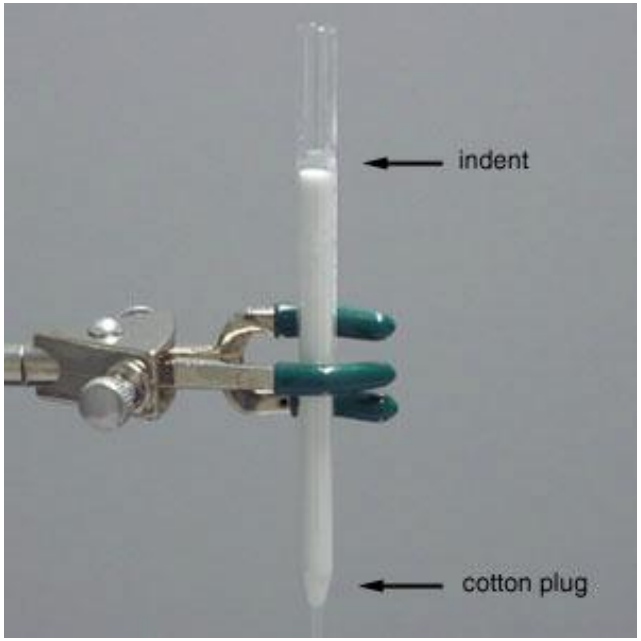
الفصل الثامن عشر:
الطرق الكروماتوجرافية العمودية – السائلة
Liquid Column Chromatography



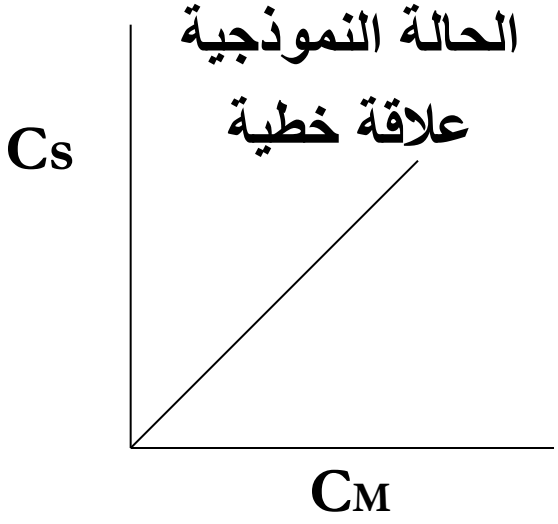
الطرق الكروماتوجرافية العمودية- السائلة

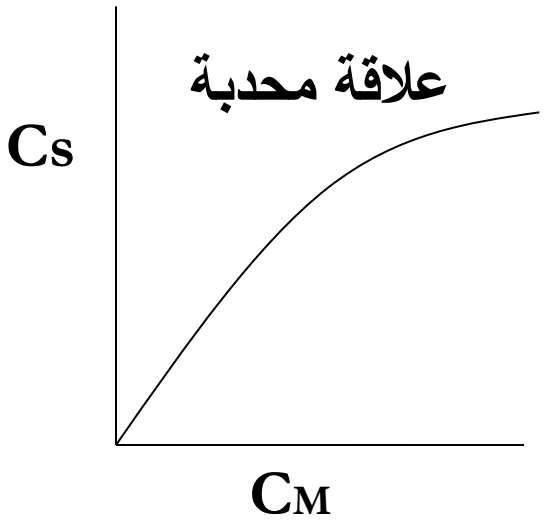
- تشمل جميع الطرق الكروماتوجرافية التي يستخدم فيها عمود و يكون الطور المتحرك عبارة عن سائل.
- تستخدم هذه الطرق لفصل المواد ذات الجزيئات الكبيرة أو الايونية أو المواد غير الثابتة حرارياً التي تتفكك عند تبخيرها.
- تستغرق الطرق الكروماتوجرافية السائلة التقليدية زمناً طويلاً لان سرعة سريان الطور المتحرك بطيئة و أمكن تسريعها باستخدام الطرق الكروماتوجرافية السائلة ذات الضغط العالي.
- هذه الطرق مناسبة لفصل كميات تتراوح بين نانوجرام الى جرام.
- تمر المواد عبر العمود بسرعات مختلفة نتيجة لاختلاف ذوبانها أو حجم جزيئاتها أو شحنتها حسب نوع الطريقة.

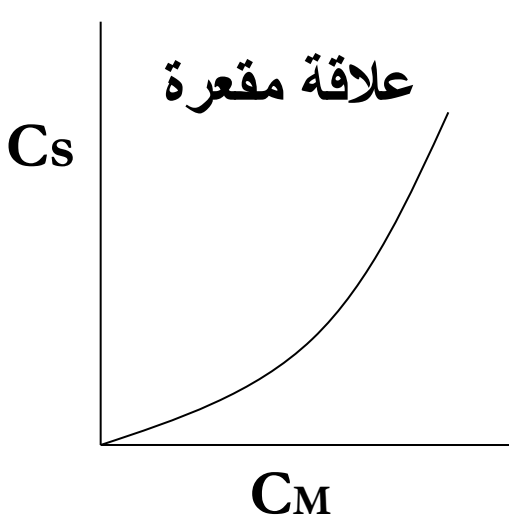
الكروماتوجرافي السائلة-الصلبة(الامتزازية)
Adsorption Column Chromatography

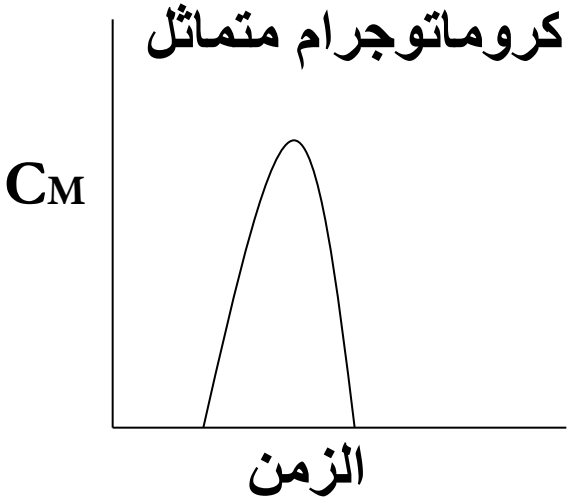
- **الطور الثابت عبارة عن مادة صلبة قطبية تمتاز بمساحة سطحية كبيرة و نشطة بحيث تجذب و تستبقى المواد المارة من خلالها بواسطة الامتزاز و لكن بدرجات مختلفة حسب نوع المادة و قطبيتها.**

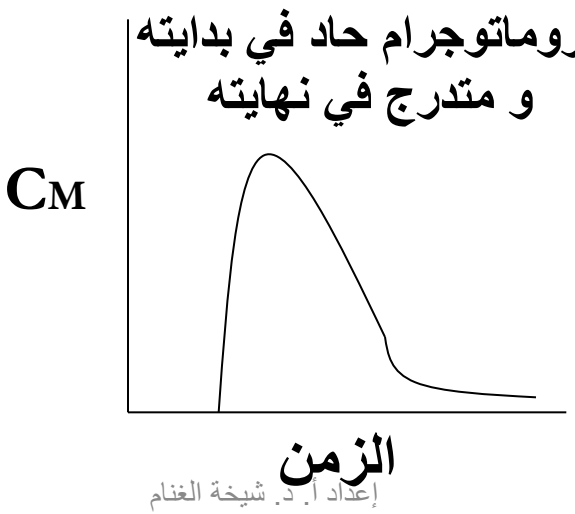
الكروماتوجرافي السائلة-الصلبة(الامتزازية)

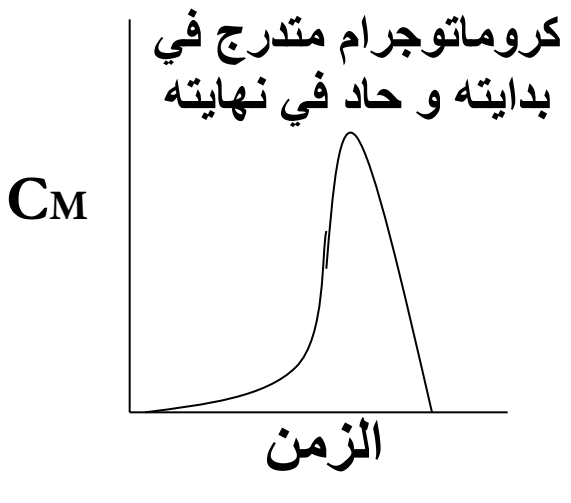




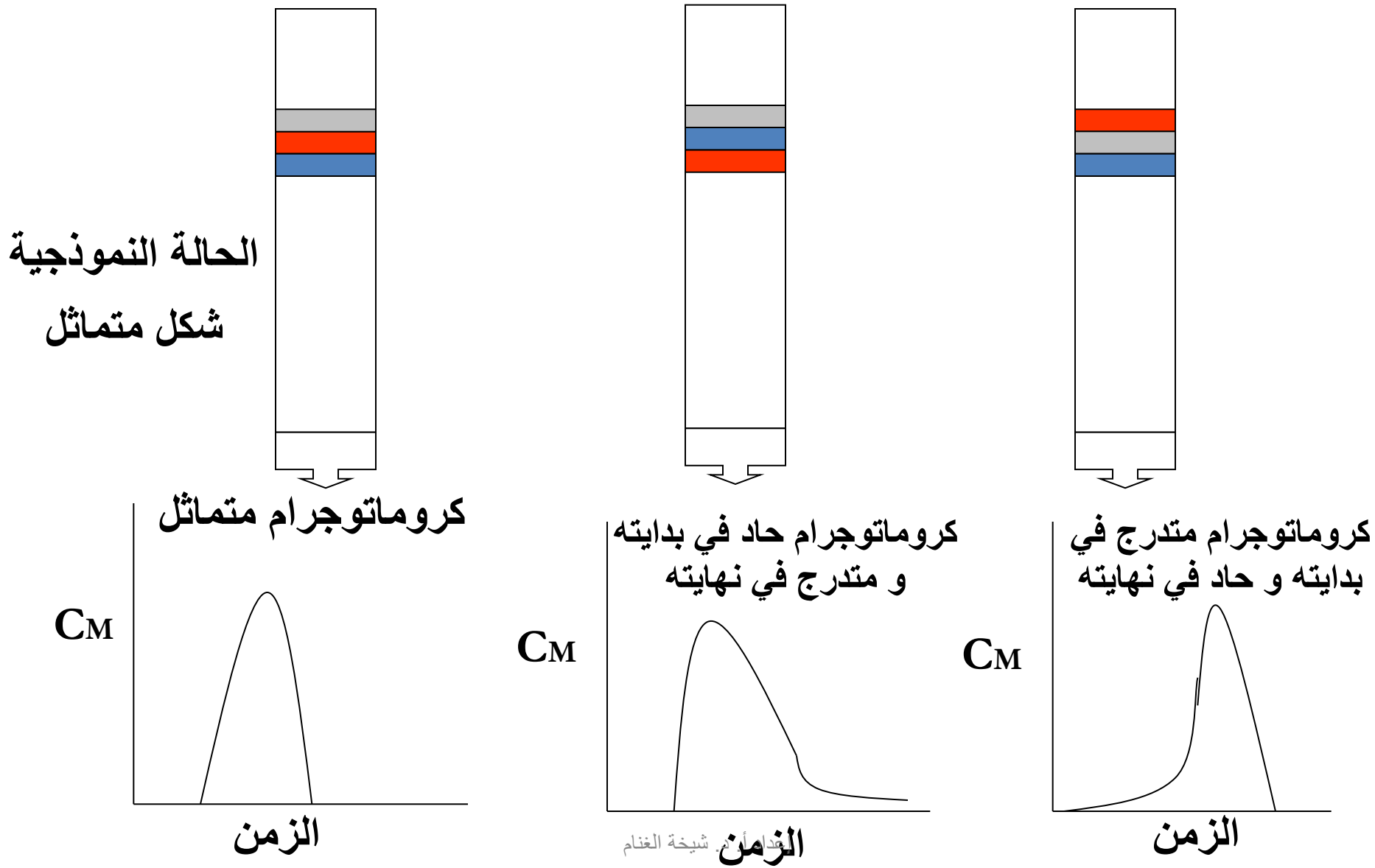








الكروماتوجرافي السائلة-الصلبة(الامتزازية)



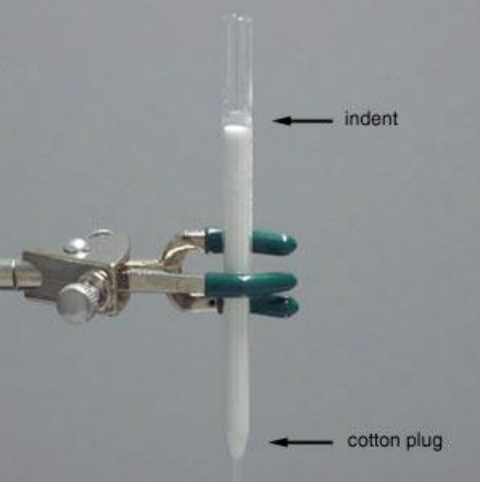
- الوضع الغالب هو السن ذو بداية حادة و نهاية متدرجة و يمكن تلافيه عن طريق:
- تنشيط الطور الثابت الصلب بتغطيته بطبقة جديدة من نفس المادة الصلبة
- رفع درجة الحرارة
- جعل كمية العينة صغيرة

الطور الثابت الصلبSolid-stationary Phase

- مادة قطبية ذات خواص امتزازية مثل الالومينا و هلام السيليكا و الفحم و كربونات الكالسيوم و النشا و السليلوز.
- تعتمد قوة الامتزاز على النشاط الكيميائي لسطح المادة المازة و على مساحة السطح. كما أن النشاط يختلف من بقعة الى اخرى على سطح نفس الحبيبة و من عبوة لاخرى لذا فان التكرارية ليست كما ينبغي.
- امتزاز المواد يعتمد على درجة قطبيتها فكلما زادت قطبية المادة كلما زادت قوة امتزازها على سطح الطور الصلب القطبي و قل ذوبانها في الطور المتحرك الاقل قطبية.
- تحتوي حبيبات هلام السيليكا على مجموعات هيدروكسيل على سطحها و التي ترتبط بالمواد القطبية برابطة هيدروجينية كذلك بالنسبة للالومينا.

الطور المتحرك السائلLiquid-Mobile Phase

- مهمة الطور المتحرك هي نقل المكونات عبر العمود كما أن له تأثير على معامل التوزيع و هذا يعتمد على قوة اذابته.
- يشترط في الطور المتحرك أن لا يخرج المكونات من العمود بسرعة لان ذلك لن يؤدي الى فصلها كما يجب أن لا تكون سرعة التخريج بطيئة لان ذلك سيزيد زمن الاستبقاء و بالتالي تعريض السن.
- رابع كلوريدالكربون<التولوين<البنزين<الكلوروفورم <الايثر< الاسيتون<الايثانول<الماء< الاحماض العضوية<الاحماض غير العضوية.
- يستخدم خليط من المذيبات كطور متحرك و يفضل ان تكون قطبيته أقل من قطبية الطور الثابت.
- يتم فصل المواد حسب قطبيتها لذا يستخدم أولا سائل متحرك أقل قطبية من الطور الثابت ثم تزداد قطبية السائل المتحرك شيئا فشيئا حتى يتم تخريج المواد الواحدة تلو الاخرى.

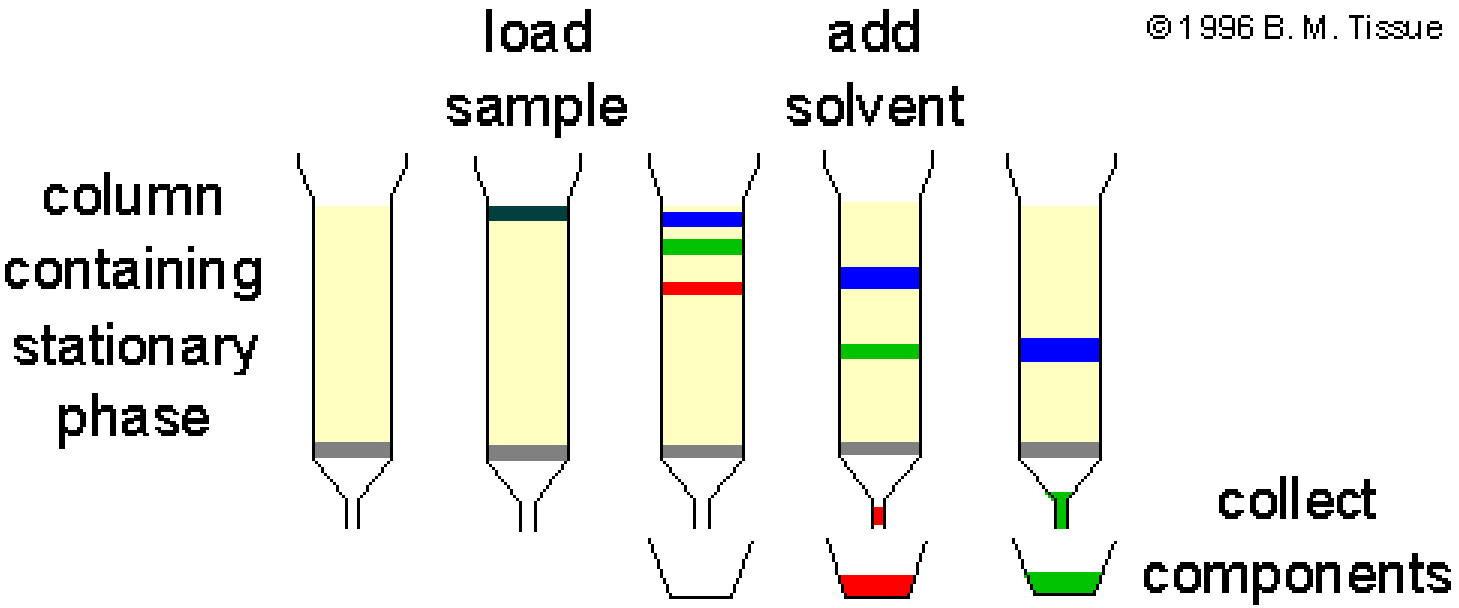


العمود الكروماتوجرافي Chromatographic Column

- يصنع العمود من الزجاج في الغالب و يتراوح طوله10-30cm بقطر حوالي 1cm أو أكثر.
- يتراوح قطر حبيبات الطور الصلب الثابت مابين 74-140µm .
- يسير الطور المتحرك عبر العمود بفعل الجاذبية أو بفعل ضغط منخفض . يعتمد معدل سريانه على حجم حبيبات الطور الصلب و قطر العمود و لزوجة الطور المتحرك و قطبيته و على وضع الصمام الذي يوجد في نهاية العمود و يفضل ان يكون معدل سرعة سريان الطور المتحرك حوالي 1ml/min .
- يوضع في نهاية العمود كمية من الصوف الزجاجي لمنع خروج الطور الثابت من العمود.

تحليل المواد المفصولة

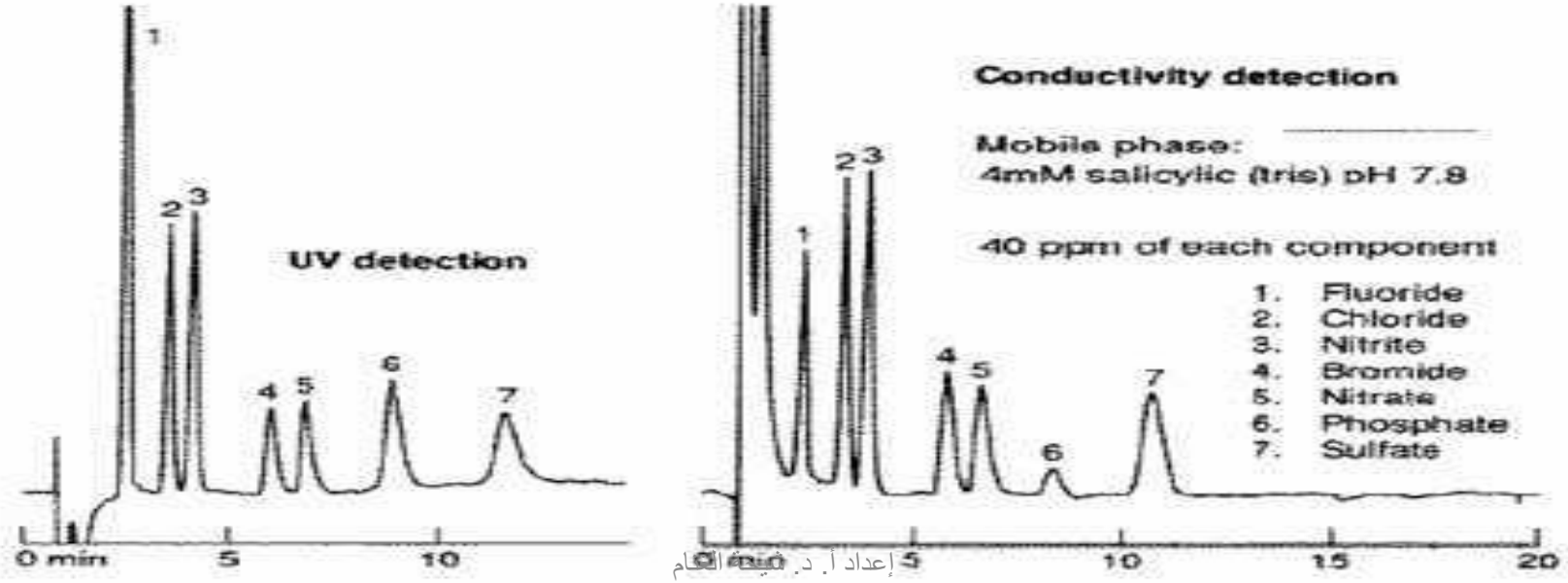
- **الطريقة الاولى: تعزل مناطق الطور الثابت بعد زمن معين كاف لفصل المكونات ثم يتم تحليل كل مكون على حده بالطرق الكيميائية المعروفة مثل الطرق الطيفية و الكهربية و غيرها**



تحليل المواد المفصولة

- **الطريقة الثانية: يتم تخريج المكونات من العمود بواسطة الطور المتحرك على دفعات و في أزمنة مختلفة تبعا لعامل التوزيع و يتم تحليل كل مكون باستخدام مقدر يوضع في نهاية العمود و ترسم العلاقة بين استجابة المقدر و الزمن لنحصل على الكروماتوجرام**

Chromatogram



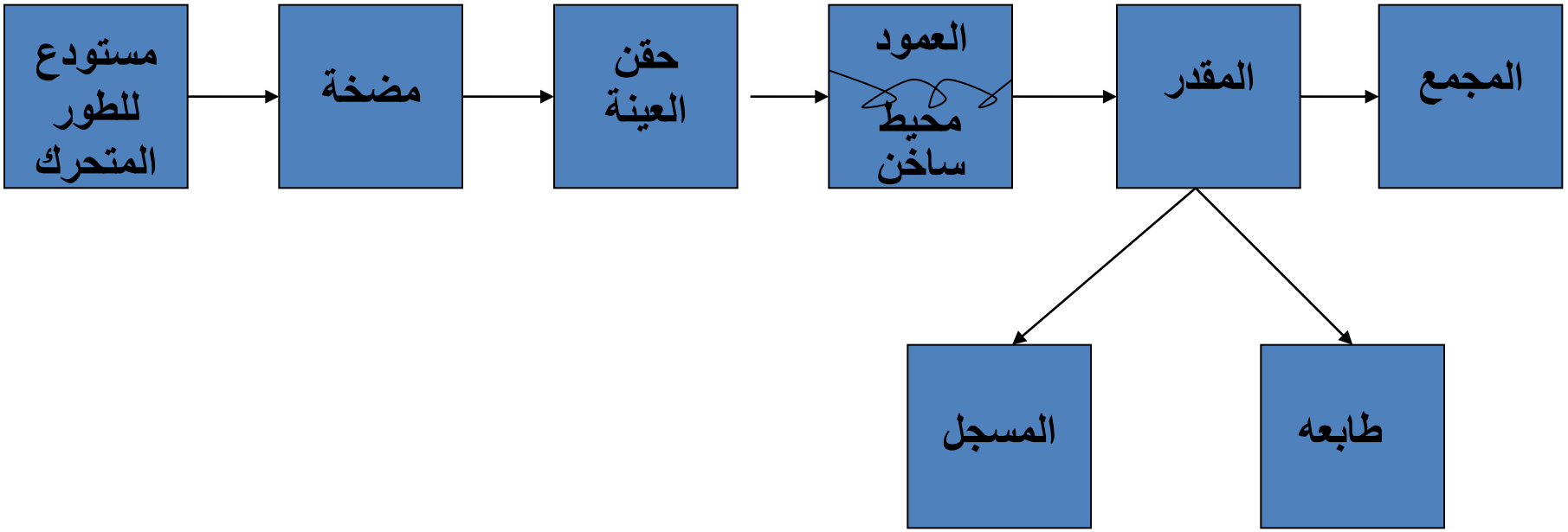
الكروماتوجرافي السائلة-السائلة
(التجزيئية أو الذوبانية)
Partition Chromatography

- **الطور الثابت عبارة عن سائل مدعم على مادة صلبة خاملة أما الطور المتحرك فهو سائل أخر أقل قطبية.**
- **تمر المواد عبر العمود بسرعات مختلفة تعتمد على مدى ذوبان المادة في كلا الطورين.**
- **يشترط أن لا يذوب الطور الثابت السائل في الطور المتحرك و لا يمتزج به.**
- **في الغالب يكون السائل الثابت أكثر قطبية من المتحرك و لكن عند فصل المواد غير القطبية يفضل أن يكون السائل الثابت غير قطبي و يسمى الطور الثابت في هذه الحالة بالطور العكسي reverse-phase.**
- **تمتاز الكروماتوجرافي التجزيئية عن الامتزازية بأن العلاقة بين Cs و CM خطية عند التراكيز المتوسطة كما أنها أفضل تكرارية.**

الكروماتوجرافي السائلة ذات الضغط العالي
High Pressure Liquid Chromatograghy(HPLC)

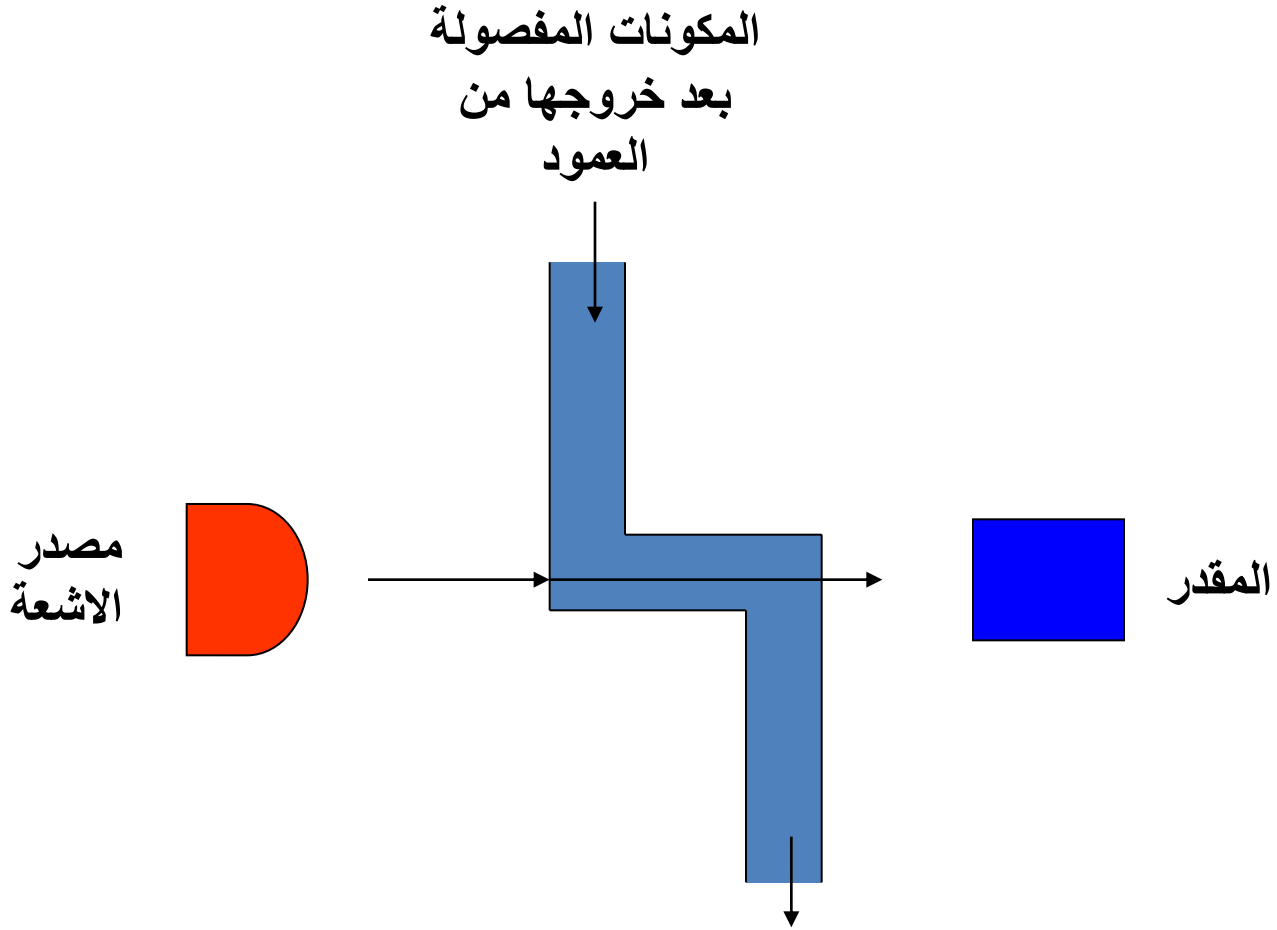
- **تستغرق الطرق الكروماتوجرافية السائلة التقليدية زمناً طويلاً لان سرعة سريان الطور المتحرك بطيئة و أمكن تسريعها باستخدام الطرق الكروماتوجرافية السائلة ذات الضغط العالي.**
- **تمتاز هذه الطريقة بامكانية زيادة معدل سرعة سريان الطور المتحرك اما عن طريق رفع درجة الحرارة أو استخدام حبيبات صغيرة جدا(5-50µm) للطور الثابت و عمود طويل (حوالي 1 m) ذو قطر صغير(1-3mm) مصنوع من الحديد أو الزجاج و تحت هذه الظروف يمكن تطبيق ضغط عال باستخدام غاز الهليوم أو النتروجين لاجبار السائل على التحرك عبر العمود بالسرعة المطلوبة مما يجعل عملية الفصل تتم في دقائق .**

جهاز HPLC


مستودع للطور المتحرك
مضخة
حقن العينة
العمود
محيط ساخن
المقدر
المجمع
المسجل
طابعه

جهاز HPLC

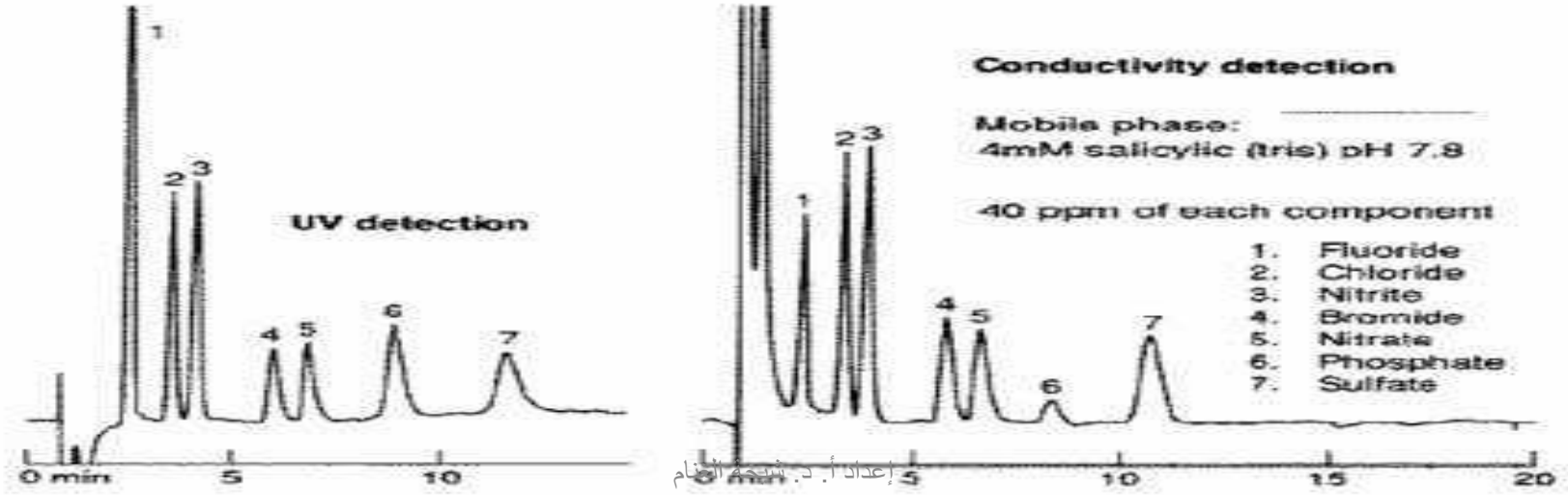
جهاز HPLC



تطبيقات HPLC

- يفضل فصل المواد ذات القطبية العالية باستخدام الطريقة التجزيئية أما المواد غير القطبية فيستخدم لها الطريقة الامتزازية.
- من تطبيقات هذه الطريقة فصل و التعرف على مكونات المبيدات الحشرية و المسكنات و الفيتامينات و المخدرات و غيرها

Chromatogram



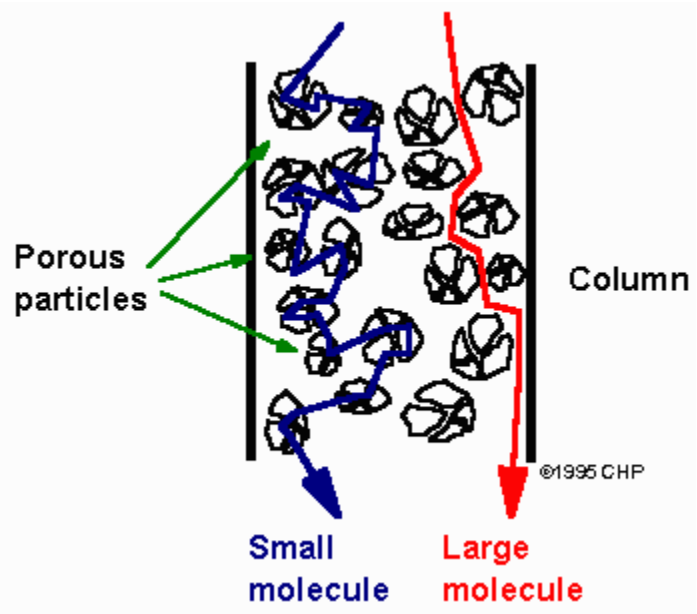
إعداد أ. د. نبيل الأنام

الكروماتوجرافي المنخلية
Size Exclusion Chromatography

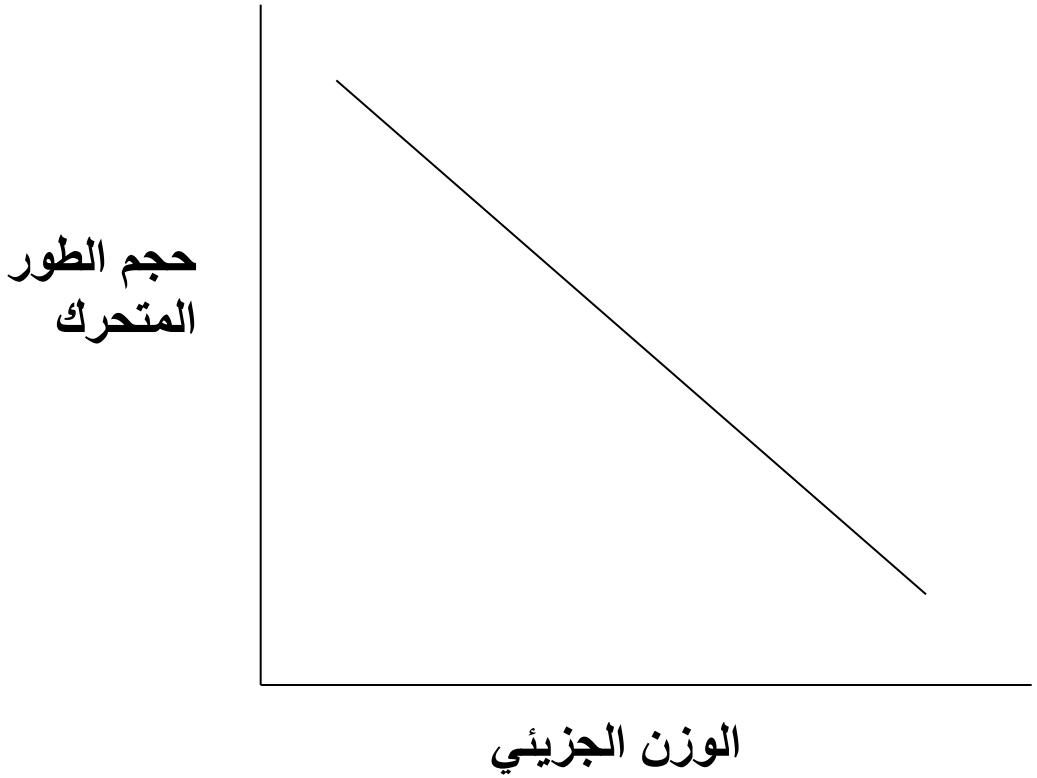
- تستخدم هذه الطريقة لفصل المواد ذات الاوزان الجزيئية العالية.
- يعبأ العمود بمادة هلامية تعمل على فصل المواد بناءً على حجم و شكل جزيئاتها بطريقة مشابهة لعمل المنخل.
- المادة الهلامية عبارة عن كربوهيدرات أو اكريلاميدات متبلمرة تحتوي على مجموعات قطبية قابلة لامتزاز المذيب لذا ينتج عن نقعها انتفاخ جزئ الهلام الذي يحتوي على ثقوب و فتحات.
- هناك العديد من المواد الهلامية تحمل أسماء تجارية مثل Sephadex ,Bio-gel,Styragel
- تستخدم هذه الطريقة في الكيمياء الحيوية لفصل البروتينات و الانزيمات و الهرمونات و غيرها.

جهاز الكروماتوجرافي المنخلية

- عند امرار المواد عبر العمود فان المواد التي حجم جزيئاتها أكبر من ثقوب جزئ الهلام سوف لا تستبقى لان حجمها كبير و انما تمر بين حبيبات الهلام أما التي حجمها أصغر من الثقوب فسوف تنفذ داخل الثقوب و تستبقى.



Gel.mov

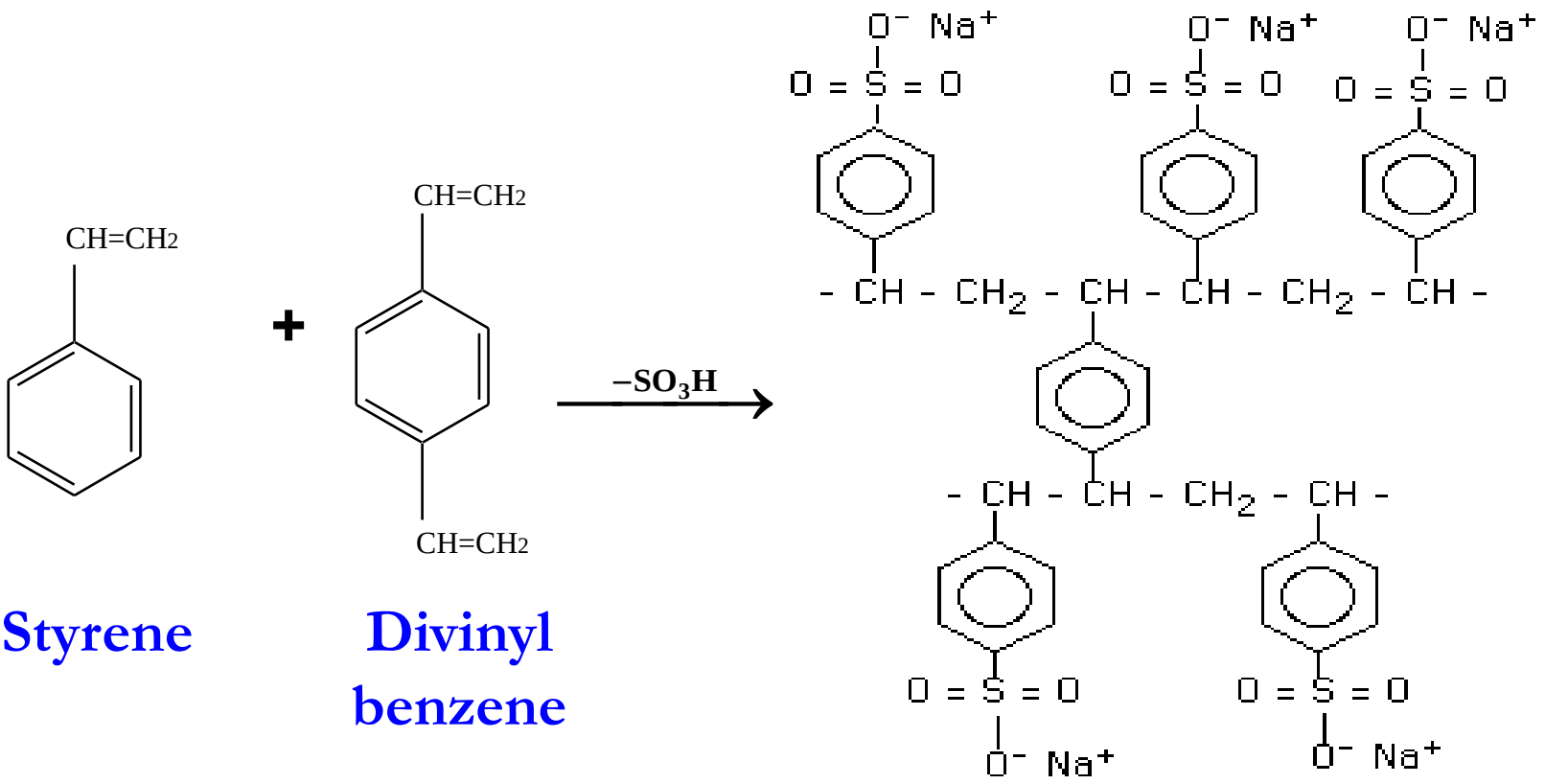


العلاقة بين حجم الطور المتحرك اللازم للتخريج و الوزن الجزيئي للمادة

التبادل الايوني Ion Exchange

- **يتكون الطور الثابت من مادة صلبة منفذة تحتوي على مجموعات مشحونة ثابتة مثل SO_3^- و أيونات تحمل شحنة مضادة متحركة مثل H^+ و يتم استبدال هذه الايونات المضادة بأيونات المواد المراد فصلها حيث تمر عبر العمود بسرعات مختلفة نتيجة لاختلاف ميل الطور الثابت للأيونات المختلفة.**
- **المادة الصلبة عبارة عن مبادلات أيونية صمغية تنتفخ عندما تترطب و هذه المبادلات هي بوليمرات عضوية محضرة مثل عديد الستايرين يضاف له أثناء التحضير divinyl benzene(DVB) لربط سلاسل عديد الستايرين و تنتج حبيبات صغيرة مستديرة.**

المبادلات الايونية الصمغية Resins



Styrene

Divinyl benzene

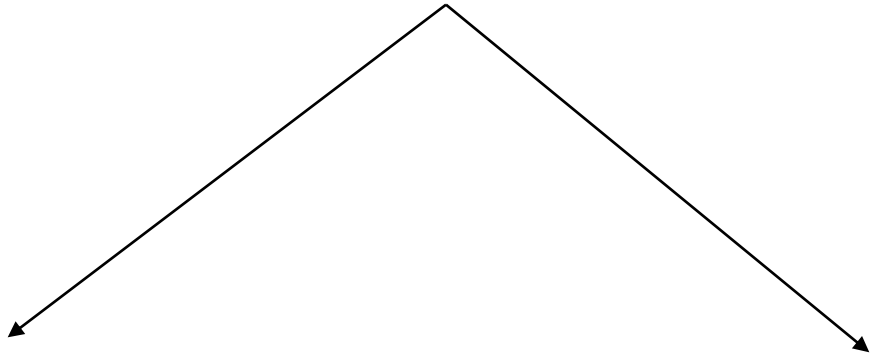
(DVB)

Figure 1

المبادلات الايونية الصمغية Resins

- **الغرض من اضافة DVB هو لربط سلاسل بوليمر عديد الستايرين و الحصول على تركيب متشابك ذو ثلاثة أبعاد منفذ و صلب و غير ذائب.**
- **نسبة التشابك cross-linking مهمة فاذا كانت منخفضة فهذا يعني انها تحتوي على ثقوب كبيرة مما يمكن الايونات من الانتشار داخل تركيب المبادل و يحدث التبادل بسرعة أما اذا كانت نسبة التشابك عالية فتكون الثقوب صغيرة و التبادل بطئ.**
- **المبادلات ذات الثقوب الصغير تناسب فصل الايونات ذات الاوزان الجزيئية الصغيرة و الثقوب الكبيرة لفصل الايونات ذات الاوزان الجزيئية الكبيرة.**
- **حجم حبيبات المبادل لها تاثير على سرعة سريان الطور المتحرك و سرعة عملية التبادل.**
- **نوع المجموعات الايونية المثبتة و قوتها تؤثر على انتقائية المبادل.**

المبادلات الايونية الصمغية Resins

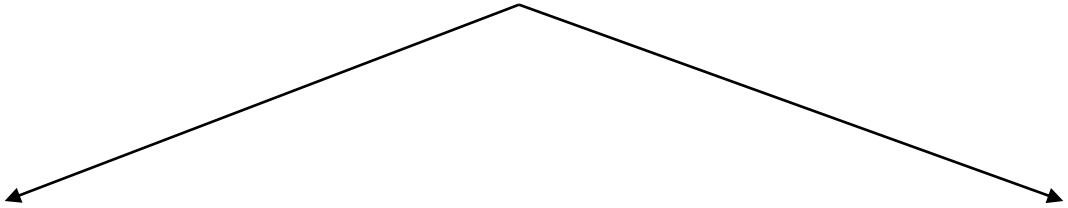


المبادلات الكاتيونية الصمغية **المبادلات الانيونية الصمغية**

Cation-Exchange Resin **Anion-Exchange Resin**

المبادلات الكاتيونية الصمغية
Cation-Exchange Resin

- **تقوم المبادلات باستبدال كاتيونات محلول العينة بكاتيوناتها.**
- **يوجد نوعين من المبادلات الكاتيونية:**



المبادلات الكاتيونية القوية
مثال: تحتوي على حمض السلفونيك

$RzSO_3^- H^+$

المبادلات الكاتيونية الضعيفة
مثال: تحتوي على حمض الكربوكسيل

$RzCO_2^- H^+$

المبادلات الكاتيونية الصمغية
Cation-Exchange Resin

$$nRzSO_3^- H^+ + M^{n+} \leftrightarrows (RzSO_3)_n M + nH^+$$

$$nRzCO_2^- H^+ + M^{n+} \leftrightarrows (RzCO_2)_n M + nH^+$$

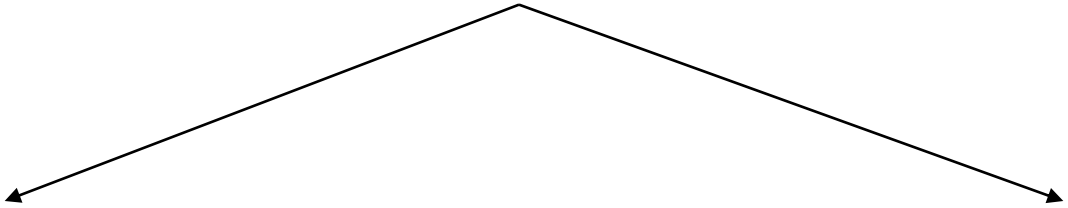
المبادلات الكاتيونية الصمغية
Cation-Exchange Resin

- **السعة التبادلية exchange capacity للمبادل الكاتيوني هي عدد الاوزان المكافئة من ايونات الهيدروجين الموجودة في المبادل و القابلة للتبادل لكل وحدة حجم أو وزن من المبادل الكاتيوني 5-1) meq/mL).**

- **تستخدم المبادلات الكاتيونية الضعيفة في pH= 5-14 اما المبادلات الكاتيونية القوية فتستخدم في المجال pH=1-14**
- **تستخدم المبادلات الكاتيونية الضعيفة لفصل الايونات القوية القاعدية ، اما المبادلات الكاتيونية القوية فتستخدم لفصل المخاليط المعقدة.**

المبادلات الانيونية الصمغية
Anion-Exchange Resin

- **تقوم المبادلات باستبدال أنيونات محلول العينة بأنيوناتها.**
- **يوجد نوعين من المبادلات الأنيونية:**



المبادلات الأنيونية القوية

مثال: تحتوي على مجموعة الامونيوم القاعدية

$$RzN^{+}R_3OH^{-}$$

المبادلات الأنيونية الضعيفة

مثال: تحتوي على مجموعة الامين

$$RzN^{+}H_3OH^{-}$$

المبادلات الأنيونية الصمغية

$$nRzN^{+}R_3OH^{-} + A^{-n} \leftrightarrows (RzNR_3)_n A + n\ OH^{-}$$

$$nRzN^{+}H_3OH^{-} + A^{-n} \leftrightarrows (RzNH_3)_n A + n\ OH^{-}$$

- **تستخدم المبادلات الأنيونية الضعيفة في pH= 0-9 اما المبادلات الأنيونية القوية فتستخدم في المجال pH=0-12**

اتزان التبادل الايوني

- يميل المبادل الكاتيوني في المحاليل المخففة الى استبدال الكاتيونات حسب شحنتها بالترتيب التالي:

+4 > +3 > +2 > +1

- يمكن التعبير عن ميل المبادل لاستبدال أيون ما عن طريق معامل التوزيع D

$$D = \frac{\text{تركيز الايون في المبادل } C_S}{\text{تركيز الايون في المحلول } C_M}$$

- قيمة D تقل مع الاستعمال لذا لابد من تنشيطه من وقت لاخر عن طريق تمرير HCl عبر العمود لتحويله للشكل الهيدروجيني اما المبادل الانيوني يمرر NaOH لتحويله للشكل الهيدروكسيدي.

استخدامات التبادل الايوني في الكيمياء التحليلية

- فصل أيونات الفلزات عن بعضها.
- تقدير الاملاح عن طريق تمرير محلول الملح عبر مبادل كاتيوني في الشكل الهيدروجيني ثم يعاير الهيدروجين المتحرر و الذي يتناسب مع تركيز الملح.
- التخلص من الايونات التي تتداخل في طريقة التحليل عن طريق فصلها بالتبادل الايوني.
- تنقية الماء من الشوائب الكاتيونية أو الانيونية عن طريق تمرير الماء على عمود يحتوي على مخلوط من مبادل كاتيوني في الشكل الهيدروجيني و أنيوني في الشكل الهيدروكسيدي حيث تستبقى الشوائب في العمود و تستبدل بالماء.

$$H^+ + OH^- \leftrightarrows H_2O$$

استخدامات التبادل الايوني في تنقية المياة

الكروماتوجرافي ذات التبادل الايوني
Ion-Exchange Chromatography

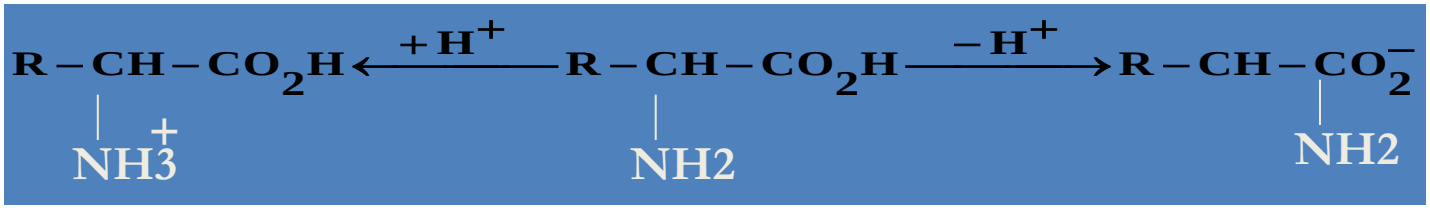
- **يعبأ العمود بالمبادل الايوني و يمرر الطور المتحرك و يوضع مقدر في نهاية الانبوب أو تجمع أجزاء ذات أحجام متساوية من المحلول الخارج من العمود و تحليل كل جزء على حده.**
- **وظيفة التبادل الايوني التقليدي هي التخلص من الايونات غير المرغوب فيها عن طريق استبقائها في العمود. أما الكروماتوجرافي ذات التبادل الايوني فان مهمتها تتعلق بفصل الايونات المختلفة عن بعضها البعض و يتم ذلك عن طريق استبقاء جميع الايونات في العمود ثم يتم تغيير تركيب مذيب الطور المتحرك اما تدريجيا و بشكل مستمر أو أضافة عامل تعقيد الى الطور المتحرك لتكوين مركبات معقدة مختلفة الثباتية مع الايونات المختلفة.**

تأثير الرقم الهيدروجيني للطور المتحرك

- **يعتمد مدى تأين الحموض الضعيفة و القواعد الضعيفة و التحلل المائي لاملاحها و لايونات الفلزات على الرقم الهيدروجيني للوسط.**
- **يمكن زيادة شحنة الايون أو تقليلها أو تغيير شحنته من السالب الى الموجب أو العكس أو جعله متعادل بتغيير الرقم الهيدروجيني للمحلول و بالتالي يمكن التحكم في معامل التوزيع للايون بالتحكم في الرقم الهيدروجيني.**

تأثير الرقم الهيدروجيني للطور المتحرك

- يمكن التحكم في الرقم الهيدروجيني عند فصل الحموض الامينية و التي يمكنها أن تتفاعل كحموض أو قواعد:



(A) (B) (C)

- الارقام الهيدروجينية التي يتم فيها تحول الحمض الاميني من شكل الى اخر تختلف من حمض أميني الى اخر و تعتمد على قيمة ثابت التفكك للحمض و لهذا يمكن فصل الحموض الامينية عن بعضها عن طريق تغيير الرقم الهيدروجيني للطور المتحرك

تأثير الرقم الهيدروجيني للطور المتحرك

- كلما زاد الرقم الهيدروجيني كلما قلت الشحنة الموجبة على الحمض الاميني و كلما زاد تركيزه في الطور المتحرك الخارج من عمود المبادل الكاتيوني.
- كلما زاد الرقم الهيدروجيني كلما زادت الشحنة السالبة على الحمض الاميني و كلما مكث الحمض في العمود أي قل تركيزه في الطور المتحرك الخارج من عمود المبادل الانيوني.

فصل الفلزات بالمبادل الأنيوني

- يمكن فصل الفلزات بعد تحويلها الى معقدات أنيونية بمفاعلتها مع عوامل تعقيد سالبة الشحنة مثل F^-, Br^-, Cl^-
- في البداية يضاف الى مخلوط الفلزات تركيز عالي من الحمض HCl ليكون معقدات سالبة الشحنة مع جميع الفلزات. مثال : اضافة مركز(10-12 M) ليكون معقدات كلوريدية سالبة الشحنة مع جميع الفلزات باستثناء الفلزات القلوية و القلوية الارضية و Cr(III),Ni(II),Al(III)

$$Cu^{2+} \xrightarrow{HCl} CuCl_4^{2-}$$

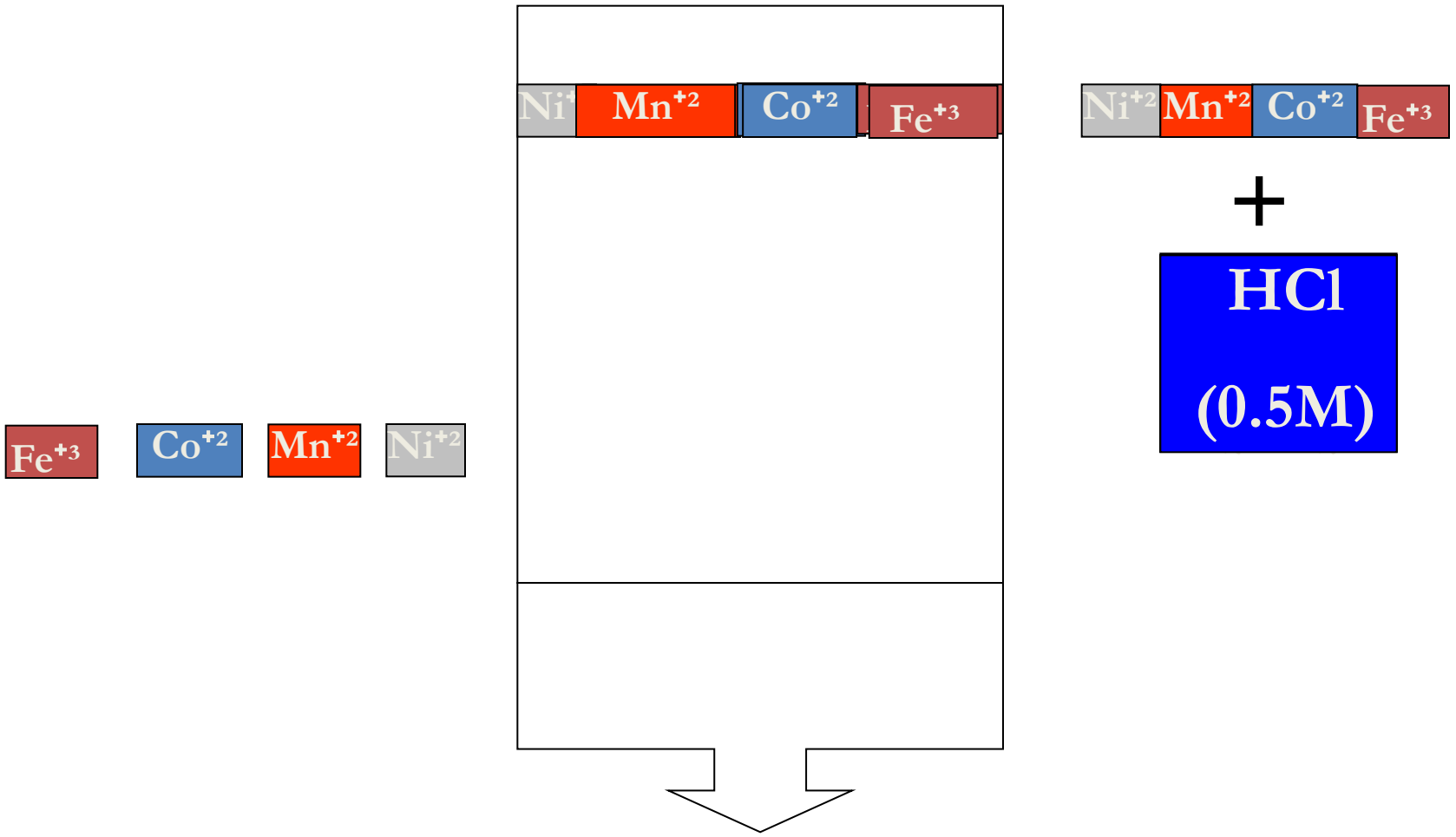
$$Co^{2+} \xrightarrow{HCl} CoCl_4^{2-}$$

فصل الفلزات بالمبادل الأنيوني

- لان معامل التوزيع للفلز يعتمد على تركيز حمض الهيدروكلوريك لذا يمكن تقليل تركيز الحمض بالتدريج حيث نجد أن الفلزات تخرج من العمود الواحد تلو الاخر.
- مثال فصل مخلوط من

$$Ni^{2+} \oplus Mn^{2+} \oplus Co^{2+} \oplus Fe^{3+}$$

فصل الفلزات بالمبادل الأنيوني



فصل الفلزات بالمبادل الكاتيوني

- **يمكن فصل بعض أيونات الفلزات مثل:**

$$Cu^{2+} \oplus Cd^{2+} \oplus Bi^{3+}$$

فصل الفلزات بالمبادل الكاتيوني