Chromatography

Chromatographic Analysis: Separation techniques (such as chromatography) are essential for obtaining pure substances free from impurities. Chromatographic analysis is classified as a modern separation method because it uses a mobile and a stationary phase to separate complex mixtures like High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), which offer high efficiency, speed, and sensitivity.

Fundamental principle: Chromatography is based on the principle of **partitioning تقسيم or distributing توزيع** a mixture between a stationary phase (solid or liquid) and a mobile phase (gas or liquid). Different components travel at different speeds, allowing for their separation.

Qualitative analysis التحليل النوعي : They are necessary to enable spectroscopic tests (IR, NMR, mass spectrometry) to be performed on the pure substance to determine its structure.

Quantitative analysis التحليل الكمي : They facilitate quantitative analyses to determine the concentration of materials.

Applications of Chromatography

1-**Pharmaceuticals الادوية :** Ensures the purity and potency of drugs and helps in their development.

2-Environmental science العلوم البيئية: Detects trace contaminants, pollutants, and toxins in samples.

3-Clinical diagnostics التشخيص السريري: Analyzes body fluids to diagnose metabolic disorders and measure levels of hormones and vitamins.

4-Food safety سلامة الاغذية : Checks for the presence of contaminants or adulterants and verifies product quality.

5-Forensic science الادلة الجنائية: Aids in the identification of unknown substances at a crime scene.

Q/What is the fundamental principle upon which all chromatographic separation techniques are based?

Q/Why is chromatographic analysis classified as a "modern separation method"?

Q/ What are the applications of chromatography? List them and explain one.

Theory and Basic Principle of Separation

1-Stationary Phase (SP): Characterized by properties such as polarity, adsorption capacity, or ion exchange.

2-Mobile Phase (MP): Characterized by properties contrasting with those of the stationary phase.

3-Separation Mechanism by Polarity (As an Example):

- The SP and MP must have **contrasting polarities قطبيتان متباينتان** (e.g., Non-polar SP and Polar MP).
- Polar substances (If the SP is non-polar and the MP is polar): Spend a longer time in the Mobile Phase (MP) (i.e., shorter retention time, faster elution).

المواد المراد فصلها اذا كانت قطبية ، نستخدم (SP غير قطبي و MP قطبي): المادة سوف تقضي وقتًا أطول في الطور المتحرك (MP) أي، وقت احتفاظ أقصر، واستخراج أسرع .

- Non-polar substances (If the SP is non-polar and the MP is polar): Spend a longer time in the Stationary Phase (SP) (i.e., longer retention time, slower elution).

المواد المراد فصلها اذا كانت غير القطبية ، نستخدم (SP غير قطبي و MP قطبي): المادة سوف تقضي وقتًا أطول في الطور الثابت(SP) أي، وقت احتفاظ أطول، واستخراج أبطأ.

- Note: The more the substance's characteristics align with the Mobile Phase (MP), the **shorter its Retention time زمن الاحتجاز في العمود اقل** will be.

ملاحظة: كلما كانت خصائص المادة متوافقة مع الطور المتحرك (MP) ، كان وقت زمن الاحتجاز في العمود اقل

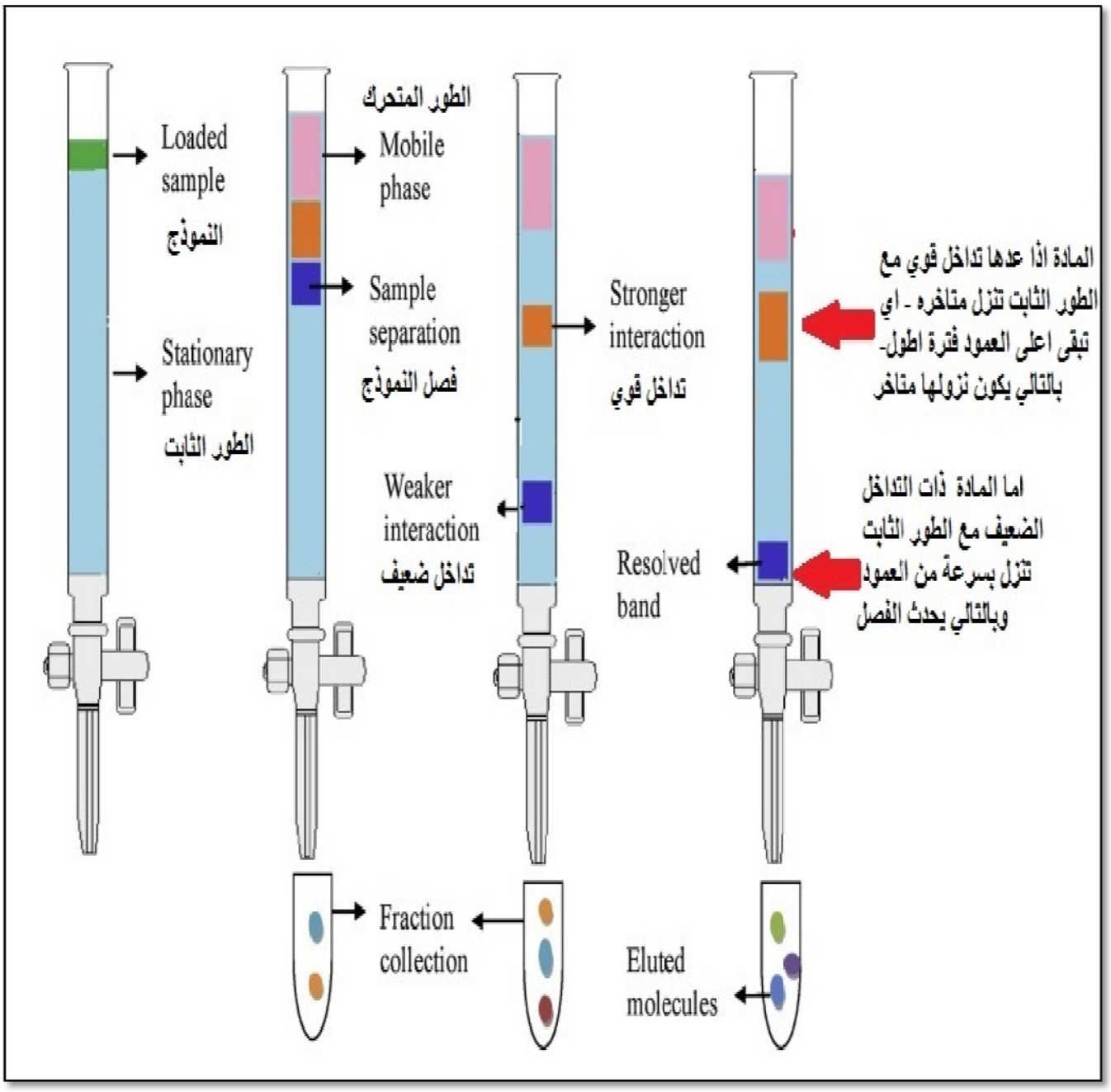
Q/What are the two main phases essential for chromatographic separation, and what is the key difference in their properties that drives the separation?

Q/ List three characteristics that can be used to define or describe the nature of the Stationary Phase (SP).

Q/ How are the properties of the Mobile Phase (MP) typically characterized in relation to the Stationary Phase?

Q/ Which type of substance (polar or non-polar) will have a shorter retention time? Explain why.

Q/Which type of substance (polar or non-polar) will elute slower (have a longer retention time)? Explain why.



Classification of Chromatography Techniques based on the state of Mobile Phase

The classification of chromatographic techniques depends on the state of the Mobile Phase (MP) used:

- **Liquid Chromatography (LC)**

Mobile Phase (MP): A liquid solvent or mixture of solvents. In LC, the sample is dissolved and carried through the Stationary Phase by a flowing liquid.

- **Gas Chromatography (GC)**

Mobile Phase (MP): An inert gas (e.g., Helium, Nitrogen, Hydrogen), often called the carrier gas. The sample must be volatile or made volatile (often by heating) to be carried through the Stationary Phase by the inert gas stream.

- **Supercritical Fluid Chromatography (SFC)**

Mobile Phase (MP): A substance (typically CO2) held at a supercritical state (i.e., above its critical temperature and pressure). In this state, the substance exhibits properties intermediate between a liquid and a gas. The supercritical fluid has the solvating power of a liquid (good for dissolution) and the diffusivity of a gas (fast separation). This technique combines advantages of both GC and LC.

الكروماتوغرافيا بالسوائل فوق الحرجة (SFC) هي تقنية فصل تستخدم مادة، عادةً **ثاني أكسيد الكربون(CO_2)** ، كـ **طور متحرك (Mobile Phase)** يتم الاحتفاظ به في حالة **فوق حرجة**. تعني الحالة فوق الحرجة أن المادة تكون أعلى من درجة حرارتها وضغطها الحرج، مما يمنحها خصائص **وسطية بين السائل والغاز**. يتميز هذا السائل الفوق حرج بقوة **الإذابة** (Solvating Power) المشابهة للسائل، مما يجعله جيدًا لإذابة العينات (مثل الكروماتوغرافيا السائلة LC) ، وله في الوقت نفسه **قدرة انتشار (Diffusivity)** سريعة مشابهة للغاز، مما يسمح بفصل سريع (مثل الكروماتوغرافيا الغازية GC). وبالتالي، تجمع تقنية SFC بين **مزايا كل من GC و LC** لتقدم فصلًا فعالًا وسريعًا.

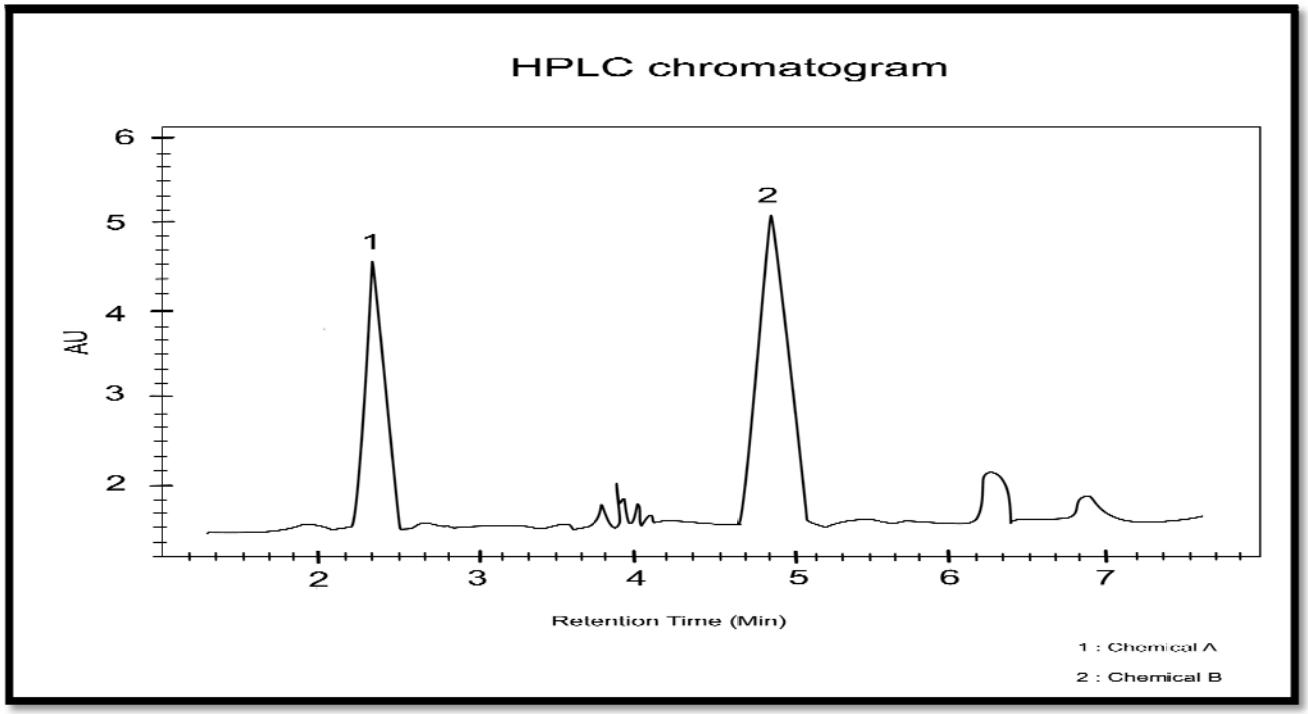
Q/What are Classification of Chromatography Techniques based on the state of Mobile Phase?

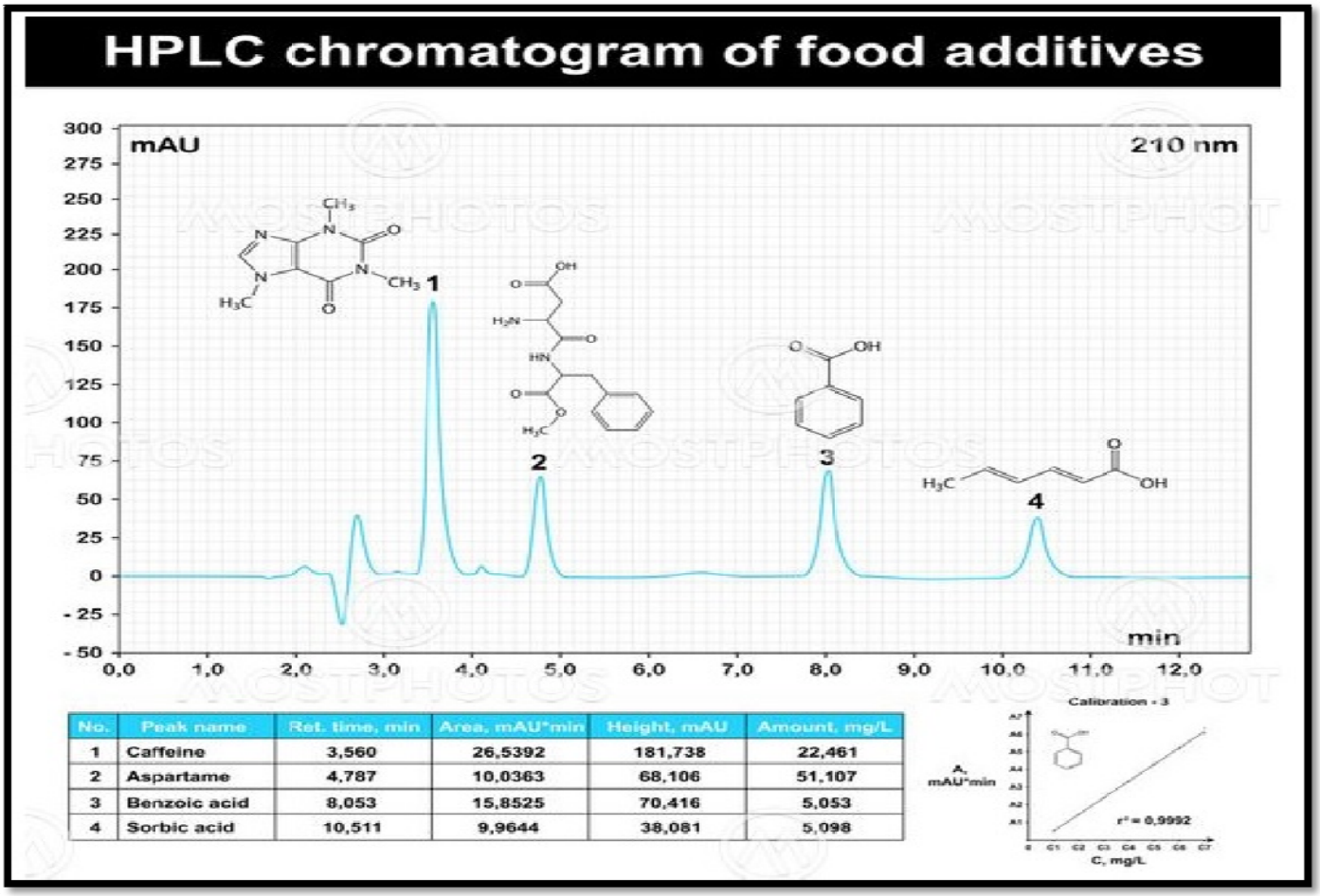
Q/Define the term "supercritical state"?

Q/ SFC is mean to combine advantages of both GC and LC. Explain which specific property of the supercritical fluid gives it:

1-The advantage similar to Liquid Chromatography (LC).

2-The advantage similar to Gas Chromatography (GC).





No.	Peak name	Ret. time, min	Area, mAU*min	Height, mAU	Amount, mg/L
1	Caffeine	3,560	26,5392	181,738	22,461
2	Aspartame	4,787	10,0363	68,106	51,107
3	Benzoic acid	8,053	15,8525	70,416	5,053
4	Sorbic acid	10,511	9,9644	38,081	5,098

Classification of Chromatographic Techniques based on the mechanism of separation

Chromatographic processes are fundamentally classified according to the **mechanism of separation** based on how the sample components interact with the mobile and stationary phases. The primary mechanisms are **adsorption, partition, ion exchange,** and **size exclusion**.

1. Adsorption Chromatography الامتزاز

Mechanism: Separation is based on the **differential adsorption** of components onto the surface of a solid stationary phase (SP) via repeated cycles of sorption (adsorption onto the solid surface) and desorption (release into the mobile phase).

- The stationary phase is typically a finely divided solid adsorbent, such as **silica (SiO2) or alumina (Al_2O_3)**.
- The mobile phase can be a liquid (in **Liquid-Solid Chromatography, LSC**) or a gas (in **Gas-Solid Chromatography, GSC**).
- **Example: Thin-Layer Chromatography (TLC)** is a specialized form of LSC where the solid SP is spread as a thin layer on an inert plate, and the separation is achieved by the capillary action of a liquid MP moving up the plate.

2. Partition Chromatography

Mechanism: Compounds are separated based on their **relative distribution (partitioning)** between the mobile phase (MP) and a stationary phase (SP) that functions like a liquid. The SP is either a liquid supported on a solid or a chemically bonded liquid-like network.

- The MP can be a liquid (in **Liquid-Liquid Partition Chromatography**) or a gas (in **Gas-Liquid Chromatography, GLC**).
- **Modes of Liquid-Liquid:**
- **Normal-Phase Chromatography (NPC):** Uses a **polar SP** (e.g., cyano-bonded silica) and a **nonpolar MP** (e.g., hexane). Retention increases with increasing analyte polarity.
- **Reversed-Phase Chromatography (RPC):** The most widely used mode today. It uses a **nonpolar SP** (e.g., C18-bonded silica) and a **polar MP** (e.g., water/acetonitrile mixtures). Retention decreases with increasing analyte polarity (i.e., retention increases with hydrophobicity).

3. Ion-Exchange Chromatography (IEX)

Mechanism: The stationary phase consists of **ion-exchange resins** that are chemically bonded with charged functionalities. Separation is based on **ion exchange equilibria**: analytes with a charge opposite to that of the SP will temporarily bind to it.

- Compounds are then selectively eluted by changing the **ionic strength** (salt concentration) or **pH** of the mobile phase to disrupt the electrostatic interactions. Hydrophobic interactions often play a significant supporting role in the separation process, particularly in anion exchange.

4. Size Exclusion Chromatography (SEC)

Mechanism: Also known as **Gel Filtration** or **Gel Permeation Chromatography**. Separation occurs according to the molecule's **hydrodynamic size** (volume in solution). The column is packed with porous gel beads.

- **Smaller molecules** can penetrate deeply into the pores, travel a longer path, and thus have a **longer retention time (elute later)**.
- **Larger molecules** are largely or completely excluded from the pores, travel around the beads, follow a shorter path, and **elute faster**.

5. Specialized Column Techniques

Affinity Chromatography

This technique utilizes a highly specific interaction where a **specific ligand** (e.g., an antibody, enzyme substrate, or receptor) is chemically attached to the stationary phase to **selectively bind a single target molecule** (e.g., a specific protein). After other components are washed away, the target molecule is eluted by altering the mobile phase conditions to break the specific ligand-target bond.

Flash Chromatography

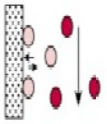
This is a **high-speed version** of the classical column chromatography (often Adsorption-based). Compressed gas (usually air or N2) is used to **force the mobile phase** through the column, significantly **reducing separation time** and often improving peak resolution.

Comparison of Chromatographic Techniques

Classification	Mechanism Focus	Stationary Phase (SP)	Mobile Phase (MP)	Primary Example/Mode
1. Adsorption **الامتزاز**	Differential surface interaction (Polarity)	**Solid Adsorbent** (e.g., Silica (SiO_2), Alumina (Al_2O_3))	**Liquid** (LSC) or **Gas** (GSC)	Thin-Layer Chromatography (TLC)
2. Partition **التوزيع**	Differential distribution (Solubility) Or Differential partitioning between a liquid-like SP and the MP. (التوزيع التفاضلي بين طور ثابت شبيه بالسائل والطور المتحرك.)	**Liquid-like Network** (e.g., C18 -bonded silica, Polymer)	**Liquid** (LLC) or **Gas** (GLC)	**Reversed-Phase** (RPC) / Gas-Liquid Chromatography (GLC) كروماتوغرافيا الطور المعكوس
3. Ion-Exchange **التبادل الأيوني**	Electrostatic attraction (Charge)	**Ion-Exchange Resin** with fixed charges (e.g., Cation/Anion Exchangers)	**Aqueous Buffer** (Ionic Strength/pH controlled)	Separation of Proteins and Amino Acids
4. Size Exclusion **الاستبعاد الحجمي**	Hydrodynamic size (Molecular volume)	**Porous Gel Beads** (Polymers with defined pore sizes)	**Liquid Solvent** (Aqueous or Organic)	Gel Filtration Chromatography (GFC)
5. Affinity **الألفة**	Highly specific, reversible interaction with a biological ligand. (تفاعل عالي النوعية وعكسي مع رابط بيولوجي.)	**Immobilized Ligand** (e.g., Antibody, Enzyme Substrate)	**Aqueous Buffer** (Eluted by pH/Salt change or competing ligand)	**Isolation of Antibodies** using Protein A/G. **عزل الأجسام المضادة**
6. Flash (Technique) **الوميض**	(Same as Adsorption, but faster)	**Solid Adsorbent** (Often Silica, Adsorption-based)	**Liquid Solvent** (Fast flow rate)	**Purification of Organic Synthesis Products (تنقية نواتج التخليق العضوي)**

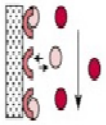
What are the different classifications of chromatographic techniques based on their separation mechanism?

Adsorption chromatography
Separation based on adsorption of chemicals to the surface of a support



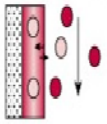
كروماتوغرافيا الامتزاز (Adsorption chromatography) الفصل يعتمد على امتزاز المواد الكيميائية على سطح مادة صلبة

Affinity chromatography is a separation method that uses a specific, biologically related binding agent (the ligand) to isolate a target molecule from a complex mixture.



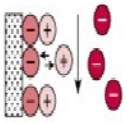
كروماتوغرافيا الألفة هي طريقة فصل تستخدم عامل ربط محدد (Binding agent) ومرتبط بيولوجيًا (The ligandالليغاند) لعزل جزيء مستهدف من خليط معقد.

Partition chromatography
Separation based on partitioning of chemicals into a layer of the stationary phase



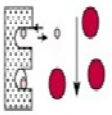
كروماتوغرافيا التوزيع (Partition chromatography) الفصل يعتمد على توزيع المواد الكيميائية في طبقة من الطور الثابت.

Ion-exchange chromatography
Separation of ions based on their binding to fixed charges on a support



كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (Ion-exchange chromatography) فصل الأيونات يعتمد على ارتباطها بشحنات ثابتة على المادة الصلبة

Size-exclusion chromatography
Separation of chemicals based on their size and ability to enter a porous support



كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي (Size-exclusion chromatography) فصل المواد الكيميائية يعتمد على حجمها وقدرتها على دخول المادة الحاملة المسامية.

Column Chromatography

Column Chromatography is a central component in chemical separation techniques, acting as a tube packed with a stationary phase where a mixture is introduced. It is a technique used to separate and purify chemical compounds from a mixture.

It operates on the principle of differential partitioning, where components of a sample are separated based on their varying affinities for a mobile phase and the stationary phase. The mobile phase then moves through the stationary phase, causing different components of the mixture to separate based on their relative interactions and affinities. The separated compounds, or eluites, exit the column at different times and are collected as fractions for purification and analysis.

Setup الإعداد : A glass tube (the column) is filled with a solid stationary phase, such as **silica gel or alumina**.

Loading the Sample تحميل العينة : The mixture to be separated is dissolved in a solvent and carefully added to the top of the column.

Elution الإزاحة : A solvent (the mobile phase) is added continuously to the top of the column. Gravity or pressure pushes the mobile phase and the dissolved mixture through the stationary phase.

Separation الفصل : Components of the mixture separate as they move down the column. Compounds with a strong intraction for the stationary phase **move more slowly** (**weaker intraction with the mobile phase**). Compounds with a weaker intraction for the stationary phaseor **move faster** (**stronger interaction with the mobile phase**).

كروماتوغرافيا العمود (Column Chromatography) هي تقنية فصل وتنقية كيميائية أساسية تُستخدم لعزل المُركبات من خليط معقد.

المبدأ الأساسي :تعتمد على مبدأ **التوزيع التفاضلي** (Differential Partitioning)، حيث يتم فصل مكونات العينة بناءً على اختلاف انجذابها (أُلفتها) النسبي بين طورين:

1. **الطور الثابت (Stationary Phase):** مادة صلبة (عادةً هلام السيليكا أو الألومينا) معبأة داخل أنبوب زجاجي (العمود).
2. **الطور المتحرك (Mobile Phase):** سائل (مُذيب) يتدفق عبر العمود.

العملية:

1. **الإعداد :**يُعبأ أنبوب زجاجي بالطور الثابت الصلب.

2. **تحميل العينة:** تُضاف العينة المُراد فصلها بعناية إلى أعلى العمود.
3. **الإزاحة (Elution):** يُضاف الطور المتحرك باستمرار، ويُدفع بفعل الجاذبية أو الضغط عبر الطور الثابت.
4. **الفصل:**
   - **المُركبات ذات التفاعل القوي مع الطور الثابت**(والضعيف مع الطور المتحرك) تتحرك ببطء وتتأخر في النزول.
   - **المُركبات ذات التفاعل الأضعف مع الطور الثابت** (والقوي مع الطور المتحرك) تتحرك بسرعة وتخرج أولاً.

تخرج المكونات مفصولة في أوقات مختلفة وتُجمع على شكل **كسور (Fractions)** لتحليلها وتنقيها.

Preparing a Column for Organic Compound Separation (Normal-Phase Chromatography)

Preparing a chromatography column correctly is crucial for achieving good separation (high resolution) in organic chemistry. This procedure typically utilizes **silica gel** as the stationary phase and is known as **Flash Column Chromatography** (using pressurized air or nitrogen).

Item	Description
Column	A straight glass column with a Teflon stopcock at the bottom.
Stationary Phase (SP)	**Silica Gel** (typically 40–63 µm particle size for flash chromatography).
Mobile Phase (MP) / Eluent	A non-polar solvent or solvent mixture (e.g., Hexane/Ethyl Acetate).
Accessories مواد اضافية	Cotton or glass wool, sand, reservoir/funnel, air pump or N2 line.

The preparing a chromatography column involves four main stages: **Setup, Packing, Loading, and Elution**.

1. Column Setup and Packing

Prepare the Column: Secure the glass column, insert a cotton/glass wool plug, and add a layer of sand above the stopcock.

Make the Slurry: Mix the Silica Gel (Stationary Phase) with the least polar Mobile Phase (Eluent) to form a smooth slurry.

2. Column Packing

Pack the Column: Pour the slurry into the column. Tap the sides gently to settle the silica and apply slight pressure to compact the bed.

Cap the Bed: Add a final layer of sand to prevent disturbance of the packed silica surface.

3. Sample Loading

Prepare Sample: Dissolve the crude mixture in the minimum possible volume of the initial mobile phase (or less polar solvent).

Load: Carefully add the dissolved sample to the top of the sand cap.

Adsorb: Let the solvent run down until the sample is just adsorbed onto the silica bed, forming a tight, narrow band.

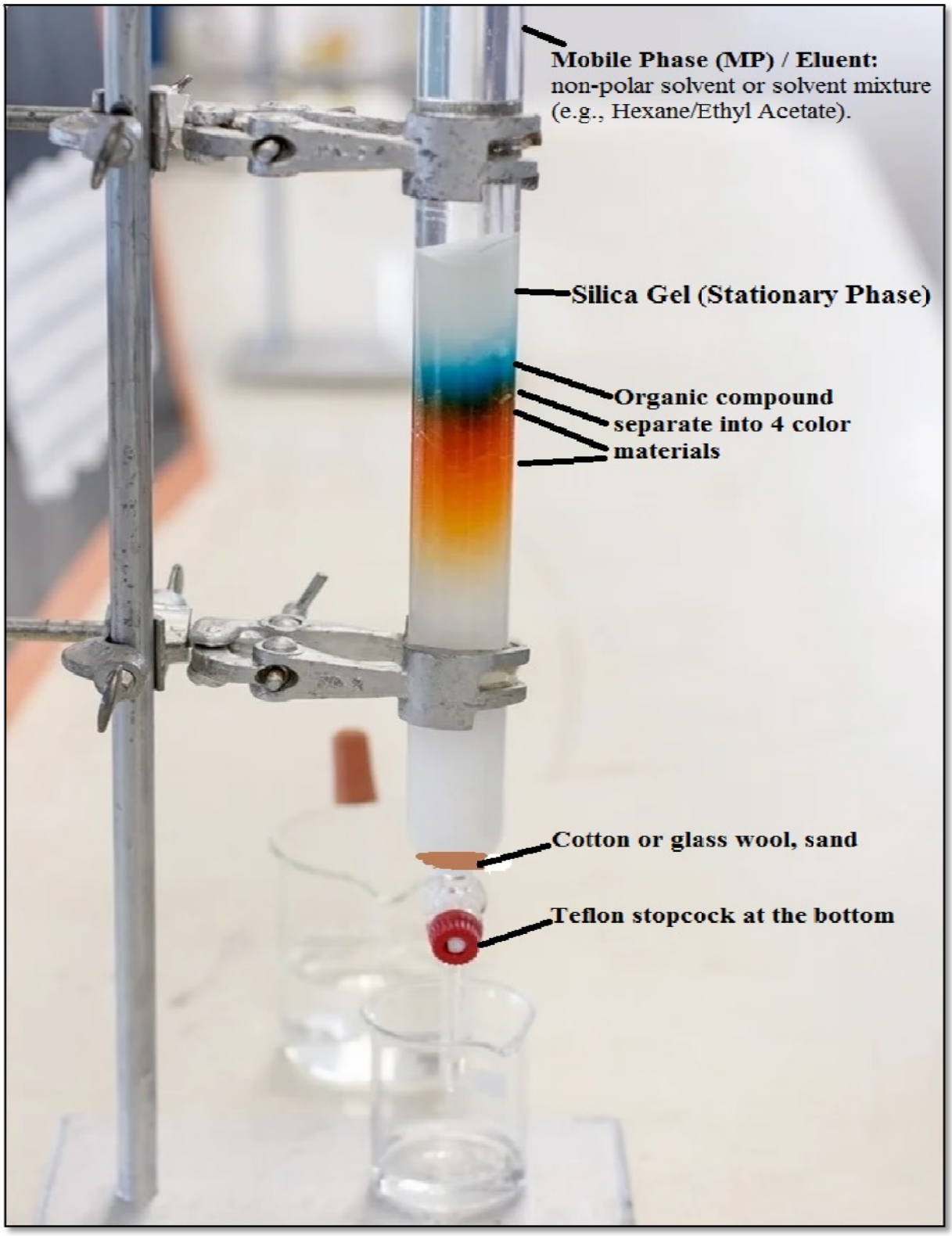
4. Elution and Collection

Start Flow: Add the initial mobile phase to the reservoir and apply gentle, continuous pressure (Flash Chromatography).

Separate: As the mobile phase moves down, components separate based on their affinity for the stationary phase. Less polar compounds move faster.

Collect: Collect the outflow (Eluate) into labeled fractions (test tubes).

Monitor and Pool: Use TLC (Thin-Layer Chromatography) to analyze the fractions. Combine (pool) the tubes containing the pure target compound.


Mobile Phase (MP) / Eluent:
non-polar solvent or solvent mixture
(e.g., Hexane/Ethyl Acetate).
Silica Gel (Stationary Phase)
Organic compound
separate into 4 color
materials
Cotton or glass wool, sand
Teflon stopcock at the bottom

Thin-Layer Chromatography (TLC)

Thin-Layer Chromatography (TLC) is a fundamental type of chromatography used for rapid separation and analysis. The separation process occurs through a thin layer of stationary phase (SP) coated onto an inert plate, typically made of aluminum, glass, or plastic.

The separation mechanism primarily relies on **Adsorption**, although Ion Exchange is also possible. The most common stationary phase used is Silica Gel (SiO_2).

Stationary Phase (SP): The thin layer coated onto the rigid plate (Silica Gel, Alumina, etc.).

Mobile Phase (MP): A solvent or a mixture of solvents in specific proportions contained in the developing chamber (TLC tank).

كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) هي تقنية أساسية وسريعة للفصل والتحليل الكيميائي.

- تتم عملية الفصل عبر طبقة رقيقة من الطور الثابت مُغطاة على لوح خامل (ألومنيوم، زجاج، أو بلاستيك)
- **آلية الفصل:** تعتمد بشكل أساسي على **الامتزاز (Adsorption)**.
- **الطور الثابت (SP):** الطبقة الرقيقة المطلية على اللوح، والأكثر شيوعاً هي **هلام السيليكا (SiO2)**.
- **الطور المتحرك (MP):** مُذيب أو خليط من المذيبات بنسب مُحددة يوضع في حوض التطوير (TLC tank).

Procedure of TLC

Preparation التحضير : A TLC strip (aluminum or glass plate) is prepared. The sample is applied as small spots (points) using a capillary tube, slightly above the level where the mobile phase will start.

Development التطوير : The strip is placed into the developing chamber (TLC tank) which contains the mobile phase at the bottom. The chamber is covered and left for a period ranging from minutes to an hour or two, depending on the speed of the mobile phase's movement.

Elution الإزاحة : The mobile phase moves up the stationary phase via capillary action, carrying the sample components at different rates.

Stopping الانتهاء **:** The mobile phase is monitored until it reaches near the top of the plate (the solvent front). The strip is then removed and allowed to dry briefly.

Visualization التظهير **:** The spots representing the mixture components are visualized using chemical reagents or light-based methods, such as Ultraviolet (UV) light at appropriate wavelengths.

خطوات العمل لتحضير كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة

1. **التحضير :**تُجهَّز صفيحة (شريطTLC) ، وتُوضع العينة عليها كـ **نقاط صغيرة** باستخدام أنبوب شعري، بحيث تكون أعلى بقليل من مستوى الطور المتحرك في الحوض.
2. **التطوير (Development):** يُوضع الشريط في حوض يحتوي على الطور المتحرك ويُغطى.
3. **الإزاحة (Elution):** يتحرك الطور المتحرك صعوداً عبر الطور الثابت بفعل **الخاصية الشعرية (Capillary Action)**، حاملاً معه مكونات العينة ومسبباً فصلها بمعدلات مختلفة.
4. **الانتهاء :**يُرفع الشريط عندما يصل الطور المتحرك إلى قرب حافة اللوح (جبهة المذيب)، ويُترك ليجف.
5. **التظهير (Visualization):** يتم الكشف عن البقع الممثلة لمكونات الخليط باستخدام طرق مختلفة، مثل **الأشعة فوق البنفسجية (UV light)** أو الكواشف الكيميائية.

الهدف :تُستخدم TLC لتحديد عدد مكونات الخليط، ومراقبة سير التفاعلات الكيميائية، وتحديد نظام المذيبات المناسب لكروماتوغرافيا العمود.

Quantitative Analysis: The Retardation Factor (R_f)

The characteristic analytical parameter in TLC is the **Retardation Factor (R_f)**.

The R_f value is calculated as the ratio of the distance traveled by the compound (analyte) to the distance traveled by the mobile phase (solvent front).

$$R_f = \frac{\textit{Distance traveled by the sample component}}{\textit{Distance traveled by the mobile phase (solvent front)}}$$

- **Value Range:** The value of Rf is always less than one (Rf<1).
- **Dependence:** The Rf value depends on the compound's **Distribution Coefficient (DK)** between the two phases and the specific characteristics of the mobile phase.

Optimal R_f Criteria

R_f Value	التأثير على العمود (Effect on Column)	النتيجة (Result)
0.0 – 0.1	The compound will bind strongly to the stationary phase and will not move (may never elute). **المُركَّب سيرتبط بقوة بالطور الثابت ولن يتحرك (قد لا يخرج أبداً).**	**Solvent System is Too Non-Polar.** (Unsuitable) **نظام المُذيب غير قطبي جداً (غير مناسب)**
0.3 – 0.5	The compound moves at an ideal rate. It separates from impurities and descends slowly enough to avoid band overlap. **المُركَّب يتحرك بمعدل مثالي. يُفصل عن الشوائب ويهبط ببطء كافٍ لتجنب تداخل النطاقات.**	**Ideal for Purification Process.** **مثالي لعملية التنقية.**
0.8 – 1.0	The compound will move too quickly with the mobile phase and will not separate from non-polar impurities. **المُركَّب سينتقل بسرعة كبيرة مع الطور المتحرك ولن ينفصل عن الشوائب غير القطبية.**	**Solvent System is Too Polar.** (Unsuitable) **نظام المُذيب قطبي جداً. (غير مناسب)**

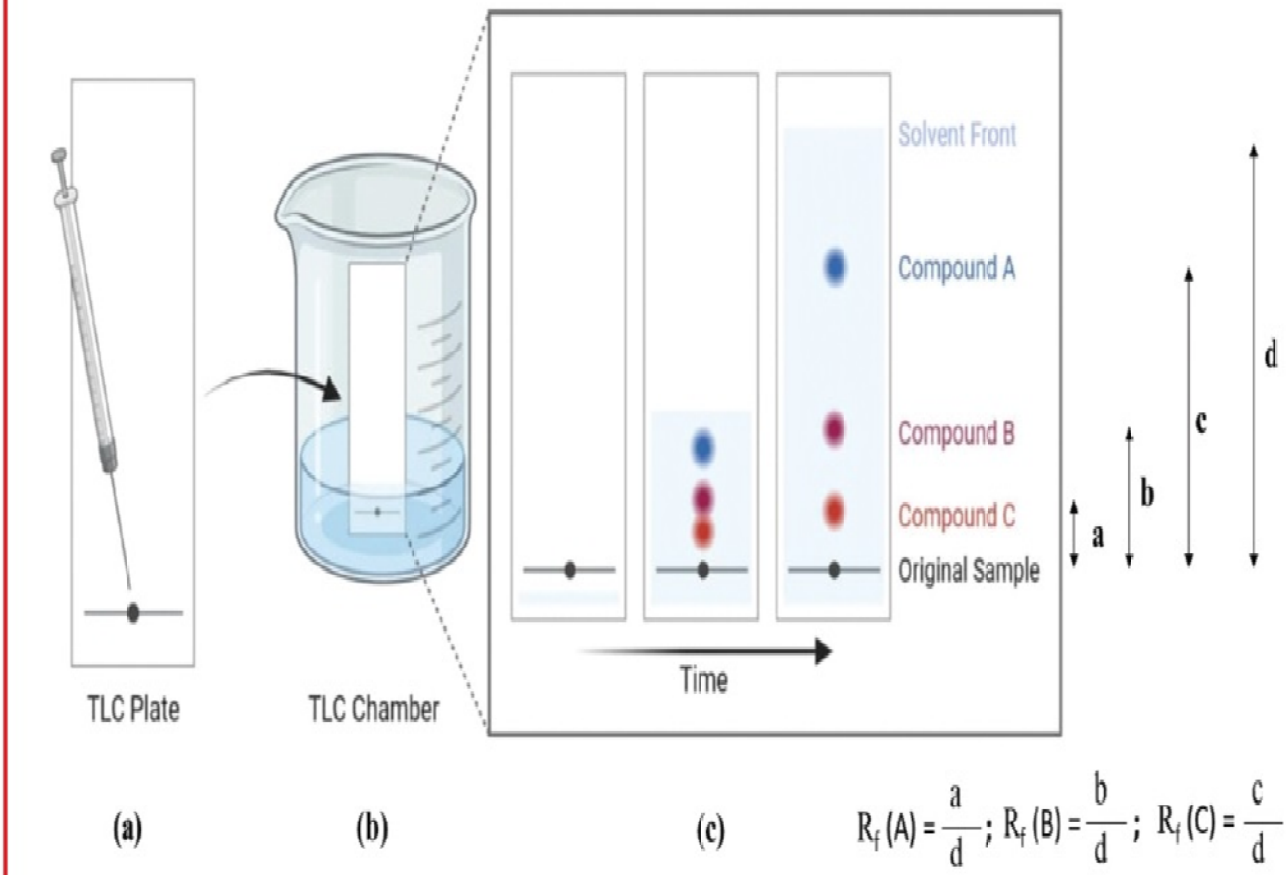
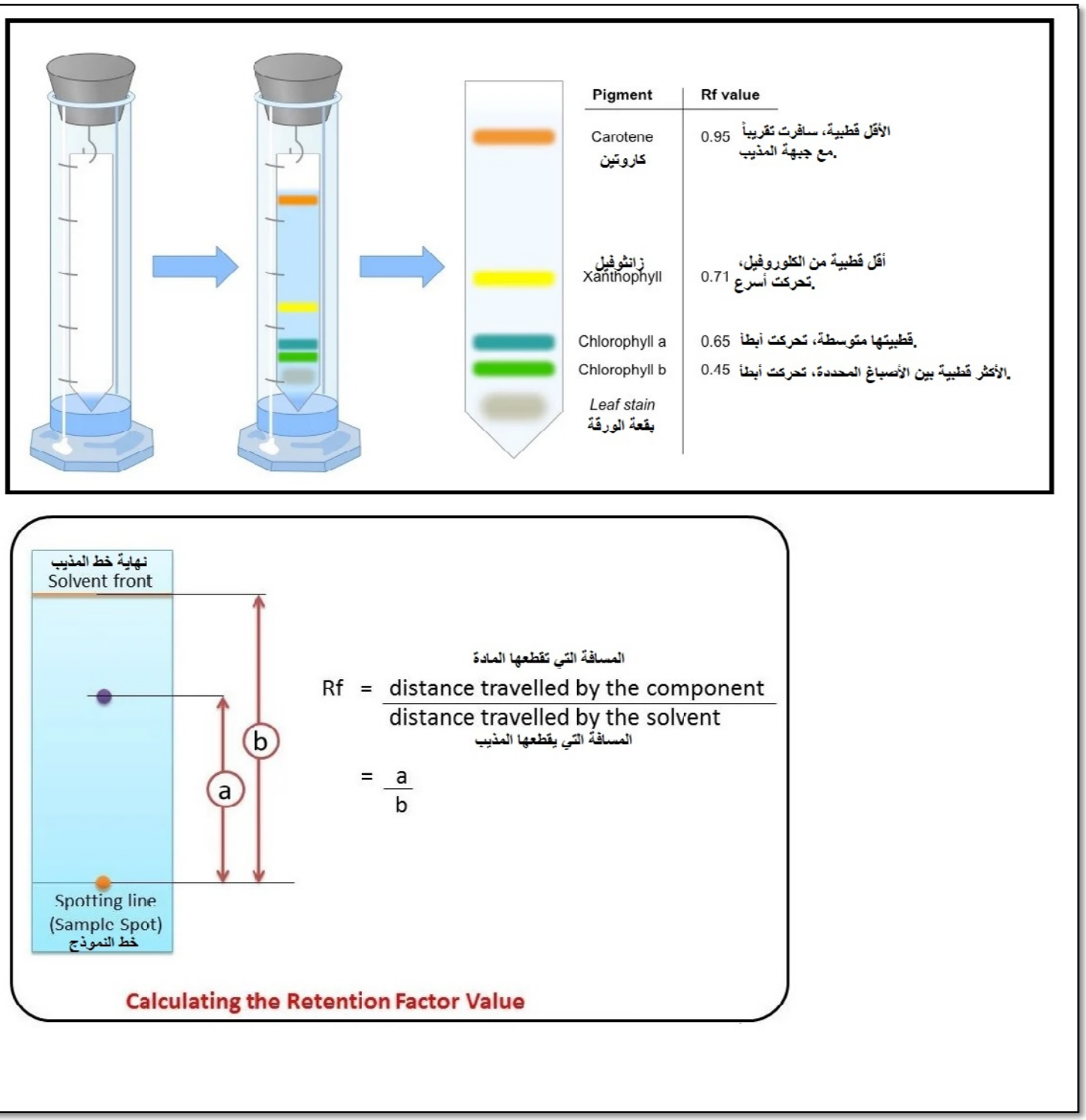
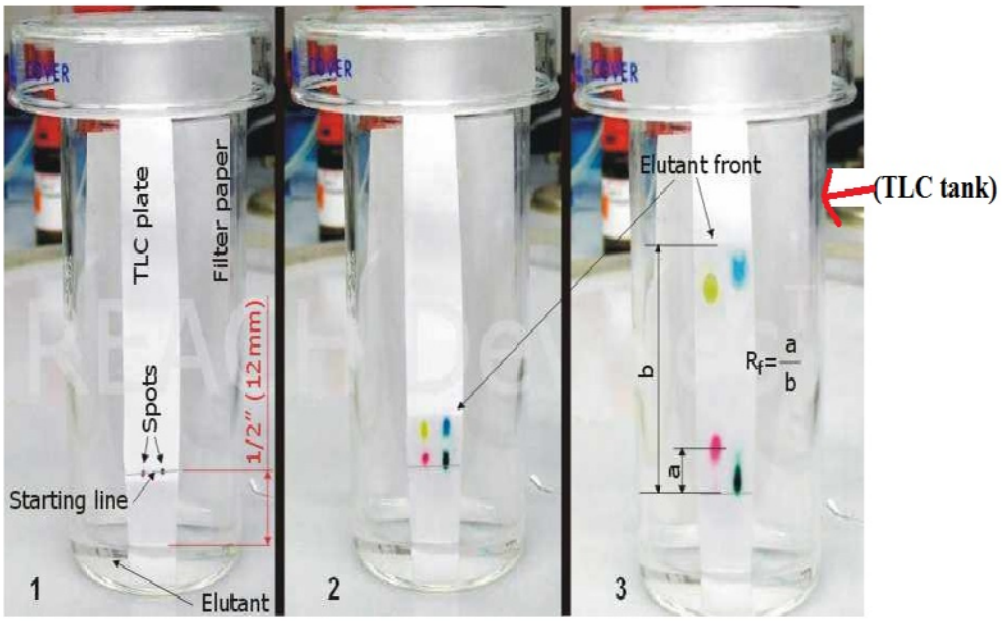
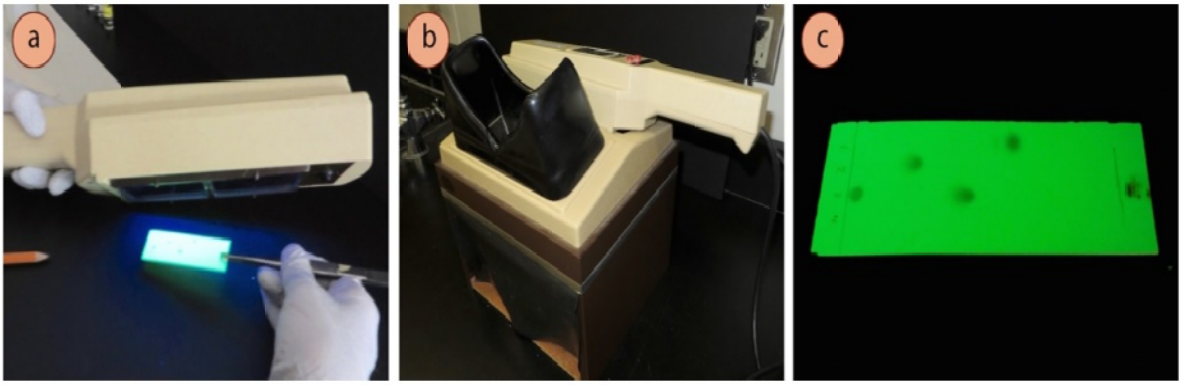


Figure . (a) Application of sample in TLC plate; (b) Development of TLC plate in chamber with suitable mobile phase; (c) Course of development of TLC plate.



تُستخدم قيم Rf التي تُحسب بقسمة مسافة البقعة على مسافة جبهة المذيب لـ **تحديد هوية المركبات** تحت ظروف فصل ثابتة. في هذا المثال، المركب ذو القطبية الأقل (الكاروتين) حصل على أعلى قيمة Rf، بينما المركب ذو القطبية الأعلى (الكلوروفيل ب) حصل على أقل قيمة Rf بين الأصباغ المفصولة بوضوح.

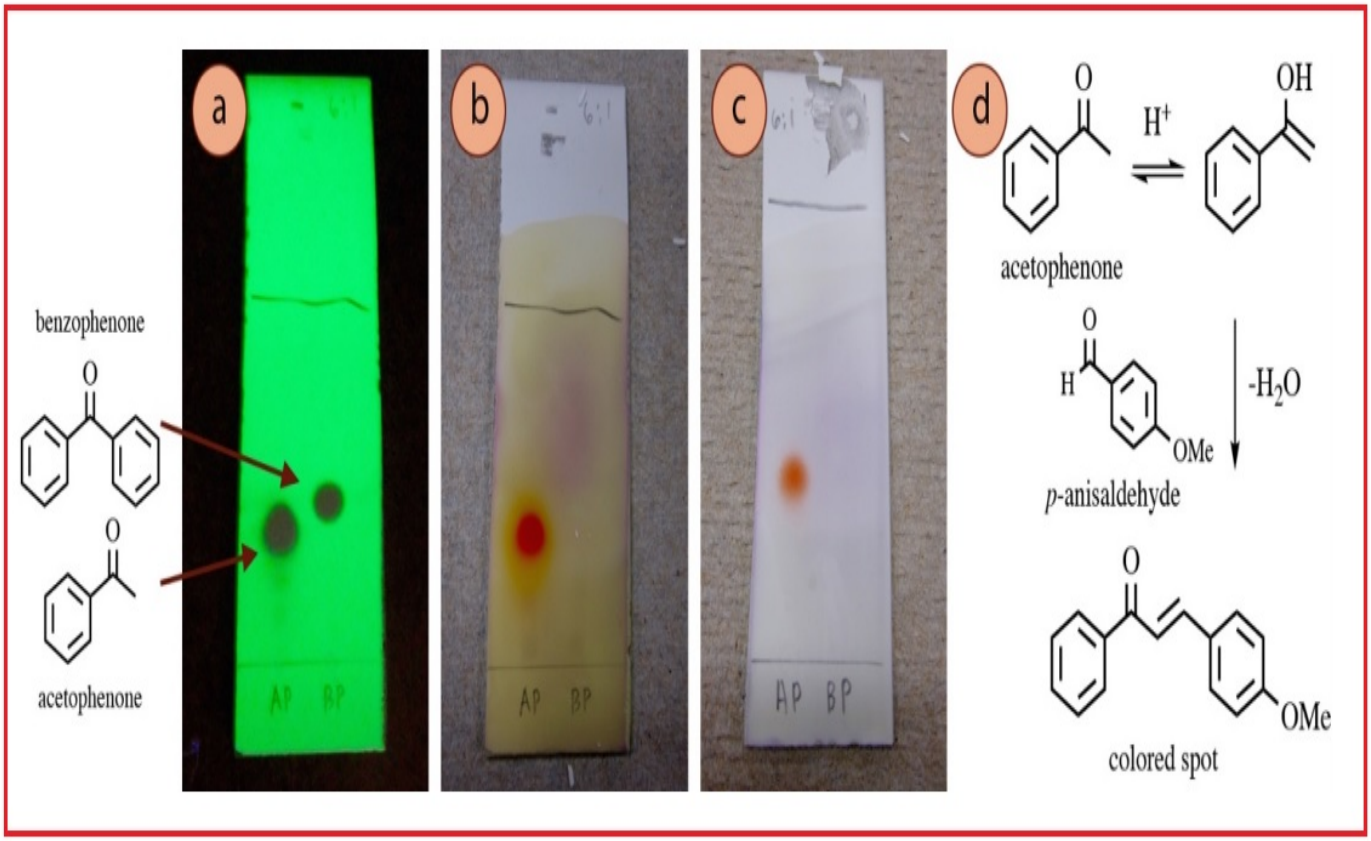




أ) مصباح الأشعة فوق البنفسجية لتوضيح لوحة TLC

ب) صندوق لحماية العينين من أضرار الأشعة فوق البنفسجية،

ج) المظهر تحت الأشعة فوق البنفسجية



Example, a TLC plate containing acetophenone and benzophenone(as seen with UV, Figure a), are stained with p-anisaldehyde and vanillin stains. Acetophenone produced a colored spot with these stains (Figures b+c) while benzophenone did not. The main difference is that benzophenone cannot form an enol, or be a nucleophile to p-anisaldehyde, so the stain is unreactive.

الأسيتوفينون والبنزوفينون كلاهما يمكن كشفه على صفيحة TLC باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (UV) لوجود **نظام الترافق (Conjugation)** في تركيبهما. لكن عند تلوينهما **بكواشف كيميائية حامضية مثل Anisaldehyde-p و Vanillin**، **يتفاعل الأسيتوفينون فقط وينتج بقعة ملونة**، بينما يبقى البنزوفينون غير متفاعل. يرجع هذا التباين إلى أن **الأسيتوفينون يمتلك بروتونات α** بجوار مجموعة الكربونيل، مما يسمح له بتكوين شكل الإينول (Form Enol) الذي يعمل كنوكليوفيل مهاجم للكاشف وتكوين مركبات ملونة جديدة. في المقابل، يفتقر البنزوفينون إلى بروتونات α (حيث تحيط بمجموعة الكربونيل حلقتان عطريتان)، وبالتالي لا يستطيع تكوين الإينول، مما يجعله غير تفاعلي مع هذه الكواشف.

الأسيتوفينون:(Acetophenone)

- صيغته تحتوي على مجموعة كربونيل مرتبطة بحلقة بنزين ومجموعة **ميثيل**.**(CH3)**
- مجموعة الميثيل هذه تحتوي على **بروتونات αحامضية** .(Alpha Protons)

- هذه البروتونات تسمح للأسيتوفينون بتكوين **شكل الإينول (Enol Form)** أو أنيون الإينولات (Enolate anion) في وجود الوسط الحامضي الناتج عن الكاشف:

Ketone⇌Enol

- هذا الشكل الإينولي (أو الأنيون) يعمل **كنوكليوفيل (Nucleophile) قوي**.
- **النتيجة:** يتفاعل الإينول أو أنيون الإينولات (المشتق من الأسيتوفينون) مع المجموعات الألدهيدية (CHO) الموجودة في الكاشفين p-Anisaldehyde و Vanillin عبر تفاعلات تكاثف، مما يؤدي إلى تكوين **مركبات ملونة** جديدة على الصفيحة بعد التسخين.

EXAMPLE: In a Thin-Layer Chromatography (TLC) experiment, a component spot migrated a distance of 1.5 cm from the origin. The solvent front, or the maximum distance the mobile phase traveled, reached 6.0 cm. Calculate the Retention Factor (Rf) for this compound.

Solution:

The R_F value is calculated as the ratio of the distance traveled by the component (spot) to the distance traveled by the solvent front:

$$\mathbf{R_f} = \frac{\textit{Distance traveled by the sample component}}{\textit{Distance traveled by the mobile phase (solvent front)}}$$

$$\mathbf{R_f} = \frac{1.5\ \text{cm}}{6.0\ \text{cm}} = \mathbf{0.25}$$

Example: Using a Highly Polar Solvent (MP)

separating a moderately polar drug compound on a standard Silica Gel (SP, highly polar) TLC plate, but using a very polar mobile phase, such as pure methanol.

Measurement	Value
Distance traveled by the spot (Dspot)	7.2 cm
Distance traveled by the solvent front (Dsolvent)	9.0 cm

Solution:

$$\mathbf{R_f} = \frac{7.2\text{cm}}{9.0\text{cm}} = \mathbf{0.8}$$

Interpretation: An R_f of 0.80 is very high. This result indicates that the **mobile phase (methanol)** was too polar, successfully overcoming the drug's interaction with the polar silica. The compound spent minimal time on the stationary phase, suggesting this solvent system would lead to **poor separation** in a column.

قيمة Rf البالغة 0.80 مرتفعة جدًا .تشير هذه النتيجة إلى أن الطور المتحرك (الميثانول) كان قطبيًا جدًا، متغلبًا بنجاح على تفاعل الدواء مع السيليكا القطبية .أمضى المركب وقتًا قصيرًا في الطور الثابت، مما يشير إلى أن نظام المذيب هذا سيؤدي إلى فصل ضعيف في العمود.

Example: Using a Non-Polar Solvent (MP)

Consider separating the same moderately polar drug compound on the same **Silica Gel** (SP) plate, but now using a very non-polar mobile phase, such as pure hexane

Measurement	Value
Distance traveled by the spot (Dspot)	0.4 cm
Distance traveled by the solvent front (Dsolvent)	8.0 cm

Solution:

$$\mathbf{R_f = \frac{0.4cm}{8.0cm} = 0.05}$$

Interpretation: An Rf of 0.05 is very low, meaning the compound barely moved from the baseline. The non-polar **mobile phase (hexane)** was **not strong enough** to displace the compound from the highly polar SP. For effective separation, a more polar solvent mixture (e.g., adding ethyl acetate to the hexane) would be required to increase the Rf to the optimal range (~0.25−0.40).

قيمة Rf تساوي 0.05، وهي قيمة منخفضة جدًا، مما يعني أن المركب بالكاد تحرك من خط الأساس .لم يكن الطور المتحرك غير القطبي (الهكسان) قويًا بما يكفي لإزاحة المركب من الطور المتحرك عالي الاستقطاب .(SP) لتحقيق فصل فعال، يلزم استخدام خليط مذيب أكثر قطبية (مثل إضافة أسيتات الإيثيل إلى الهكسان) لزيادة قيمة Rf إلى النطاق الأمثل (حوالي **0.3 – 0.5**)

Nature and Classification of Chromatographic Adsorbents in TLC

The strength of a **Stationary Phase (SP) Adsorbent** depends on its **chemical polarity**, **particle size**, and **moisture content**.

1. **Particle Size:** TLC uses **significantly finer particles** than column chromatography. Finer particles mean a **larger surface area** and more active sites, leading to stronger adsorption and better TLC separation.
2. **Adsorption Strength:** Adsorbents rank in decreasing order of power (retention ability): Alumina > Silica Gel > Magnesia > Calcium Carbonate>Sucrose >Starch

3. **Classification by Polarity:**

- **Polar Adsorbents** (Strong, e.g., Silica Gel): Retain solutes primarily through **hydrogen bonding** and **dipole-dipole interactions**.
- **Non-Polar Adsorbents** (Weak): Retention relies mainly on **van der Waals forces**.

4. **Role of Moisture and Activation:** Moisture content drastically changes the SP's behavior, especially for polar materials like silica gel:

- **High Moisture (~10–20%):** The system acts as **Partition Chromatography**, where the adsorbed water layer is the effective stationary phase.
- **Low Moisture (~4–6%):** The system acts as **Adsorption Chromatography**, with separation based on the surface energy of the solid.
- **Activation:** TLC plates are often **activated by heating** to remove excess water, ensuring the adsorbent is in its strong, active adsorption state.

5. **Use of Binders: Adsorbents are typically mixed with a** binder **(like gypsum) to help the material** settle quickly **and** adhere firmly **to the plate. Due to the rapid setting caused by the binder, the slurry must be applied immediately.**

تعتمد قوة **المادة المازة (الوسط الثابت - SP)** في TLC على ثلاثة عوامل رئيسية: **القطبية الكيميائية، حجم الجسيمات، ومحتوى الرطوبة**. تُستخدم في TLC جسيمات **أدق بكثير** من كروماتوغرافيا العمود لزيادة مساحة السطح وقوة الامتزاز. تُصنّف المواد المازة من الأقوى (مثل **الألومينا** والسيليكا جيل القطبية التي تحتجز عبر **الروابط الهيدروجينية**) إلى الأضعف (مثل النشا والمواد غير القطبية التي تحتجز عبر قوى فان دير فالس). يلعب **محتوى الرطوبة** دوراً حاسماً؛ فالرطوبة العالية (10–20%) تجعل الفصل يعتمد على **التوزيع**، بينما الرطوبة المنخفضة (4–6%) تجعله يعتمد على **الامتزاز** النشط، ولذلك تُفعّل صفائح TLC **بالتسخين** لإزالة الماء الزائد. وأخيراً، يُضاف **رابط (Binder)** مثل الجبس للمادة المازة لمساعدتها على الالتصاق بالصفيحة، ويتطلب ذلك فرد المعجون **فوراً** بسبب سرعة تصلبه.

Mobile Phase (Solvent) in TLC Chromatography

The **Mobile Phase (MP)**, or solvent, determines separation efficiency via its **Eluting Power**—its ability to move the solute by displacing it from the **Stationary Phase (SP)**.

- **Polarity Effect (Normal Phase):** For polar adsorbents (like Silica Gel), **increasing MP polarity increases eluting power**.
- **Retention:** A weak (non-polar) MP leads to weak **solute-solvent interaction** and strong **solute-adsorbent interaction**; the solute stays near the baseline (Rf is low).
- **Elution:** Adding a stronger (polar) MP increases the solute-solvent interaction, competing with the SP and causing the solute to move faster, thus **increasing the Rf value**.

الوسط المتحرك (المذيب) في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

يحدد **الوسط المتحرك (MP)**، أو المذيب، كفاءة الفصل من خلال **قوته الإيلافيّة**، وهي قدرته على إزاحة المادة المذابة من **الوسط الثابت (SP)**. في أنظمة الطور العادي (مثل السيليكا القطبية)، كلما زادت قطبية المذيب، زادت قوته الإيلافيّة. إذا كان المذيب ضعيفاً (غير قطبي)، تكون التفاعلات بين المادة المذابة والمذيب ضعيفة، وتبقى المادة مرتبطة بقوة بالوسط الثابت، مما يؤدي إلى انخفاض قيمة Rf (احتجاز قوي). أما إضافة مذيب أقوى (أكثر قطبية) فيزيد من التفاعل بين المادة المذابة والمذيب، مما يمكنه من التغلب على قوى الامتزاز، فتتحرك المادة المذابة أسرع، وبالتالي **تزداد قيمة Rf**.

The Eluotropic Series

The eluotropic series is a list of solvents ranked by their ability to elute compounds from a stationary phase in chromatography. It helps determine the appropriate mobile phase for a separation, with the order generally progressing from non-polar to polar solvents. The specific order depends on the stationary phase and the compounds being separated, as there is no single universal series.

- **Purpose:** To select a solvent or solvent mixture (mobile phase) for separating compounds in a chromatography technique like Thin Layer Chromatography (TLC).
- Solvents with higher eluting power are better at "pulling" compounds off the stationary phase. They do this by competing with the analyte for the active sites on the stationary phase. (Solvents are graded in an Eluotropic Series based on their increasing ability to elute (displace) compounds from an adsorbent.)
- The series generally goes from least polar to most polar solvents.

Least polar: Non-polar solvents like hexane.

Most polar: Polar solvents like ethanol, methanol, or water.

Increasing Eluting Power →
Weak (Non-Polar): Light petroleum, Cyclohexane, Toluene

Intermediate: Ether, Ethyl acetate, Acetone

Strong (Highly Polar): Ethanol, Water, Acetic acid

- **NOTE:** The specific order of solvents in an eluotropic series is not fixed and depends on:

The stationary phase being used (e.g., silica gel or alumina).

The chemical properties of the compounds being separated.

- **Solvent Selection:** A mixture of solvents is typically used. A major solvent in which the solute is slightly soluble is modified by adding a small amount of a more polar solvent to tune the eluting power and achieve an optimal Rf (e.g., 0.25 to 0.40).

المتسلسلة الإيلافيّة (Eluotropic Series)

المتسلسلة الإيلافيّة هي **قائمة بالمذيبات** مُرتبة حسب **قوتها الإيلافيّة** (قدرتها على إزاحة المركبات من الوسط الثابت)، وهي أساس اختيار الوسط المتحرك (MP) في الكروماتوغرافيا. تزداد القوة الإيلافيّة للمذيب بزيادة **قطبيته** (في أنظمة الطور العادي مثل السيليكا)، حيث يتنافس المذيب الأقوى مع المادة المذابة على مواقع الامتزاز، مما يزيد من سرعة حركة المادة (زيادة Rf). تُقسم السلسلة عمومًا من المذيبات **الضعيفة** غير القطبية (مثل الهكسان) إلى **القوية** القطبية (مثل الماء). يتم استخدام خليط من المذيبات لضبط هذه القوة والحصول على Rf أمثل (عادةً 0.25 إلى 0.40) للفصل الجيد.

Nature of solute

The **functional groups** play a big role in the **migration of a solute**. The presence of polar groups will lead to low migration. Also the **configuration & conformation** ex. cis & trans have effect on the migration because they will determine the way of attachment of the functional groups to the adsorbent.

Nonpolar groups: CH_3-, CH_2O-, $Ph-$, CH_2CH_2-

Polar groups: $-CO_2H$, $-OH$, $-NH_2$, $-SO_3H$, PO_3H_2-

The relationship between the **molecular weight & adsorption** has a rule which states that within a similar series the adsorption increase with an increase in the molecular weight & this what is called **Traubes rule**. As the adsorption increase the Rf value will decrease.

Natural products may be "**tracked**" by running analytical TLC of fractions from other separation processes, such as column chromatography, HPLC. More than one solvent system should always be used for TLC separation, as even apparently "pure" spots may consist of several compounds with identical Rf values. The similarity of different extracts from the same species can also be assessed in this way & the decision to combine nonpolar & polar extracts can be made on the basis of identical or similar TLC chromatogram.

طبيعة المادة المُذابة (Solute) وتأثيرها على الفصل الكروماتوغرافي

تؤثر **الخصائص الكيميائية للمادة المُذابة** بشكل كبير على هجرتها في الكروماتوغرافيا (TLC والعمود). تلعب **المجموعات الوظيفية** دوراً أساسياً: فوجود المجموعات **القطبية** (مثل $-CO_2H$, $-OH$, $-NH_2$, $-SO_3H$, $-PO_3H_2$) يؤدي إلى **امتزاز أقوى** على الوسط الثابت القطبي (مثل السيليكا) وبالتالي إلى **هجرة منخفضة** (Rf قليل)، بينما المجموعات غير القطبية (مثل CH_3-, CH_2O-, $Ph-$, CH_2CH_2-) تؤدي إلى هجرة أعلى. كما يؤثر **الشكل الفراغي (Conformation)** للمركب (مثل cis و trans) على تفاعله مع المادة المازة. ووفقاً لـ **قاعدة تروب (Traubes rule)**، ضمن سلسلة متجانسة من المركبات، يزداد الامتزاز بزيادة **الوزن الجزيئي**، مما يؤدي إلى **انخفاض قيمة Rf**. في التطبيقات العملية، يتم استخدام TLC لمتابعة نواتج الفصل (Tracking) من تقنيات أخرى (GC،HPLC)، ويجب استخدام **أكثر من نظام مذيب** للتأكد من نقاء البقعة، لأن بقعتين مختلفتين قد تعطيان نفس قيمة Rf في مذيب واحد.

Traube's Rule

Traube's Rule states that within a **homologous series** of compounds, **adsorption onto the stationary phase (SP) increases as the molecular weight increases**. This is because the addition of non-polar groups (CH2 units) strengthens the overall **van der Waals forces** between the solute and the SP. Consequently, compounds with higher molecular weight will exhibit **stronger retention** and a **lower Rf value**. For instance, in separating a series of carboxylic acids on polar silica gel, the largest acid (Hexanoic Acid, C6) will be retained the most and have the lowest Rf.

Example (Homologous Series):

If you separate a series of straight-chain carboxylic acids (R-COOH) on a polar stationary phase (Silica Gel):

Acetic Acid (C2) → Butyric Acid (C4) → Hexanoic Acid (C6)

CH3COOH → $CH_3CH_2CH_2COOH$ → $CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$

The **Hexanoic Acid (C6)** will have the **strongest adsorption** (lowest Rf) because its larger non-polar tail contributes more van der Waals forces to the overall adsorption process compared to the smaller acids.

تنص **قاعدة تروب (Traube's Rule)** على أنه ضمن **سلسلة متجانسة** من المركبات العضوية، فإن **الامتزاز على الوسط الثابت (SP) يزداد بزيادة الوزن الجزيئي**. يرجع ذلك إلى أن إضافة المجموعات غير القطبية (مثل وحدات CH2) تُعزز القوة الكلية لـ **قوى فان دير فالس** بين المادة المذابة والوسط الماز. وبالتالي، فإن المركبات ذات الوزن الجزيئي الأعلى تُظهر **احتجازاً أقوى** و**قيمة Rf أقل**. على سبيل المثال، عند فصل سلسلة من الأحماض الكربوكسيلية على السيليكا القطبية، سيكون الحمض الأكبر (Hexanoic Acid) هو الأكثر امتزازاً والأقل في قيمة Rf.