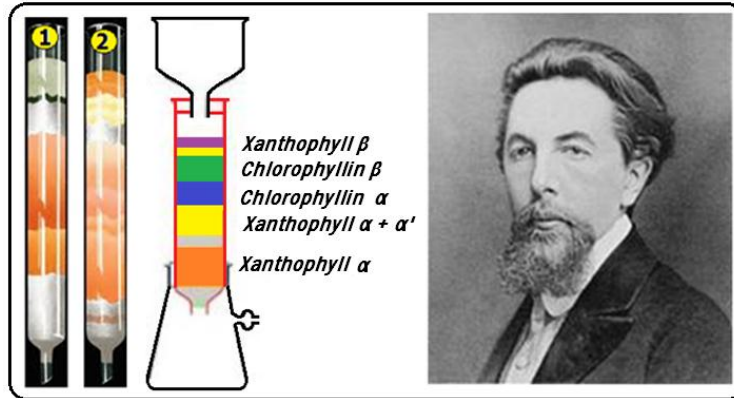


الكروماتوغرافيا Chromatography طريقة لفصل وتنقية المواد الكيميائية من مزائجها

المقدمة:

نشأت فكرة الكروماتوغرافيا على يد عالم النبات الروسي ميشيل تسويت *Michael Tswett* عندما فكر بإيجاد طريقة لفصل الأصبغة النباتية الملونة، فقد نشر في عام ١٩٠٦ وصفاً لفصل الكلوروفيل وغيره من الأصبغة من مستخلص نباتي مستخدماً أدوات مشابهة لما نراه في الشكل التالي، فوضع إيثر النفط *Petroleum ether* الحاوي على العينة في أعلى أنبوب زجاجي ضيق يحتوي على مسحوق متراص لكاربونات الكالسيوم، أتبعها بغسيل العينة في عمود باستخدام كمية إضافية من إيثر النفط فلاحظ توزع وانفصال الأصبغة على مناطق متميزة، وتمكن من استخلاص المكونات بصورها النقية ومن ثم تحليلها، وشرح النتائج التي وصل إليها على أساس أن الأصبغة الأكثر امتزازاً تحل محل الأصبغة الأقل امتزازاً وهكذا...، وأوحى له ظهور مناطق ملونة بالاسم كروماتوغرافيا نسبة لكلمة كروما *Chroma* اللاتينية والتي تعني (لون)، وتُتبع هذه الطريقة حالياً بنجاح كبير لفصل جميع المواد الملونة وغير الملونة من مزائجها، وبأشكالها الثلاث: الصلبة أو السائلة أو الغازية.



تشمل الكروماتوغرافيا الآن أشكالاً وأنماطاً مختلفة بحسب التوزع التفاضلي لمكونات عينة ما بين طورين، يبقى أحد الطورين ثابتاً ويدعى الطور الثابت *Stationary phase*، ويتحرك الطور الآخر *Mobil phase* لينفذ من خلال سطوح الطور الثابت، وتسبب حركة الطور المتحرك هجرة تفاضلية لمكونات العينة بالياتٍ مختلفة.

أنواع الكروماتوغرافيا: *Types of Chromatography*

هنالك عدة طرق لتصنيف التقنيات الكروماتوغرافية، ومع ذلك فإن أكثرها مبني على تسمية الاطوار المستخدمة (متحرك- ثابت)، وعلى الشكل:

بعض أنماط تسمية الكروماتوغرافيا			
غاز - سائل	غاز - صلب	سائل - سائل	سائل - صلب
GLC	GSC	LLC	LSG

وهناك التصنيف التقني الذي يقوم على تقنية العمل المعتمدة *Operational Technique* مثل كروماتوغرافيا التصفية المتتابعة، والتي يتم فيها الأخذ بعينة صغيرة لتغسل خلال العمود بالطور المتحرك كما وصفها تسويت، وستكون جميع أشكال الكروماتوغرافيا التي سنأتي على مناقشتها هنا من كروماتوغرافيا التصفية المتتابعة، منوهين لوجود أشكالاً أخرى للتصنيف بحسب أنواع الأطوار، أو بحسب آليات العمل.

كروماتوغرافيا سائل - صلب أو كروماتوغرافيا الامتزاز *Liquid - solid our adsorption chromatography*

اكتشفها تسويت وأعاد استعمالها كون وليدر *Kuhn and Lederer* عام ١٩٣١، واستخدمت بكثرة في التحليل العضوي والكيميائي، واستخدما هلام السليكا أو الألومينا النقية كمواد مالئة للعمود لمعدلات مساحة السطح العالية لهما بالنسبة للحجم، وتمتعهما بسطوح فعالة كيميائياً. ويعيبها ارتباط دقة نتائجها بمعامل التوزيع الذي يرتبط بالتركيز.

كروماتوغرافيا سائل - سائل أو كروماتوغرافيا التجزئة : *Liquid - liquid our partition chromatography*

وضعها كل من مارتن وسيج *Martin and Synge* عام ١٩٤١، ونالا عليها جائزة نوبل، يتكون الطور الثابت فيها من طبقة رقيقة من سائل محمولة على سطح مادة صلبة مسامية حاملة، وهناك عدد كبير من السوائل المناسبة لهذه الطريقة، ما عزز من انتشارها، وبخاصة عدم ارتباط دقة نتائجها بمعامل التوزيع الذي يرتبط بعامل التركيز ما يمنحنا نتائج فصل أكثر حدة.

كروماتوغرافيا غاز - صلب *Gas-solid chromatography*

وقد استخدمت قبل عام ١٨٠٠ لتنقية الغازات، غير أنه لم يشيع استخدامها إلا في الأربعينات من هذا القرن، عندما قام كل من هيس وكلايسون وفليس *Hess, Classon & Philips* بتطويرها، فقد سبق لها أن عانت من عيوب كروماتوغرافيا امتزاز السائل، إلا أن البحوث الحالية مع أنواع جديدة للأطور الصلبة قد وسعت من تطبيقها.

كروماتوغرافيا غاز - سائل *Gas-liquid chromatography*

تدعى أحيانا بكروماتوغرافيا طور البخار *Vapor-phase chromatography* من الكيميائيين العضويين، وقد تكون أكثر استخداماً من كل طرائق الفصل الأخرى، فقد أحدثت ثورة في الكيمياء العضوية منذ ان اعتمدها لأول مرة جيمس ومارتن *James & martin* عام ١٩٥٢، وأكبر عقبة تواجهها الآن أن تتمتع مكونات العينات المراد فصلها (أو مشتقاتها) ضغط بخار منخفض عند درجة حرارة العمود، وتمكننا هذه الطريقة من تحليل عينات يصل وزنها حتى دون الميكروغرام، ومازالت هناك إلى الآن بعض المعضلات الواجب حلها، ومع ذلك فقد توقع مارتن *Nobel laureate A.J.P. Martin* حينها بأنه سيأتي اليوم الذي تكون فيه هذه الطريقة هي الأولى اعتماداً في مختبرات الكيمياء التحليلية الآلية.

كروماتوغرافيا التبادل الشاردي *Ion exchange chromatography*

وهو مجال خاص لكروماتوغرافيا سائل - صلب، وهو كما يدل الاسم يطبق بخاصة على المركبات الشاردية، فقد أحدث إدخال راتنجات التبادل الشاردي قبيل الحرب العالمية الثانية ثورة في عمليات الفصل الصعبة لفلزات الأتربة النادرة *Rare earth metals* والحموض الأمينية.

الكروماتوغرافيا الورقية *Paper chromatography*

وهو مجال خاص من كروماتوغرافيا سائل - سائل، والذي يكون فيه الطور الثابت عبارة عن غشاء رقيق من ممتز على حصى ورقية، كذلك يمكن استخدام سائل ثابتة أخرى، وتتميز هذه التقنية ببساطتها الكبيرة، ذلك أنه لا يحتاج تطبيقها لأكثر من أن وضع بقعة من العينة على طرف ورقة ترشيح،

ومن ثم غمس طرف الورقة بمذيب التصفية المتتابعة، وتناسب هذه التقنية عمليات فصل مكونات ضئيلة وتحديدتها بكواشف إظهار حساسة.

الترشيح الهلامي *Gel Filtration*:

وهي عملية فصل تعتمد على تنجز هلام الدكسترين المحور *Modified Dextran*، وهو عبارة عن شبكة ثلاثية الأبعاد لجزيئات متعدد السكاريد *Polysaccharide* الخطي المترابط عرضياً، تنتفخ المادة في الماء لتكون بنية غربالية قادرة على عزل الجزيئات بحسب حجومها، ويمكننا بمعالجات لاحقة على السطح رفع تركيز الجزيئات وعزلها من ١٠٠ إلى عدة ملايين.

ونجد أيضاً كروماتوغرافيا الهلام النفوذ *Gel permeation chromatography*، وهي تقنية مشابهة يستخدم فيها هلام من نوع متعدد الستيرين *Polystyrene* لفصل البوليمرات.

كروماتوغرافيا منطقة الهجرة الكهربائية المستمرة *Continuous - zone electrophoresis*:

وتتألف من ممر مزدوج أسطواني الشكل يسלט مجالاً كهربائياً أثناء عملية التصفية المتتابعة بكروماتوغرافيا الورق عبر الورقة عمودياً على جريان المذيب، لذلك تنحرف بعض الشوارد عن الاتجاه الرئيس بحسب شحناتها وقابليتها للحركة.

نظرية الكروماتوغرافيا *Chromatography theory*:

يعزى التقدم السريع والاستخدام الواسع للكروماتوغرافيا إلى النظرية التي جاء بها في البداية كل من مارتن وسينج حول كروماتوغرافيا تجزئة السائل، إذ وضعوا قواعد المعالجة الدقيقة والمفصلة لكروماتوغرافيا غاز - سائل.

لنتأمل شريحة صغيرة من عمود يراد استخدامه لكروماتوغرافيا سائل - سائل كما في الشكل التالي، وسنجد أنه ما من جزيئية في عينة ما لا بد أن تكون: إما في الطور الثابت وبالتالي فلن تتحرك إلى الأمام، أو في الطور المتحرك وحينئذ سيتم حملها على امتداد العمود بنفس سرعة الطور المتحرك، يلعب الطور المتحرك دور عامل الحمل *Carrier* مؤمناً عملية الانتقال، أما الطور الثابت فيكون يلعب دور العامل المؤخر *Retarder*.

توازنات التوزيع *Distribution equilibria*:

يرتبط توزيع جزيئات عينة بين طورين بثابت توازن يعرف بمعامل التوزيع *K: Distribution coefficient*، ويدعى أحياناً بمعامل التجزئة *Partition coefficient*، ويجري التوازن ما بين قوتين: أولهما قوة جر للأمام مع المذيب، وأخرى للخلف بسبب ألفتها للطور الثابت وهكذا تخضع التراكيز في المعدل لقانون التوزع:

$$K = C_S / C_M$$

ويدل الرمزان *S, M* على الطورين الثابتين والمتحرك على التوالي.

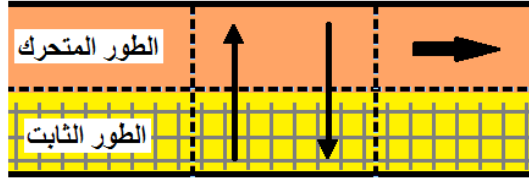
يطبق معامل التوزيع *K* على عدة أنواع من الآليات بحسب طبيعة الأطوار وأنواع مكونات العينة مع كل طور، ومع ذلك وسواءً أكانت العملية من نوع التبادل الشاردي أو محلول الامتزاز أو تبخير من محلول، يتم تحديد قيمة العدد النسبي *K* في كلا الطورين، فإذا كانت قيمة *K* كبيرة فإن العدد في الطور الثابت يكون أكثر مما في الطور المتحرك، وإن جزيئات ذلك المكون ستقضي وقتاً أطول في الطور الثابت لتوازن ديناميكي حقيقي، ويتناسب جزء الوقت الكلي تقضيه جزيئة عادية في الطور المتحرك تناسباً طردياً مع جزء العدد الكلي الموجود في الطور المتحرك:

جزء اللازم في الطور المتحرك = عدد الجزيئات في الطور المتحرك / العدد الكلي للجزيئات =

$$C_M V_M / (C_M V_M + C_S V_S) = 1 / (1 + K V_S / V_M) = 1 / (1 + K')$$

حيث أن: $K' = K V_S / V_M$ متغير جديد يدعى عامل السعة *Capacity factor*

ويساوي أيضاً: $C_M V_M / C_S V_S$ ، أو نسبة مولات مكون العينة في الطور الثابت مقسوماً على مولات الطور المتحرك.



تقنيات العمل

الكروماتوغرافيا المستوية *Plane*:

سميت كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة *TLC*: اختصار لـ *Thin Layer Chromatograph* وتستخدم لفصل مواد المزيج لمعرفة ألوانه لكن لا نحصل على مادة اللون بشكل محسوس. يبطن الجانب الخلفي لصفحة الـ *TLC* بمعدن الألمنيوم أو الحديد أو يطلى بالسيليكا ليلعب دور الطور الساكن.

خطوات العمل:

- 1- تجهيز ألواح الطبقة الرقيقة (الطور الساكن): إن المواد المدمصة في *TLC* هي نفسها المدمصة في كروماتوغرافيا الأعمدة. وتصنع الألواح لتكون جاهزة للاستخدام مباشرة.
- 2- اختيار المذيب المناسب (الطور المتحرك): يعتمد اختيار المذيب على نوع المادة المراد فصلها، فمن الضروري انتقاء المذيب الأنسب باختبار عددٍ من المذيبات، إذ يمكن للمذيب العالي القطبية مثل الكلوروفورم أو البنزن أن يحرك البقع مع حركته، على العكس من المذيبات الأقل قطبية والتي قد تترك البقع مكانها. كما يمكننا إضافة الماء أو الميثانول أو ... حسب الحاجة.
- 3- وضع العينة: يتم وضع حجم معين في حدود ٥-٢٠ مل بواسطة ماصة دقيقة أو أنبوب شعري دقيق على خط البدء (خط الهجرة) الذي يبعد ٢ سم من أحد أضلاع اللوح. وينبغي ألا يزيد قطر البقعة عن ١ سم، وللمحافظة على بقاء البقعة صغيرة توضع العينة بأحجام صغيرة عدة مرات مع التجفيف بعد كل إضافة.
- 4- تقنية الفصل: يتم الفصل بهذه الطريقة بوضع قطرة من المحلول الذي يحتوي على المزيج المراد فصل مكوناته على بعد ٢ سم من أحد أضلاع اللوح، ثم يغطى اللوح (تجنباً لتبخّر المذيب والحفاظ على الجو المشبع)، ويتوجب ألا يزيد ارتفاع المذيب في الوعاء عن ١ سم (أي لا يصل إلى خط البدء)، وبعد وقت قصير يبدأ المذيب في التحرك إلى أعلى ماراً بالبقعة التي تحتوي على المزيج ويبدأ فصل مكوناته حسب قوة ادمصاص كل منها على سطح الطور الساكن، وينتج عن ذلك فصل بقعة المزيج لعدة بقع. وعندما تقترب جبهة المذيب من نهاية اللوح نخرج اللوح من الوعاء ونقوم بتحديد المكان الذي وصلت إليه جبهة المذيب لمعرفة المسافة التي قطعها المذيب، ثم نحدد مواقع البقع المفصولة، وتقاس المسافة التي قطعتها البقع مباشرة إذا كانت هذه المواد المفصولة ملونة أما إذا كانت غير ملونة فلا بد من إتباع طريقة ما لإظهار البقع.
- 5- طرق تظهير البقع المفصولة *Visualization method*: من السهل جداً القيام بعملية الفصل عندما تكون المواد المفصولة ملونة، إلا أنه غالباً ما تكون المواد المفصولة عديمة اللون ما يستوجب تلوينها بإضافة كواشف لإظهار معينة. كما يمكننا أيضاً استخدام مصباح الأشعة فوق البنفسجية *UV* لتظهر المركبات المفصولة على شكل بقع براقعة ساطعة على الطبقة الرقيقة، كما يظهر على بعضها خاصية التألق *Flourescence* فقط.

وهناك أيضا إضافة مادة متألقة إلى الوسط الثابت في الطبقة الرقيقة مثل خليط من كبريتات الزنك والكاديوم، وإذا كانت المركبات المفصولة تسبب إخماد التألُّق *Quenching fluorescence* فإنها ستظهر على هيئة بقع سوداء على الصفحة عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية.

٦- معامل التأخير: عند تثبيت كل الظروف على الطبقة الرقيقة فإن أي مركب سيقطع مسافة ثابتة بالنسبة إلى المسافة التي سيقطعها المذيب (جبهة المذيب) وتعرف النسبة بين المسافة التي تقطعها المادة المفصولة X_A والمسافة التي يقطعها المذيب بمعامل التأخر ويرمز لها بالرمز R_f .

R_f : المسافة التي قطعها مركز البقعة من خط البدء X_A

X_f : المسافة التي قطعتها جبهة المذيب من خط البدء، حيث $R_f > 1$ دائما.

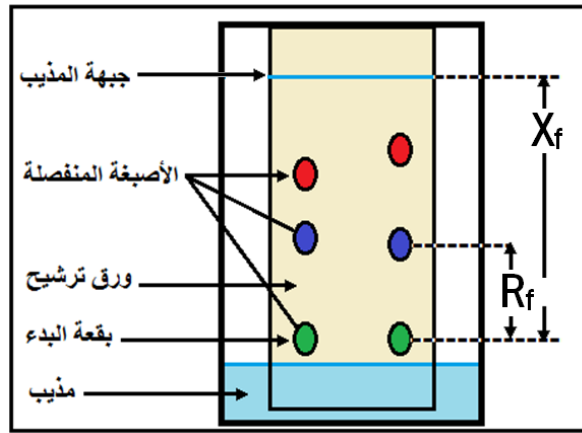
ويكون معامل التأخير ثابتا للمركب المعطى عندما تكون كل ظروف التجربة هي نفسها وهو يمثل أحد الصفات الفيزيائية لهذا المركب.

ويمكن التعرف إلى المادة المجهولة عن طريق حساب تلك المسافات من نقطة البداية إلى مركز المادة.

٢- الكروماتوغرافيا الورقية *PC*: يتألف الطور الساكن هنا من صفيحة ورقية، ويستخدم عادةً ورق الترشيح السيليلوزي العادي أو المعالج كيميائياً، ويتدفق الطور المتحرك السائل في الورقة مسبباً الفصل الكروماتوغرافي.

ومن فوائد هذه الطريقة بقاء المناطق المفصولة على الورقة ذاتها، ما يمكننا من التعرف عليها أو استخلاصها بسهولة.

يمكن اختيار شكل النسيج المكون للورقة وسماكتها حسب طبيعة المواد المراد فصلها، أما أبعاد الورقة المستخدمة فهي عادةً ١,٥-٢,٥ سم عرضاً و ٢٥-٣٠ سم طولاً. وطريقة الفصل مشابهة لـ *TLC* لكنها تحتاج لوقت أطول نوعاً ما.



٣- كروماتوغرافيا العمود *Column*: وتصنف على أسلوبيين: سائلة وغازية

الكروماتوغرافيا السائلة *LC*: وتصنف إلى سائل - سائل *LLC*، وسائل - صلب *LSC*

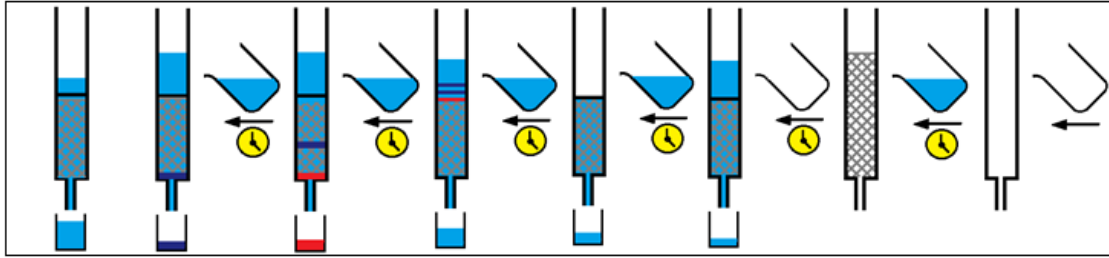
تختلف الكروماتوغرافيا السائلة عن الطرق الأخرى بأن الطور الساكن مؤلف من مادة خاملة كالسيليكات أو البولي ستيرين الحاوي على مركبات شاردية كالمجموعات الكربوكسيل أو مجموعات الأمونيوم، حيث يمكن أن تتبادل المكونات الأولية في العينة المارة في العمود مع المكونات الشاردية في الطور الساكن مؤدية إلى فصلها عن مكونات العينة الأخرى، ويستعمل الزجاج عادةً في كروماتوغرافيا العمود لدعم الطور الصلب.

خطوات العمل:

١- نحقق المزيج على سطح العمود الممتلئ بالطور الساكن.

٢- نغسل بكمية قليلة من المحلول الطارد فتنفصل المواد، ولكنها تبقى قريبة من بعضها.

٣- نبدأ مرحلة تدفق المحلول الطارد بصورة متواصلة فتبدأ مكونات المزيج بالانفصال عن بعضها تبعاً لألفتها ما بين الطورين الساكن والمتحرك، حتى تمام خلو العمود من المواد ليصبح جاهزاً لعملية فصل تالية، ونسجل أزمان العملية تباعاً: 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..



الكروماتوغرافيا الغازية GC: تعد هذه التقنية وسيلة تحليل مهمة لتحليل المواد الغذائية، وتكتسب أهميتها في دراسة تركيب الحموض الدهنية في الدهون والزيوت. غالباً ما يتكون الطور الغازي (المتحرك) غاز خامل كالهيدروجين أو الهليوم أو الآزوت، والذي ينساب عبر عمود في درجة حرارة معينة تتراوح بين ٦٠ م° إلى أكثر من ٢٠٠ م° لكي يتحول إلى أبخرة يمكننا الفصل بينها.

المواصفات الواجب توفرها في المادة المراد فصلها بالكروماتوغرافيا الغازية:

١. أن تكون قابلة للتطاير عند درجة حرارة العمود.
٢. أن تكون المادة ثابتة حرارياً لا تتفكك في درجة حرارة العمود.

أقسام جهاز الـ GC:

١. أسطوانة الغاز: الحاوية على الطور المتحرك.
٢. حجرة الحقن.
٣. العمود: مزود بفرن للتحكم بدرجة حرارته.
٤. الكاشف: متصل مع راسم خطي يعطي الكروماتوغرام الموافق.

الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

شكل من أشكال الكروماتوغرافيا العمودية، تستخدم في الكيمياء الحيوية والتحليلية لفصل وتحديد وقياس مركبات المزيج الواحد، ويستخدم فيها عمود يحتوي على المادة الثابتة *Stationary phase* ومضخة تحرك المادة المتنقلة المراد تحليلها *Mobile phase*، وكاشف لتحديد زمن الاحتباس لكل مادة.

ويتباين زمن الاحتباس بين مادة وأخرى بسبب الاختلاف في الروابط البينية بين المادة المراد تحليلها والمادة الثابتة في العمود ما يؤخر ظهور المادة على الكاشف.



تعتمد طريقة التحليل على استخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء *HPLC*، وتعتمد هذه الطريقة على تباين سرعة تحرك الأصبغة في عمود الفصل حيث استخدم عمود فصل من النوع *RPC18*، ووجد من خلال هذه الدراسة أن الزمن اللازم لخروج مركبات الأصبغة من عمود الفصل يعتمد على مدى قطبية الصباغ، إذ تخرج أولاً من عمود الأصبغة السوداء فالزرقاء فالبرتقالية وأخيراً الأصبغة الحمراء، ما يعني أن الأصبغة السوداء ذات قطبية أعلى من باقي الأصبغة، وتم لتحريك الأصبغة داخل عمود الفصل استخدام الطور المتحرك:

N-Cetyl-N,N,N-tri methyl ammonium bromide: (CTAB)

