيق تلك الاستنتاجات ، نجد أن منحنى الإشارة المتوقع يجب ان يكون متماثلاً ، كما في الشكل ، إلا أن ذلك بعيد عن الحقيقة ، للأسف ، وهو ما يضعف هذه النظرية.

حساب كفاءة العمود لفصل مادة معينة

لننظر إلى الكروماتوجرام التالي ، والذي يبين فصل مادة ما ، ونرغب في حساب كفاءة فصلها بواسطة العمود المستخدم:



حيث W تعبر عن اتساع الإشارة عند خط الأساس ، بينما $W_{1/2}$ تعبر عن اتساع الإشارة عند نصف إرتفاعها ، كما هو موضح بالشكل .

والآن ، يمكن القول أن اتساع الإشارة (أي الانحراف المعياري) يتناسب مع الجذر التربيعي لعدد الطبقات:

$$\sigma \propto \frac{1}{\sqrt{N}}$$

أيضاً ، نعلم أن الاتساع يتناسب طردياً مع زمن مكوث المادة في العمود ، أي:

$$\sigma \propto t_R$$

وبذلك يمكن القول أن:

$$\sigma \propto t_R * \frac{1}{\sqrt{N}}$$

ويبدو أن معامل التناسب في أغلب الأحيان يساوي 1 ، لذلك بتربيع الطرفين نحصل على:

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma^2} = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2$$

لكن ، من المعروف إحصائياً ، أن 95.5% من جزيئات المادة تكون موجودة في $\pm 2\sigma$ ، أو ما يعني أربعة أمثال الانحراف المعياري. أي أن اتساع الإشارة عند خط الأساس تساوي أربعة أمثال الانحراف المعياري ، عندما يكون 95.5% من جزيئات المادة ضمن الإشارة ، أي أن:

$$W = 4\sigma \text{ or } \sigma = \frac{W}{4}$$

وبالتعويض عن σ في المعادلة أعلاه:

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

ومن الممكن استخدام $W_{1/2}$ لإجراء نفس عملية الحساب ، آخذين بعين الاعتبار أن:

$$W_{\frac{1}{2}} = 2.354 \sigma$$

وهذا يجعل المعادلة أعلاه:

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{\frac{1}{2}}} \right)^2$$

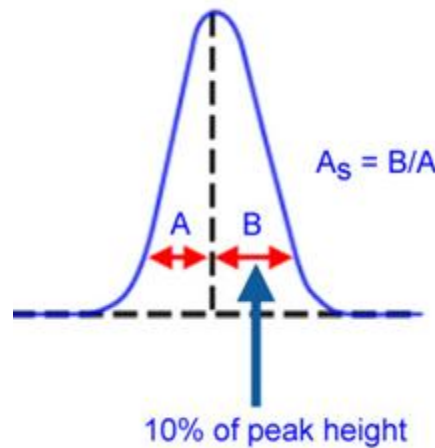
ويمكن استخدام أي من المعادلتين أعلاه لحساب قيمة N (الكفاءة) ، إلا أن استخدام المعادلة الأخيرة (التي تستخدم $W_{\frac{1}{2}}$) يعتبر الأكثر شيوعاً ، وربما الأكثر دقة ، نظراً لأنه ليس من الممكن - في كثير من الأحيان - حساب قيمة W بدقة ، بسبب عدم تماثل الإشارة أو التداخل ، أو العجز عن تحديد خط الأساس.

شكل منحنى الإشارة (ال $peak$) في الكروماتوجرافي

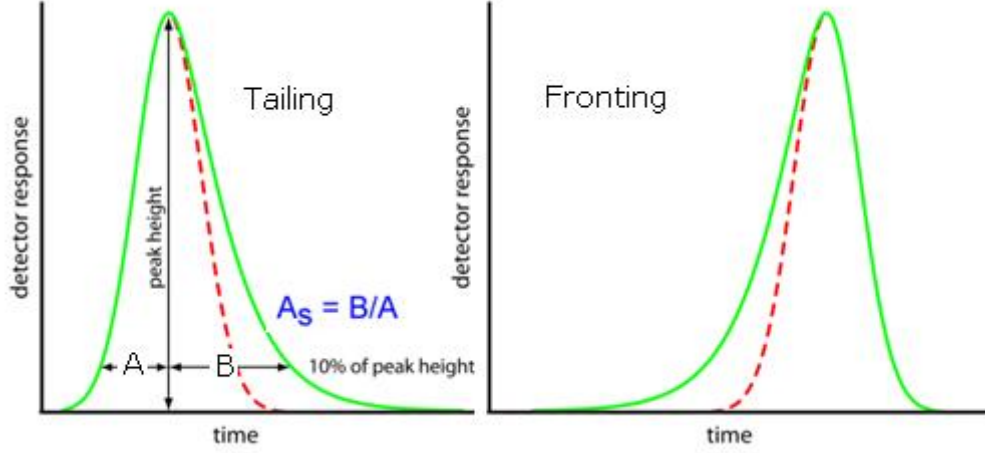
رأينا سابقاً أن نظرية الطبقات بينت أن منحنى الإشارة يجب ان يكون متماثلاً ، إلا أن الحقيقة أنه في كثير من الأحوال لا نحصل على منحنى متماثل. ومن الممكن التدايل على مستوى التماثل باستخدام معامل يسمى معامل عدم التماثل ($asymmetry\ factor, A_s$) ، حيث يمكن القول أن:

$$A_s = \frac{B}{A}$$

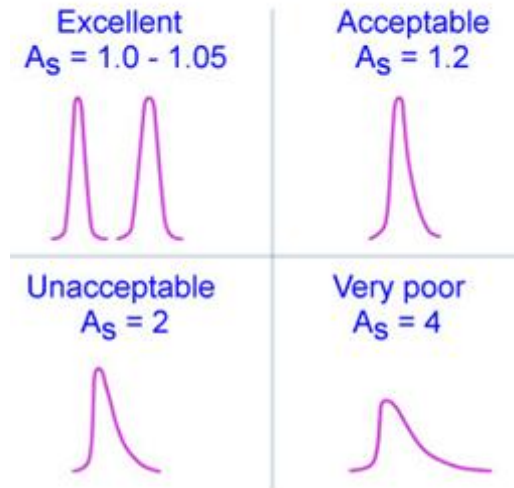
حيث يمكن تعريف B و A من الشكل التالي:



حيث يتم تحديد قيمة كل من A و B عند 10% من ارتفاع الإشارة عن خط الأساس (*baseline*). فإذا كانت مسافة B أكبر من A فإن منحنى الإشارة يوصف على أن به ذيل (*tailing*) ، وإن كان العكس فإن منحنى الإشارة يوصف على أن به *fronting*.



لكن يجب الانتباه إلى أن جميع المعادلات المستخدمة في الكروماتوجرافي تفترض أن منحنى الإشارة الخاص بكل مادة متماثل ، وهو كما أوضحنا غير صحيح على إطلاقه. وكلما ابتعد منحنى الإشارة عن التماثل (أي ، كلما ابتعدت قيمة معامل اللاتماثل عن 1) كلما ازدادت فرصة عدم اتباع عملية الفصل للمعادلات المختلفة في الكروماتوجرافي ، مما يعقد عملية الوصول إلى نتائج مرضية. ومن الممكن الاستدلال على مدى قبول واتباع منحنى الإشارة لأي مادة للمعادلات والعلاقات التي تحكم عمليات الفصل الكروماتوجرافي ، بالنظر إلى الشكل التالي ، والقيم المصاحبة له:



وبالمناسبة ، فإن تلك القيم ليست من المسلمات ، ولكنها اقتراحات منطقية يمكن استخدامها ، ولا بد للشخص المسئول محاولة إيجاد سبب ذلك التصرف ، وعمل ما يلزم لضبطه والتغلب عليه ، وتحسين شكل منحنى الإشارة ليصبح أقرب ما يكون إلى التماثل ، وهو أمر ممكن.

ثانياً: النظرية الحركية (Kinetic or rate theory)

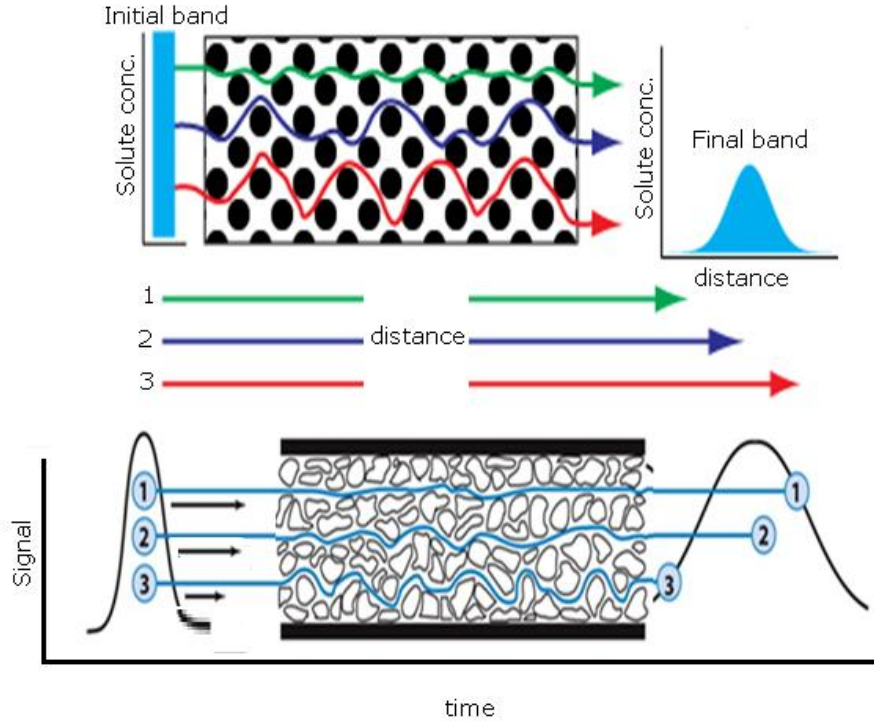
في هذه النظرية ، تم أخذ العديد من العوامل التي تؤثر على سرعة حركة وانتشار جزيئات المادة المراد فصلها (*solute molecules*) ليس فقط بناء على قطبية الوسطين الثابت والمتحرك ، وإنما العديد من العوامل الأخرى ، بما في ذلك نقاوة سطح الوسط الثابت ، وطرق التعبئة وطبيعة الحبيبات المستخدمة ، وحجمها ، وكفاءة الانتقال خلال مساماتها ، وغيره. وفي النهاية ، تستطيع هذه النظرية تفسير انتشار ال *solutes* بدرجات متفاوتة ، وأيضاً سبب حصولنا على منحنيات إشارة غير متماثلة.

العوامل التي تؤثر على اتساع منحنى الإشارة (Band broadening)

يتوقف انتشار المادة المستهدفة في العمود على عدة عوامل ، منها:

i. تأثيرات المسارات المتعددة (*multiple path effects*)

حتى في وجود عمود معبأ بحبيبات (المفروض أن لها نفس الحجم والشكل) ، فإن المسارات التي تتخذها بعض جزيئات المادة تكون متعددة ، أي ليست بنفس المسافة ، وبالتالي فإن زمن المكوث لكل جزيء سيختلف ولو قليلاً عن الجزيئات الأخرى ، وبالتالي حدوث انتشار لتلك الجزيئات ، أو اتساع منحنى الإشارة. ويسمى هذا النوع من أسباب الاتساع *eddy diffusion* ، ويعتمد بشكل أساسي على شكل وحجم الحبيبات الحاملة للوسط الثابت وكفاءة وانتظام تعبئة العمود. والشكل التالي يوضح ذلك:



ومن الممكن التعبير عن مشاركة هذا العامل في اتساع منحنى الإشارة (أو عملياً بزيادة ارتفاع الطبقة النظرية ، بحسب النظرية السابقة) بالمعادلة التالية:

$$H_e = J d_p$$

حيث أن H_e هو ارتفاع الطبقة الناشئ عن المسارات المتعددة ، J ثابت ، بينما d_p هو قطر الحبيبات.

ومن الواضح في هذه المعادلة أن الانتشار يقل كلما قل حجم حبيبات العمود ، إضافة إلى الثابت الذي يمثل تأثيرات العوامل الأخرى المؤثرة على اتخاذ الجزيئات مسارات مختلفة ، والتي تم ذكرها أعلاه.

.ii الانتشار الجزيئي الناتج عن اختلاف التركيز (molecular diffusion)

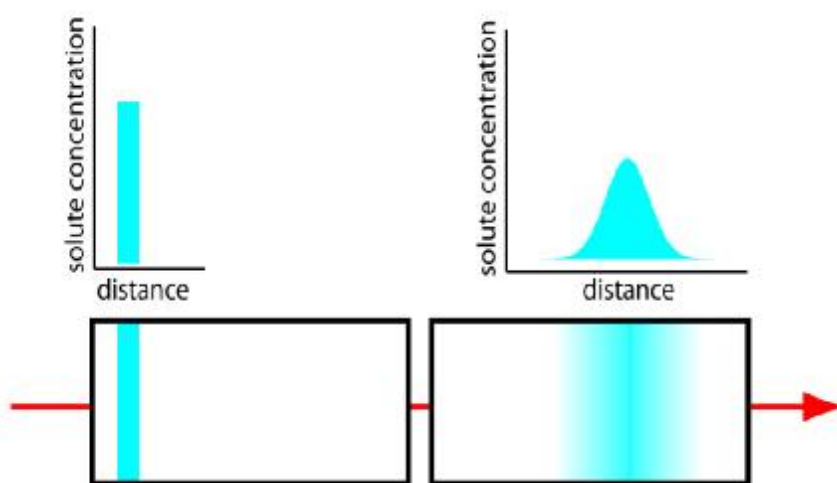
ويسمى هذا النوع أيضاً الانتشار الطولي (longitudinal diffusion) ، ومنشأه بسيط للغاية ، ويتمثل في انتشار الجزيئات الموجودة في المنطقة المركزة إلى المناطق الأقل تركيزاً حولها. وبديهي أن مقدار الانتشار يتوقف على معامل انتشار جزيئات المادة في الوسط ، بحيث يزيد الانتشار واتساع منحنى الإشارة بزيادة معامل

الانتشار. وحيث ان معامل الانتشار للغازات - بشكل عام - أكبر بكثير من السوائل ، فمن البديهي أن تأثير هذا العامل في كروماتوجرافيا الغاز سيكون جوهرياً ، بينما أقل من ذلك بكثير في كروماتوجرافيا السائل. كذلك فإن الانتشار بهذه الطريقة يتوقف بالتأكيد على سرعة الوسط المتحرك ، ويمكن كتابة المعادلة التالية للتدليل على هذا التأثير:

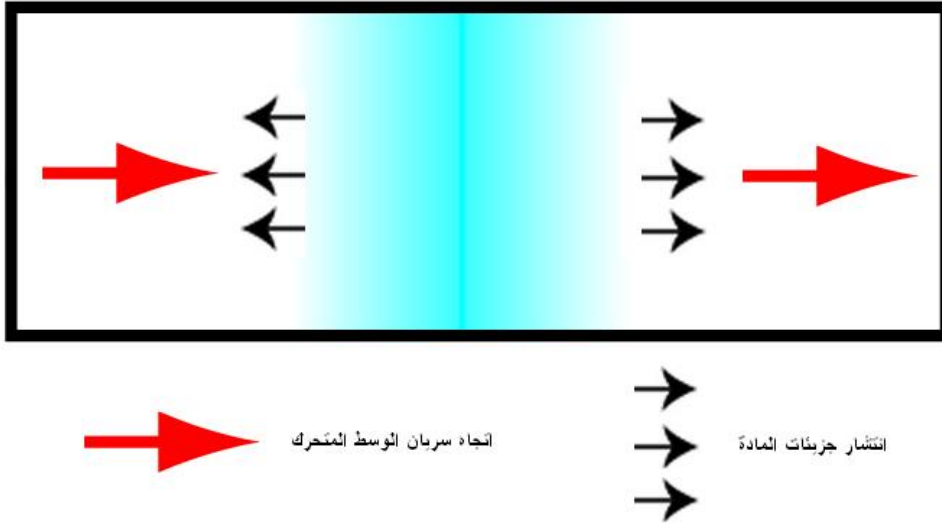
$$H_l = \frac{\rho D_M}{u}$$

حيث H_l هو ارتفاع الطبقة الناشئ عن الانتشار الطولي ، ρ ثابت ، D_M هو معامل انتشار جزيئات المادة في الوسط المتحرك ، بينما u تعبر عن سرعة سريان الوسط المتحرك.

ومن الواضح هنا أن سرعة الانتشار الطولي تتناسب عكسياً مع سرعة سريان الوسط المتحرك ، ويمكن تبين ذلك من الشكل:



ومن المهم أن نفهم أن الانتشار الطولي يقل كلما زادت سرعة سريان الوسط المتحرك ، ذلك لأن تلك السرعة تقلل الانتشار المعاكس لها ، وفي نفس الوقت فإن سرعة الوسط المتحرك أكبر من سرعة الانتشار في نفس الاتجاه ، مما يجعل تأثير هذا النوع من الانتشار قليلاً جداً ، عند استخدام سرعات عالية للوسط المتحرك ، وهو ما نفعله بالضبط في كروماتوجرافيا الغاز.



.iii مقاومة حركة وانتقال جزيئات المادة (mass transfer kinetics)

من الممكن ملاحظة مقاومة حركة الجزيئات ، ومنعها من الانتقال في زمن قصير جداً ، وذلك في الوسطين الثابت والمتحرك - بحسب وجود الجزيئات - على حد سواء. ويتعلق ذلك بعدد من العوامل ، التي تتضمن عدم إمكانية حدوث اتزان كامل للجزيئات بين الوسطين الثابت والمتحرك ، والذي يعتمد بدوره على سرعة سريان الوسط المتحرك ، وقدرة جزيئات المادة على الانتشار في الوسطين ، واعتماد ذلك على سمك كل وسط في المنطقة المعنية ، ويمكن توضيح العوامل المختلفة المؤثرة على المقاومة في الوسطين ، وذلك كما يلي:

(a) المقاومة التي تعانيها الجزيئات في الوسط المتحرك (mobile phase mass transfer)

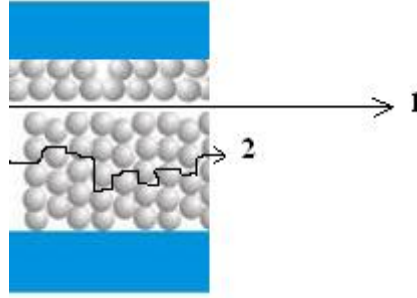
في هذه الحالة ، يمكن القول أن هناك عوامل متعددة تؤثر على مقاومة حركة الجزيئات في الوسط المتحرك ، منها:

1. مكان وجود الجزيء المعني ، فمثلاً الجزيئات الموجودة في مركز العمود تتحرك بسرعة أكبر من تلك المتواجدة بالقرب من جدار العمود ، وذلك من أساسيات ميكانيكا الموائع:

hydrodynamic flow profile

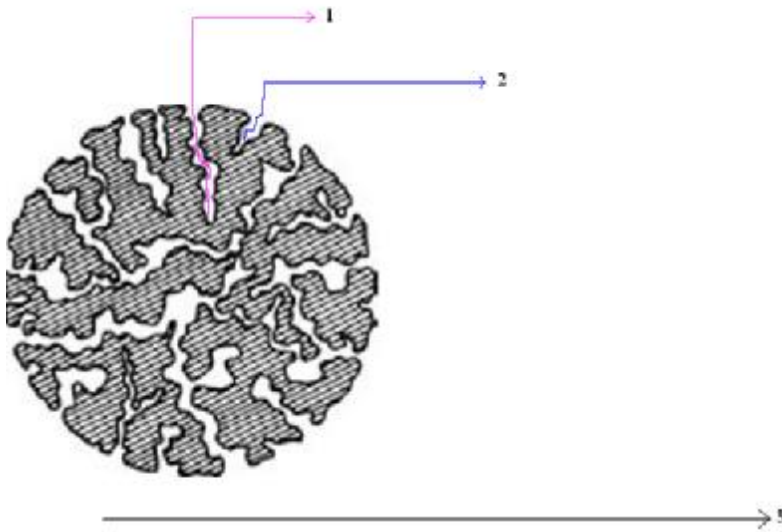
2. وجود عيوب في تعبئة العمود (Channels)

وفي هذه الحالة ، تكون حركة الجزيئات التي صادفت المرور عبر تلك القنوات - بالتأكيد - أسرع بكثير من تلك التي لم تصادفها.



3. ولوج بعض الجزيئات في مسامات ومسارات مغلقة (*stagnant mobile phase*)

إن تواجد الجزيئات في الوسط المتحرك لا يعني مطلقاً أنها تتحرك بنفس السرعة ، كما تقدم آنفاً ، ومن ضمن الأسباب التي تؤدي إلى اختلاف سرعاتها أو حركتها وجود بعض المسامات والمسارات المغلقة في الحبيبات المكونة للعمود ، حيث أن الجزيئات التي تلج خلال تلك المسامات لا تتحرك بالسرعة المطلوبة ، لانعدام حركة وسريان الوسط المتحرك فيها.



وعليه ستعتمد سرعة حركة الجزيئات في الوسط المتحرك (الراكب في المسارات والمسارات المغلقة) على معامل انتشار تلك الجزيئات في الوسط المتحرك ، الذي يتوقف بدوره على لزوجة الوسط المتحرك .
ومن الممكن جمع أهم العوامل التي تحكم مقاومة حركة الجزيئات في الوسط المتحرك بالعلاقة التالية:

$$H_m = \frac{\forall d_p^2 u}{D_M}$$

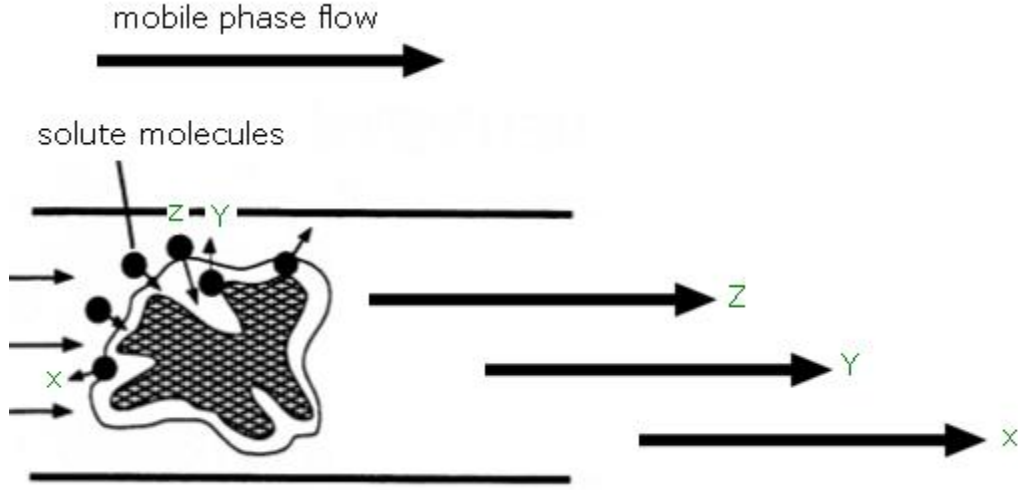
حيث H_m ارتفاع الطبقة النظرية الناشئ عن مقاومة حركة الجزيئات في الوسط المتحرك ، \forall ثابت ، d_p قطر الحبيبات ، u معدل سريان الوسط المتحرك ، و D_M معامل انتشار المادة في الوسط المتحرك. ويتضح من العلاقة أن ارتفاع الطبقة النظرية يتناسب طردياً مع معدل سريان الوسط المتحرك ، إضافة إلى حجم الحبيبات المستخدمة في تعبئة العمود ، بينما يتناسب عكسياً مع معامل انتشار جزيئات المادة في الوسط المتحرك .

(b) المقاومة التي تعانيها الجزيئات في الوسط الثابت (*stationary phase mass transfer*)

يعتبر سمك الوسط الثابت من اهم العوامل التي تؤدي إلى زيادة ارتفاع الطبقة النظرية ، بالذات في وجود معدل سريان عال للوسط المتحرك ، وخاصة إذا قل معامل انتشار جزيئات المادة في الوسط الثابت. ويمكن الاستدلال على ذلك من العلاقة:

$$H_s = \frac{\emptyset d_s^2 u}{D_s}$$

حيث H_s ارتفاع الطبقة النظرية الناشئ عن مقاومة حركة الجزيئات في الوسط الثابت ، \emptyset ثابت ، d_s سمك الوسط الثابت ، u معدل سريان الوسط المتحرك ، و D_s معامل انتشار المادة في الوسط الثابت. ويتضح من العلاقة أن ارتفاع الطبقة النظرية يتناسب طردياً مع معدل سريان الوسط المتحرك ، إضافة إلى سمك الوسط الثابت ، بينما يتناسب عكسياً مع معامل انتشار جزيئات المادة في الوسط الثابت.



وقد قام السيد *van Deemter* ببناء معادلة شاملة لارتفاع الطبقة النظرية ، وذلك بجمع كافة العوامل المذكورة أعلاه ، فحصل على المعادلة التالية:

$$H = J d_p + \frac{\rho D_M}{u} + \frac{\forall d_p^2 u}{D_M} + \frac{\emptyset d_s^2 u}{D_s}$$

وبافتراض العلاقات التالية:

$$A = J d_p , B = \rho D_M , C_M = \frac{\forall d_p^2}{D_M} , \text{ and } C_s = \frac{\emptyset d_s^2}{D_s}$$

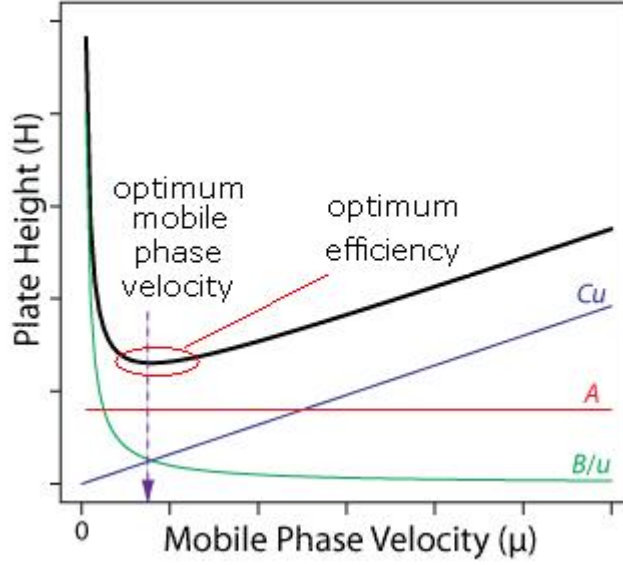
وباعتبار أن:

$$C = C_s + C_M$$

فإنه يمكن التعبير عن المعادلة بالشكل التالي:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

حيث تم التعبير عن مشاركة المسارات المتعددة بالثابت A (فيما يتعلق باتخاذ الجزيئات مسارات متعددة) ، أما العامل B فيعبر عن الانتشار الجزيئي ، بينما العامل C فيعبر عن مقاومة حركة الجزيئات في الوسطين الثابت والمتحرك. كما يمكن تمثيل المعادلة بالشكل التالي:



حيث يظهر من جمع العوامل المختلفة وجود قيمة دنيا لارتفاع الطبقة النظرية (أعلى كفاءة) ، وذلك عند معدل سريان معين للوسط المتحرك ، ويمكن الوصول إلى قيمة معدل السريان المثلى عن طريق مفاضلة معادلة *van Deemter* ، بإيجاد التغير في ارتفاع الطبقة النظرية بالنسبة إلى التغير في معدل سريان الوسط المتحرك:

$$\frac{dH}{du} = 0 - \frac{B}{u^2} + C$$

وحيث أن التفاضل عند أي قمة أو قاع يساوي صفرًا ، أي $\frac{dH}{du} = 0$ ، فإن:

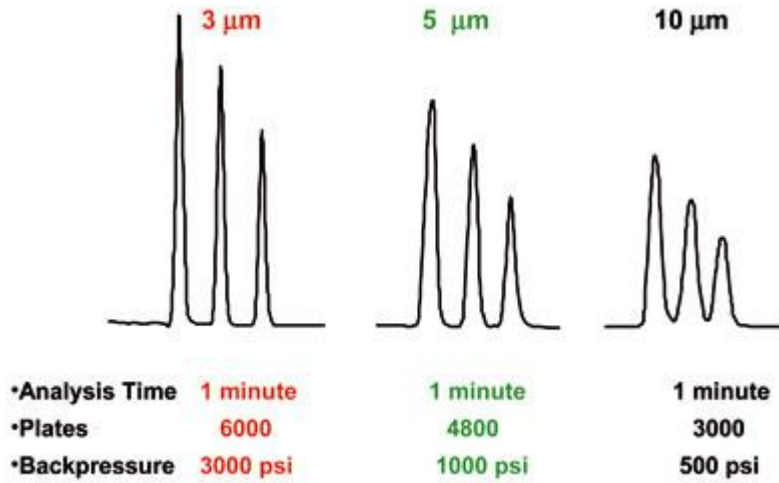
$$u_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

ومن المفترض أن يؤدي استخدام تلك السرعة إلى أفضل كفاءة ، حيث أن ارتفاع الطبقة النظرية أقل ما يمكن عندها. إلا أنه من الناحية العملية نجد أننا بحاجة إلى سرعة أكبر من تلك المحسوبة.

ومن الجدير بالذكر أيضاً أن العامل B هو الأهم في حالة كروماتوجرافيا الغاز ، وذلك نظراً لسرعة انتشار المواد الغازية ، بالذات عند درجات الحرارة المرتفعة. وعليه يجب العمل على تقليل قيمة B وذلك عن طريق:

1. استخدام معدل سريان مرتفع للوسط المتحرك (غاز)
2. استخدام وسط متحرك (غاز) ذو كثافة (أي لزوجة) عالية ، وذلك لتقليل ال D_M كما أن العامل C هو الأهم في حالة كروماتوجرافيا السائل ، وعليه يجب العمل على تقليله ، وذلك عن طريق:

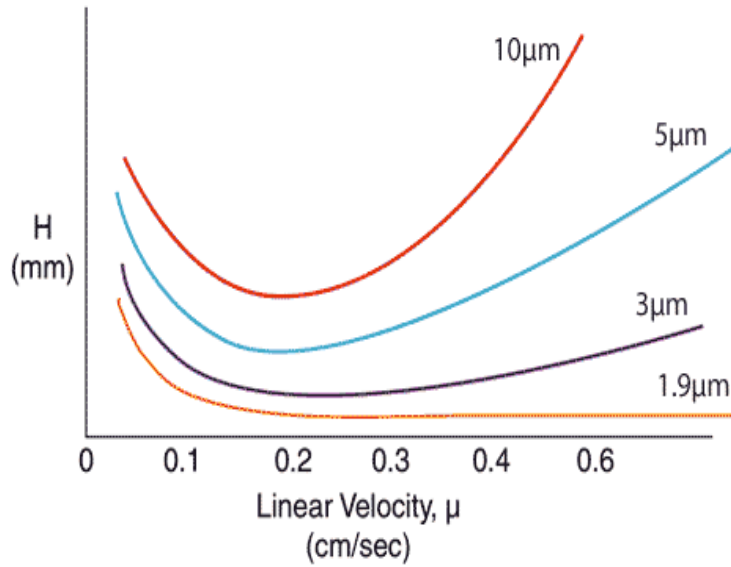
1. استخدام حبيبات ذات قطر أقل ، لتقليل d_p



2. استخدام وسط متحرك ذو لزوجة منخفضة ، وذلك لزيادة D_M
3. استخدام عمود يكون فيه سمك الوسط الثابت قليلاً ، لتقليل d_s
4. استخدام وسط ثابت يكون معامل انتشار الجزيئات فيه عالياً (أي زيادة D_s)
5. تقليل معدل سريان الوسط المتحرك ، لتقليل u

تأثير قطر الحبيبات على ارتفاع الطبقة النظرية

كما رأينا سابقاً أن العامل C_M يتناسب طردياً مع مربع قطر الحبيبات ، وبالتالي فإن ارتفاع الطبقة النظرية يزداد بشكل كبير بزيادة قطر الحبيبات. وقد لاقى تقليل حجم الحبيبات درجة كبيرة من الاهتمام ، عبر تاريخ كروماتوجرافيا السائل تحديداً ، بالرغم من وجود عوائق على رأسها زيادة الضغط العكسي عند تقليل حجم الحبيبات ، مما يدفعنا لاستخدام مضخات أقوى ، لم تتوفر بالشكل المعقول إلا في العقود الثلاثة الماضية. ويمكن النظر إلى الشكل التالي الذي يبين العلاقة بين ارتفاع الطبقة النظرية ومعدل سريان الوسط المتحرك:

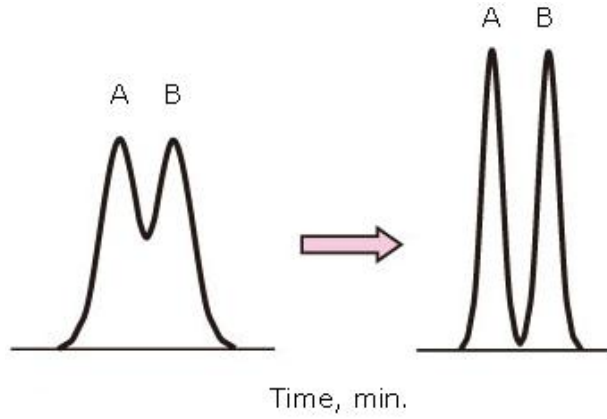


ونلاحظ من الشكل أنه كلما استخدمنا حبيبات ذات قطر أقل كلما قل تأثر ارتفاع الطبقة النظرية على التغير في سرعة سريان الوسط المتحرك. ولعله باستخدام حبيبات أقل من 1.9 mm فإن اعتماد H على سرعة الوسط المتحرك تقترب من الصفر ، أو بمعنى آخر فإنه يمكن إجراء عملية الفصل عند سرعات عالية ، دون أن ينعكس ذلك على كفاءة الفصل ، أي تقليل زمن الفصل دون آثار جانبية. لكن يجب الانتباه إلى أننا نضطر حينها إلى تقليل طول العمود ، وذلك لتقليل الزيادة الكبيرة في الضغط العكسي ، الذي قد لا تستطيع المضخة تحمله.

قدرة العمود على الفصل ($resolution, R$)

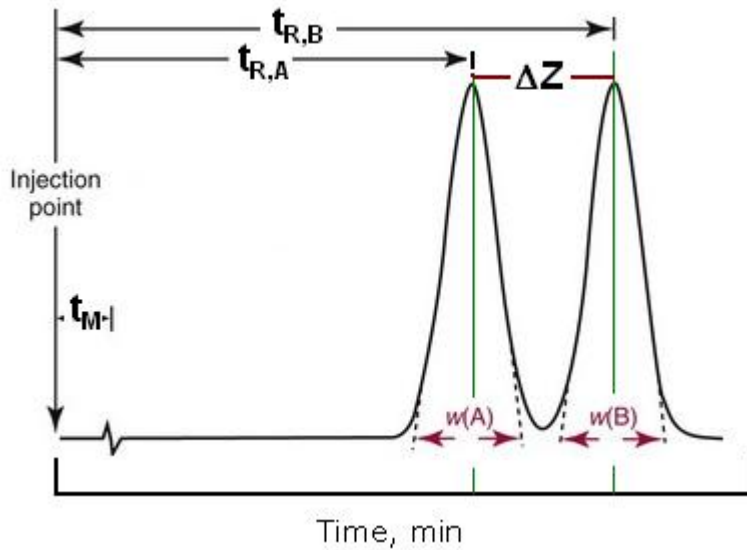
تعتبر قدرة العمود على فصل مكونين متجاورين من مكونات العينة من أهم الدلائل على نجاح أو فشل عملية الفصل. وبدیهي أن أي عمود يستخدم في عمليات الفصل الكروماتوجرافي لمكونات عينة ما ، يجب أن يكون قادراً على فصل تلك المكونات ، وإلا لم يكن استخدام تلك التقنية مبرراً.

ففي الشكل التالي نلاحظ أنه لم يتم فصل المكونات إلى اليسار ، بصورة جيدة ، بينما يعتبر الفصل بينهما ممتازاً في الشكل الأيمن:



والسؤال: كيف يمكن التعبير عن قدرة العمود على فصل مادتين من خليط منهما؟ وإلى أي مدى؟

للإجابة على هذا التساؤل ، دعونا ننظر إلى عملية الفصل في الشكل التالي:



يمكن تعريف قدرة العمود على فصل مادتين من بعضهما البعض ، رياضياً ، وذلك كما يلي:

$$R = \frac{\Delta Z}{\left(\left[\frac{W(A)}{2} + \frac{W(B)}{2} \right] \right)}$$

وعليه ، يمكن التعويض عن ΔZ ، وترتيب المعادلة على فرض أن $W(A) = W(B) = W$ ، لتصبح:

$$R = \frac{[t_{R,B} - t_{R,A}]}{W}$$

لكن ، من المعروف سابقاً أن:

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

وباعتبار قياس الكفاءة للمركب B نجد أن قيمة W تصبح:

$$W = \frac{4t_{R,B}}{\sqrt{N}}$$

أيضاً ، في معادلة سابقة تم إيجاد العلاقة بين زمن المكوث وعامل المكوث ، وذلك كما يلي:

$$t_R = t_M (1 + k')$$

والآن بالتعويض في معادلة الفصل ، نحصل على التالي:

$$R = \frac{[t_M (1 + k_B') - t_M (1 + k_A')]}{\left[\frac{4t_M (1 + k_B')}{\sqrt{N}} \right]}$$

وبترتيب المعادلة نحصل على العلاقة التالية:

$$R = \frac{\sqrt{N} [k_B' - k_A']}{4 [(1 + k_B')]}$$

وبالقسمة على نحصل على المعادلة:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left[\frac{1 - \left(\frac{k_A'}{k_B'} \right)}{\left(\frac{1 + k_B'}{k_B'} \right)} \right]$$

وبالترتيب أيضاً ، نحصل على المعادلة:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{k_B'}{1 + k_B'} \right) \left(1 - \left(\frac{k_A'}{k_B'} \right) \right)$$

لكن من المعروف أنه تم تعريف عامل الاختيار كما يلي:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

وبالتعويض في المعادلة الأخيرة ، نحصل على المعادلة النهائية لقدرة العمود على الفصل ، وهي بالشكل التالي:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{k_B'}{1 + k_B'} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)$$

وبالتعمن في هذه المعادلة يتبين لنا أن قدرة العمود على الفصل هي دالة في ثلاثة متغيرات مهمة ، هي:

1. الكفاءة (N) ، التي هي ببساطة عدد الطبقات النظرية ، والتي يمكن الحصول عليها من العلاقة:

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

أو العلاقة:

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

كما يمكن زيادة عدد الطبقات عن طريق تقليل ارتفاع الطبقة (H في معادلة *van Deemter*) ، وذلك باستخدام جميع الأساليب المذكورة سابقاً لفعل ذلك.

وحيث أن $R \propto \sqrt{N}$ ، ونعلم أيضاً أن:

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

فهذا يعني أن:

$R \propto \sqrt{L}$ ، وبالتالي:

$$\frac{R_1}{R_2} = \frac{L_1^2}{L_2^2}$$

أي أنه إذا حصلنا على قدرة فصل مقدارها 0.5 مثلاً باستخدام عمود طوله 10 cm فإنه يمكن حساب طول العمود اللازم للحصول على $R = 1.0$ ، وذلك بالتعويض في المعادلة (باستخدام نفس الوسط الثابت والمتحرك ، وكافة الظروف الأخرى):

$$\frac{0.5}{1.0} = \frac{10^2}{L_2^2}$$

$$L_2^2 = \frac{10^2 * 1.0}{0.5} = 200$$

وبالتالي فإننا بحاجة إلى عمود طوله:

$$L_2 = \sqrt{200} \cong 14.1 \text{ cm}$$

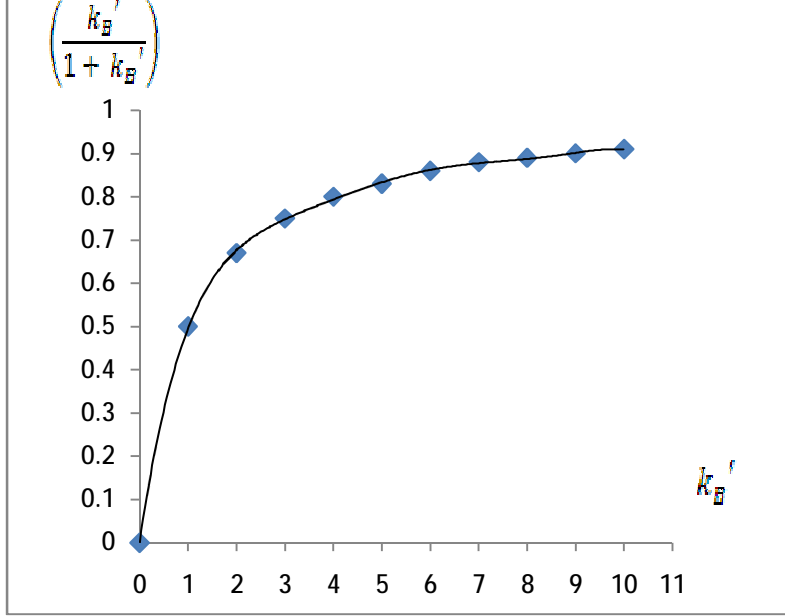
2. زمن المكوث ، معبراً عنه بعامل المكوث (k_B') ، إلا أن العلاقة معقدة إذ يظهر ال k_B' في البسط والمقام ، على حد سواء. ولمعرفة تأثير زمن المكوث على قدرة العمود على الفصل ، من الممكن افتراض قيم متزايدة ل k_B' وملاحظة انعكاس ذلك على القدرة على الفصل. ولنحاول بناء مثل تلك العلاقة ، كما يلي:

k_B'	$\left(\frac{k_B'}{1 + k_B'}\right)$
1.0	0.50
2.0	0.67
3.0	0.75
4.0	0.80
5.0	0.83
6.0	0.86
7.0	0.88
8.0	0.89
9.0	0.90
10.0	0.91

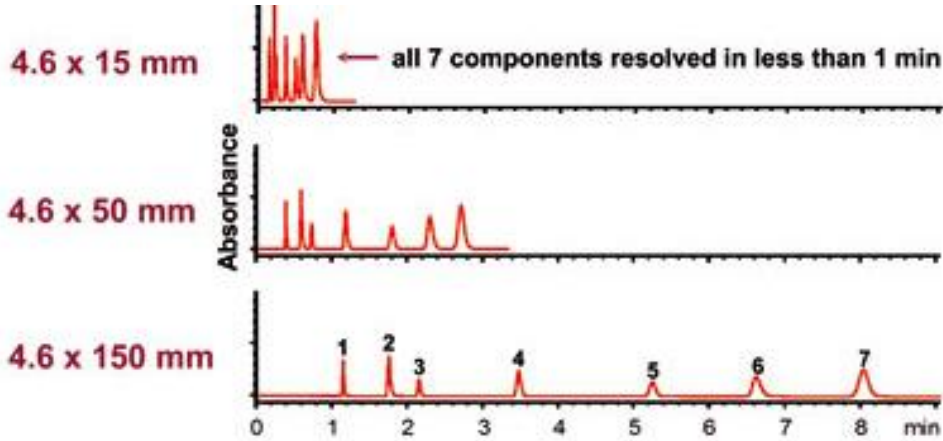
ويبدو واضحاً من الجدول أن القدرة على الفصل تتأثر تأثيراً إيجابياً وبشكل لافت عندما تكون قيمة ال k_B' صغيرة ، بينما تصبح الزيادة في قدرة الفصل قليلة للغاية (أو مهملة) عندما تزداد قيمة k_B' بشكل كبير (يمكنك حساب ذلك لقيم $k_B' =$

100 and 1000 ومقارنة النتائج). ومن الممكن استيعاب ذلك بشكل أفضل عند

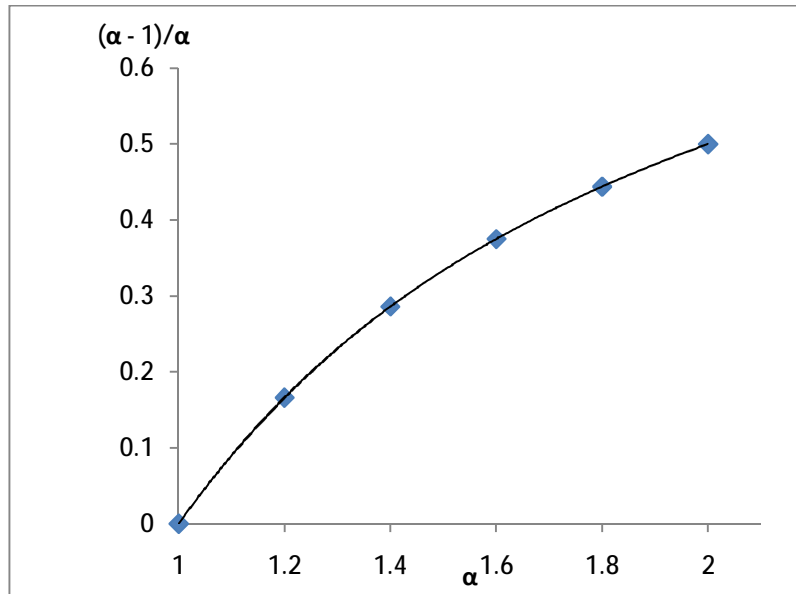
رسم النتائج ، وذلك كما يلي:



لذلك ، يبدو مبرراً أن نحاول دائماً الحصول على عمليات فصل يكون فيها عامل المكوث (k') في المدى من 5 إلى 10 ، ببساطة لأن القيم أقل من 5 تعني قدرة أقل على الفصل ، بينما القيم أكثر من 10 تعني أننا نضيع وقتنا ، ونستهلك كميات أكبر من الوسط المتحرك ، لكن دون مردود إيجابي واضح على القدرة على الفصل. كما يجب الانتباه إلى أن اتساع حزمة المادة المراد فصلها يتناسب طردياً مع زمن مكوثها في العمود ، وعليه يجب الحذر:



3. الاختيارية (ال *selectivity*) ، حيث يمكن القول أن قيمة عامل الاختيارية بين مكونين يجب أن يكون أكبر من 1 ($a > 1$) لأن قدرة العمود تقترب من الصفر عندما يقترب معامل الاختيارية من الواحد الصحيح ، وتساوي صفرًا عندما يساوي معامل الاختيارية صفرًا أيضاً ، بحسب المعادلة. والسؤال: كيف يمكن زيادة قيمة معامل الاختيارية لزيادة قدرة العمود على الفصل؟



في الحقيقة ، هناك عدة وسائل لفعل ذلك ، من أهمها:

(a) تعديل تركيبة الوسط المتحرك ، وبالذات نسبة أو نوع المادة العضوية المعدلة لقطبية الوسط المتحرك ، وسيأتي الحديث عن تفاصيل ذلك عند دراستنا لكروماتوجرافيا السائل عالية الأداء.

(b) تغيير نوع الوسط الثابت في العمود (أي استخدام عمود آخر يحتوي على وسط ثابت مختلف) ، وهو إجراء لا نحبذ لأنه قد لا يتوفر في المختبر ، وشراؤه بحاجة إلى تكاليف باهظة.

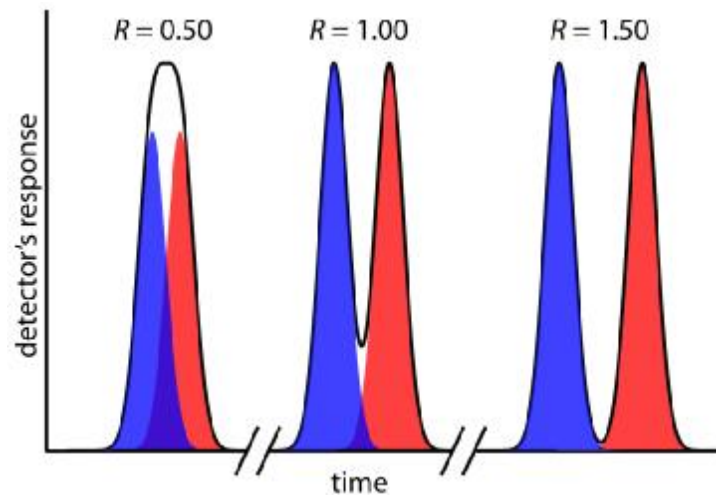
(c) تعديل درجة حرارة الفصل ، أي التحكم بالحرارة ، لأن ثابت التجزئة للمواد المختلفة عادة يتغير بتغير درجة الحرارة. ويوجد في العديد من الأجهزة في الأسواق أداة لتسخين العمود (فرن) ، يمكن بموجب ذلك تعديل قيمة معامل الاختيارية.

(d) إضافة بعض المكونات الكيميائية التي تغير من آليات عملية الفصل ، مثل المركبات التي تكون الأزواج الأيونية (*ion-pairing reagents*) ، أو تلك التي تكون لها خصائص منشطة للأسطح (*surface active agents*) ، والتي تغير من ميكانيزمات عملية الفصل ، وقد ينتج عن ذلك تغيير قيمة عامل الاختيارية ، بما يسمح بنجاح عملية الفصل.

وتعتبر قيمة عامل الاختيار من أهم العوامل التي تؤثر على الفصل ، ويظهر ذلك جلياً بالنظر إلى الجدول التالي ، حيث يتضح ما لزيادة قيمة عامل الاختيار من انعكاس كبير على قدرة العمود على الفصل:

<u>Parameter Change</u>	<u>N</u>	<u>k'</u>	<u>α</u>	<u>R_s</u>
Standard	10,000	2	1.1	1.52
+10% N	11,000	2	1.1	1.59
-25% N	7,500	2	1.1	1.31
-50% N	5,000	2	1.1	1.07
-60% N	4,000	2	1.1	0.96
-75% N	2,500	2	1.1	<u>0.76</u>
+10% k'	10,000	2.2	1.1	1.56
+10% α	10,000	2	1.2	<u>2.78</u>

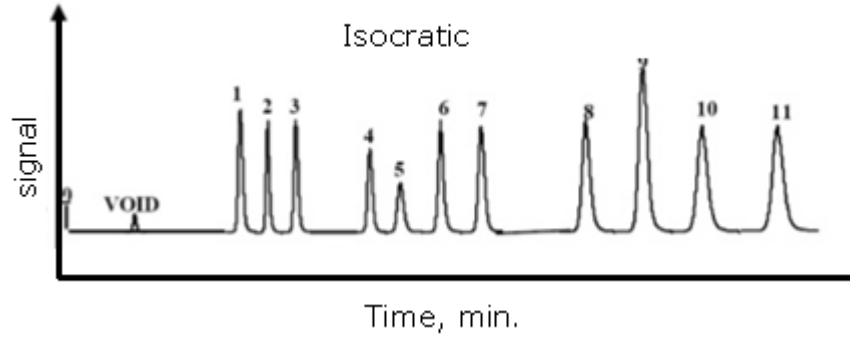
إن القيمة المقبولة لقدرة أي عمود على الفصل هي في الواقع 1.25 ، حيث انه عند هذه القيمة يكون التداخل أقل من 2% ، بينما يصل إلى أقل من 0.2% عندما تكون $R = 1.5$:



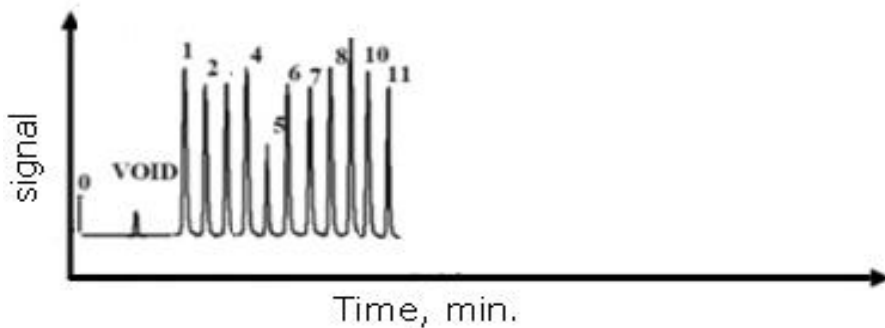
المشكلة العامة في عمليات الفصل

في حالة كروماتوجرافيا السائل ، عند استخدام وسط متحرك ذو تركيبة ثابتة (*isocratic elution*) ، فإن الكروماتوجرام الذي نحصل عليه لن يكون مثالياً ، في أغلب الأحيان ، ونعني بالمثالية ما يلي:

1. أن تتم عملية الفصل في أقل زمن ممكن
2. أن تكون جميع المكونات مفصولة عن بعضها البعض بكفاءة عالية ($R > 1.25$)
3. أن يكون اتساع ال *peaks* أقل ما يمكن ، وبالذات تلك التي تخرج متأخرة ، لكن ما يحدث فعلياً يتلخص في تداخل بعض ال *peaks* ، واتساع تلك التي تخرج متأخرة ، إضافة إلى كفاءة أقل أو أكبر بكثير من المطلوب ، وزمن مكوث غير مبرر (طويل جداً). ولننظر إلى الشكل التالي لتوضيح المسألة:

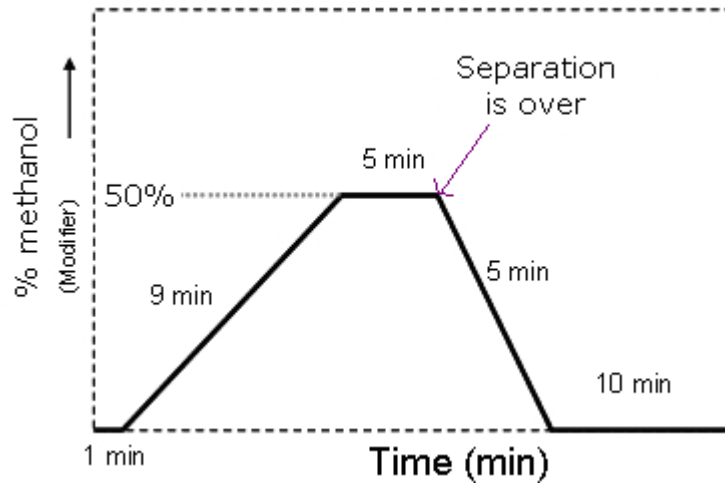


بينما عملية الفصل المثالية تشبه إلى حد كبير الكروماتوجرام الذي يظهر في الشكل التالي:



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

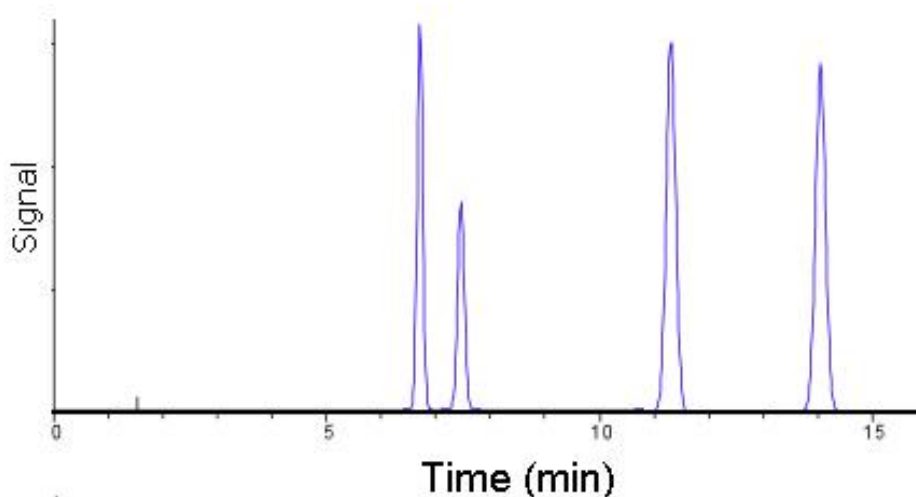
في الحقيقة ، تعتمد إجابة هذا السؤال الهام على نوع الكروماتوجرافي ذات العلاقة ، وحيث أننا نتحدث هنا عن كروماتوجرافيا السائل ، فإن الوصول Y الى عملية الفصل المثالية تتطلب استخدام وسط متحرك يتغير تركيبه بشكل مبرمج (*gradient elution*) ، يتناسب مع المطلوب. أي أننا بحاجة إلى تعديل تركيبة الوسط المتحرك بشكل مستمر أثناء عملية الفصل ، بحيث نجبر كل مادة من المواد الموجودة في العينة على الخروج من العمود عند الوقت الذي نرغب به (أي الذي يلبي الشروط أعلاه). فمثلاً ، في حالة استخدام وسط ثابت غير قطبي ، نجد أن المواد غير القطبية تقضي وقتاً أطول في العمود ، بينما تغادر المواد القطبية العمود أولاً. وعليه يمكن تعديل تركيبة الوسط المتحرك (القطبي) باستخدام مذيب ذو طبيعة عضوية نسبية ، بحيث نقلل من قطبية الوسط المتحرك ، عندها نجد أن قابلية المواد غير القطبية لقضاء وقت أطول في الوسط المتحرك تزداد ، أي أنها تغادر العمود في وقت أقصر. ومن الممكن أن تستخدم عدة برامج لتعديل الوسط المتحرك ، بحيث نحصل على الفصل المطلوب بالكفاءة المرغوبة ، ولننظر إلى ال *gradient* التالي:



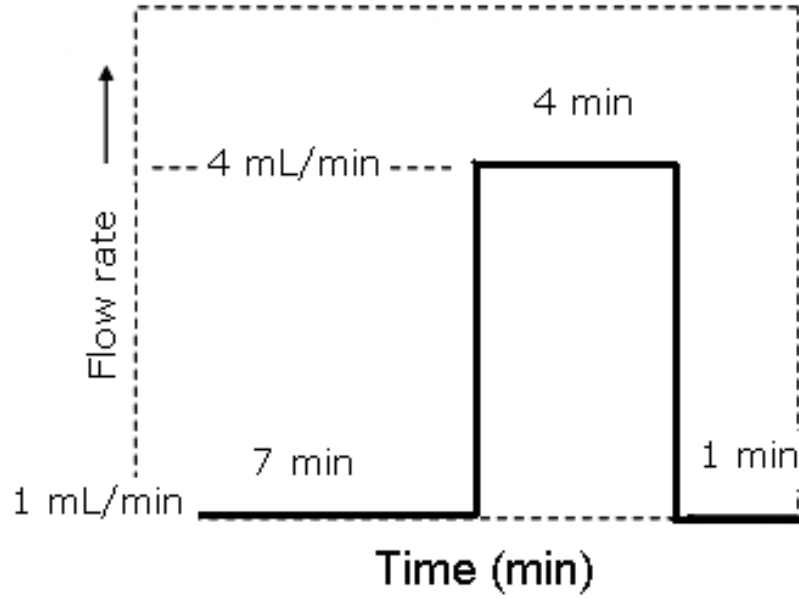
في هذا البرنامج نستخدم وسط متحرك يحتوي على *methanol* % معينة وذلك لمدة دقيقة واحدة ، ثم نبدأ بزيادة نسبة الميثانول ليصل إلى 50% خلال 9 دقائق ، ونحافظ على هذه النسبة لمدة 5 دقائق ، ومن ثم نعود إلى التركيب الأصلي للوسط المتحرك خلال 5 دقائق ، وأخيراً نستمر في ضخ الوسط المتحرك لمدة 10 دقائق ، وذلك لإعادة حالة العمود وخصائصه إلى الحالة الأصلية. ويجب أن نلاحظ أن عملية الفصل يجب أن تكون قد انتهت عند آخر الوقت الذي تكون فيه نسبة ال *organic modifier* أعلى ما يمكن ، وما يتم بعد

ذلك ليس له علاقة بعملية الفصل وإنما بإعادة العمود إلى حالته الأصلية (*column regeneration*). كما يجب الانتباه إلى أنه (في أغلب الأحوال) يحدث انحدار لأعلى في خط الأساس (*baseline drift*) مع تعديل تركيبة الوسط المتحرك ، مما يستدعي تحديد ذلك عن طريق تنفيذ برنامج التعديل دون حقن العينة أولاً ، ومن ثم يتم طرح الكروماتوجرام الناتج من كروماتوجرام العينة ، وبذلك يتم التصحيح ، ويستقيم خط الأساس. ومن المهم أيضاً الانتباه إلى طبيعة المادة العضوية المعدلة للوسط المتحرك ، إذ يجب ان تكون ذائبة فيه بشكل تام عند النسب المستخدمة ، وأيضاً يجب ان يكون الوسط المتحرك المعدل قادراً على إذابة العينة في جميع الأحوال ، كما يفضل أن تتم عملية تعديل الوسط المتحرك تدريجياً حتى يكون الخط متجانساً دائماً. وبديهي أن برنامج التعديل قد يكون خطياً كما هو أعلاه ، أو باستخدام خطوات (*step gradient*) أو أي شكل آخر.

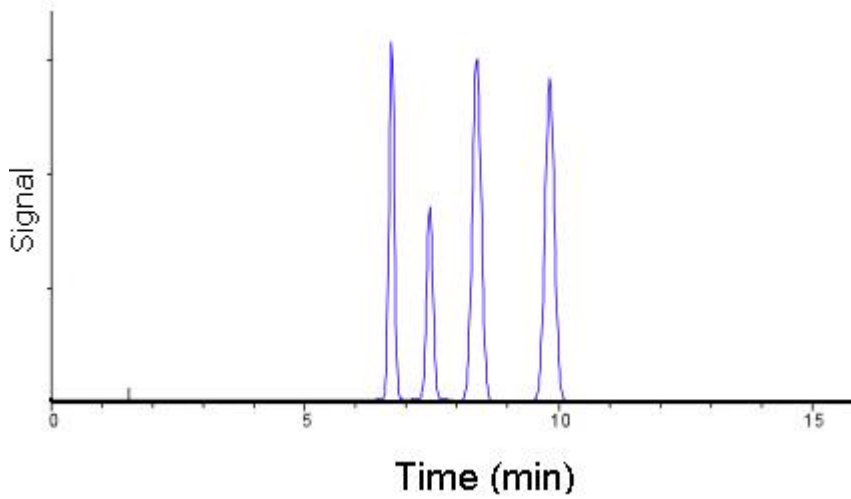
وفي بعض الحالات ، يتم فقط تعديل سرعة الوسط المتحرك لإجبار ال *peaks* المتأخرة على الخروج مبكراً ، أو ما يسمى *flow rate programming* . أنظر إلى الكروماتوجرام التالي:



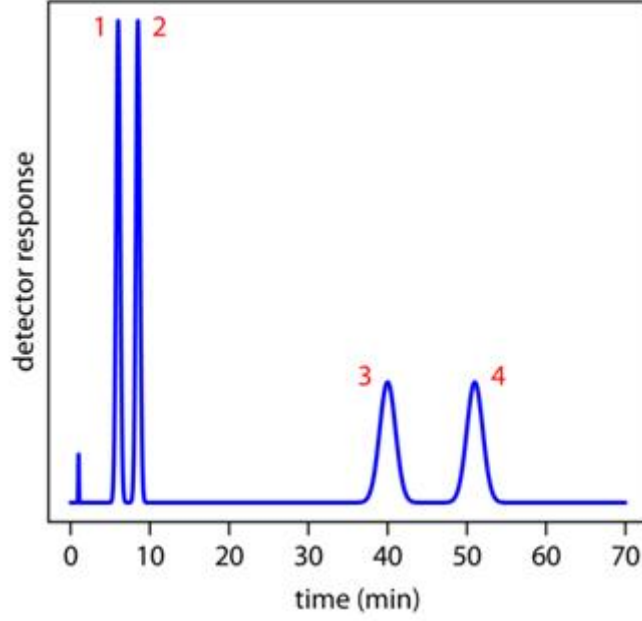
حيث نشاهد أن المركبين الثالث والرابع يأخذان وقتاً يمكن تقليصه ، باستخدام برنامج تعديل سرعة الوسط المتحرك ، كما في الشكل:



وعند تطبيق البرنامج يمكن أن نحصل على الكروماتوجرام التالي ، حيث تم تقليص زمن الفصل بشكل كبير :

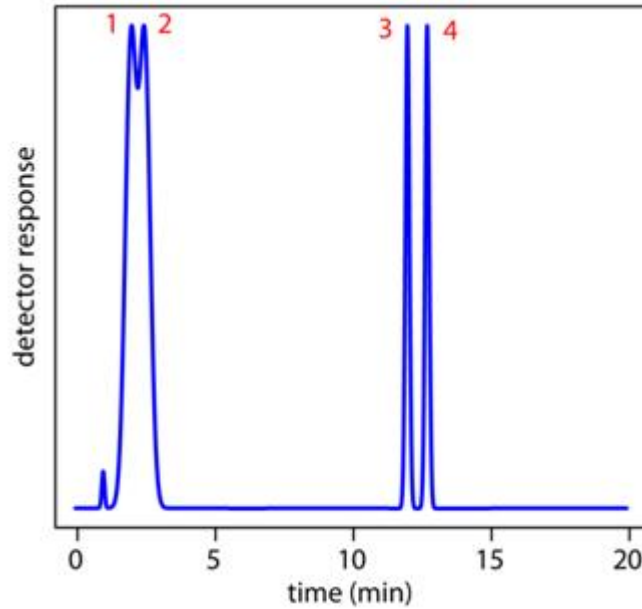


أما في حالة كروماتوجرافيا الغاز ، فإننا نحصل على نفس نوع المشاكل المذكورة أعلاه ، إلا أن العامل الوحيد المستخدم لتحسين عملية الفصل وتقليل الوقت ، على حد سواء ، هو درجة الحرارة. ولنفترض أننا حصلنا على الكروماتوجرام التالي باستخدام كروماتوجرافيا الغاز عند درجة حرارة ثابتة (*isothermal separation*) ولتكن مثلاً $150^{\circ}C$:



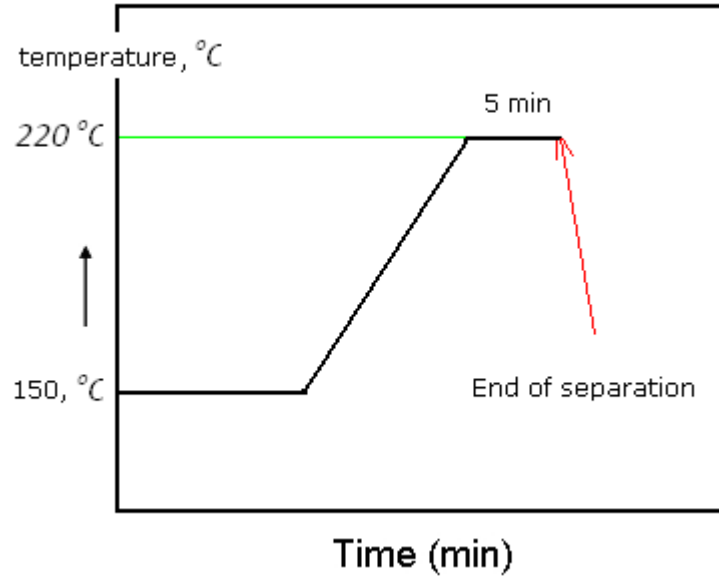
نجد أن المركبين 1 و 2 مفصولان بشكل جيد ، بينما 3 و 4 تكون ال *peaks* عريضة ، ويخرجان بعد وقت طويل.

ولنفترض أننا حصلنا على الكروماتوجرام التالي باستخدام كروماتوجرافيا الغاز عند درجة حرارة ثابتة (*isothermal separation*) ولتكن مثلاً 220°C :

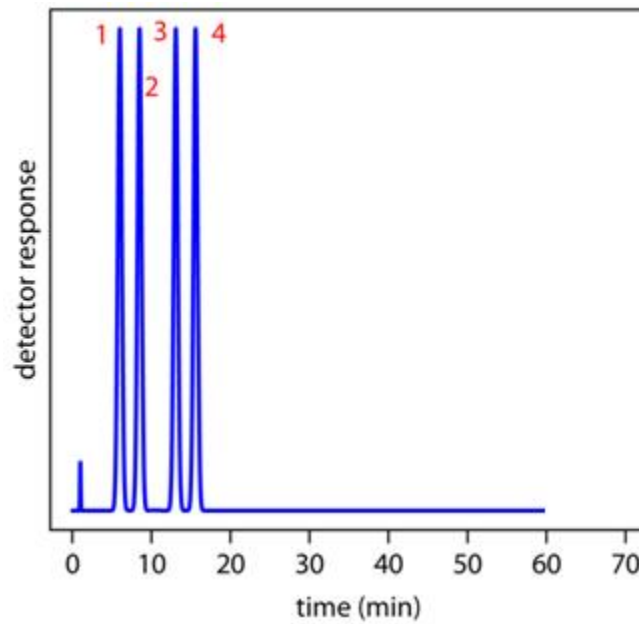


حيث نلاحظ أن الفصل بين المركبين 1 و 2 أصبح سيئاً بينما تحسنت عملية الفصل جداً للمركبين 3 و 4.

هنا ، من الممكن ببساطة بناء برنامج (*temperature program*) تعديل درجة الحرارة للوصول إلى عملية فصل أفضل. وحيث أننا راضون عن فصل المركبين 1 و 2 عند بداية درجة حرارة 150°C ، فإننا نستخدم بداية درجة حرارة 150°C لمدة 10 دقائق (كي نحصل على فصل جيد للمركبين 1 و 2) ، ومن ثم نزيد درجة الحرارة إلى 220°C بمعدل (*ramp rate*) 20 درجة في الدقيقة (مثلاً) ، عندها نحصل فصل جيد للمركبين 3 و 4 ، أي أننا نصمم برنامج فصل كما في الشكل:



وبذلك نحصل على الكروماتوجرام التالي:



حيث تمت عملية الفصل بصورة مرضية ، باستخدام ما يسمى *temperature programming gas chromatography (TPGC)*.

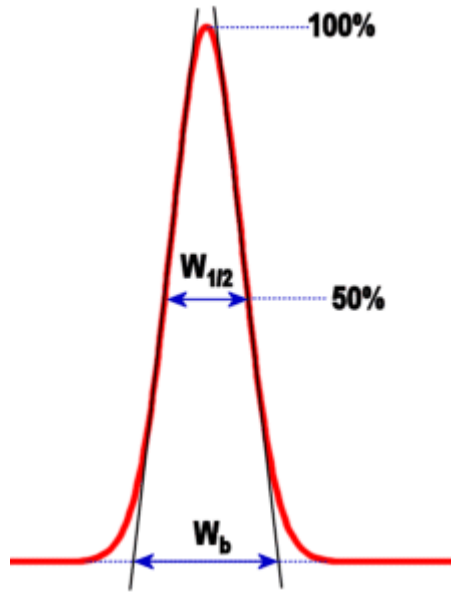
تطبيقات الكروماتوجرافي العملية

1. التحليل الوصفي

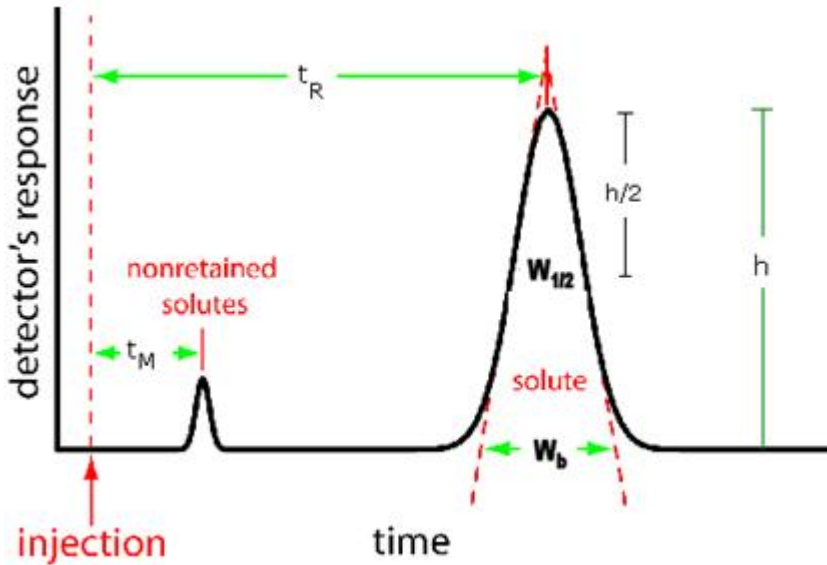
يعتبر زمن المكوث في العمود ، عند ظروف معينة وبالمقارنة مع المواد القياسية ، دالاً على ماهية المواد المكونة للعينة ، إذ تمكث كل مادة زمناً معيناً في العمود. لكن ، ألا يمكن أن يكون زمن مكوث مواد مختلفة واحداً (أي تشترك أكثر من مادة في زمن المكوث) داخل العمود؟ الإجابة بالتأكيد نعم. إذاً لا يمكن الجزم يقيناً بوجود مادة ما في عينة باعتبار زمن مكوثها في العمود وتشابه ذلك زمن مكوث مع المادة القياسية ، عند نفس الظروف ، باستخدام مؤشر زمن المكوث فقط. من أجل ذلك يمكن القول - في غياب مكشاف قادر على التعرف على ماهية المادة - أن الكروماتوجرافي هو تقنية نافية أكثر منها مثبتة ، إذ يمكن الادعاء بأريحية معقولة أن مادة ما ليست موجودة في العينة إذا لم نستطع رؤية منحنى إشارة لها عند زمن المكوث المفترض والمعروف من المادة القياسية. إلا أننا لا نستطيع أن نجزم بوجود مادة معينة بمجرد حصولنا على منحنى إشارة عند زمن المكوث المفترض. إلا أن تقنية الكروماتوجرافي تستخدم بكفاءة للتعرف على المواد المضافة ، مثلاً المواد الحافظة والأصبغ في الأغذية ، ومكونات الأدوية ، كما يمكن تتبع تكون بعض المواد في التفاعلات المختلفة ، لأننا ببساطة نعلم أن تلك المواد موجودة أو نرغب في التأكد من ذلك ، ومعرفة تركيزاتها.

2. التحليل الكمي

تعتبر الكروماتوجرافي تقنية ممتازة للتعرف على تراكيز المواد المختلفة في العينات ، حيث يمكن استخدام ارتفاع منحنى الإشارة (*peak height*) للدلالة على التركيز ، حيث يتم قياس الارتفاع لمجموعة من المحاليل القياسية ، ومن ثم بناء المنحنى الخطي ، ومن قيمة ارتفاع منحنى إشارة المادة يتم إيجاد تركيزها.



ومن الجدير بالذكر أن قياس اتساع ال *peak* دائماً يتطلب رسم مماسين على جانبيها ، كما يتطلب معرفة خط الأساس ، أو تقديره. أما زمن المكوث فيتم تحديده من بداية الحقن حتى نقطة التقاء المماسين ، كما في الشكل التالي:



كما يمكن استخدام المساحة تحت منحنى الإشارة للدلالة على التركيز ، وربما كان استخدام المساحة أكثر واقعية ، بالذات عندما تكون ال *peaks* عريضة ، إذ يكون الفرق في الارتفاع قليلاً. وعلى أي حال ، فإن أجهزة الكروماتوجرافي المتواجدة في الأسواق حالياً لديها القدرة على قياس الارتفاعات والمساحات بصورة غاية في الدقة ، مع عمل التصحيح المناسب في حالة التداخل ، وانحدار خط الأساس ، إضافة إلى امتلاكها العديد من الدوال القادرة على

حساب الكفاءة ، وعرض ال *peak* عند خط الأساس ، وعرضها عند منتصف الارتفاع ، وغير ذلك كثير .

إن أكثر مصادر الخطأ تأثيراً في الكروماتوجرافي تتعلق بقلّة حجم العينة التي يتم حقنها (بالذات في كروماتوجرافيا الغاز) ، وكذلك في معدل الحقن. ومن الممكن التغلب على الخطأ الناتج عن عدم التأكد في حجم العينة المحقونة عن طريق استخدام مادة قياسية داخلية (*internal standard*). حيث تضاف هذه المادة بكميات ثابتة لجميع المحاليل القياسية والعينات ، مع مراعاة ألا يتداخل منحنى إشارة هذه المادة مع منحنى إشارة المادة المراد تعيينها وأن يكون لها نفس معامل استجابة المكشاف (*detector response factor*). أما الإشارة التي يتم رسمها في منحنى المدى الخطي فهي نسبة الإشارة الخاصة بالمادة المراد تعيينها إلى إشارة المادة القياسية الداخلية. ويمكن القول أن تلك النسبة تبقى ثابتة لتركيز معين ، بغض النظر عن اختلاف الحجم الذي يتم حقنه.