المحاضرة العاشرة

الكروماتوغرافيا Chromatography

10-1.تعريف :الفصل الكروماتوغرافي يعرف باللغةِ العَربية باسمِ (الاستشراب)، وأيضاً يطلقُ عليه مسمى تفريق الألوان، وهو عبارةٌ عن طريقةٍ تستخدمُ لفصلِ المواد، والعناصر الكيميائيّة المختلطة مع بعضها البعض، وتعتمدُ على فكرة توزيع المكوّنات الكيميائيّة على نسبٍ مختلفةٍ من الممكن فصلها بسهولةٍ طالما توفّرت كافة الأدوات والوسائل التي تساعدُ في ذلك، ومن الأمثلة على المواد التي من الممكن فصلها: فصل المواد الصلبة عن السائلة، وفصل المواد الصلبة عن الغازيّة.

تعودُ الدراسات الأولى المرتبطة بهذا الأسلوب في فصلِ المواد الكيميائية إلى عام 1901م، عندما قام عالم الكيميائيّ تسويت بمُحاولةِ فصلِ أصباغ النباتات عن بعضها البعض، وأطلق عليها مسمّى الكروماتوجراف نسبةً إلى كلمةِ كروما ومعناها اللون، أما كلمة جراف فمعناها الكتابة، وبعد ظهور العديد من التطوّرات الكيميائيّة في مجالِ دراسة طُرق الفصل بين العناصر أصبحت طريقة الكروماتوجرافيّة من أهمّ الطُرق الناجحة في الفصل بين العناصر الكيميائيّة.

وتعتمد على توزع المواد في مزائجها بين طورين:

1.الطور المتحرك (Mobile phase) :وهو يمارس فعل الطرد والتحريك، إما أن يكون سائل (الكروماتوغرافيا السائلة) أو غاز (الكرماتوغرافيا الغازية).

2.الطور الساكن (Stationary phase) :وهو يمارس فعل الاحتجاز والتأخير،إما أن يكون مادة صلبة عارية أو مغطاة بطبقة من مادة بوليميرية تعطيها صفة ساكنة كالسيليكا او الألومينا (اوكسيد الألمنيوم).

10-2. طُرق الفصل الكروماتوغرافي:

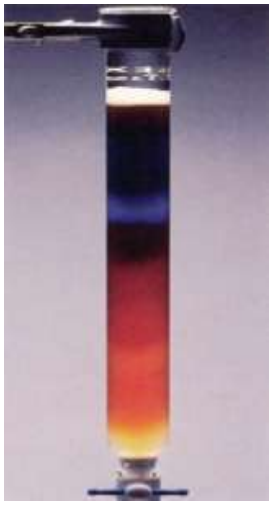
يعتمدُ أسلوبُ الكروماتوغرافية في فصلِ المواد الكيميائيّة على مجموعةٍ مِن الطُرق، وهي:

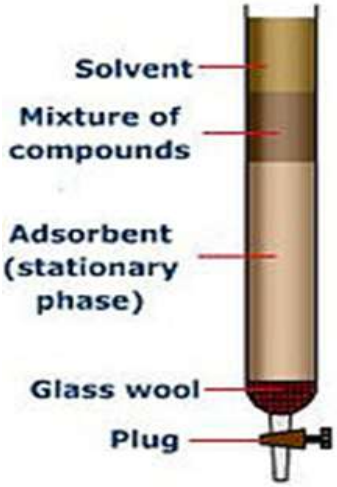
10-2-1. الكروماتوغرافيّة العموديّة Column Chromatography :

هي من الطُرق التي تستخدم في فصلِ المواد الكيميائية السائلة، والصلبة وأُطلق عليها مسمى كروماتوغرافية عموديّة؛ بسبب استخدام عمودٍ زجاجي يشبه السحاحة قطرة 3 سم وطوله حوالي 50 سم وفي نهايته صنبور (صمام) كما يوضع في طرفة السفلي قطعة من القطن أو الصوف الزجاجي ويملا العمود إما بحبيبات من الألومينا «Al2O3» الصلبة أو السليكا جل أو هلام السيليكا والتي تمثل الطور الثابت أو الحبيبات الدعامة الصلبة المغطاة بطبقات رقيقة من سائل يمثل الطور المتحرك. الشكل(10-1)

،يوضع محلول العينة في عمود مملوء بالسيليكا جل. و أثناء سير المحلول خلال العمود فإن مكونات العينة تتفاوت في سرعتها في الوصول إلى أسفل العمود و بالتالي يصبح العمود معلماً بحلقات أفقية ملونة كل منها يمثل احد مكونات محلول العينة.

وغالبا ما تستخدم في التطبيقات التحضيرية على مقاييس دقيقة تبدا من ميكروغرام وتصل إلى كجم. والميزة الرئيسية لكروماتوغرافيا العمود هو التكلفة المنخفضة نسبيًا.





الشكل (10-1) كروماتوغرافيا العمود

طريقة إجراء التجربة:

ليكن بفرض لدينا مزيج مكون من مادتين وأردنا إجراء عملية الفصل فإن تسلسل عملية الفصل ستكون على النحو التالي:

1. توضع المادة المراد فصلها على هيئة محاليل مذابة في الماء في قمة العمود ويفتح الصنبور فينساب المذيب حتى يتم امتزاز أو تجزئة المواد المراد فصلها حسب نوع الطور الثابت المستخدم

2.بعد ذلك يضاف قليل من المذيب أعلى العمود فتأخذ المواد المراد فصلها في التحرك بسرعات نسبية مختلفة وتظهر بعد ذلك عدة مناطق ملونة بعد ان كانت منطقة واحدة أعلى العمود وبمرور الوقت يحدث الفصل التام لمكونات المادة المراد فصلها ويصبح لكل مادة منطقة خاصة بها وفي حالة استخدام مواد غير ملونة فان هذه المناطق لا ترى بالعين المجردة ولكن يستدل على وجودها باستخدام الكواشف الكيميائية.

. 3.ونقوم بتسجيل الزمن تباعًا لحظة خروج أول قطرة وآخر قطرة للمادة الأولى من العمود، ثم نحسب الزمن الوسطي لخروج المادة الأولى، حيث يعبر الزمن الوسطي لخروج المادة عن أعلى تركيز لها، ونفس الأمر بالنسبة للمادة الثانية وهكذا..

4. بعد الانتهاء من عملية الفصل يصبحَ العمود الزجاجي فارغاً، وجاهزاً لعمليّة فصلٍ جديدة.

10-2-2. الكروماتوغرافيا السائلة:

هي طريقة الفصل التي تستخدمُ في فصلِ المواد الكيميائية السائلة عن غيرها من المواد الأخرى، وتتطلب هذه العملية استخدام عمودٍ زجاجي كما في الفصلِ العمودي، ولكن تساعدُ في فصلِ المواد الصلبة ذات المكونات الصغيرة جداً، عن المواد السائلة المختلطة معها، ويعتمدُ تحقيق نجاح عملية الفصل هذه على مجموعةٍ من الأمور، وهي: استقرار المواد الكيميائية داخل العمود. المسافة التي تربطُ بين أجزاء، ومكونات المواد الكيميائيّة. معدل الضغط داخل العمود الزجاجي فكلّما كان الضغطُ مرتفعاً، كلما ساهم ذلك في سرعة تطبيق الفصل بين مكوّنات العناصر الكيميائيّة.

تختلف الكروماتوغرافيا السائلة عن الطرق الأخرى بأن الطور الساكن مؤلف من مادة خاملة مثل السيليكا أو البولي سيتارين المحتوي على مكونات أيونية مثل مجموعات الكربوكسيل أو مجموعات الأمونيوم، حيث يمكن أن تتبادل المكونات الأولية في العينة المارة في العمود مع

المكونات الأيونية في الطور الساكن مؤدية إلى فصلها عن مكونات العينة الأخرى، يستعمل في كروموتوغرافيا العمود عادة الزجاج لدعم الطور الصلب.

10-2-3.الكروموتوغرافيا السائلة ذات الاداء العالي :(HPLC) :

الأهميه لكروماتوغرافي السائل عالي الأداء ترجع إلى ان بعض المواد ليست بطياره كفاية بحيث تستطيع فصلها بكروماتوغرافي الغاز وتتطلب درجات الفصل العاليه اتزانات مكتمله للمذابات بين الاطوار لهذا يستخدم جسيمات دعم صلبه صغيره جدا وطبقات رقيقه من الطور السائل وحشوه مترابطه لتلك الجسيمات واقطار اعمده صغيره ايضا. الجسيمات المذكوره اعلاه تعطي درجات فصل افضل بسبب:

السريان المتجانس خلال العمود.

المسافه التي ينتشر من خلالها المذاب في الطور المتحرك في مستوى الجسيمات.

معدل السريان الأفضل والذي يكون اسرع بالنسبه للجسيمات الصغيره بسبب انتشار المذاب خلال مسافات اصغر،وكذلك يفضل استخدام ضغط عالي حيث يؤدي استخدام ضغط قدره 1000 ps7000-الى انتاج معدل سريان0.5

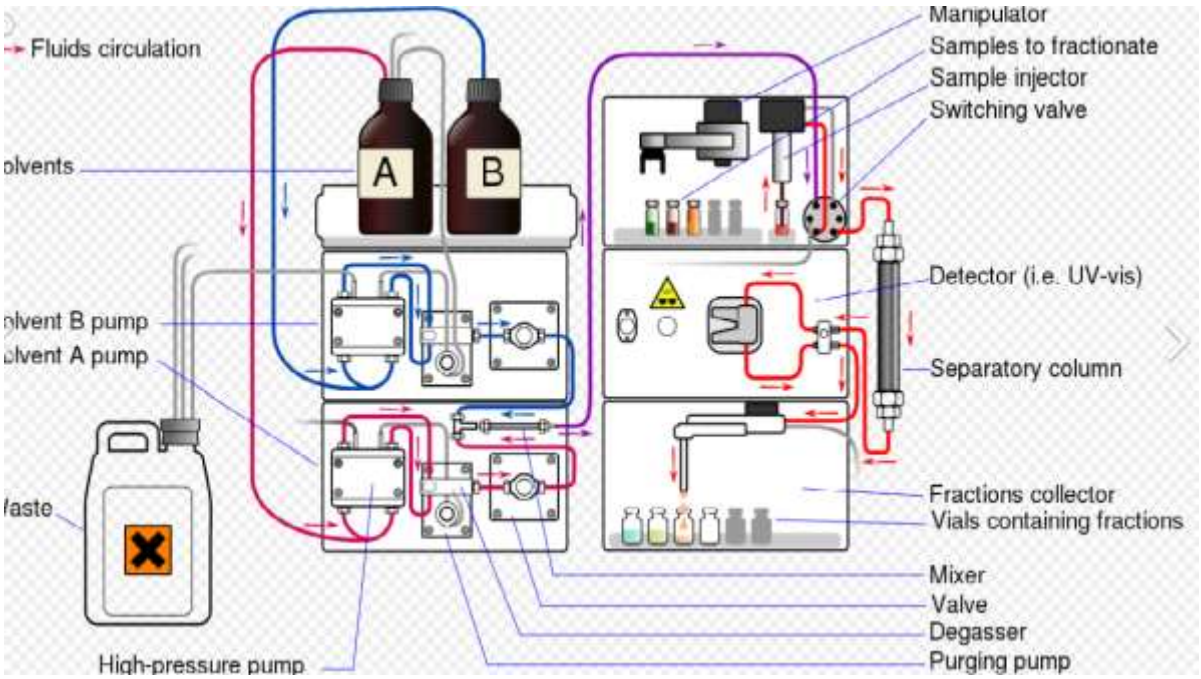
مكونات الجهاز:

يتكون الجهاز من الاقسام التالية حسب الشكل (10-2)

1. وعاء الوسط المتحرك (mobile phase reservoir): هو دورق (flask)، أو مجرد وعاء تجاري بشرط أن يكون نقيًا نظيفاً مفرغًا من الهواء والغازات؛ حتى لا يتسبب في خطأ في التحليل. كما يجب تنقيته من الشوائب عند إعداد الوسط المتحرك؛ لمنع تعطل الجهاز والخطأ في التحاليل.

2. نظام توصيل المذيب (solvent delivery system): هو مضخة لضمان السريان الحر للوسط المتحرك بشكل مستمر ودقيق وبنبضٍ ثابت. هناك نوعان يستخدمان في HPLC: مضخة حقنية ذات مسمار (screw-driven syringe type)، وهي بالرغم من امتيازها

بسهولة التحكم في معدل السريان إلا أنها غير مناسبة لتغيير المذيب. تتكون المضخة المزدوجة الترددية ذات المكابس (Reciprocating piston) من غرفة أسطوانية تُملأ وتُفرغ بواسطة الحركة الأمامية والخلفية للمكابس، وتشمل مزايا هذه التقنية حجمها الداخلي الصغير الذي يراوح بين 35 إلى 40 ميكرولتر، مع ضغط خارجي كبير يصل إلى 10000 رطل لكل بوصة مربعة (psi). من استخدامات الجهاز المهمة، الفصل المتدرج (gradient elution) بمعدلات سريان ثابتة حيث لا تتأثر– بشكل ملحوظ– بأي من؛ الضغط العكسي للعمود (column back–pressure) ولا لزوجة المذيب.



الشكل (10–2) الكروموتوغرافيا السائل ذات الاداء العالي (HPLC)

3. **نظام إدخال العينة:** يمكن أن يكون آلي أو يدوي ويستخدم صمامات، عند فتحها يمكن ملأ تجويف العينة (loop sample) بحجم من 10 إلى 50 ميكرولتر. وعند غلق الصمامات تذهب العينة إلى مجرى الوسط المتحرك ذي الضغط العالي حيث يُرسل إلى العمود حيث يتم تحليلها. يجب أن تكون العينة في حالة سائلة وتُذاب في محلول إذا كانت في حالة صلبة، حيث يكون المذيب منسجمًا مع الوسط المتحرك والثابت، وتُحقن العينة بكمية تتراوح من 1لـ100 ميكرولتر.

4. **العمود:** هو قلب الجهاز، حيث تحدث عملية الفصل. عادةً ما يكون مصنوعًا من الفولاذ غير قابل للصدأ ومضاد للتآكل وينقسم إلى نوعين:

١- الأعمدة التحليلية: هي النوع الأساسي وتوجد في جميع الأجهزة ويتراوح طولها من 5 إلى 25 سم وبقطر داخلي من 3 مم إلى 5 مم محشو بمادة الوسط الثابت وهي جزيئات بحجم 5 ميكرومتر.. وفي الثمانينات، تطورت سرعة الفصل بسبب تقليل القطر وزيادة الطول.

٢- الأعمدة الأولية (precolumns): وتنقسم إلى نوعين. الأول، العمود النابش للفضلات (scavenger column) ويقع بين منطقة حقن العينة ووعاء الوسط المتحرك ويقوم بتحسين جودة الوسط المتحرك، والثاني، العمود الحارس (Guard column) ويقع بين العمود التحليلي ومنطقة حقن العينة ويقوم بإزالة الشوائب من المذيب. كما ينقسم حشو العمود المُستخدَم في هذا الجهاز إلى نوعين: حزم مُغلَفة (pellicular) وهي بوليمرات على هيئة خرزات كروية وغير مسامية يتراوح قطرها من30 إلى 40 مم، مُغلَفة بطبقة رقيقة مسامية من السيليكا أو الألومينا أو الراتنج القادر على التبادل الأيوني (Ion-exchange resin)، والذي يستخدم الآن لفصل البروتينات والجزيئات الحيوية كبيرة الحجم، والنوع الآخر من الحشو هو الحشو المسامي، وعادة يحتوي على جزيئات صغيرة يتراوح قطرها بين 3ل10مم وتتكون من السيليكا أو الألومينا أوالراتنج القادر على التبادل الأيوني والسيليكا تُعتبَر أكثر المواد المُستخدَمة شيوعًا في حشو العمود وأحيانًا تُحاط بطبقة عضوية رقيقة ترتبط بالسطح الداخلي للعمود كيميائيًا أو فيزيائيًا).

5. **الكاشف (detector):** وظيفته مراقبة المواد المُذابة المراد استخلاصها عند خروجها من العمود؛ فهو يبعث إشارات كهربائية تتناسب مع مستوى خاصية معينة لدى مادة الوسط المتحرك أو للمادة المُستخرَجة. وهناك الكثير من الأنواع:

- كاشف الأشعة البنفسجية (U.V. absorbance detectors)
- الكاشف الفلوريسيني (fluoresce detectors)
- الكواشف الكهروكيميائية (electrochemical detectors)
- كواشف التوصيلية (conductivity detectors)

- كواشف معامل الانكسار (refractive index detectors)
- مطياف الكتلة (mass spectrometer)

6. **الأنابيب الرابطة:** هي مصنوعة من مادة خاملة لا تتفاعل مع مادة الوسط المتحرك والمذيبات، وتكون في العادة مصنوعة من الحديد غير قابل للصدأ أو من البلاستيك الخامل.

7. **جهاز حاسوب أو مسجل:** يستخدَم كجهاز مُجمِع للبيانات؛ حيث يكون متصلًا بالكاشف فيلتقط الإشارات الإلكترونية الآتية منه ثم يقوم بتحليلها وإخراجها في شكل رسوم بيانية تسمى كروماتوغرام (chromatogram).

8. **وعاء الفضلات.**

ما هي أنواع الجهاز؟

1. **الكروماتوغرافيا التجزيئية – (partition chromatography):**

من أكثر الأنواع استخدامًا ويتكون الوسط الثابت من سائل غير قابل للذوبان في سائل الوسط المتحرك، ويتفرع هذا النوع إلى فرعين. الأول « liquid–liquid partition chromatography»، حيث تُثبت جزيئات الوسط الثابت فيه على سطح مواد الحشو بالامتزاز. الثاني «liquid–bonded–phase chromatography» حيث يتشكل الوسط الثابت فيه من أنواع عضوية ترتبط كيميائيًا بسطح مواد الحشو.

2. **كروماتوغرافيا الامتزاز (adsorption chromatography):**

هو الطراز القديم للكروماتوغرافيا السائلة، ويتضمن الكثير من التقنيات والمبادئ التي تُطبق على النوع التجزيئي (حيث يعتمد على الامتزاز في عملية الفصل أيضًا) تُطبق أيضًا على هذا النوع، أما الوسط الثابت فهو من السيليكا أو الألومينا فقط.

3. كروماتوغرافيا الأيونات (Ion chromatography):

يتميز هذا النوع بأن الوسط الثابت فيه عبارة عن راتنج مُبادِل للأيونات، سواء الأنيونات أو الكاتيونات. يوجد في العمود ويُستخدم لفصل الأنواع المشحونة، وتتم عملية الكشف عبر القياسات التوصيلية.

4. كروماتوغرافيا الأحجام (size-exclusion Chromatography):

كروماتوغرافيا الأحجام أو كروماتوغرافيا الجل،. تنطبق على الأنواع ذات الحجم الجزيئي الكبير، ومواد الحشو تحتوي على جزيئات صغيرة من السيلكا أو البوليمر التي تحتوي على شبكة من الثقوب؛ حيث تستطيع جزيئات المُذيب والمُذاب الإنتشار.

5. كروماتوغرافيا الانجذاب (affinity chromatography):

يُستخدَم في هذا النوع كاشف (reagent) يسمى ربيطة الانجذاب (affinity ligand). ويكون مرتبطًا بشكل تساهمي بدُعامة صلبة. الربيطة، هي- عادة، أجسام أو مثبطات إنزيمات أو أي مواد تستطيع الارتباط بشكل انتقائي بالجزيئات المُراد تحليلها من العينة حين مرورها، حيث تستطيع هذه الجزيئات الانجذاب أو الارتباط بربيطات الانجذاب ويتم احتجازها في العمود.

6. كروماتوغرافيا عديمة التناظر (chiral chromatography):

يعتبر هذا النوع من أكبر التطورات في تقنية الكروماتوغرافيا؛ حيث تمكن هذه التقنية من فصل المواد حسب التناظر المرآتي (chirality). هنا، عامل الفصل قد يكون مادة مضافة إلى الوسط المتحرك أو العامل نفسه وهو الوسط الثابت. يبقى الشرط المهم أن يكون له نفس الخصائص التناظرية لإحدى الأشكال، ليتمكن من فصلها.

بالمقارنة مع جهاز «GC»:

يتميز جهاز «GC» عن جهز «HPLC»، بالسرعة والبساطة في التركيب..وفي المقابل يمتاز «HPLC» عن جهاز «GC» بالقدرة على التعامل مع المواد غير القابلة للتطاير، بما فيها الأيونات غير العضوية والمواد غير المستقرة حراريًا والتي لا يستطيعها الأخير.