



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministry of Higher Education and Scientific Research
جامعة قاصدي مرباح - ورقلة
University of Kasdi Merbah - Ouargla
كلية الرياضيات وعلوم المادة
Faculty of Mathematics and Material Sciences
قسم الكيمياء



Chemistry Department

مذكرة مقدمة لنيل شهادة ماستر أكاديمي

في الكيمياء

تخصص: كيمياء تحليلية

من طرف الطالبين:

عسال جهاد، بن جنيدي حدة

بعنوان:

تحليل عينات بواسطة جهاز

CPG-MS و HPLC-MS

نوقشت وأجيزت علنا بتاريخ: 2021/06/20 أمام لجنة المناقشة المكونة من:

أ.د. هادف دراجي	أستاذ محاضر - أ - جامعة ورقلة	رئيسا
أ.د. بلقار محمد الأخضر	أستاذ محاضر - أ - جامعة ورقلة	مناقشا
أ.د. زروقي حياة	أستاذ محاضر - ب - جامعة ورقلة	مؤطرا
أ.د. شربي رقية	أستاذ محاضر - أ - جامعة ورقلة	مساعد مؤطرا

السنة الجامعية 2021/2020



الإهداء

أهدي هذا العمل راجية من الله أن يجد القبول والنجاح

إلى التي وهبت فلذة كبدها كل العطاء والحنان، إلى من كان دعائها سر نجاحي، إلى يا من برك من بر
الله، إليك يا اجنتي يا أمي .

إلى مدرسي الأولى وسندي في الحياة، إلى الذي وهبني كل مايملك ووفر لي سبل التعليم لأحقق آماله إلى
من يدفعني نحو الأمام لنيل المبتغى، إلى من كان لي أبوأماً، إليك يا أبي العزيز بشير .

إلى من كان لي سند في وقت شدتي، إلى بلسم روحي وبسمتي، إليك يا أخي ساعد، أرجو من الله أن يجزيك
كل خير على وقوفك معي ومساندتي .

إلى من بوجودهم اكتسب قوة ومحبة لا حدود لها إلى من تقاسمت معهم عبء الحياة، إلى أختي . إلى
أمي الثانية ومربيتي، إلى من ضحت من أجلنا إلى أختي الكبرى نعيمة، إلى توأم روحي ورفيقة الدرب
وصاحبة القلب الطيب الكبير أختي مريم، إلى ضحكتي وشجاعتي وأماني أخي الحبيب محمد صدام، أ سأل
الله العلي القدير أن يحفظكم ويحميكم وينور دربكم .

إلى كل أفراد عائلتي بن جنيدي، إلى رفقاء الدرب وصديقاتي مريم بن دريغم
وزينب نوادي .

كما أقدم بالشكر والتقدير لكل أساتذة قسم الكيمياء، جزاكم الله كل خير .

الطالبة حدة



إهداء

إلى والدي الكريمين اللذين كان لهما الفضل بعد الله في تربيته
وإعدادي وتنشئتي،

أبدأ بنبع العطف والعنان، والتي بحبها الكثير ودعائها المتواصل
هونتك علي

متاعبي، إلى من رسمت ومازالت ترسم البسمة علي وجهي في أصعب
الأوقات، إلى أمي

الغالية أطل الله في عمرها .

إلى أبي العزيز، إلى أختي.

جهاد

الشكر والعرفان

الحمد لله السميع العليم ذي العزة والفضل العظيم والصلاة والسلام على المصطفى الهادي الكريم وعلى آله وصحبه أجمعين . وبعد نشكر الله العلي العليم الذي أنار لنا درب العلم والمعرفة وأعنا على إتمام هذا العمل.

نتقدم بالشكر الجزيل والعرفان بالجميل للدكتورة زروقي حياة لقبولها الإشراف على هذه الدراسة وكانت لملاحظاتها السديدة الأثر الكبير في وصول البحث إلى هذه الصورة فجزاها الله عنا كل خير وجعله في ميزان حسناتها، كما نشكر مساعد المؤتمر الدكتورة شربي رقية . كما نتقدم بالشكر والامتنان إلى عضوي لجنة المناقشة الدكتور بلغار محمد الأخضر والدكتور هادف دراجي اللذين بذلا الوقت والجهد في التدقيق وإثراء هذه الدراسة البحثية شكلا ومضمون .

كما يطيب لنا أن نتقدم بجزيل الشكر والعرفان لكل أساتذتنا الكرام الذين علمونا ما كنا نجهل وأناروا دروبنا طلية مشوارنا الدراسي.

الملخص:

تتم في هذه الدراسة دراسة نظرية مفصلة ،الكروماتوغرافي الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي CPG-MS والكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي المقترنة بالمطياف الكتلي HPLC-MS حيث تم التطرق إلى أهم الأجزاء والمكونات الرئيسية لكلا الجهازين CG-MS ، HPLC-MS. والتعرف على الشروط العملية ومبدأ عمل كل طريقة، والأطوار المميزة لها. مع ذكر أبرز المشكلات و المعوقات التي تصادف الباحث الكيميائي أثناء القيام بالتحليل للعينات على جهازي HPLC-MS CG- MS وفي الأخير تم إستنتاج أهم المزايا و المجالات التطبيق لكل من جهاز HPLC-MS، CG-MS. ونظرا لعدم توفر الأجهزة في المؤسسة التي ندرس بها لم نقم بالعمل المخبري.

الكلمات الدالة: HPLC-MS، CG-MS، تحليل العينات، الطور الثابت، الطور المتحرك ، المضخات عالية الضغط، الحقن بالتبخير المباشر، الكروماتوغرام.

Summary:

This study is a detailed theoretical study , of gas chromatography associated with Mass spectra GC-MS and hig-performance liquid chromatography , associated with Mass spectra HPLC-MS , The major parts and components of both GC-MS , HPLC-MS have been addressed .

Learn about the practical conditions and the principle of operation of each method and its distinctive phases .The main problems and difficulties encountered by the chemist during the sample analysis are mentioned onGC-MS and HPLC-MS.

The most important features and application areas of GC-MS and HPLC-MS are finally inferred . Because of the lack of equipment in the institution we are studying , we have not done the work of informers.

Key words : GC- MS, HPLC-MS , Sample analysis, stationary phrase, mobilephrase, chromatogram.

قائمة الرموز :

الرمز	بالعربية	الأجنبية
σ	الانحراف المعياري	l'écart type du pic
σ^2	التباين	variance
δ	عرض متوسط الارتفاع	La largeur á mi-hauteur
ω	قاعدة الذروة	a largeur de base du pic
K_d	معامل التوزيع	ditribution constant
C_s	تركيز المادة في الطور الثابت	concentration de la phase stationnaire
C_m	تركيز المادة في الطور المتحرك	Concentration de la phase mobile
t_R	زمن المكوث للمركب	Le tempe de rétention
t'_R	زمن المكوث الحقيقي	Le tempe de rétention corrigé ou réduit
t_M	الزمن الميت	Le tempe de mort
μ	سرعة جزيئات الوسط المتحرك	la vitesse la phase mobile
V_M	الحجم الميت	la volum mort
D	معدل تدفق الطور المتحرك	le débit
V_R	حجم الاحتجاز	le volume Rétention
K'	عامل السعة	Le facteur de Rétention
α	عامل الانتقائية أو الاختيارية	Le facteur de sélectivité
H	كفاءة العمود	l'efficacité d'un colonne
N	عدد الطبقات النظرية	Number de plateaux théoriques

La Résolution	قدرة الفصل	R_s
	ارتفاع الطبقة الناشئ عن المسارات المتعددة	H_e
Diamètre des granulés	قطر الحبيبات	d_p
	ارتفاع الطبقة الناشئ عن الانتشار الطولي	H_l
Coefficient de diffusion dans phase mobile	معامل انتشار جزيئات في الوسط المتحرك	D_M
	ارتفاع الطبقة النظرية الناشئ عن مقاومة حركة الجزيئات في الوسط المتحرك	H_m
Coefficient de diffusion dans le phase stationnaire	معامل انتشار الجزيئات المادة في الوسط الثابت	D_s
	ارتفاع الطبقة النظرية الناشئ عن مقاومة حركة الجزيئات في الوسط الثابت	H_s
Épaisseur de phase stationnaire	سمك الوسط الثابت	d_s
Vitesse optimale	السرعة المثلى	μ_{opt}
Gas Chromatography	كروماتوغرافيا الغاز	GC
Mass Spectrometry	مطياف الكتلة	MS
Gas Solid Chromatography	كروماتوغرافيا غاز - صلب	GSC
GasLiquidChromatography	كروماتوغرافيا غاز - سائل	GLC
Pound Square inch absolute pressure	رطل لكل بوصة مربعة الضغط المطلق	PSIA
Pound Square inch gauge pressure	رطل لكل بوصة مربعة الضغط	PSIG
Pound Square inch	رطل لكل بوصة مربعة	PSI
atmosphère	وحدة الضغط الجو	atm

Carbondioxide	ثاني أكسيد الكربون	CO ₂
Methane	الميثان	CH ₄
Sulfurdioxide	ثاني أكسيد الكبريت	SO ₂
Nitrate	النترات	NO ₃
Nitrogenoxidegas	أكسيد النيتروجين	NO _x
Helium	الهليوم	He
Hydrogen	الهيدروجين	H ₂
Nitrogen	النيتروجين	N ₂
Centemeter	السنتيمتر	Cm
Second	الثانية	S
Polytetrafluoroethylene	التفلون	PTFE
microliter	ميكرو لتر	μl
Septum	الحاجز	Septa
Celsius	درجة مئوية	°C
Programmable tempe- ratuevaporising	التبخير بدرجة حرارة مبرمجة	PTV
minute	الدقيقة	min
Temperature programing gas Chromatography	كروماتوغرافيا الغاز ببرمجة درجة الحرارة	TPGC
meter	المتر	m
micrometer	الميكرومتر	μm
Fusedsilica open tubular	أنبوب مفتوح من السيليكا المنصهرة	FSOT

Porous layer open tubular	أنبوب مفتوح طبقتة مسامية	PLOT
Support coated open tubular	أنبوب مفتوح بدعم مغلف	SCOT
Polyethylene glycol	بوليمر الإيثيلين غلايكول	PEG
Photo multiplier tube	صمام المضاعف الضوئي	PMT
Torricelli	تور	toor
Molecule weight	الوزن الجزيئي	M ⁺
Mass	الكتلة	m
Spacers axis	محور الفواصل	X
Axis arrangement	محور الترتيب	Y
Volume	الحجم	V
référence	مرجعي	réf
échantillon	عينة	éch
	مساحة القمة	A
Cencetration	التركيز (مول/ لتر)	C
Volatile organic compounds	المركبات العضوية المتطايرة	VOCs
Polycyclic aromatic hydrocarbons	الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات	PAH
High-performance liquid chromatography	الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي	HPLC
Ultra Performance liquid chromatography	الكروماتوغرافيا السائلة فائقة الأداء	UPLC
Electrospray ionisation	التأين بالرش الكهربائي	ESI
Amospheric pressure chemical ionisation	التأين الكيميائي تحت الضغط الجوي	APCI

Normal phase liquid chromatography	كروماتوغرافيا الطور العادي	NPLC
Reverse- phase liquid chromatography	كروماتوغرافيا الطور العكوس	RPLC
Ion-Exchange chromatography	كروماتوغرافيا التبادل الأيوني	IEX
Sizeexclusion chromatography	كروماتوغرافي الاستبعاد الحجمي	SEC
bar	بار (وحدة ضغط)	bar

قائمة الأشكال:

الرقم	العنوان	الصفحة
1	مخطط الكروماتوغرام	05
2	شكل قمم الكروماتوغرافيا	06
3	توزيع جزيئات المادة بين الطورين (الثابت و المتحرك)	07
4	مخطط كروماتوغرام	08
5	كروماتوغرام الناتج عن فصل المادتين 1 و 2	09
6	تأثير المسارات المتعددة	11
7	الانتشار الجزيئي	13
8	تأثير مكان وجود الجزيء المعني	14
9	تأثير عيوب تعبئة العمود	14
10	ولوج الجزيئات في المسامات والمسارات المغلقة	15
11	المقاومة التي تعانها الجزيئات في الوسط الثابت	16
12	كروماتوغرام المرجعي $C_{réf}$ وكروماتوغرام العياري $C_{éch}$	19
13	كروماتوغرام المرجعي وكروماتوغرام العياري	21
14	جهاز كروماتوغرافيا الغاز GC	25
15	جهاز كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة GC-MS	26
16	منظم الضغط ذو المرحلة الواحدة	28
17	منظم الضغط ذو المرحتين	29
18	منظم الضغط المرتبط بالخط	29
19	القدرة على الفصل باستخدام الغازات الثلاثة (N_2, H_2, He)	31
20	حقنة سيرينغ	32
21	الحقن اليدوي	32
22	أخذ العينات التلقائي	32
23	حاقن ال septa	33
24	تأكل حاقن ال septa	33
25	الحقن بالتبخير المباشر	34
26	الحقن بدرجة حرارة مبرمجة PTV	34

35	الحقن المباشر في العمود	27
35	غرفة التبخير	28
37	صورة غرفة التبخير	29
37	شكل مصمم يسمح بتركيز اتجاه العينة على مدخل العمود	30
40	الفصل باستخدام حرارة متغيرة وحرارة ثابتة	31
42	الأعمدة المعبأة	32
42	الأعمدة الشعرية	33
43	أنواع الأعمدة الشعرية	34
45	مادة صناعة الأعمدة الشعرية	35
47	الصيغة الكيميائية للبولي سيلوكسان polysiloxane	36
48	الصيغة الكيميائية لبوليمر الإيثيلين جلايكول PEG	37
50	ربط الوسط الثابت Covalent bonding of sp	38
51	ربط جزيئات الوسط الثابت crosslinking	39
52	مطياف الكتلة	40
53	طيف الكتلة لمركب العضوي	41
54	مخطط كروماتوغرام والطيف الكتلي	42
55	شكل يوضح جهاز GC-MS	43
58	كروماتوغرام عند درجة حرارة ثابتة 150°C	44
58	كروماتوغرام عند درجة حرارة ثابتة 220°C	45
59	برنامج لتعديل درجة حرارة الفصل TPGC	46
59	الكروماتوغرافيا الناتج عن استخدام برنامج TPGC	47
60	كروماتوغرام عند درجة حرارة ثابتة 150°C	48
60	كروماتوغرافيا باستخدام برنامج TPGC	49
63	المركبات الكيميائية المعزولة من الزيت الأساسي لنبته M.oleifera	50
64	كروماتوغرافيا GC-MS الخاص بالمركبات الكيميائية المعزولة من الزيت الأساسي لنبته M.oleifera	51
66	مخطط توضيحي لجهاز HPLC	52
66	صورة لجهاز HPLC-MS	53
67	صورة للقارورات المستعملة في جهاز HPLC-MS	54

68	صورة جهاز UPLC	55
68	صورة مضخات جهاز HPLC	56
68	صورة لمضخة حقنة في جهاز HPLC	57
69	رسم توضيحي لمكونات مضخة ترددية في أجهزة HPLC	58
69	صورة مخمد النبضات	59
69	صورة للمكبس الترددي وخاتم لمنع التسرب	60
70	رسم توضيحي لمضخة ذات راس واحد	61
70	رسم توضيحي لمضخة مزدوجة الرأس	62
71	صورة الحاقن المستخدم في جهاز HPLC	63
71	صورة لحاقن HPLC ومواقع الفتحات الموجودة فيه	64
72	رسم توضيحي لعملية الحقن في جهاز	65
72	صورة لأنبوبة العينة ذات أحجام مختلفة	66
73	رسم توضيحي لخطوات عمل الحاقن	67
73	صورة الإسطوانة الموجودة في الحاقن	68
73	صورة لنوع الإبرة الإسطوانية الخاصة بحاقن	69
74	صورة لأعمدة الفصل في جهاز HPLC مختلفة الأحجام و الأنواع	70
74	رسم توضيحي لأجزاء العمود المستخدمة في جهاز HPLC	71
75	رسم تخطيطي لكيفية ربط جهاز MS بجهاز HPLC	72
76	رسم تخطيطي لعملية الرش الكهربائي	73
76	رسم تخطيطي لعملية التأين الكيميائي تحت الضغط الجوي	74
78	بنية الكيميائية لهلام السيليك	75
79	جزيئات السيليك من نوع مسامي 5 ميكرو متر	76
79	صورة لمسامات من نوع الأحادية	77
80	كروماتوغرام لنفس مركبات في شروط مختلفة	78

قائمة الجداول :

الصفحة	العنوان	الرقم
44	مقارنة الأعمدة المعبأة (Packedcolumn) و الأعمدة غير المعبأة (capillarycolumn)	1
46	بعض خواص الكروموسوربات	2
48	أنواع الأوساط الثابتة للبولي سيلوكسان (Polysiloxane)	3
49	أنواع الأوساط الثابتة واستعمالاتها في كروماتوغرافيا الغاز	4
77	المواد المستخدمة كطور ثابت في HPLC	5
78	مراحل تطور المسامات	6
82	بعض الأطوار الثابتة المعدلة كيميائياً في HPLC	7
83	بعض المذيبات المستعملة كطور متحرك في HPLC	8

قائمة المنحنيات:

الصفحة	المنحنى
17	منحنى (1): المنحنى البياني لمعادلة Van Deemter
19	منحنى (2): المنحنى العياري الخارجي $A = f(c_i)$
30	منحنى (3): يوضح كفاءة الفصل باستخدام الغازات الثلاثة (H_2 , He , N_2) عند سرعات عالية

قائمة المحتويات:

الصفحة	المحتوى
I	الإهداء
II	شكر والعرفان
III	الملخص
VII	قائمة الرموز
XII	قائمة الأشكال
XV	قائمة الجداول
XVI	قائمة المنحنيات
XVII	قائمة المحتويات
2	مقدمة عامة
I - الفصل الأول: عموميات حول الكروماتوغرافيا	
5	1.1 - الكروماتوغرام
5	1.1 - 1 - شكل القمم في الكروماتوغرافيا
6	1.1 - 2 - خصائص الكروماتوغرام
7	1.1 - 2 - 1 - معامل التوزيع Distribution
7	1.1 - 2 - 2 - زمن المكوث المضبوط t_R'
8	1.1 - 2 - 3 - متوسط السرعة الخطية لجزيئات المادة داخل العمود
8	1.1 - 2 - 4 - سرعة جزيئات الوسط المتحرك μ
8	1.1 - 2 - 5 - الحجم الميت V_M
9	1.1 - 2 - 6 - حجم الاحتجاز V_R
9	1.1 - 2 - 7 - عامل السعة K'
9	1.1 - 2 - 8 - عامل الإنتقائية (الإختيارية) α
10	1.1 - 2 - 9 - كفاءة الفصل (كفاءة العمود) H
10	1.1 - 2 - 10 - قدرة العمود على الفصل Resolution
11	2.1 - العوامل التي تؤثر في اتساع منحنى الإشارة
11	2.1 - 1 - تأثير المسارات المتعددة
12	2.2 - 1 - الإنتشار الجزيئي الناشئ عن إختلاف التركيز

13	2.1-3-مقاومة حركة الجزيئات وانتقال جزيئات المادة
13	2.1-3-1-المقاومة التي تعانيتها الجزيئات في الوسط المتحرك
15	2.1-3-2-المقاومة التي تعانيتها الجزيئات في الوسط الثابت
16	3.1 - معادلة السيد Van Domter
18	4.1 - التحليل الوصفي والكمي في الكروماتوغرافيا
18	4.1-1- التحليل الوصفي
18	4.1-2- التحليل الكمي
18	4.1-2-1- المعايير الخارجية
20	4.1-2-2- المعايير الداخلية
II - الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغاز المقترنة بالمطياف الكتلي GC-MS	
24	1.1 - كروماتوغرافيا الغاز
24	1.1-1- آلية الفصل باستخدام كروماتوغرافيا الغاز
25	1.1-2- جهاز كروماتوغرافيا الغاز GC
25	1.1-3- مكونات جهاز كروماتوغرافيا الغاز GC-MS
26	2.1.1 - مبدأ كروماتوغرافيا غاز - مطياف الكتلة GC-MS
27	2.1.1-1- أجزاء جهاز GC-MS
27	2.1.1-1-1- أسطوانة الغاز الحامل carrier gascylinder
27	2.1.1-1-1-2- كيف تعبر الشركات عن نقاوة الغاز
27	2.1.1-1-2-1- منظم سريان الغاز الحامل
27	2.1.1-1-2-3- منظم الضغط المرتبط بأسطوانة الغاز cylinder regulator
29	2.1.1-1-2-4- منظم الضغط المرتبط بالخط
29	2.1.1-1-2-5- خصائص الغاز الحامل
31	2.1.2-2-1- الحاقن Injector
32	2.1.2-1-2-1- طرق الحقن
33	2.1.2-1-2-2- أنواع الحواقي
34	- الحقن بالتبخير المباشر
34	- حقن المجزئ/ الغير مجزئ Split/Splitless
35	- الحقن بدرجة حرارة مبرمجة PTV
35	- الحقن المباشر في العمود

35	2.1-2-3- نسبة التجزئة
36	2.1-2-4- غرفة التبخير
37	2.1-2-5- عملية الحقن وكيفية ضبط درجة حرارة الحاقن
38	2.1-3- Oven الفرن
38	2.1-3-1- ضبط درجة حرارة الفرن
39	- الحرارة الثابتة
39	- البرمجة الحرارية
40	2.1-3-2- خصائص فرن ذات درجة حرارة واحدة ثابتة Isothrmal
40	2.1-3-3- خصائص فرن ذات درجة حرارة يتم ضبطها طبقا لبرنامج معين
41	2.1-4- العمود
41	2.1-4-1- طول العمود وقطره
44	2.1-4-2- مادة صناعة العمود
45	2.1-4-3- حبيبات التعبئة وحجم وشكل الحبيبات وخصائصها
46	2.1-4-4- طلاء السائد
47	2.1-4-5- الوسط الثابت وأنواعه
49	2.1-4-6- النسبة المئوية للوسط الثابت
50	2.1-4-7- مشكلة نزع الوسط الثابت وحلها
51	2.1-4-8- درجة حرارة العمود
51	2.1-5- مكشاف مطياف الكتلة
53	2.1-5-1- طيف الكتلة
54	2.1-6- المسجل
55	3. طريقة عمل GC-MS
55	4. العوامل المؤثرة على كفاءة الفصل في الكروماتوغرافيا GC-MS
56	4.1- التغلب على مشاكل عملية الفصل والكفاءة في الكروماتوغرافيا الغازية GC-MS
57	4.2- المشكلة العامة في عملية الفصل في كروماتوغرافيا الغاز GC
60	5. تطبيقات كروماتوغرافيا الغاز
61	6. مثال تطبيقي
61	6.1- تحليل الزيوت الأساسية لنبذة Moingaoleifra
61	6.1-1- طريقة الجمع العينة

61	6.1-1-2- طريقة الإستخلاص
61	6.1-1-3- طريقة العمل
62	6.1-1-4- النتائج والمناقشة
1 - الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي المقترن بمطياف الكتلة HPLC-MS	
65	1.1 - تمهيد
65	2.1 - مبدأ عملها
65	3.1 - جهاز HPLC-MS ومكوناته الأساسية
66	3.1-1- خزان الطور المتحرك
67	3.1-2- المضخات عالية الضغط
68	3.1-2-1- مضخة الحقنة
68	3.1-2-2- مضخة الترددية
70	3.1-2-2-1- أنواع المضخات الترددية
71	3.1-3- الحاقن
74	3.1-4- العمود
75	3.1-5- المكشاف
75	3.1-5-1- آلية العمل HPLC-MS
76	3.1-5-1-أ- التأين بالرش الكهربائي
76	3.1-5-1-ب- التأين تحت الضغط الجوي
77	3.1-6- المسجل
77	4.1- الاطوار المميزة
77	4.1-1- الطور الثابت
78	4.1-1-1- المادة الاساسية لطور الثابت
80	4.1-2- انواع الطور الثابت
80	4.1-2-1-أ- الطور الثابت القطبي
81	4.1-2-1-ب- الطور الثابت الغير قطبي
82	4.1-3- الاحتياطات الواجب مراعاتها أثناء اختيار الطور الثابت
82	4.1-2- الطور المتحرك
83	4.1-2-1- شروط المذيب المستخدم
84	4.1-2-2- نوع وتركيبية الوسط المتحرك

84	4.2-3- أنظمة تدفق الطور المتحرك
85	4.3- العينة
85	5. أنوع كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي HPLC
85	5.1- الطور العادي
86	5.2- الطور العكوس
86	5.3- التبادل الأيوني
86	5.4- الإستبعاد الحجمي
86	6. العوامل المؤثرة
87	6.1- العوامل المؤثرة على الكفاءة
87	6.2- العوامل المؤثرة على قدرة الفصل
87	6.3- تأثير طول السلسلة
87	6.4- تأثير درجة الحموضة
87	7. ابرز المعوقات في التحليل
88	7.1- اسباب تتعلق ببناء وتركيبية العمود
88	7.2- اسباب لا تتعلق بالعمود
88	8. الحلول
89	9. تطبيقات HPLC-MS
91	الخاتمة
93	قائمة المصادر والمراجع

المقدمة

المقدمة :

تعتبر طرق الفصل و وسائل التحليل بنوعها الآلية والغير آلية ،مهمة جدا في الكيمياء التحليلية حيث بواسطتها يمكن حل الكثير من المشاكل التي تعترض المحلل الكيميائي ، ويتم إستعمال هذه الطرق والوسائل في العديد من المجالات كالتطب و الصناعة وغيرها من المجالات .

ومن أكثر طرق الفصل و التحليل شيوعا و إستعمالا في الكيمياء التحليلية نجد الكروماتوغرافيا وهي طريقة تستعمل في التحليل الكمي و النوعي ، وقد تم إكتشافها من طرف العالم ميخائيل تويست سنة 1903¹، وذلك من خلال قيامه بفصل أصباغ النباتات الملونة بإستخدام عمود معبأ بكاربونات الكالسيوم.

وقد أطلق توست على هذه التقنية الجديدة من تقنيات الفصل اسم كروماتوغرافي ، وذلك من اللاتينية Chroma وتعني لون، و graphien وتعني يكتب، أو بمعنى آخر تقنية كتابة اللونية.

وبتطور الكروماتوغرافيا تم إكتشاف طرق حديثة ، مثل الكروماتوغرافيا الغازية التي تطورت بسرعة كبيرة بعد أن تم إقتراحها عام 1948-1952 ، و كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي التي تطورت في فترة 1970-1980 ، ولقد أصبحت هذه الأجهزة تتوفر مقترنة بالمطياف الكتلي الذي يتميز بالقدرة على التعرف على المركبات المفصولة بدرجة عالية من التأكد قد تصل إلى اليقين ،مما أدى إلى تحسين الطريقتين والوصول إلى نتائج ودقة فصل عالية².

كروماتوغرافيا الغاز المتصل بمطياف الكتلة GC-MS و كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المتصلة بمطياف الكتلة HPLC-MS، هما تقنيات فصل إكتسبت إقبال واسع في كل المختبرات الاكاديمية والصناعية .

ولهذا تم إقتراح هذا الموضوع لمعرفة مبدأ عمل جهاز GC-MS وجهاز HPLC-MS، بحيث تم تقسيم هذه الدراسة إلى :

¹ - دكتور رضوان صدقي، الطرق الحديثة لتحليل الأحماض الأمينية وتقييم نوعية البروتين، المكتبة الأكاديمية (شركة مساهمة مصرية)، القاهرة بمصر 2004 ، ص 68.

² - د. منذر سليم عبد اللطيف، مبادئ التحليل الآلي مكتبة الفيزياء كوم 2018.

- الفصل الأول : عموميات حول الكروماتوغرافيا .
 - الفصل الثاني : الكروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي GC-MS
 - الفصل الثالث : الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي المقترنة بالمطياف الكتلي-HPLC
- .MS

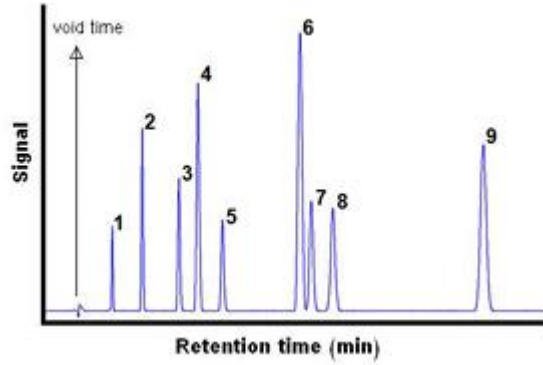
الفصل الأول

عموميات حول الكروماتوغرافيا

1. عموميات حول الكروماتوغرافيا:

1. الكروماتوغرام:

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



الشكل (1): مخطط الكروماتوغرام.

تظهر إشارة على خط الأساس توضح قيمة الزمن غير المحسوب، 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 مؤشر على ماهية المادة، أي أنه يستخدم كدليل تتم الاستفادة منه في التحليل الوصفي، بغرض التعرف على المواد المختلفة، أما شدة الإشارة (ارتفاع منحنى الإشارة)، أو مساحته التي نحصل عليها فتستخدم في التحليل الكمي، حيث تتناسب الشدة مع التركيز¹.

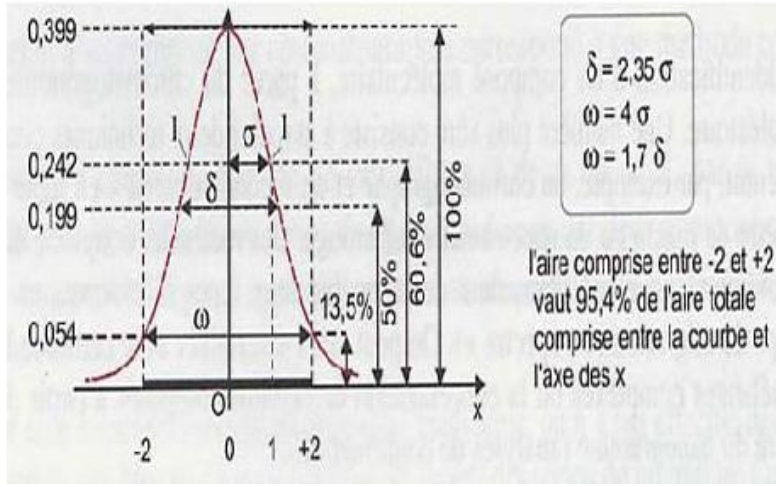
1.1 شكل القمم في الكروماتوغرافيا:

شكل القمم في قمم الكروماتوغرافيا مساوية لمنحنى غاوس ذو المعادلة².

¹ - مبادئ التحليل الآلي، الفصل العاشر ص 9.

² - Pr, M.N. BENNANI, Techniques D'Analyses Chromatographiques, Forme des pics en chromatographie, Université Moulay-ismail Faculté des sciences-Mecknés Département de chimie, page 12.

$$y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{t^2}{2}}$$



الشكل (2): شكل قمم الكروماتوغرافيا.

وتتميز هذه القمم بمايلي:

σ : الانحراف المعياري (يقابل نصف عرض الذروة التي تقاس عند 60.6% من ارتفاعها)

σ^2 : التباين

δ : عرض متوسط الارتفاع يقاس عند $h/2$ حيث $\delta=2.35\sigma$

ω : قاعدة الذروة حيث: $\omega=4\sigma=1.7\delta$

1. 2.1 خصائص الكروماتوغرام:

1. 2.1 معامل التوزيع **Distribution constant**: يحكم توزيع جزيئات المادة المراد فصلها بين

الوسطين (الثابت والمتحرك) بواسطة ثابت الاتزان الذي يعرف بمعامل التوزيع K_d وبالتالي فإن

جزيئات المادة تعبر بسرعة في الاتجاهين بين الوسطين وأن معدلات تركيزها تخضع لقانون التوزيع¹:

¹ - فاتن شومان, الكيمياء التحليلية الصيدلانية 2 (طرق الفصل) لطلاب السنة الثانية صيدلة: جامعة الشام الخاصة, الجزء

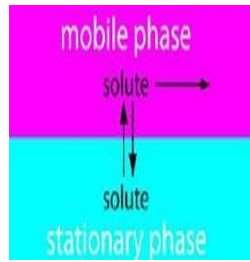
النظري 2020, الفصل الخامس الأسس النظرية في الكروماتوغرافيا ص 40 - 41.

الفصل الأول: عموميات حول الكروماتوغرافيا

$$K_d = \frac{C_s}{C_m}$$

C_s : تركيز المادة في الطور الثابت C_m : تركيز المادة في الطور المتحرك

عندما تكون قيمة K_d كبيرة هذا يعني أن تركيز المادة في الوسط الثابت أكبر من تركيزها في الوسط المتحرك وبالتالي فإن جزيئات المادة هذه سوف تمكث وقتاً طويلاً نسبياً في الوسط الثابت (تتأخر في الخروج).



الشكل (3): توزيع جزيئات المادة بين الطورين (الثابت والمتحرك).

1. 2.2.1 زمن المكوث المضبوط t_R' :

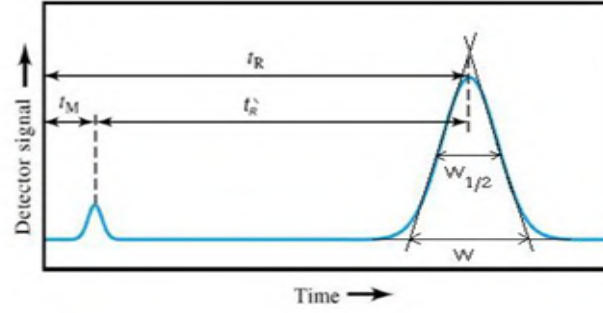
$$t_R' = t_R - t_M$$

t_R : زمن المكوث، و t_R' : هو زمن المكوث المضبوط (أي زمن المكوث مطروحاً منه الزمن الضائع أو الميت t_M).

t_M : هو الزمن الضائع (أي الزمن الذي تقضيه أي مادة لا يحدث لها أي تداخل مع الوسط الثابت في العمود)¹.

¹ - مبادئ التحليل الآلي، الفصل العاشر ص 14.

الفصل الأول: عموميات حول الكروماتوغرافيا



الشكل (4): مخطط كروماتوغرام.

3.2.1 متوسط السرعة الخطية لجزيئات المادة داخل العمود: \bar{v} :

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

L: هو طول العمود t_R : هو زمن المكوث

4.2.1 سرعة جزيئات الوسط المتحرك u :

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

L: هو طول العمود t_M : الزمن الضائع (الزمن الذي يقضيه الوسط المتحرك كي يمر في العمود)¹.

5.2.1 الحجم الميت V_M : (حجم الطور المتحرك في العمود)².

$$V_M = t_M \cdot D$$

D: معدل تدفق الطور المتحرك

¹ - مبادئ التحليل الآلي، الفصل العاشر ص 11 - 12.

² - Y.FRACONS, Licence Professionnelle Industries Chimiques et Pharmaceutiques, Chromatographie en Phase Gazeuse CPG: Aspect théorique.

الفصل الأول: عموميات حول الكروماتوغرافيا

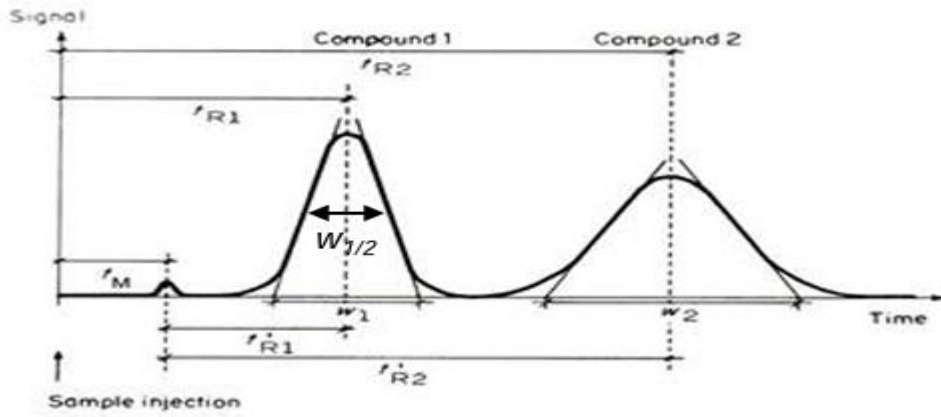
6.2.1 حجم الاحتجاز V_R : (حجم الطور المتحرك اللازم لهجرة المركب من بداية العمود إلى نهايته)¹.

$$V_R = t_R \cdot D$$

7.2.1 عامل السعة K' Capacity factor²:

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

$$k' = \frac{t_R'}{t_M} \quad \text{حيث: } t_R' = t_R - t_M$$



الشكل (5): كروماتوغرام الناتج عن فصل المادتين 1 و 2.

8.2.1 عامل الانتقائية α (الاختيارية) Selectivity factor³:

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{K_2'}{K_1'} = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{V_{R2} - V_M}{V_{R1} - V_M}$$

K_1' : عامل السعة للمادة 1 K_2' : عامل السعة للمادة 2

¹ - Chromatographie en Phase Gazeuse.

² - مبادئ التحليل الآلي. الفصل العاشر ص 13.

³ - الكيمياء التحليلية الصيدلانية 2. الفصل الخامس ص 45.

الفصل الأول: عموميات حول الكروماتوغرافيا

1. 9.2.1 كفاءة الفصل (كفاءة العمود)¹:

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

L: طول العمود H: الارتفاع المكافئ للطبقة النظرية N: عدد الطبقات النظرية

يمكن حساب N من العلاقتين التاليتين²:

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

أو:

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

W₁: عرض القمة W_{1/2}: عرض القمة عند منتصف الارتفاع

1. 10.2.1 قدرة العمود على الفصل Resolution R_s³:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} = \frac{2\Delta t}{W_1 + W_2}$$

W₁: عرض القمة للمادة 1 W₂: عرض القمة للمادة 2

t₁: زمن المكوث للمادة 1 t₂: زمن المكوث للمادة 2

¹ - الكيمياء التحليلية الصيدلانية 2. الفصل الخامس ص 47.

² - مبادئ التحليل الآلي. الفصل العاشر ص 22-23.

³ - الكيمياء التحليلية الصيدلانية 2. الفصل الخامس ص 50.

الفصل الأول: عموميات حول الكروماتوغرافيا

وكذلك يمكن حساب قدرة العمود على الفصل بالعلاقة التالية¹:

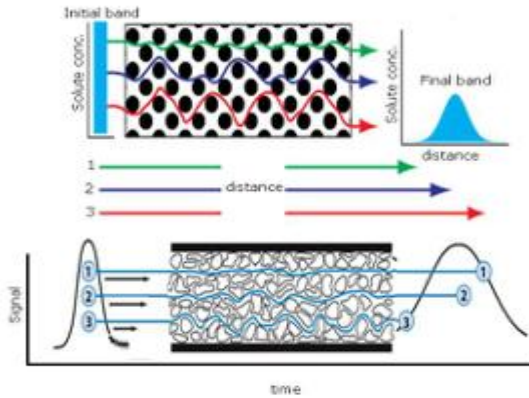
$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{k_B'}{1 + k_B'} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)$$

N: عدد الطبقات النظرية $t'_{R2}/t'_{R1}:\alpha$

1. العوامل التي تؤثر في اتساع منحنى الإشارة:

1.2 تأثير المسارات المتعددة:

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 مكوث كل جزيء سيختلف ولو قليلاً عن الجزيئات الأخرى، وبالتالي حدوث انتشار لتلك الجزيئات، أو اتساع منحنى الإشارة، ويعتمد بشكل أساسي على شكل وحجم الحبيبات الحاملة للوسط الثابت وكفاءة وانتظام تعبئة العمود والشكل التالي يوضح ذلك:



الشكل (6): تأثير المسارات المتعددة.

ومن الممكن التعبير عن مشاركة هذا العامل في اتساع منحنى الإشارة بالمعادلة التالية:

¹ - مبادئ التحليل الآلي. الفصل العاشر ص 37.

$$H_e = J d_p$$

H_e : هو ارتفاع الطبقة الناشئ عن المسارات المتعددة j : ثابت d_p : 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.

1. 2.2 الانتشار الجزيئي الناشئ عن اختلاف التركيز:

ويسمى هذا النوع أيضا الانتشار الطولي، ومنشأه بسيط للغاية، ويتمثل في انتشار الجزيئات الموجودة في المنطقة المركزة إلى المناطق الأقل تركيزا حولها وبديهي أن مقدار الانتشار يتوقف على معامل انتشار جزيئات المادة في الوسط المتحرك، بحيث يزيد الانتشار واتساع منحنى الإشارة بزيادة معامل الانتشار، وحيث أن معامل الانتشار للغازات - بشكل عام - أكبر بكثير من السوائل، فمن البديهي أن تأثير هذا العامل في كروماتوغرافيا الغاز سيكون جوهريا، بينما أقل بكثير في كروماتوغرافيا 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:

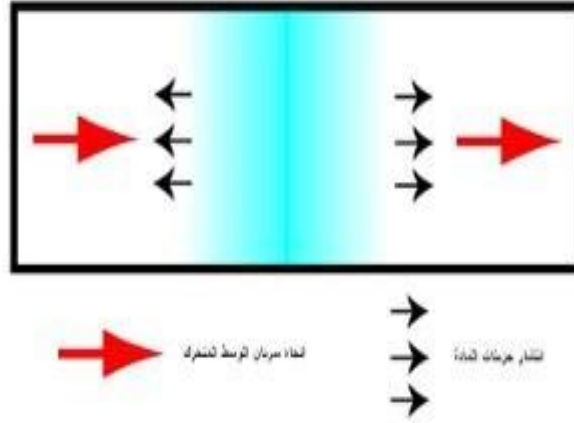
H_l : ارتفاع الطبقة الناشئ عن الانتشار الطولي ρ : ثابت D_M : معامل انتشار جزيئات المادة في الوسط المتحرك

u : سرعة سريان الوسط المتحرك

إن الانتشار الطولي يقل كلما زادت سرعة سريان الوسط المتحرك، ذلك لأن السرعة تقلل الانتشار المعاكس لها، وفي نفس الوقت فإن سرعة الوسط المتحرك أكبر من سرعة الانتشار في نفس الاتجاه، مما

الفصل الأول: عموميات حول الكروماتوغرافيا

يجعل تأثير هذا النوع من الانتشار قليل جداً، عند استخدام سرعات عالية للوسط المتحرك وهو ما نفعله بالضبط في كروماتوغرافيا الغاز¹.



الشكل (7): الانتشار الجزيئي.

1. 3.2 مقاومة حركة وانتقال جزيئات المادة:

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 الجزيئات على الانتشار في الوسطين، واعتماد ذلك على سمك كل وسط في المنطقة المعنية، ويمكن توضيح العوامل المختلفة المؤثرة على المقاومة في الوسطين وذلك كما يلي²:

1. 1.3.2 المقاومة التي تعانيها الجزيئات في الوسط المتحرك:

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

¹ - مبادئ التحليل الآلي. الفصل العاشر ص 26 - 28.

² - مبادئ التحليل الآلي. الفصل العاشر ص 28 - 31.

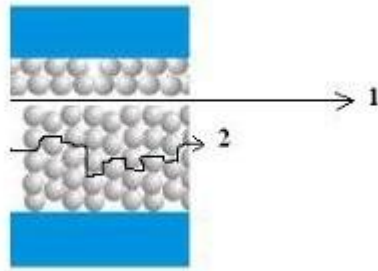
الفصل الأول: عموميات حول الكروماتوغرافيا

مكان وجود الجزيء المعني : فمثلا الجزيئات الموجودة في مركز العمود تتحرك بسرعة أكبر من تلك المتواجدة بالقرب من جدار العمود.



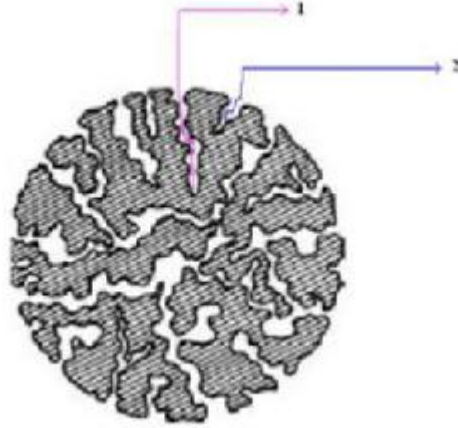
الشكل (8): تأثير مكان وجود الجزيء المعني.

وجود عيوب في تعبئة العمود: وفي هذه الحالة، تكون حركة الجزيئات التي صادفت المرور عبر تلك القنوات - بالتأكيد - أسرع بكثير من تلك التي لم تصادفها.



الشكل (9): تأثير عيوب تعبئة العمود.

ولوح بعض الجزيئات في مسامات ومسارات مغلقة : إن تواجد الجزيئات في الوسط المتحرك لا يعني مطلقاً أنها تتحرك بنفس السرعة، 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 المسامات لا تتحرك بالسرعة المطلوبة، لانعدام حركة وسريان الوسط المتحرك فيها.



الشكل (10): ولوج الجزيئات في المسامات والمسارات المغلقة.

وعليه ستعتمد سرعة حركة الجزيئات في الوسط المتحرك (الراكب في المسارات 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:

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

H_m : ارتفاع الطبقة النظرية الناشئ عن مقاومة حركة الجزيئات في الوسط المتحرك v : ثابت

d_p : قطر الحبيبات u : معدل سريان الوسط المتحرك D_M : معامل انتشار جزيئات المادة في الوسط المتحرك

ويتضح من العلاقة أن ارتفاع الطبقة النظرية يتناسب طرديا مع معدل سريان الوسط المتحرك، إضافة إلى حجم الحبيبات المستخدمة في تعبئة العمود، بينما يتناسب عكسيا مع معامل انتشار جزيئات المادة في الوسط المتحرك.

1. 2.3.2 المقاومة التي تعانيها الجزيئات في الوسط الثابت:

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

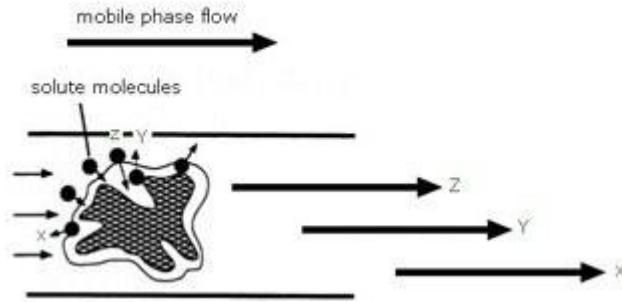
الفصل الأول: عموميات حول الكروماتوغرافيا

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

H_s : ارتفاع الطبقة النظرية الناشئ عن مقاومة حركة الجزيئات في الوسط الثابت ϕ : ثابت

d_s : سمك الوسط الثابت u : معدل سريان الوسط المتحرك D_s : معامل انتشار جزيئات المادة في الوسط الثابت

ويتضح من العلاقة أن ارتفاع الطبقة النظرية يتناسب طرديا مع معدل سريان الوسط المتحرك، إضافة إلى سمك الوسط الثابت، بينما يتناسب عكسيا مع معدل انتشار جزيئات المادة في الوسط الثابت.

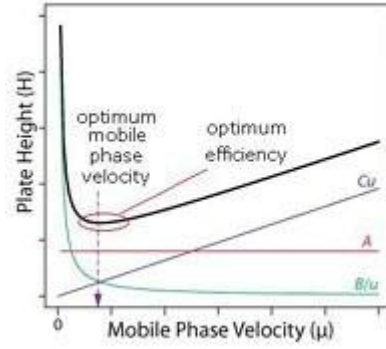


الشكل (11): المقاومة التي تعانيها الجزيئات في الوسط الثابت.

1. 3 معادلة السيد Van Deemter:

$$H=A+B/u+Cu$$

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:



المنحنى (1): المنحنى البياني لمعادلة Van Deemter.

وبما أن في كروماتوغرافيا الغاز GC لا توجد مسارات متعددة فمعادلة Van Deemter تصبح:

$$H = B/u + Cu$$

إن العامل B هو الأهم في كروماتوغرافيا الغاز وذلك نظرا لسرعة انتشار المواد الغازية، بالذات عند درجات الحرارة المرتفعة وعليه يجب العمل على تقليل B.

وفي كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي HPLC تكون المعادلة كالتالي:

$$H = A + B/u + Cu$$

كما أن العامل C هو الأهم في كروماتوغرافيا السائل وعليه يجب العمل على تقليله.

يمكن الوصول إلى قيمة معدل سريان المثلى عن طريق مفاضلة معادلة Van Deemter، بإيجاد التغير في ارتفاع الطبقة النظرية بالنسبة إلى التغير في معدل سريان الوسط المتحرك:

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

وحيث أن التفاضل عند أي قمة يساوي صفر، أي $\frac{dH}{du} = 0$ ، فإن¹:

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

¹ - مبادئ التحليل الآلي. الفصل العاشر ص 25 - 33.

الفصل الأول: عموميات حول الكروماتوغرافيا

1. 4 التحليل الوصفي والكمي في الكروماتوغرافيا:

1.4 التحليل الوصفي:

يجرى التحليل النوعي بواسطة زمن الاحتجاز (Retention time) هو الزمن اللازم لوصول المادة من لحظة حقنها عبر العمود إلى لحظة وصولها إلى الكاشف وتسجيل أعلى نقطة في الذروة، حيث يتم مقارنة زمن احتجاز المادة مع زمن احتجاز المادة القياسية للتشخيص النوعي¹.

1. 2.4 التحليل الكمي:

يعتمد أساسا على طريقتين من المعايرة هما المعايرة الخارجية والمعايرة الداخلية.

1. 2.4 المعايرة الخارجية:

في المجال الخطي لاستجابة الكاشف تتناسب كمية كتلة المادة المذابة المحقونة طرديا مع مساحة الذروة التي قدمها الكاشف:

$$m_i = k_i \cdot A_i$$

A_i : مساحة قمة المذاب تقاس بالكاشف أو تقدر على الكروماتوغرام.

K_i : معامل استجابة المطلق للكاشف.

m_i : كتلة المذاب التي تم حقنها على مستوى الحاقن ومرت عبر العمود الكروماتوغرافي يتم تحديدها من خلال معرفة حجم المحلول.

الخطوات:

- تحضير محلول مرجعي (قياسي) بتركيز معروف $C_{réf}$ للمذاب المراد قياسه.

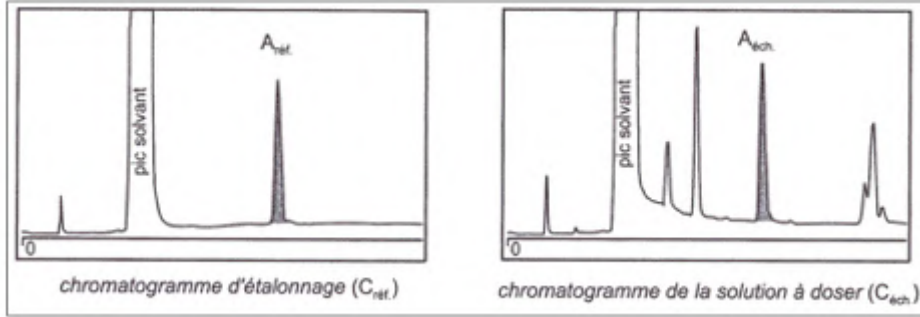
- حقن حجم معين V .

- تحديد مساحة القمة $A_{réf}$ من خلال الكروماتوغرام القياسي (chromatogramme étalon) المحصل عليه.

¹ - التحليل الآلي، المحاضرة الثالثة، ص 7.

الفصل الأول: عموميات حول الكروماتوغرافيا

- حقن نفس الحجم من العينة التي تحتوي على المذاب بتركيز غير معروف ليتم معايرته.
- يتم تحديد مساحة القمة $A_{éch}$ من خلال الكروماتوغرام المحصل عليه في نفس الشروط التجريبية (chromatogramme de la solution doser).



الشكل (12): كروماتوغرام المرجعي ($C_{réf}$) وكروماتوغرام العياري ($C_{éch}$).

محلول مرجعي (solution étalon):

$$m_{iréf} = c_{iréf} \cdot v = k_i \cdot A_{iréf}$$

محلول عياري (solution à doser):

$$m_{iéché} = c_{iéché} \cdot v = k_i \cdot A_{iéché}$$

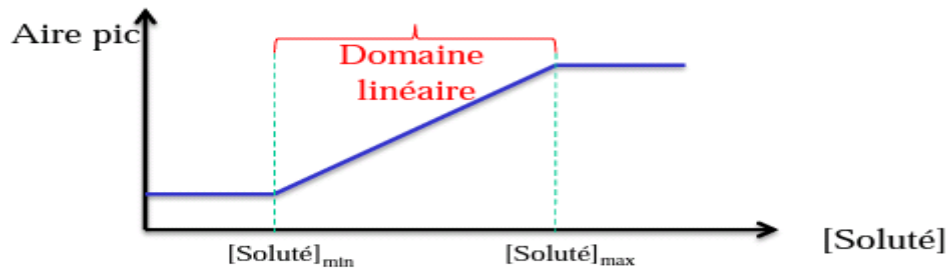
ومن العلاقة التالية يمكننا حساب التركيز المجهول:

$$c_{éch} = c_{réf} \cdot A_{éch} / A_{réf}$$

لتقليل الأخطاء في حساب المادة المراد فحصها والتحقق من خطية استجابة الكاشف:

من منحنى $A = f(c_i)$ للمحاليل القياسية يتم تحديد تركيز المادة للمحلول المراد فحصه:

$$A_{éch}^1 \rightarrow c_{éch}$$



المنحنى (2): المنحنى العياري الخارجي $A = f(c_i)$

¹-Introduction à la chromatographie page 59 - 64.

الفصل الأول: عموميات حول الكروماتوغرافيا

1. 2.2.4 المعايرة الداخلية:

تعتمد هذه الطريقة على حساب معامل الاستجابة لكل مكون نريد معايرته بالاستناد على مادة مرجعية:

حساب معامل الاستجابة النسبي k :¹

نفرض أن العينة تتكون من مركبين 1 و 2، ومركب 3 نرسم له E وهو المركب الإضافي المستعمل كمادة مرجعية Etalon interne، نحضر المحاليل التالية:

- محلول (1) للمركب 1 ذو تركيز c_1 .

- محلول (2) للمركب 2 ذو تركيز c_2 .

- محلول (3) للمركب 3 ذو تركيز c_E .

نحقن المحاليل المحضرة سابقا بنفس الحجم في شروط محددة فنحصل على كروماتوغرام المرجعي (chromatogramme d'étalonnage).

وبتطبيق العلاقة السابقة:²

$$\left. \begin{array}{l} m_1 = K_1 \cdot A_1 \\ m_2 = K_2 \cdot A_2 \\ m_E = K_E \cdot A_E \end{array} \right\} \frac{m}{m_E} = \frac{K_1 * A_1}{K_E * A_E} \quad \frac{m_2}{m_E} = \frac{K_2 * A_2}{K_E * A_E}$$

نستنتج معامل الاستجابة النسبي k :

$$K_{1/E} = \frac{K_1}{K_E} = \frac{m * A_E}{m_E * A_1}$$

$$K_{2/E} = \frac{K_2}{K_E} = \frac{m_2 * A_E}{m_E * A_2}$$

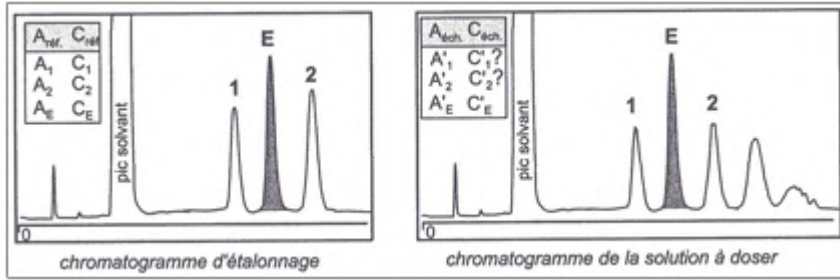
حساب تراكيز العينة:

¹ - علاوي مسعودة، محاضرة كروماتوغرافيا الغاز: كلية الرياضيات وعلوم المادة، جامعة قاصدي مرياح ورقلة 2019.

² - introduction à la chromatographie page 66 - 67.

الفصل الأول: عموميات حول الكروماتوغرافيا

نحقن حجم محلول من العينة مضاف إليه كمية من المادة المرجعية E في نفس الشروط السابقة فنحصل على الكروماتوغرام العياري (chromatogramme de la solution doser):



الشكل (13): كروماتوغرام المرجعي و كروماتوغرام العياري.

ويتم تحديد تركيز العينات بتطبيق العلاقة¹:

$$\frac{m_1}{m_E} = K_{1/E} * \frac{A_1}{A_E} \quad C_1 = C_E * K_{1/E} * \frac{A_1}{A_E}$$

$$\frac{m_2}{m_E} = K_{2/E} * \frac{A_2}{A_E} \quad C_2 = C_E * K_{2/E} * \frac{A_2}{A_E}$$

للحصول على نتائج دقيقة يجب أن تتوفر الشروط التالية في المادة المرجعية²:

- يجب أن تكون نقية وغير متواجدة في العينة.
- قمة المادة المرجعية يجب أن تكون مرسومة بشكل واضح ومميزة عن بقية القمم.
- لها زمن احتجاز قريب من أزمنة احتجاز المركبات المراد معايرتها.
- تركيزها قريب أو أكبر من المركبات المراد معايرتها للحصول على استجابة خطية على جهاز الكشف.
- يجب أن لا تتفاعل مع مكونات العينة.

¹ - introduction à la chromatograohie page 69.

² - محاضرة كروماتوغرافيا الغاز 2019.

الفصل الثاني

كروماتوغرافيا الغازية المقترنة

بالمطياف الكتلي GC-MS

II. كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي GC-MS:

II. 1 كروماتوغرافيا الغاز:

هو جهاز تحليل كروماتوغرافي الغاز وهو جهاز يقوم بتحليل نوعي وكمي لمخاليط المركبات العضوية خاصة المتطايرة منها في عينة، ويعتمد التحليل على تقنية كروماتوغرافيا الغاز، ويستخدم الغاز الحامل مثل النتروجين أو الهليوم كطور متحرك أما الطور الساكن فيكون إما:

- مادة امتزاز صلبة ويسمى في هذه الحالة كروماتوغرافيا غاز - صلب
Gas Solid Chromatography (GSC).

- سائل غير متطاير مطلي على سائد صلب ويسمى في هذه الحالة كروماتوغرافيا غاز - سائل
GasLiquidChromatography (GLC).

تستعمل هذه التقنية لفصل مركبات عديدة وبشكل خاص المركبات العضوية مثل الكحولات والهيدروكربونات والأسترات والألدهيدات^{1,2,3}.

1.1 آلية الفصل باستخدام كروماتوغرافيا الغاز:

كروماتوغرافيا الغاز باستخدام وسط ثابت صلب محدودة التطبيقات، وتعتمد آلية الفصل باستخدامها على التغير الواسع في الإدمصاص والتغير في درجة الحرارة وتستخدم بشكل أساسي لفصل الغازات الخفيفة مثل: CO_2 ، CH_4 ، SO_2 ، NO_3 ، NO_x ، وأمثالها أيضا، لذا لن تتم الاستفاضة بتفصيلها و سنتطرق بالتفصيل لآليات عملية الفصل التي تتم في وجود وسط ثابت سائل و وسط متحرك غازي فإنه يمكن القول أن المادة في العمود ستجزأ في الوسطين الثابت والمتحرك، بحسب طبيعتها القطبية وطبيعة قطبية الوسط الثابت، وحيث أن خصائص الوسط المتحرك الغازي لا يمكن تعديلها، فإن من المؤكد أن دور الوسط المتحرك الغازي ينحصر في حمل المادة في العمود،

¹ - سعود وهران منعم، كروماتوغرافيا الغاز: (جامعة الأنبار/ كلية العلوم/ قسم الكيمياء)، ص 1.

² - كتاب طرق الفصل الكيميائي (الكروماتوغرافيا): الفصل الثالث كروماتوغرافيا الغاز GC، ص 48.

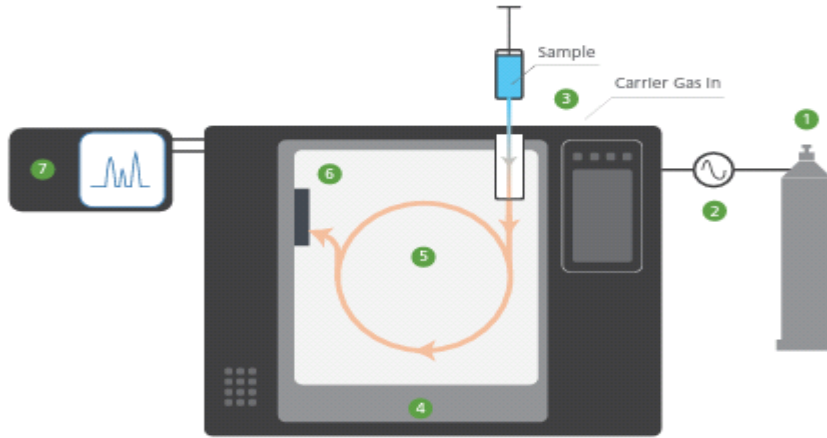
³ - أمل ناجي وادي، زينب محمد عبد الله، هادي كريم دحام، تطبيقات المواد البلورية السائلة في كروماتوغرافيا الغاز - السائل: مجلة جامعة النهدين/ المجلد 16 /العدد 2، دائرة بحوث المواد، وزارة العلوم والتكنولوجيا، بغداد - العراق ص 11.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

عند مغادرتها الوسط الثابت لذلك تم التوافق على تسمية الوسط المتحرك الغازي بالغاز الحامل (Carrier gas) ، لأنه لا تحدث عملية تجزئة حقيقية بين الوسطين، ولانحصار دور الوسط المتحرك الغازي على حمل المواد المختلفة خلال الحاقن، والعمود، والمكشاف.

إن أساس عملية الفصل في كروماتوغرافيا الغاز تتوقف على الخصائص القطبية للمواد المراد فصلها، ومدى انسجامها وتشابها مع الخصائص القطبية للوسط الثابت؛ فكلما كان التشابه أكبر كلما زاد زمن مكوث تلك المواد في الوسط الثابت (عند درجة حرارة معينة) والعكس صحيح¹.

II. 2.1 جهاز كروماتوغرافيا الغاز GC:



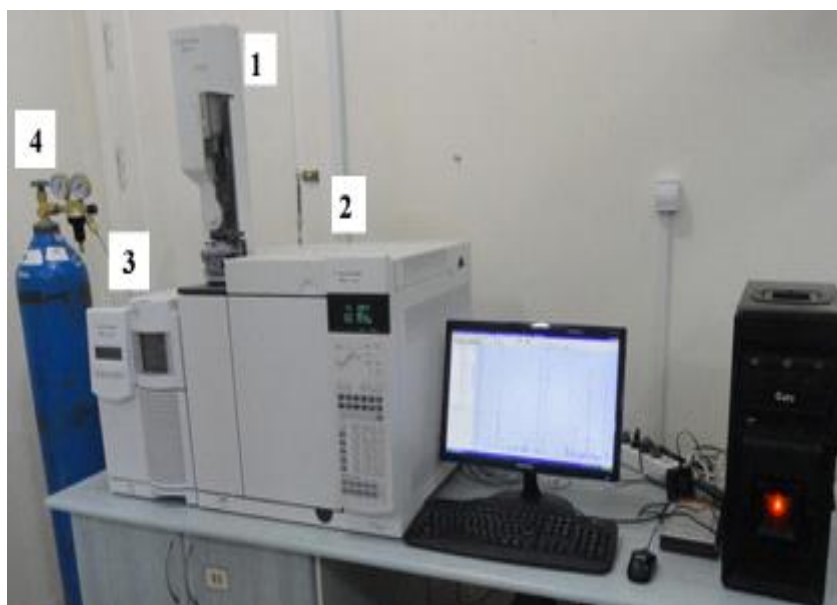
الشكل (14): جهاز كروماتوغرافيا الغاز GC.

II. 3.1 مكونات جهاز كروماتوغرافيا الغاز GC:

- 1 أسطوانة الغاز الحامل.
- 2 -منظم سريان الغاز الحامل.
- 3 -الحاقن.
- 4 -الفرن.
- 5 -العمود.
- 6 -المكشاف.

¹ - مبادئ التحليل الآلي، الفصل الحادي عشر، ص 2.

سننتقل إلى طريقة عمل جهاز كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة GC-MS وأجزائه والصورة التالية توضح هذا الجهاز:



الشكل (15): جهاز كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة GC-MS.

1 وحدة الحقن الآلي 2- GC 3- Mass spectrometry 4- وحدة التغذية بالغاز الحامل

II. 2 مبدأ كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة GC-MS:

تجمع تقنية ال GC-MS بين ميزة الكروماتوغرافيا الغازية (GC) في فصل المكونات المختلفة للمركبات العضوية الطيارة التي لا تتفكك حراريا في شروط التحليل وميزة الحساسية الانتقائية لمطيافية الكتلة (MS) مما يجعله قادرا على تحليل كمي وكيفي للمركبات العضوية الطيارة، تتم مقارنة طيف الشظايا لكل مركب مع أطياف مرجعية موجودة ضمن مكتبة إلكترونية ملحقة بالجهاز ،وبناء عليه يتم تحديد صيغة هذه المركبات حيث أن الجهاز مزود بحاسب يتضمن برنامج تشغيل الجهاز ومكاتب إلكترونية مثل: (Nist- Weily- Pesticides- Drugs) تضم مركبات مرجعية¹.

¹ - محمد يونس، الدليل المخبري في المعهد العالي لبحوث البيئة/ التجهيزات والأجهزة التحليلية الموجودة في المخبر /4 جهاز كروماتوغرافيا الغازية مع كاشف طيف الكتلة، جامعة تشرين المعهد العالي لبحوث البيئة، التجهيزات والأجهزة التحليلية الموجودة في المخبر 4، جهاز كروماتوغرافيا الغازية مع كاشف طيف الكتلة، 1 حزيران 2014، اللاذقية سوريا.

1.2 أجزاء جهاز GC-MS:

1.1.2 أسطوانة الغاز الحامل Carrier gas Cylinder:

إن الغاز الحامل قد يكون نتروجين أو هليوم (وفي بعض الأحيان هيدروجين لكن استخدامه نادرا نظرا لمخاطر السلامة) وتأتي أسطوانة الغاز الحامل بضغط يتناسب مع طبيعة الغاز، فمثلا تتسع أسطوانة النتروجين (سعة 50 لتر ماء) إلى حوالي 10 متر مكعب من الغاز عند ضغط يقترب من 2900PSIG (pound square inch gauge pressure) حيث أن الضغط الجوي يعادل PSIA 14.7 (pound per square inch absolute pressure)، والذي يساوي 0 PSIG ومن المعلوم أن:

1PSI = 6894.75729 pascals، أي أن الضغط الجوي يعادل:

$$1 \text{ atm} = 14.7 * 6894.75729 = 101.353 \text{ pascal}$$

أما أسطوانة الهليوم (سعة 50 لتر ماء) فتتسع عادة لحوالي 9 متر مكعب، عند ضغط حوالي 2900 PSIG، لذلك يمكن الملاحظة أن ضغط الأسطوانة يعتمد على نوع الغاز.

1.1.1.2 كيف تعبر الشركات عن نقاوة الغاز:

مثلا إذا كانت نقاوة غاز معين 99.8% فإنه يتم التعبير عن ذلك باستخدام الاختصار 2.8، فالرقم على اليسار (ال 2) تعني عدد التسعات في النسبة المئوية للنقاوة، أما الرقم إلى اليمين فيعبر عن أول رقم على أقصى يمين التسعات ولتوضيح ذلك أكثر ننظر إلى غاز ما نقاوته 99.994% فنقول بأنه يعبر عن ذلك باستخدام الاختصار 4.4 (أي 4 تسعات والرقم على يمين آخر تسعة هو 4) أما الغاز الذي نقاوته 99.9999% فيعبر عن ذلك باستخدام الاختصار 6.0 (أي 6 تسعات بالضبط)¹.

2.1.1.2 منظم سريان الغاز الحامل:

إن الغرض الأساسي من وجود المنظم هو المحافظة على ضغط ثابت للغاز الداخل إلى كروماتوغرافيا الغاز (ال GC) ومن الممكن تصنيف المنظمات إلى قسمين:

3.1.1.2 منظم الضغط المرتبط بأسطوانة الغاز regulator cylinder:

¹ - مبادئ التحليل الآلي، الفصل الحادي عشر ص 3 - 4.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

يرتبط هذا النوع من المنظمات بالأسطوانة مباشرة (عبر الصمام الموجود في أعلاها) ومهمته تخفيف ضغط الغاز من حوالي 2500PSI داخل الأسطوانة (عندما تكون ممتلئة) إلى حوالي 100 PSI وهو الضغط اللازم لتشغيل الجهاز ويشتمل المنظم على ساعتين لقياس الضغط إحداهما لقياس الضغط العالي داخل الأسطوانة أما الأخرى فتستخدم لقياس الضغط الخارج أو ضغط الإمداد والتشغيل. أما الضغط النهائي المستخدم لتشغيل الجهاز فيتم التحكم فيه وضبطه من قبل المستخدم، وذلك من خلال التحكم بالمفتاح الموجود في مقدمة المنظم الفرعي ومن الجدير بالذكر أنه يوجد نوعان من أنواع المنظمات المستخدمة لهذا الغرض، هما المنظم ذو المرحلة الواحدة single stage regulator والمنظم ذو المرحلتين two stage regulator أما المنظم ذو المرحلتين فيحتوي في الحقيقة على منظمين، يقوم الأول بتقليل الضغط من 2500 PSI إلى 200-600 PSI أولاً، بينما يقوم الآخر بتقليل الضغط إلى حوالي 100 PSI في المرحلة اللاحقة.

إن هذه التقنية (على خلاف المنظم ذو المرحلة الواحدة) تمنع تغير ضغط التشغيل عندما يقل الضغط داخل الأسطوانة (عندما يقترب الغاز داخل الأسطوانة من النفاذ)، وعليه فإن المنظمات ذوات المرحلتين هي التي تستخدم دائماً في أجهزة ال GC لضمان الحصول على ضغط إمداد وتشغيل ثابت للجهاز.



الشكل (16): منظم الضغط ذو المرحلة الواحدة.



الشكل (17): منظم الضغط ذو المرحلتين.

II. 4.1.1.2 منظم الضغط المرتبط بالخط:

ويكون هذا النوع من المنظمات مرتبطا بخط الإمداد، لكن استخدامه في أجهزة ال GC قليل للغاية¹.



الشكل (18): منظم الضغط المرتبط بالخط.

II. 5.1.1.2 خصائص الغاز الحامل:

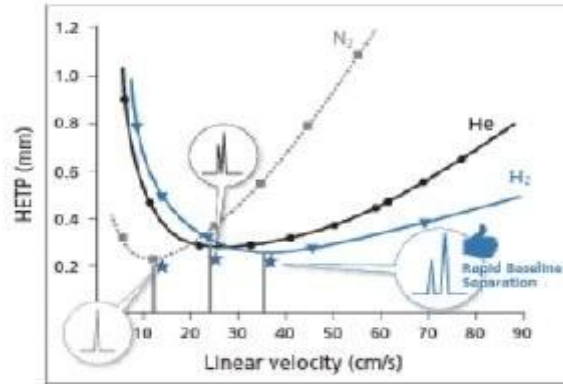
يجب أن يتميز الغاز الحامل بعدد من الخصائص أهمها:

1 أن يكون نقيًا جدًا أي 5.0 أو 4.0 على الأقل.

¹ - مبادئ التحليل الآلي، الفصل الحادي عشر، ص 4 - 5.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

- 2 أن لا يتفاعل مع الوسط الثابت أو المواد التي يتم فصلها، بالذات عند درجات الحرارة العالية التي تستخدم في عملية الفصل وعليه ليس من الحكمة استخدام الهواء كغاز حامل لأنه يحتوي على نسبة مهمة من الأوكسجين الذي يقوم بأكسدة الوسط الثابت والمواد المختلفة.
- 3 أن يتميز بكثافة عالية (لزوجة قليلة) ما أمكن، وذلك لتقليل معامل انتشار المواد المراد فصلها، بالذات عندما تكون المواد المراد فصلها شديدة التطاير (لها درجة غليان قليلة ولا تميل للبقاء فترة معقولة في الوسط الثابت).
- 4 أن يكون متوافقا مع المكشاف المستخدم.
- 5 أن يعطي أفضل كفاءة ممكنة، ويمكن بالنظر إلى الشكل التالي استنتاج أن الهيدروجين أفضل من الهليوم بينما الهليوم أفضل من النيتروجين فيما يتعلق بالكفاءة، حيث يمكن استخدام الهيدروجين عند سرعات عالية دون تأثير ملحوظ على ارتفاع الطبقة النظرية، وبالتالي الكفاءة.

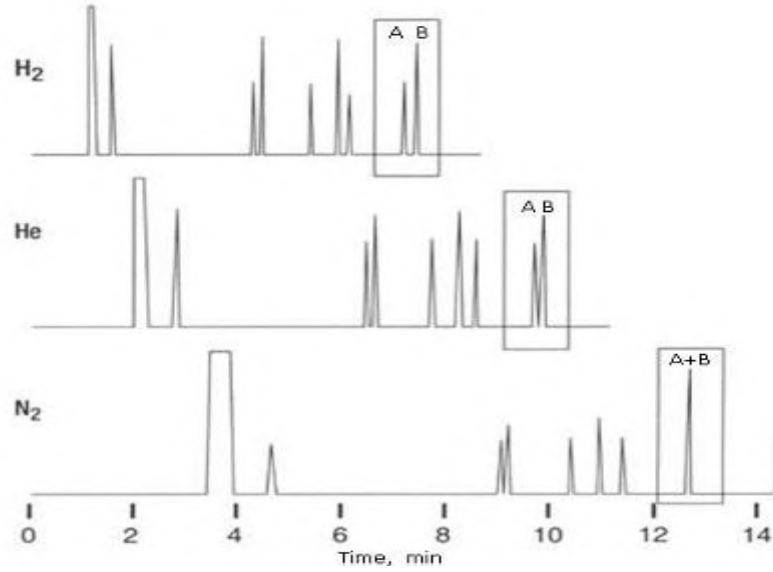


المنحنى(3): يوضح كفاءة الفصل باستخدام الغازات (N₂،H₂،He) عند سرعات عالية.

كما يمكن ملاحظة أن الغازات الثلاثة لها نفس الكفاءة تقريبا عندما يتم استخدامها في السرعات من 20-30 cm/s وعليه يجب مراعاة ذلك عندما نختار نوع الغاز الحامل.

ولننظر كيف تتأثر القدرة على الفصل باستخدام الغازات الثلاثة، حيث تزداد القدرة على الفصل عند استخدام الهيدروجين أكثر من الهليوم، بينما النيتروجين لم يؤدي إلى فصل المركبين A و B، عند نفس الظروف.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي



الشكل (19): القدرة على الفصل باستخدام الغازات الثلاثة (N₂, H₂, He).

- 6 أن لاينضوي استخدامه على مخاطر، فمثلا استخدام الهيدروجين قد يؤدي لحدوث انفجار إذا تم السماح بتراكمه لأنه يحترق بشدة في وجود الأوكسجين الجوي.
- 7 أن يكون رخيص الثمن (مع العلم أنه لا يوجد غازات بهذه المواصفات رخيصة الثمن) ومتوفر في الأسواق¹.

II. 2.1.2 الحاقن Injector:

يتم حقن العينة داخل جهاز ال GC عبر الحاقن، الذي يحول العينة إلى غاز وبشكل فوري، وذلك حتى يتم حملها (عن طريق الغاز الحامل) إلى داخل العمود، كي تبدأ عملية الفصل إن أغلب أنواع الحواقن المستخدمة تجاريا هي من نوع الحاجز septum type injector، حيث يكون الحاجز عبارة عن أسطوانة يبلغ قطرها حوالي 2 cm بينما يبلغ ارتفاعها من 2 إلى 3 mm، وتكون عادة مصنوعة من التفلون الحراري (PTFE) الذي يتحمل درجة حرارة لغاية 400 °C دون أن يتكسر ويتميز بدرجة عالية من المرونة لمنع المواد الغازية من المرور خارج الجهاز.

ويتم حقن العينة باستخدام Syringe دقيقة، وتأتي بحجوم مختلفة من 1-10 µl وتكون الإبرة المصاحبة لها مدببة، ومن أشهر الشركات المصنعة لها تاريخيا شركة Hamilton كما في الشكل:

¹ - مبادئ التحليل الآلي، الفصل الحادي عشر ص 6 - 7.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي



الشكل (20): حقنة سيرينغ Syringe.

1.2.1.2 طرق الحقن:

توجد طريقتان للحقن هما: الحقن اليدوي و أخذ العينات التلقائي.



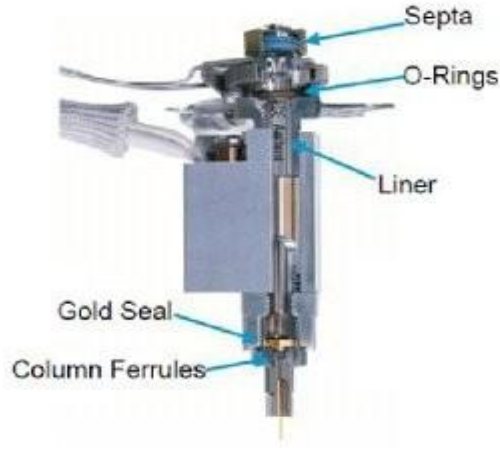
الشكل (21): الحقن اليدوي.



الشكل (22): أخذ العينات التلقائي.

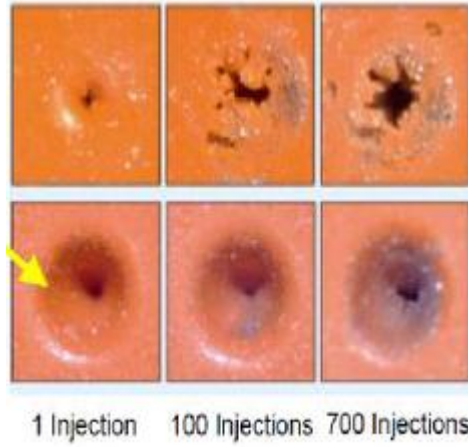
وفي الشكل التالي يمكن رؤية مقطع من الحاقن ومكوناته الأساسية:

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي



الشكل (23): حاقن ال Septa.

و من الجدير بالذكر أن ال Septa المصنوعة من التفلون تعتبر ممتازة جدا، نظرا لأنها ثابتة بشكل كبير ولا تسمح بحدوث نزف لأي من مكوناتها إلا أنها للأسف تتآكل، وتفقد مرونتها مع الوقت، وعليه يجب تغييرها كل فترة بحسب نوع التحاليل ودرجات الحرارة المستخدمة انظر الشكل¹:



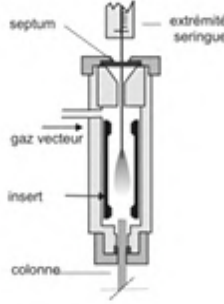
الشكل (24): تآكل حاقن ال Septa.

ii. 2.2.1.2 أنواع الحواقن:

¹ - مبادئ التحليل الآلي، الفصل الحادي عشر ص 7 - 9.

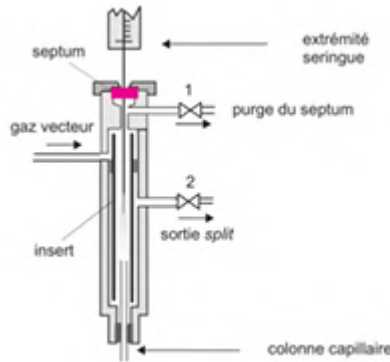
الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

- الحقن بالتبخير المباشر: يتم تسخين الحاقن إلى $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ، يتم تبخير العينة بأكملها التي يتم إدخالها عبر حقنة مباشرة وتحويلها مع الغاز الحامل نحو العمود، ويستخدم بشكل أساسي مع الأعمدة الممتلئة¹.



الشكل (25): الحقن بالتبخير المباشر.

- حقن مجزئ/غير مجزئ **split/Splitless**: يتم التخلص من جزء كبير من العينة المحقونة و المبخرة والمختلطة بالغاز الحامل من الحاقن بواسطة صمام تسرب، وهكذا يدخل جزء صغير من الخليط العمود، هناك وضعان يعتمدان على ما إذا كان صمام التسرب مفتوحا (الانقسام) أو الصمام مغلقا لمدة دقيقة تقريبا بعد الحقن (وضع عدم الانقسام)².



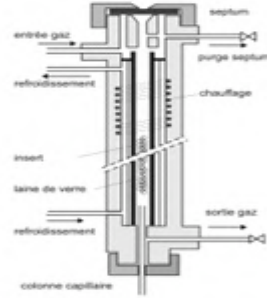
الشكل (26): حقن مجزئ/غير مجزئ **split/Splitless**.

¹-Introduction à la Chromatographie, Université de Paris, PARIS 7 UFR de Chimie, Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG), page 20.

²-Pr, MECHABAR Rachid: la chromatographie page 14.

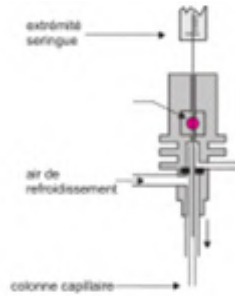
الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

- الحقن بدرجة حرارة مبرمجة PTV: يدخل الخليط سائلا في الحاقن البارد ثم يسخن الخليط في وضع الانقسام أو الانقسام لتبخير المركبات، يسمح حاقن PTV بتدرجات درجة حرارة سريعة وغرفة الحقن محاطة بالمقاومة وتدفق الغاز البارد¹.



الشكل (27): حاقن بدرجة حرارة مبرمجة PTV.

- الحقن المباشر في العمود: يتم حقن الخليط البارد والسائل مباشرة في العمود².



الشكل (28): الحقن المباشر في العمود.

II. 3.2.1.2 نسبة التجزئة:

تعتبر نسبة التجزئة عن النسبة بين كمية المادة المحقونة التي تدخل العمود إلى الكمية الكلية (التي تخرج من فتحة التجزئة + التي تدخل إلى العمود) وتتراوح هذه النسبة عادة من 1:20 إلى 1:300 بينما قد تقل هذه النسبة لتصل 1:5 عند استخدام أعمدة يمكنها فصل كميات أكبر من المادة، ومن الممكن أن تقل هذه النسبة لتصل إلى أقل من 1:1000 في حالة استخدام أعمدة دقيقة للغاية أو تحتوي على كميات

¹ - la chromatographie page 15.

² - la chromatographie page 15.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

قليلة جدا من الوسط الثابت إذا تتوقف هذه النسبة على طبيعة العينة وتركيزها، كما تتوقف على طبيعة العمود وخصائصه ويمكن حساب نسبة التجزئة كما يلي:

$$\text{Splitratio} = \frac{\text{Flowrateincolumn}}{\text{Flowrateincolumn} + \text{Splitflowrate}}$$

وحيث أنه في العادة تكون سرعة سريان الغاز الحامل في العمود قليلة جدا بالمقارنة مع تلك التي تمر في فتحة التجزئة، فإنه يمكن القول:

$$\text{Splitratio} = \frac{\text{Flowrateincolumn}}{\text{Splitflowrate}}$$

ومن الممكن حساب نسبة التجزئة عمليا باستخدام جهاز قياس سرعة سريان الغاز من فتحة التجزئة، واستخدام المعادلة التالية لحساب سرعة سريان الغاز في العمود¹:

$$F_{\text{column}} = \frac{\pi}{4} * d_c^2 * \frac{L}{t_M} * \frac{273 + T_{\text{out}}}{273 + T_{\text{column}}} * \frac{2}{3} * P_{\text{in}}$$

d_c : قطر العمود (mm) L : طول العمود (m) t_M : الزمن الضائع (min)

P_{in} : ضغط دخول الغاز بال (bar (absolute) (يساوي قراءة الساعة بال 1+ bar (الضغط الجوي))

T_{out} : درجة حرارة المحيط الخارجي للجهاز T_{column} : درجة حرارة العمود.

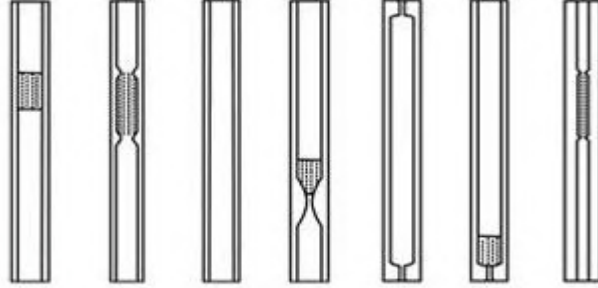
4.2.1.2 .II غرفة التبخير Vaporisation Chamber:

يتم تبخير العينة داخل الحاقن في أنبوبة زجاجية مصنوعة من الزجاج، و يطلق عليها glass liner، وتأتي عادة بأشكال وأقطار مختلفة، وقد تحتوي على صوف زجاجي في بعض الأحيان وفي هذه الأنبوبة يتم تحويل المواد المحقونة إلى مواد غازية، حيث يجب الانتباه إلى نظافة غرفة التبخير بشكل

¹- مبادئ التحليل الآلي، الفصل الحادي عشر ص 11 - 12.

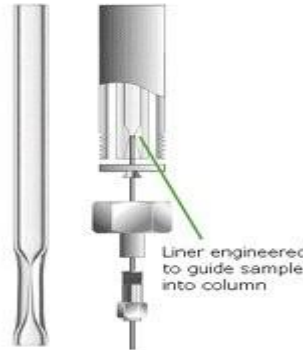
الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

مستمر إذ أن بعض المواد المتحللة قد تلتصق بجدرانها مما يتسبب في وجود شوائب تخرج مع العينة وتؤثر على التحليل والشكل التالي يوضح بعض صور غرفة التبخير:



الشكل (29): صور غرفة التبخير.

وعادة ما يتم معالجة سطح ال liner كي منع يتم الادمصاص على السطح، كما يتم تصميم الشكل كي يسمح بتركيز اتجاه العينة على مدخل العمود¹.



الشكل (30): شكل مصمم يسمح بتركيز اتجاه العينة على مدخل العمود.

5.2.1.2. II. عملية الحقن وكيفية ضبط درجة حرارة الحاقن:

يجب أن تكون عملية الحقن سريعة، بحيث تبدأ عملية فصل كامل للعينة في نفس الوقت، إذ من البديهي أن عملية الحقن البطيئة ستجعل عملية الفصل تبدأ للجزيئات التي تم حقنها أولاً مباشرة، بينما تتأخر عملية الفصل لجزء العينة الذي يتم حقنه متأخراً، مما يؤدي إلى اتساع منحنيات الإشارة (peaks) بشكل كبير دون مبرر. أما اختيار درجة حرارة الحاقن فيجب أن يتم على أساس أن تكون درجة الحرارة

¹ - مبادئ التحليل الآلي، الفصل الحادي عشر ص 12 - 13.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

كافية لتحويل جميع مكونات العينة إلى غازات بشكل لحظي، و بمجرد الحقن ومن النادر جدا أن يتم استخدام درجات حرارة تزيد عن 350°C ، لكن ذلك أيضا يرتبط بطبيعة المركبات المكونة العينة، حيث يتم تلقائيا تحديد حرارة الحاقن اعتمادا على درجة حرارة العمود، باستخدام المعادلة الأولية التالية:

$$\text{Injector temperature (T}_i\text{)} = \text{Column temperature (T}_c\text{)} + 50$$

و تقوم معظم الأجهزة تلقائيا بتحديد درجة حرارة الحاقن على أساس المعادلة السابقة و يسمح الجهاز للمستخدم بإدخال درجة حرارة أخرى، لكن بشرط أن تكون أعلى من درجة حرارة العمود، بينما لا يسمح أن تكون درجة حرارة الحاقن أقل من درجة حرارة العمود أبدا¹.

3.1.2 الفرن (Oven):

يتم تسخين العمود عن طريق التحكم في درجة حرارة الفرن، الذي يتواجد فيه العمود ويجب أن يكون الفرن قادرا على تسخين العمود لدرجات الحرارة المطلوبة (عادة أقل من 350°C)، وتعتمد الحرارة المستخدمة على نوع الوسط الثابت في العمود، إذ لا يعقل أن يتم استخدام درجات حرارة عالية تتسبب في تكسر الوسط الثابت، كما أن من مستلزمات الفرن أن يكون قادرا على رفع درجة الحرارة بالمعدل المطلوب (Ramp rate)، أي عدد من الدرجات يصل إلى $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ، أو أكثر وعادة يتم التحكم في درجة الحرارة باستخدام برنامج حاسوب مخصص لهذا الغرض، أي أن التحكم في الفرن يكون بشكل مبرمج، حيث يتم إدخال البرنامج قبل بدء عملية الفصل Temperature programming GC (TPGC)، ومن الجدير بالذكر أيضا أنه من الحكمة إدخال درجة الحرارة القصوى المسموح للفرن بالوصول إليها، وذلك بمجرد تركيب عمود فصل جيد، بحيث تكون تلك الدرجة أقل من درجة تحمل العمود بعشرين درجة مثلا، وتخزين ذلك في الجهاز عندها إذا أردت (عن طريق الخطأ) إدخال درجة حرارة أعلى لن يسمح لك الجهاز بذلك وكأنه ببساطة يذكرك أن العمود لا يحتمل تلك الدرجة، وبذلك تحافظ على العمود بحالة جيدة².

3.1.2 ضبط درجة حرارة الفرن:

¹ - مبادئ التحليل الآلي، الفصل الحادي عشر ص 13 - 14.

² - مبادئ التحليل الآلي، الفصل الحادي عشر ص 14.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

إن اختيار درجة حرارة الفرن اللازمة لعملية الفصل (Isothermal GC) ، أو تصميم برنامج ما (TPGC) ، يعتبر جوهر عملية الفصل المفترض أن تؤدي إلى فصل مكونات العينة في أقل وقت و أعلى كفاءة، إن أساس اختيار درجة الحرارة إنما يعتمد على طبيعة مكونات العينة، بحيث أن التقنية الأوسع انتشارا وقبولاً تقضي بأن يتم تحديد درجة حرارة العمود (الفرن) على أساس أن تكون متوسط درجة غليان المكونات المختلفة للعينة، ويتم استخدام تلك الدرجة عادة لإجراء عملية الفصل الأولية عند درجة حرارة ثابتة Isothermal، ويتم بعدها النظر في آليات زيادة الكفاءة وتقليل زمن الفصل¹.

وتؤثر درجة الحرارة على عملية الفصل تأثيراً كبيراً وخاصة إذا كان النموذج يتكون على خليط من المواد ذات درجات تطاير مختلفة وخاصة درجة حرارة العمود التي تعد أحد الأسس في عملية الفصل هنا، إضافة إلى طبيعة الطور الثابت في العمود، وبصورة عامة هناك نوعين من الظروف الحرارية للعمود Oven temperature of column هما²:

الحرارة الثابتة Isothermal temperature:

أي يجرى التحليل باستخدام درجة حرارة واحدة للعمود طول فترة التحليل.

البرمجة الحرارية temperature programmer:

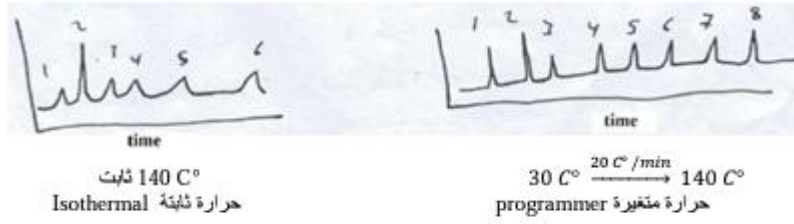
أي يجرى التحليل باستخدام درجات حرارية مختلفة طول فترة التحليل (تغيير درجة الحرارة أثناء التحليل) أي يبدأ التحليل بدرجة حرارة معينة ويزداد تدريجياً أثناء التحليل وقد تكون الزيادة على عدة مراحل وبمعدل سرعة مختلفة أحياناً.

ويمكن ملاحظة تأثير درجة حرارة العمود على عملية الفصل من خلال المثال التالي:

¹ - مبادئ التحليل الآلي، الفصل الحادي عشر ص 14 - 15.

² - سرحان علي سلمان، التحليل الآلي: المرحلة الرابعة، طباعة أنور عبد الوهاب خلف، (جمهورية العراق وزارة التعليم العالي والبحث العلمي/ جامعة تكريت/ كلية العلوم/ شعبة الإعلام)، المحاضرة الثالثة في كروماتوغرافيا الغاز ص 3.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي



الشكل (31): الفصل باستخدام حرارة متغيرة وحرارة ثابتة.

II. 2.3.1.2 خصائص فرن ذات درجة حرارة واحدة ثابتة Isothermal:

مميزاته:

- يعتبر أبسط طريقة لعمل أي اختبار حيث أنه لا يأخذ الكثير من الوقت في تعديل درجة حرارة الفرن فدرجة الفرن ثابتة والجهاز دائما جاهز للعينات.
- يحافظ على درجة الحرارة خلال التجربة.

عيوبه:

- العينات التي بها العديد من المركبات تأخذ الكثير من الوقت لإتمام عملية الفصل.
- في كثير من الأحيان تؤثر ثبات الحرارة بالسلب على عملية الفصل.

II. 3.3.1.2 خصائص فرن ذات درجة حرارة يتم ضبطها طبقا لبرنامج معين:

مميزاته:

- اختزال وقت التفاعل.
- ثبات شكل ال Peak في كل مراحل التجربة.
- سهولة الكشف والقياس للعينة.

عيوبه:

- العينات ذات درجة الحرارة العادية تتأثر عند تغيير درجة الحرارة من الأقل إلى الأعلى على عكس الفرن الثابت حراريا.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

- لا بد من تبريد الفرن بعد كل حقنة للوصول لدرجة الحرارة البادئة وهذا يؤدي إلى التأخير في وقت إتمام عدد من العينات¹.

4.1.2 العمود Chromatographic column: II

يعتبر العمود أهم مكون من مكونات عملية الفصل، إذ تتوقف عليه القدرة على الفصل (ال resolution) وكفاءة الفصل (ال efficiency) فليس من الممكن الحصول على عمليات فصل مقبولة دون استخدام العمود المناسب وعند الحديث عند العمود، يمكن تناول نقاط متعددة، من أهمها²:

- طول وقطر العمود.
- مادة صناعة هيكل العمود.
- حبيبات التعبئة وحجم وشكل الحبيبات وخصائصها.
- الوسط الثابت وأنواعه وخصائصه.
- درجة حرارة العمود.

1.4.1.2 طول العمود وقطره: II

يعتمد طول العمود على كونه معبأ (Packed) أم أنبوبة مفتوحة (دون حبيبات تعبئة ويسمى (open tubular))، فالأعمدة المعبأة يكون طولها قصير نسبياً بحيث لا يتجاوز عشرة أقدام (3 أمتار) وذلك ببساطة لأن الحبيبات المستخدمة تعيق تدفق الغاز الحامل، وعند زيادة ضغط الغاز الحامل الداخل إلى العمود فإن هذا لا يعني بالضرورة زيادة سرعة تدفق الغاز، لأن الغازات تتضغط، وبالتالي لا يمكن التحكم بسرعة تدفق أو سريان الغاز الحامل عن طريق زيادة الضغط الداخل، أي أن سرعة تدفق الغاز تعتمد على طول العمود، والطول الأقصى المستخدم (3 أمتار) يسمح باستخدام السرعات المطلوبة في ال GC ويدهي أن سرعة تدفق الغاز الحامل في العمود تتوقف أيضاً على حجم حبيبات التعبئة، حيث يزداد الضغط العكسي عندما يقل حجم الحبيبات، مما يؤدي إلى انضغاط الغاز عند زيادة ضغط الغاز الحامل ولعل أقل طول للعمود المعبأ يكون حوالي 3 أقدام.

¹- أحمد سعيد محمود، الكروماتوغرافيا وتطبيقاتها (الكروماتوغرافيا الغازية): <http://www.researchgate.net>.

²- مبادئ التحليل الآلي، الفصل الحادي عشر ص 15 - 23.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي



الشكل (32): الأعمدة المعبأة.

أما العمود المفتوح من الطرفين (غير المعبأ) ويكون على شكل أنبوبة شعرية مفتوحة الطرفين، فيتراوح طوله من 15 - 100 m، ويكون الوسط الثابت على هيئة طبقة رقيقة على الجدار الداخلي للأنبوبة الشعرية.

أما قطر العمود المعبأ فيتراوح بين 1/16 إلى 1/4، إلا أن أكثر الأقطار استخداماً هو 1/8 ويعتمد القطر على تطبيقات استخدام العمود، حيث أن الأقطار 1/16 و 1/8 تستخدمان لأغراض تحليلية، بينما 1/4 يستخدم لأغراض تحضيرية (بمعنى الحصول على كميات وافرة من المادة المفصولة بصورة نقية، أو بغرض إجراء تجارب أخرى عليها مثل ال NMR، mass spectrometry أو لأسباب أخرى)، في حين يتراوح قطر العمود غير المعبأ الشعري (capillary column) من 100 μm إلى حوالي 530 μm و يطلق على هذا العمود ذو القطر الواسع ومن الجدير بالذكر أن كمية المادة التي يمكن فصلها تعتمد عادة على قطر العمود، وتزيد بزيادته.



الشكل (33): الأعمدة الشعرية.

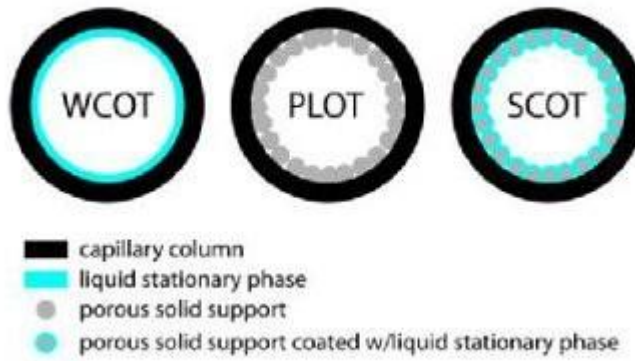
الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

و توجد عدة أنواع للأعمدة الشعرية مفتوحة الطرفين، من أهمها:

(Fused silica open tubular) FSOT: و هو العمود الأكثر شيوعا واستخداما، حيث يتم تصنيعه من السيليكا النقية (SiO_2) ويتم تدعيمه بوضع طبقة من البوليمر (polyimide)، مما يضيفي عليه اللون البني المحمر المشهور وأغلب ما يمكن أن نطلق عليه مصطلح WCOT (wall coated open tubular) حيث يكون الوسط الثابت عبارة عن طبقة رقيقة من السائل تغطي الجدار الداخلي للعمود.

(Porous layer open tubular) PLOT: وفيه توجد طبقة من الحبيبات التي تقوم مقام الوسط الثابت، على الجدار الداخلي للعمود، مما يزيد المساحة السطحية، وبالتالي كمية المادة الممكن فصلها، وزيادة الكفاءة، ويستخدم أساسا في ال GSC.

(Support coated open tubular) SCOT: ويشبه عمود ال PLOT تماما، إلا أن الحبيبات على الجدار للعمود تكون مغطاة بطبقة من الوسط الثابت السائل، أي أنه يستخدم في ال GLC.



الشكل (34): أنواع الأعمدة الشعرية.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

الجدول (1) يوضح مقارنة بين الأعمدة المعبأة (Packed column) والأعمدة غير المعبأة (Capillary column).

	FSOT	WCOT	SCOT	Packed
Longueur / m	10-100	10-100	10-100	1-6
Diamètre interne / mm	0.1-0.3	0.25-0.75	0.5	2-4
Nombre de plateaux / m	2000-4000	1000-4000	600-1200	500-1000
Echantillon / ng	10-75	10-1000	10-1000	10-10 ⁶
Pression relative	Basse	Basse	Basse	Haute
Vitesse / cm · s ⁻¹	20-30	20-30	20-30	2-5

الجدول رقم (1): جدول المقارنة بين الأعمدة المعبأة (Packed column) والأعمدة غير المعبأة (Capillary column).

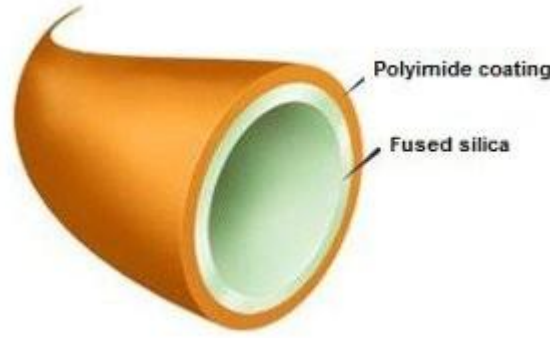
II. 2.4.1.2 مادة صناعة العمود:

في أغلب الأحيان تكون مادة صناعة العمود المعبأ (Packed column) من الصلب المقاوم للكيماويات (Stainless steel 314L)، إلا أن الأدبيات العلمية تشير إلى إمكانية تصنيعه من الزجاج لكن عمليا نجد أن أعمدة ال GC المصنوعة من Stainless steel هي المتوفرة في الأسواق على نطاق واسع ومن المهم فقط أن نتذكر أن المادة المصنوع منها العمود يجب ألا تتفاعل مع الوسط الثابت أو أحد مكونات العينة، بالذات عند الحرارة العالية المستخدمة في عمليات الفصل، أو أن تسمح بعملية الادمصاص على سطحها، أي يجب أن يكون العمود مصنوعا من مادة خاملة كيميائيا.

أما الأعمدة غير المعبأة (الشعرية)، فإن مادة صناعتها هي السيليكا المنصهرة (fused silica)، حيث أن عملية سحب الأنابيب الشعرية المصنوعة من هذه المادة ممكنة وسهلة بأطوال و أقطار محددة إلا أن تلك الأنابيب الشعرية سهلة الكسر، ولهذا يتم تغطيتها بطبقة مقوية، هي عبارة عن بوليمر (polimide).

¹ - Marie-Paule Bassez, Chromatographie en phase gaz: page 16.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي



الشكل (35): مادة صناعة الأعمدة الشعرية.

II. 3.4.1.2 حبيبات التعبئة وحجم وشكل الحبيبات وخصائصها:

في أغلب الأحيان، يتم استخدام الحبيبات التي نحصل عليها من طحن بعض الرواسب الرملية الناتجة عن بعض الكائنات البحرية الدقيقة المتحللة (diatomaceous earth)، والتي يكون جدارها الخارجي عبارة عن سيليكات (hydrated SiO_2) وبذلك تكون عادة مسامية جدا، وتتميز بكثافة قليلة، بينما تتميز بلمس خشن ويمكن الحصول عليها بأقطار مختلفة تتراوح من $10 - 200\mu m$ ، ويمكن اختيار القطر المناسب بحسب الحاجة، وتتميز تلك الحبيبات بما يلي:

- تتحمل درجات حرارة عالية (ثابتة حراريا).
- تتحمل ظروف التعبئة (ثابتة ميكانيكيا).
- مسامية (مساحتها السطحية كبيرة).
- خاملة السطح.

أما شكلها الخارجي فقد يكون كرويا، أو مستقيما، أو نجميا، أو غيره، كما أنه من الممكن أن تكون الخلية أحادية، أو على هيئة مستعمرات أكبر حجما، وتأخذ شكلا ما إلا أن الشكل الكروي، ذو قطر حوالي $50\mu m$ هو الأكثر استخداما في تعبئة أعمدة كروماتوغرافيا الغاز.

توجد عدة أنواع من حوامل الدياتومييت المتوفرة تجاريا والتي تختلف فيما بينها بمساحة السطوح النوعية، المسامية، والقطر الحبي، وكمية تحميل الطور السائل ومنها:

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

Gas Chroma S, Gas Chroma R, Gas Chroma Q, Chromosorb A,G,P,W وكما يبين

الجدول

(2) بعض خواص الكروموسوربات¹:

نسبة تحميل الطور الساكن (%)	مساحة السطح النوعي (m ² /g)	الحامل
40	2.7	Chromosorb A
30	4.0	Chromosorb P
5	0.5	Chromosorb G
25	1.0	Chromosorb W

جدول رقم (2): بعض خواص الكروموسوربات.

ويفيد مسحوق التفلون سائدا للمواد المذابة الشديدة القطبية، ويستخدم في التطبيقات التي يكون فيها السطح خاملا جدا².

II. 4.4.1.2 طلاء السائد:

يحضر العمود المحشو بخلط الصلب مع كمية محددة من الطور السائل المذاب في مذيب واطى الغليان مناسب مثل البنتان أو ثنائي كلورو ميثان أو الأسيتون، ويبخر المذيب فيما بعد بالتسخين الهادئ مع التحريك المستمر عند الضرورة للحصول على طلاء منتظم، ويمكن إزالة الكمية الضئيلة المتبقية من المذيب تحت الخواء، تملأ الأعمدة عادة بسكب العبوة في الأنبوب المستقيم مع الرج أو الضرب الهادئ، وتسد النهايات بصوف زجاج ويحنى العمود إلى الشكل المناسب بحيث يلائم الفرن، وبدل ذلك يمكن حشو الأعمدة المحنية وذلك بتحميل مادة العبوة في تيار غاز عالي السرعة، ويجب أن نحتاط عند حشو الأعمدة الكبيرة لتلافي تكوين القنوات وعزل الجسيمات حسب حجمها، يجب تكييف العمود المحشو حديثا وذلك بإمرار الغاز الحامل خلاله عند درجات حرارة عالية ولعدة ساعات.

¹ - أحمد بيروتي، تطوير حامل كروماتوغرافي من البيلون الحلبي المطعم بالأوكتان واستخدامه في التحليل الكروماتوغرافي الغازي، رسالة ماستر، جامعة حلب 2017.

² - روبرت بكسوك توماس كارنز، دونالد شيلدرز ايان مكوليام، ترجمة " باسم محمد سعدي، مقدار عبد الستار مهدي"، الطرائق الحديثة للتحليل الكيميائي: مكتبة المرید، الطبعة الأولى، كروماتوغرافيا الغاز ص 127.

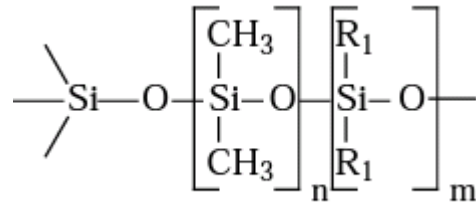
الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

أما الأعمدة غير المعبأة لا تحتوي على حشو، ويتم طلاؤها بطبقة رقيقة من الطور السائل وذلك بإمرار محلول مخفف له خلال العمود وبمعدل سرعة واطئ، ثم يبخر المحلول المتبقي على الجدار وذلك بإمرار الغاز الحامل تاركاً طبقة من الطور السائل، وإن الخبرة تساعد في الحصول على طلاء مرض.

أما في تعبئة أعمدة الـ GSC فيستخدم الكربون والألومينا (Al_2O_3) وحببيات molecular seive والبوليمرات المسامية Poursous Polymers^{1,2}.

II. 5.4.1.2 الوسط الثابت و أنواعه:

من أشهر المواد المستخدمة في تصنيع الوسط الثابت تلك المواد القائمة على أساس استخدام البولي سيلوكسان (Polysiloxane derivatives)، والتي تتغير خصائصها بتغير نوع ونسبة المجموعات النشطة المرتبطة بالمركب الأصلي المبني عادة على الـ داي ميثيل سيلوكسان مثل:



الشكل (36): الصيغة الكيميائية للبولي سيلوكسان (Polysiloxane).

حيث يمكن أن تكون R أي مجموعة نشطة مثل:

R: Phenyl, trifluoropropyl, Cyanopropyl

و غيرها حيث تتفاوت تلك المجموعات بخصائصها، وما تضيفه على الوسط الثابت من تغير في قطبيته وتحمله لدرجة الحرارة.

¹- الطرائق الحديثة للتحليل الكيميائي، ص 130 - 149.

²- مبادئ التحليل الآلي، الفصل الحادي عشر ص 19.

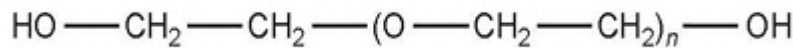
الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

Name	Chemical nature of polysiloxane	Max. temp.
SE-30	Dimethyl	350
Dexsil300	Carborane-dimethyl	450
OV-17	50% Phenyl methyl	375
OV-210	50% Trifluoropropyl	270
OV-225	25% Cyanopropyl- 25% phenyl	250
Silar-SCP	50% Cyanopropyl- 50% phenyl	275
SP-2340	75% Cyanopropyl	275
OV-275	Dicyanoallyl	250

جدول رقم (3): أنواع الأوساط الثابتة للبولي سيلوكسان Polysiloxane.

وتعتبر الأوساط الثابتة القائمة على أساس جزيء البولي سيلوكسان من أهم الأوساط الثابتة التي تجد تطبيقات واسعة في تحليل العديد من أصناف المركبات باستخدام كروماتوغرافيا الغاز، وتاريخيا كانت شركة Ohio Vally من السابقين في تحضير هذه الأنواع من الأوساط الثابتة، وقد أخذت تلك الأوساط الثابتة الأحرف الأولى للشركة، حيث أصبحت تعرف بالـ OV-class وكما نرى في الجدول فإن كل OV-XXX تعني وسطا ثابتا ذو تركيب كيميائي معين، وخصائص مختلفة أما اليوم فنجد العديد من الشركات التي تصنع أوساطا ثابتة مكافئة تماما لـ OV-SP بينما تعطىها تسميات مختلفة مثل SX-XXX، XXX وغيرها.

وهناك مجموعة أخرى من الأوساط الثابتة القائمة على أساس بوليمر الإيثيلين جلايكو لـ PEG والشكل التالي يوضح تركيب هذا الوسط الثابت:



الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

الشكل (37): الصيغة الكيميائية لبوليمر الإيثيلين جلايكول PEG.

حيث يتميز هذا النوع من الوسط الثابت بقطبية عالية، تسمح باستخدامه في فصل المركبات التي لها قطبية كبيرة مثل الأحماض العضوية والكحولات، وتعتمد درجة تكسره على عدد المونمرات المستخدمة، لكن من الملاحظ أن تلك الأوساط الثابتة لا تتحمل درجات حرارة تزيد عن 250°C ومن المستحسن ألا تزيد درجة حرارة العمود عن 200°C عند استخدام PEG كوسط ثابت.

كما أنه من الممكن تعديل القطبية باستبدال بعض ذرات الهيدروجين بمجموعات عضوية أخرى، مما يؤدي إلى تعديل خصائص الوسط الثابت.

جدول رقم (4): أنواع الأوساط الثابتة واستعمالاتها في كروماتوغرافيا الغاز¹:

Phase stationnaire	$T_{\max}^{\circ}\text{C}$	Utilisations
Polydiméthyl siloxane	350	hydracarbures, aromatiques, stéroïdes
5% Phényl-polydiméthyl siloxane	350	esters méthyliques d'acides gras, alcaloïdes, composés halogénés
50% Phényl-polydiméthyl siloxane	250	stéroïdes, pesticides, glycols
70% Trifluoropropyl-polydiméthyl siloxane	350	aldéhydes, cétones, composés chlorés et nitrés
Polyéthylène glycol	250	acides, alcools, éthers, huiles essentielles, glycols
50% Cyanopropyl-polydiméthyl siloxane	240	acides gras polyinsaturés, acides, alcools

↓ polarité

6.4.1.2 .II النسبة المئوية للوسط الثابت Percent loading:

تعتبر كمية الوسط الثابت التي تغطي الحبيبات الصلبة مهمة للغاية، إذ تنعكس على أداء العمود، وذلك من عدة جوانب:

- تزداد الكفاءة بنقص سمك الوسط الثابت، أي بنقص النسبة المئوية للوسط الثابت والعكس صحيح.

- تزداد كمية المادة الممكن فصلها باستخدام العمود كلما زادت نسبة الوسط الثابت.

¹ - Chromatographie en phase gaz, page 24.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

- عادة ما تزيد سعة منحنى الإشارة بزيادة نسبة الوسط الثابت.
- المركبات شديدة التطاير تتطلب نسبة عالية من الوسط الثابت، بينما يفضل استخدام نسبة قليلة لفصل المواد قليلة التطاير.

ومن الممكن حساب النسبة المئوية للوسط الثابت بالعلاقة التالية:

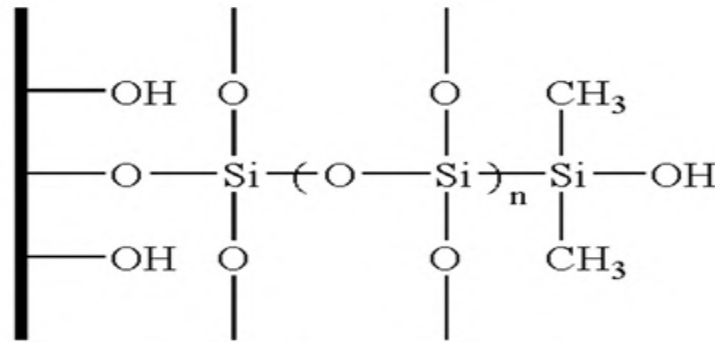
$$\text{Percent loading} = \frac{\text{Weight of liquid SP}}{\text{Weight of liquid SP} + \text{Weight of solid support}} * 100$$

وتعتبر النسبة % 1-15 الأكثر استخداما.

II. 7.4.1.2 مشكلة نزع الوسط الثابت وحلها:

حيث أن الوسط الثابت في ال GC عبارة عن سائل (عند درجات الحرارة المستخدمة في عمليات الفصل)، لذلك فإن الوسط الثابت يكون عرضة للنزف عند درجات الحرارة العالية، لأنه بالتأكيد يملك ضغط بخار معين يزداد بزيادة درجة الحرارة، من أجل ذلك كان ضروريا التفكير في حل هذه المشكلة والتي تؤدي إلى تغير خصائص الفصل بشكل مستمر، ويتم ذلك عبر إحدى الطريقتين:

- ربط الوسط الثابت كيميائيا بالحبيبات الصلبة (أو سطح الجدار الداخلي لعمود السيلكا الشعري (FSOT)، وذلك عبر تكوين روابط تساهمية بينهما، مما يجعل إمكانية النزف معدومة، إلا في حالة تكسر الرابطة الكيميائية الذي قد يحدث في حالة رفع درجة الحرارة أعلى من الدرجة الموصى بها لكل عمود.

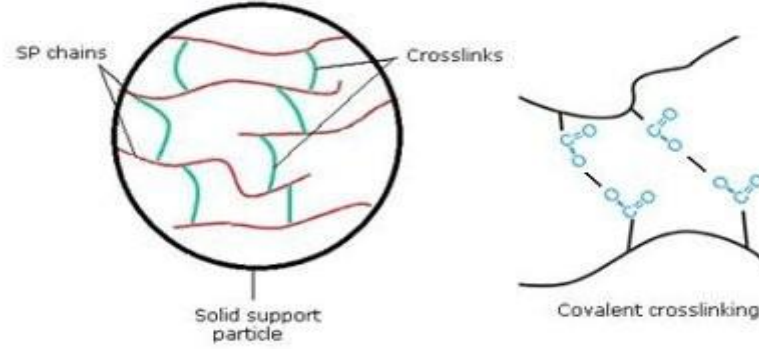


Covalent bonding of SP

الشكل (38): ربط الوسط الثابت (covalent bonding of sp).

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

- ربط جزيئات الوسط الثابت بعضها ببعض حول الحبيبات المختلفة، وبذلك يكون الوسط الثابت عبارة عن بوليمر كبير الحجم غير متطاير، يحيط بالحبيبات الصلبة وتسمى هذه الآلية cross (linking).



الشكل (39): ربط جزيئات الوسط الثابت (cross linking).

8.4.1.2 درجة حرارة العمود:

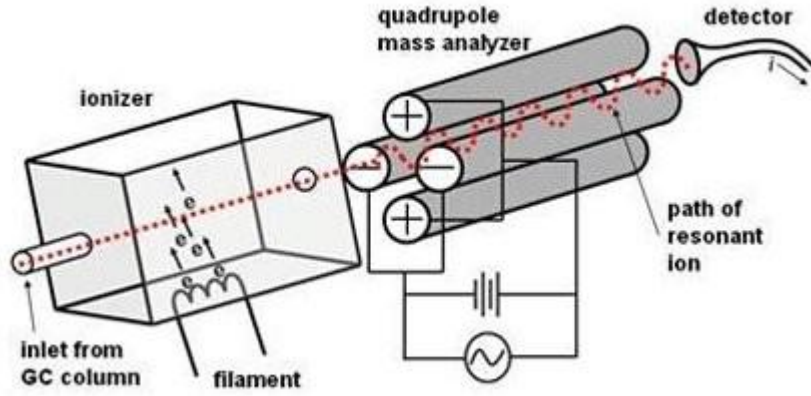
في عمليات الفصل، يتم ضبط درجة حرارة العمود على أساس متوسط درجات غليان مكونات العينة، وذلك في التجربة المبدئية لتحديد طبيعة عملية الفصل، والتفكير في بناء استراتيجية لإنجازها، ويتم ذلك باستخدام درجة حرارة ثابتة أثناء هذه العملية (isothermal GC) لكن تجدر الإشارة إلى أنه يمنع بتاتا استخدام درجات حرارة أعلى من تلك المذكورة ضمن مواصفات العمود، إذ أن فعل ذلك يؤدي إلى تكسر الوسط الثابت، وبالتالي انتهاء صلاحية العمود، لكن على الجانب الآخر، نعلم أن الوسط الثابت في ال GC يجب أن يكون سائلا أثناء عملية الفصل، وحيث أن كثير من الأوساط الثابتة تكون على هيئة شحوم صلبة عند درجات الحرارة العادية، لذا وجب تسطير ليس فقط درجة الحرارة القصوى للعمود، بل أيضا درجة حرارة الدنيا (اللازمة كي يكون الوسط الثابت سائلا)، وهي الدرجة التي لا يمكن استخدام العمود عند درجة حرارة أقل منها.

5.1.2 مكشاف مطياف الكتلة mass spectrometer:

ويعتبر هذا المكشاف من أفضل وأعلى أنواع المكاشيف، إذ أنه بالإضافة إلى الحساسية العالية، فإنه يتميز بالقدرة على التعرف على المركبات المختلفة بدرجة عالية من التأكد، قد تصل إلى اليقين ذلك لأن هذا المكشاف يقوم على أساس تفتيت المادة إلى أجزاء أيونية أصغر، والتعرف على الكتل الجزيئية

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

لكل منها، أي أنه يستخدم كل من زمن المكوث والتركيب الجزيئي لتحديد هوية المادة، والشكل التالي يوضح نوع معين من أنواع هذا المكشاف (quadruple mass analyzer):



الشكل (40): مطياف الكتلة (quadruple mass analyzer).

وحيث أن هذا النوع من مطياف الكتلة هو الأكثر انتشارا مع أجهزة كروماتوغرافيا الغاز، فمن المفيد إعطاء تصور بسيط عن تركيبه و آلية عمله:

غرفة التأيين: وهي عبارة عن غرفة تدخلها المواد الخارجة من العمود، مادة تلو أخرى بعد فصلها، فتعرض المادة إلى إشعاع من الإلكترونات التي تعمل على تأيينها وتقنيتها إلى أيونات أبسط تتفاوت في كتلتها الجزيئية.

عدسات التركيز: يتم توجيه الأيونات عبر ما يسمى بعدسات التركيز، وهي ليست عدسات بصرية، بل ألواح مشحونة بشحنات سالبة وأكثر سالبية، تسرع حركة الجزيئات نحو محلل الكتلة.

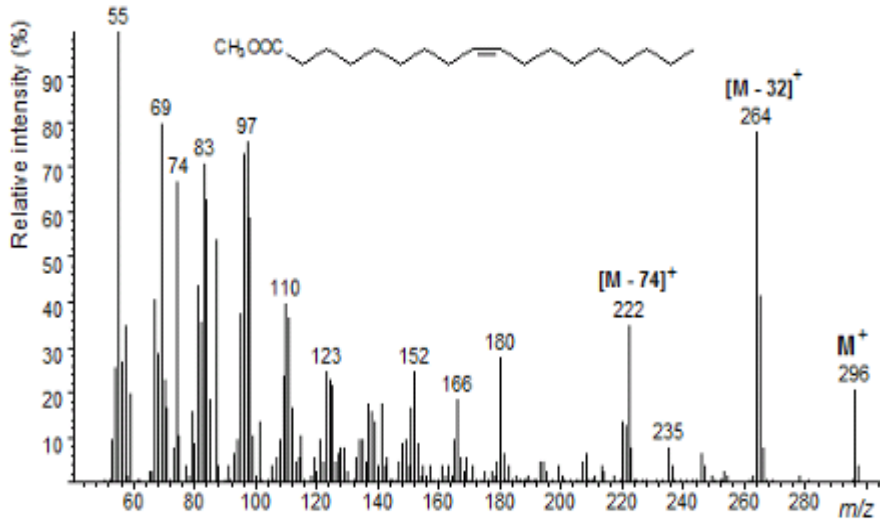
محلل الكتلة: وهناك أنواع عديدة من محلات الكتلة، لكن ال quadruple mass analyzer أكثرها استخداما مع ال GC، ولعله أيضا الأبسط والأقل تكلفة ويتكون من أربعة أقطاب، كل اثنا منهما متقابلين وموصولان بجهد متردد وثابت، كما هو موضح بالشكل أعلاه، إن قيمة الجهد الثابت والمتغير تسمح فقط لكتلة جزيئية واحدة بالمرور خلال محلل الكتلة، والوصول إلى المكشاف، ولغرض معرفة جميع الكتل الجزيئية للمادة، فإننا نعمل مسح للجهد، بما يشبه ال scan في الأجهزة الطيفية، وعندها تمر الكتل الجزيئية خلال المحلل وتصل المكشاف تباعا.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

المكشاف: ويسمى أنبوية مضاعف الإلكترونات، وهو يشبه photo multiplier tube تماما، إلا أنه لا يستخدم الفوتونات بل الإلكترونات، وله نفس حساسية الPMT، وربما أفضل وجميع تلك المكونات موجودة تحت ضغط منخفض للغاية يصل إلى 10^{-8} - 10^{-7} torr.

II. 1.5.1.2 طيف الكتلة:

طيف الكتلة هو ناتج مسح الوفرة النسبية للأيونات بحسب نسبة كتلتها إلى شحنتها، أكثر المعلومات المفيدة من MS هي الوزن الجزيئي (ذرة M^+) وهي التي يمكن أن تشير إلى ماهية الصيغة، وتسمى القيمة الأكثر وفرة (الأكبر) في الطيف الكتلي ذروة القاعدة (base beak) وهي تمثل الأيون الذي وفرته أعلى من وفرات الكتل الأخرى وقد جرت العادة على مقارنة الوفرات النسبية للشظايا المختلفة بالقيمة الأكثر وفرة إذ يعطى لها القيمة 100 وتقدر القمم الأخرى كنسب مئوية منسوبة للقيمة الأساس^{2,3}.



الشكل (41): طيف الكتلة لمركب عضوي.

¹ - مبادئ التحليل الآلي، الفصل الحادي عشر ص 29 - 30.

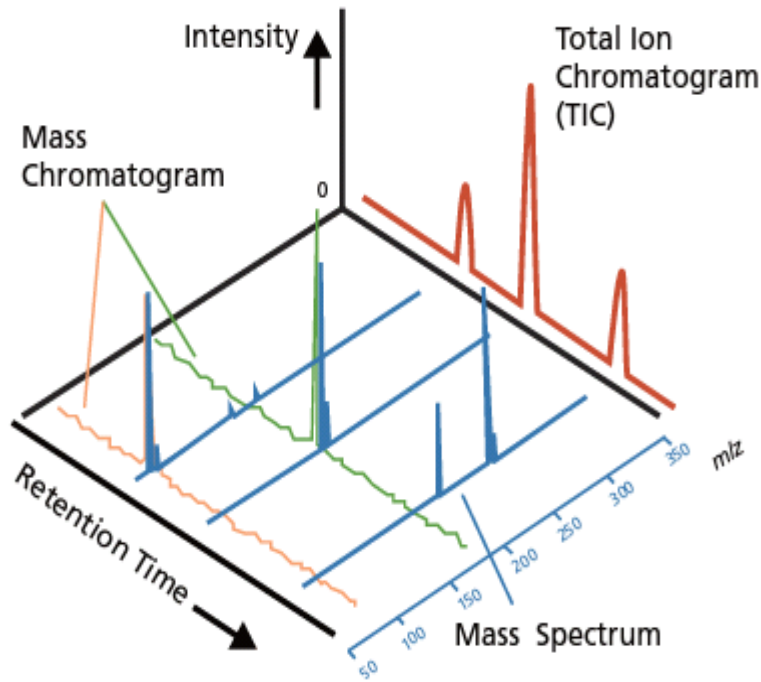
² - نديم المهنا، أمجد المدني، ثناء الحداد، تشخيص المتماكببات لأروماتية وتحديد البنية بالطرائق الطيفية، التشخيص باستعمال مطياف الكتلة مربوط بكروماتوغرافيا غازية GC-MS: مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية/ المجلد 30/ العدد الثاني، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية، 2014، ص 46 - 47.

³ - Spectrometry Book home: latest MS full chapter. Doc, Spectrometry Work Book page 1.

II . 6.1.2 المسجل:

إن الإشارة الكهربائية التي تصدر من الكاشف يجري تكبيرها بواسطة مكبر (amplifier) وتسجل على شكل ذروة peak بواسطة المسجل ويحسب تركيز المادة بحساب المساحة تحت الذروة (Area Under the peak)، أو ارتفاع الذروة (high of peak) حيث يتناسب تركيز المادة طرديا مع مساحة أو ارتفاع الذروة¹.

وعليه، فإن العينة عند حقنها في العمود تنفصل في العمود إلى المواد المختلفة المكونة لها، ومن ثم تبدأ المواد تباعا في الدخول إلى مطياف الكتلة ليتم تحليلها والتعرف عليها وعلى تركيزها والنتيجة تكون على صورة كروماتوغرام كالمعتاد للمواد المكونة للعينة، إضافة إلى طيف الكتلة الخاص بكل مادة، وبالتالي يمكن التعرف على المواد المختلفة دون أدنى شك (في أغلب الأحيان).



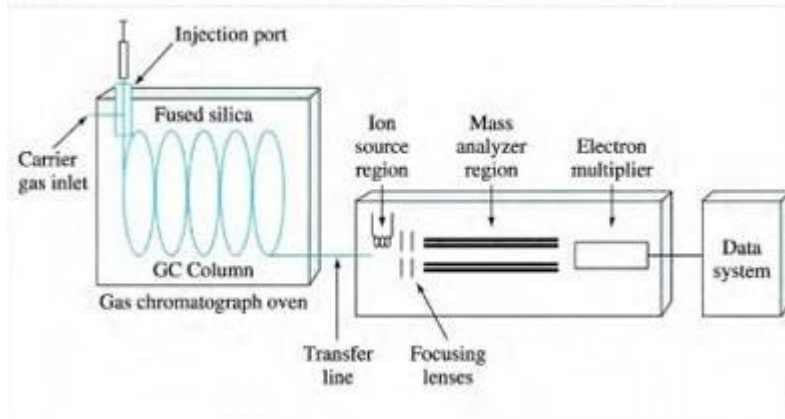
الشكل (42): مخطط كروماتوغرام والطيف الكتلي.

¹ - التحليل الآلي، المحاضرة الثالثة، ص 6.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

II. 3 طريقة عمل GC-MS:

- عند خروج المركبات الفردية من عمود GC فإنها تدخل في كاشف التأين الإلكتروني، هناك يتم قصفها بتيار من الإلكترونات مما يؤدي إلى تفككها إلى أجزاء، يمكن أن تكون هذه الشظايا كبيرة أو صغيرة من الجزيئات الأصلية.
- الشظايا هي أيونات مشحونة بكتلة معينة، تسمى كتلة الجزء مقسوما على الشحنة نسبة الكتلة إلى الشحنة M/Z .
- مجموعة من 4 مغنطيسات كهربائية تسمى رباعي قطب تركز كل جزء من خلال شق و إلى الكاشف، تمت برمجة الأقطاب الرباعية بواسطة الكمبيوتر لتوجيه بعض شظايا M/Z فقط من خلال الشق والبقية ترتد بعيدا.
- يدور رباعي قطب عبر مختلف M/Z واحدا تلو الآخر حتى يتم تغطية نطاق M/Z وهذا يحدث عدة مرات في الثانية، كل دورة من النطاقات يشار على أنها مسح ضوئي.
- يسجل الكمبيوتر رسما بيانيا لكل مسح، يمثل المحور X نسبة M/Z ، يمثل المحور Y الإشارة (الوفرة) لكل جزء من الأجزاء التي تم اكتشافها¹.



الشكل (43): شكل يوضح جهاز GC-MS.

II. 4 العوامل المؤثرة على كفاءة عملية الفصل في كروماتوغرافيا الغاز GC:

- من أهم العوامل المؤثرة على ارتفاع الطبقة النظرية في كروماتوغرافيا الغاز هو الانتشار الطولي الجزيئي:

¹ - Gas Chromatography - Mass Spectrometry : [http:// www.gmu.edu](http://www.gmu.edu).

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

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

مما يستدعي بالضرورة استخدام سرعات أكبر للغاز الحامل، وتقليل D_M عن طريق استخدام غازات لها كثافة أعلى، أي يفضل استخدام النيتروجين على الهليوم، مثلا مع مراعاة أمور أخرى كالسرعة المراد استخدامها وخلافه.

- استخدام حجم صغير لحبيبات تعبئة العمود يزيد من الكفاءة، كما جاء في المعادلة المذكورة آنفا:

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

لكن للأسف، لا يمكن استخدام حبيبات صغيرة للغاية، ببساطة لأن الغازات تعاني من مقاومة شديدة عند مرورها من خلال حبيبات أصغر، وتزداد المقاومة كلما قل حجم الحبيبات، إلى أن تصل إلى النقطة التي يبدأ عندها الغاز الحامل بالانضغاط، مما يعقد عملية الفصل وتفسيراتها لذلك لا بد من استخدام حبيبات ذات أقطار أكبر بكثير من تلك المستخدمة في كروماتوغرافيا السائل.

- استخدام نسبة منخفضة من الوسط الثابت يقلل سمكه، مما ينعكس إيجابا على الكفاءة وذلك يتوقف على طبيعة وخصائص المواد المراد فصلها فيما يتعلق بمدى تطايرها، حيث أنه من المعروف:

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

- كلما زاد طول العمود تزداد الكفاءة، وبالرغم من أن الأعمدة الشعرية إجمالا غير معبأة، إلا أنها عادة أكبر كفاءة من الأعمدة المعبأة¹.

1.4 التغلب على مشاكل عملية الفصل والكفاءة في كروماتوغرافيا الغاز GC:

1 ضبط عامل الفصل أو الاختيارية، حيث يمكن القول أنه من المعلوم أن قيمة عامل الاختيارية بين مكونين يجب أن يكون أكبر من الواحد ($\alpha > 1$) لأن قدرة العمود على الفصل تقترب من الصفر عندما يقترب معامل الاختيارية من الواحد الصحيح، وتساوي صفرا عندما يساوي معامل

¹ - مبادئ التحليل الآلي. الفصل الحادي عشر ص 31-33.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

الاختيارية صفراً أيضاً، بحسب معادلة القدرة على الفصل التي تطرقنا لها كيف يمكن زيادة قيمة

معامل الاختيارية لزيادة قدرة العمود على الفصل في الكروماتوغرافيا؟

2 لا بد من نلجأ إلى:

3 تغيير نوع الغاز الحامل إلى هليوم أو هيدروجين، وقد رأينا تأثير ذلك.

4 تعديل درجة حرارة الفصل وبناء برنامج قادر على التمييز بين المكونات المختلفة (TPGC)، أي التحكم بدرجة الحرارة.

5 تغيير نوع الوسط الثابت في العمود (أي استخدام عمود آخر يحتوي على وسط ثابت مختلف)، وهو إجراء لا بد منه إن أردنا الحصول على عملية فصل مناسبة¹.

II. 2.4 - المشكلة العامة في عملية الفصل في كروماتوغرافيا الغاز GC:

في كروماتوغرافيا الغاز، عند استخدام درجة حرارة ثابتة isothermal GC، فإن الكروماتوغرام

الذي نحصل عليه 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 القمم عند القاعدة أقل ما يمكن، وبالذات تلك التي تخرج متأخرة.

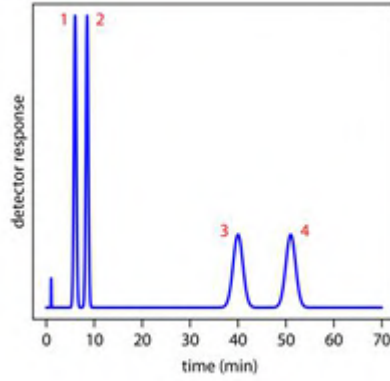
لكن ما يحدث فعلياً يتلخص في تداخل بعض القمم، واتساع تلك التي تخرج متأخرة، إضافة إلى كفاءة أقل أو أكبر بكثير من المطلوب، وزمن مكوث غير مبرر (طويل جداً، في بعض الأحيان).

ولنفترض أننا حصلنا على الكروماتوغرام التالي باستخدام كروماتوغرافيا الغاز عند درجة حرارة

ثابتة isothermal separation ولتكن مثلاً 150°C .

¹ - مبادئ التحليل الآلي. الفصل الحادي عشر ص 34.

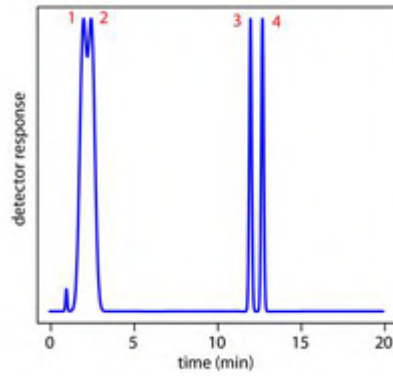
الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي



الشكل (44): كروماتوغرام عند درجة حرارة ثابتة 150°C .

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

ولنفترض أننا حصلنا على الكروماتوغرام التالي باستخدام كروماتوغرافيا الغاز عند درجة حرارة ثابتة isothermal separation ولتكن مثلا 220°C .



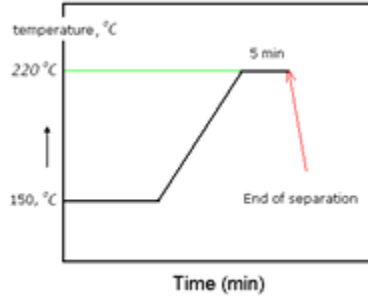
الشكل (45): كروماتوغرام عند درجة حرارة ثابتة 220°C .

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

هنا، من الممكن ببساطة بناء برنامج temperature program تعديل درجة الحرارة (TPGC) للحصول على فصل أفضل وحيث أننا راضون عن فصل المركبين 1 و 2 عند درجة حرارة 150°C ، فإننا بداية نستخدم تلك الدرجة لمدة 10 دقائق (كي نحصل على فصل جيد للمركبين 1 و 2)، ومن ثم

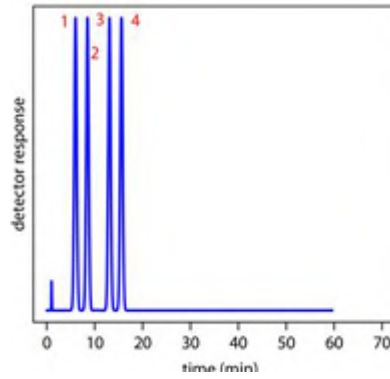
الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

نزيد درجة الحرارة إلى 220°C (ramp rate) 20 درجة في الدقيقة مثلا، عندها نحصل على فصل جيد للمركبين 3 و 4، أي أننا نصمم برنامج فصل كما في الشكل:



الشكل (46): برنامج لتعديل درجة حرارة الفصل TPGC.

وبذلك نحصل على الكروماتوغرام التالي:

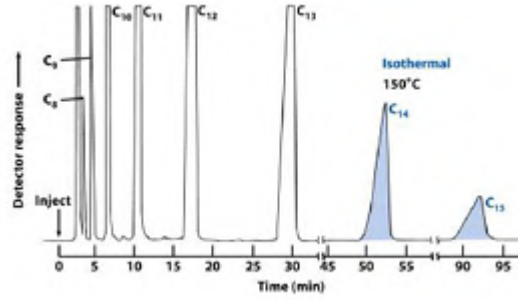


الشكل (47): الكروماتوغرام الناتج عن استخدام برنامج TPGC.

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

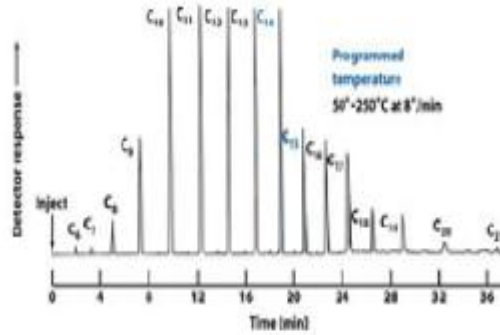
ولننظر أيضا إلى عملية الفصل التالية، حيث تمت العملية عند درجة حرارة ثابتة isothermal separation هي 150°C .

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي



الشكل (48): كروماتوغرام عند درجة حرارة ثابتة 150°C.

ونلاحظ من الكروماتوغرام أن المركبات بعد C15 لم تظهر، بالرغم من انتظار ما يزيد عن 95min، بينما تم فصل كافة المركبات باستخدام برنامج مناسب من درجة الحرارة، حيث تم الحصول على عملية الفصل التالية، في أقل من أربعين دقيقة باستخدام TPGC¹.



الشكل (49): كروماتوغرام باستخدام برنامج TPGC.

II. 5 تطبيقات كروماتوغرافيا الغاز:

- التحليل الكمي والكيفي للمركبات العضوية الطيارة مثل الكحولات والإثيرات والأسترات والكيونات والألدهيدات.
- التحليل الكمي والكيفي لمحتويات الزيوت العطرية والعطور.
- التحليل الكمي والكيفي للمبيدات المختلفة ومتبقياتهما.
- التحليل الكمي والكيفي للفحوم الهيدروكربونية متعددة النوى (PAH).
- التحليل الكمي والكيفي للمركبات العضوية المتطايرة VOCs.

¹ - مبادئ التحليل الآلي. الفصل الحادي عشر ص 34 - 38.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

- التحليل الكمي والكيفي للهيدروكربونات¹.

II. 6 مثال تطبيقي:

يجدر بنا أنه كان من المفترض أن نقوم بالعمل التجريبي في المخابر البيداغوجية للكلية، لكن بسبب الظروف التي فرضها وباء كورونا، لجأنا إلى الاستعارة بالمنشورات العلمية السابقة المتعلقة بموضوع دراستنا لإنجاز هذا العمل.

II. 1.6. تحليل الزيوت الأساسية لنبته *Moringa.oleifra* باستخدام GC-MS:

II. 1.1.6. طريقة جمع العينة:

- تم الحصول على بذور *M.oleifera* من منطقة Ankit Agrowal في الهند.
- تم التعرف على النبتة، والمصادقة التصنيفية عليها من قبل الدكتور Heba El-Gezawy، قسم العقاقير، كلية الصيدلة، جامعة 6 أكتوبر.

- تم تنظيف البذور وتجفيفها تحت أشعة الشمس المباشرة وطحنها بواسطة مطحنة ميكانيكية.

II. 2.1.6. طريقة الاستخلاص:

- تم أخذ 500g من بذور *M.oleifera* و وضعت في جهاز التقطير المائي لمدة 3 ساعات لاستخلاص الزيت الطيار.

- تم تجفيف الزيت بكبريتات الصوديوم اللامائية.

- خزن الزيت الطيار عند 4°C حتى التحليل.

- كانت نسبة مردود الزيت الطيار لبذور *M.oleifera* هي 0.05% لونه أصفر.

II. 3.1.6. طريقة العمل:

- تم إجراء تحليل الزيت العطري باستخدام كروماتوغرافيا الغاز Hewlett Packard (HP) 6890

(Agilent) series، المتصل بمطياف الكتلة (Agilent) HP 5973 series، المجهز بجهاز

أخذ عينات تلقائي وحاقن شعري واحد.

- TR-FAME عمود شعري طوله 30 m، قطره الداخلي 0.25mm وبسمك 0.25µm.

- حجم العينة المحقونة 1µl.

- تمت برمجة درجة حرارة فرن GC من 80°C - 230 بمعدل 3°C في الدقيقة.

¹- الدليل المخبري في المعهد العالي لبحوث البيئة، التجهيزات والأجهزة التحليلية الموجودة في المخبر 4.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

- درجة حرارة منفذ الحاقن 200°C ، الغاز الناقل الهليوم، معدل التدفق 1.5 ml/min .
- استند في تحديد مكونات الزيوت المتطايرة إلى مقارنة أزمنة احتجازها بالبيانات والمعلومات الخاصة بالمراجع المتاحة ومع البيانات المنشورة وكذلك من خلال البحث في مكتبة قاعدة بيانات NIST-MS.

1 - 4.1.6. النتائج و المناقشة:

أظهر تحليل GC-MS للزيت الأساسي لنبذة *M.oleifera* وجود 24 مكونا والمكون الرئيسي هو Naphthalene بنسبة (35.65%) النتائج موضحة في الجدول (50) والشكل (51) ¹:

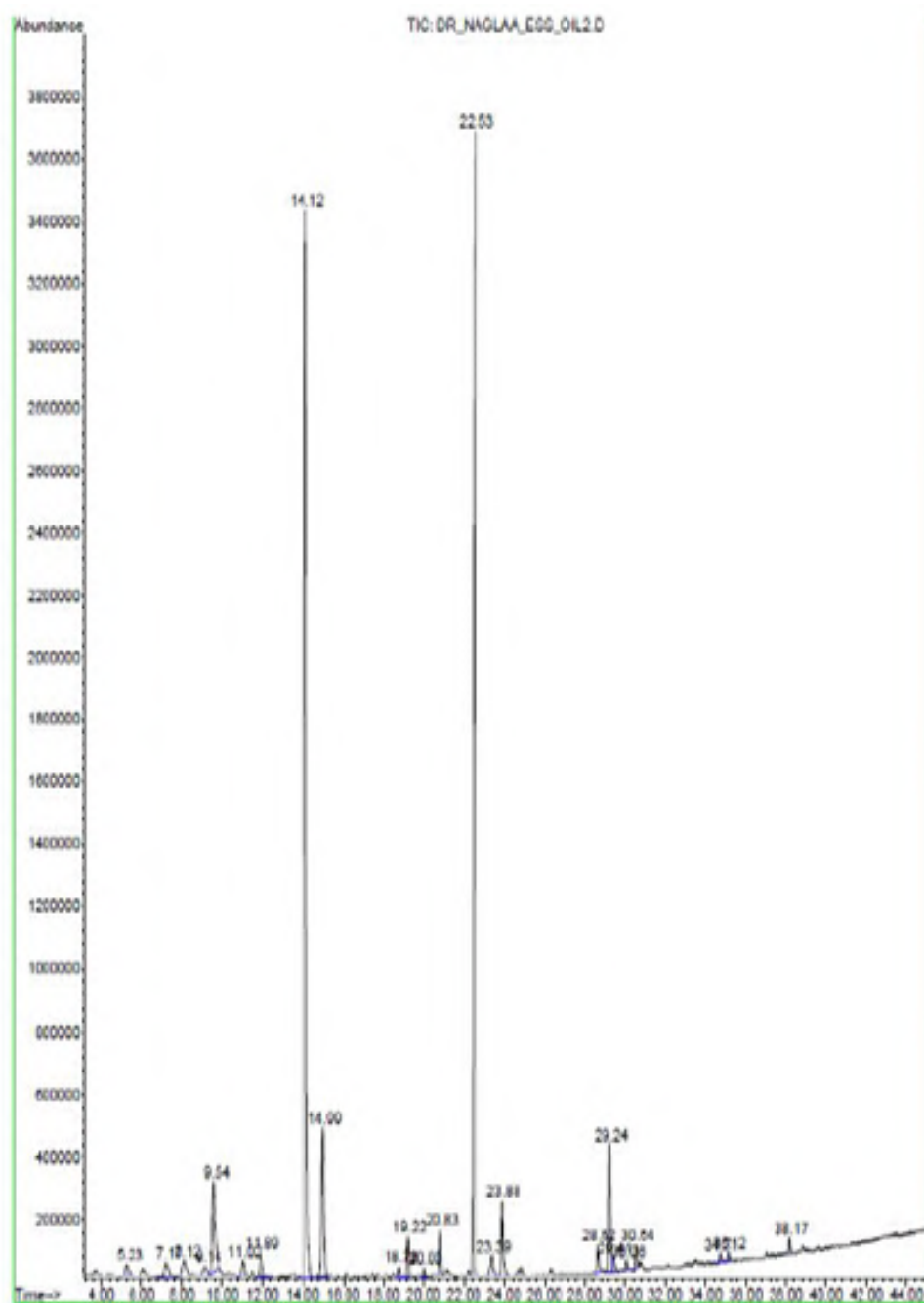
¹ - غدامسي.س - بن عامر.م، تقدير الفعالية المضادة للأكسدة للمركبات العضوية المكونة للزيوت الأساسية لبعض النباتات الطبية، مذكرة ماستر، قسم الكيمياء، كيمياء عضوية، كلية الرياضيات و علوم المادة، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، 2020، ص 91-97-112-121.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي

Peak No.	Compound	Relative Retention time *	Percentage (%)
1	Tetratriacontyl heptafluorobutyrate	0.37	0.56
2	Hexadecane	0.51	1.10
3	Caryophyllene	0.58	1.09
4	(-)-Aristolene	0.65	0.65
5	Estragole	0.66	4.5
6	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl-4-methyl	0.78	0.62
7	Anethole	0.84	1.29
8	Naphthalene	1	35.65
9	Butylated Hydroxytoluene	1.06	6.12
10	Tridecanoic acid	1.33	0.35
11	1-Methyl-5-(1-methylethyl)-1H-pyrazol-3-ol	1.36	1.32
12	Methyleugenol	1.42	0.32
13	Thymol	1.48	1.21
14	Benzene isothiocyanatomethyl	1.6	34.89
15	2-Pentadecanone	1.66	0.91
16	Hexadecanoic acid methyl ester	1.69	2.35
17	Methyl stearate	2.03	0.63
18	11-Octadecenoic acid, methyl ester	2.07	4.01
19	trans-13-Octadecenoic acid methyl ester	2.08	0.51
20	cis-Vaccenic acid	2.13	0.23
21	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	2.16	0.64
22	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 8-methylnonyl ester	2.46	0.21
23	Eugenol	2.49	0.22
24	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester	2.7	0.34

الشكل (50): المركبات الكيميائية المعزولة من الزيت الأساسي لنبته *M.oleifera*.

الفصل الثاني: كروماتوغرافيا الغازية المقترنة بالمطياف الكتلي



الشكل (51): كروماتوغرام GC-MS الخاص بالمركبات الكيميائية المعزولة من الزيت الأساسي لنباتة

M. oleifera

الفصل الثالث

كروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي المقترن

بمطياف الكتلة HPLC-MS

1- تمهيد:

الكروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي أو الضغط العالي، أو كما يختصر لها HPLC هي طريقة تمتاز بالدقة والحساسية العالية¹. ويعتبر هذا النوع من الكروماتوغرافي أسرع بكثير من الكروماتوغرافي السائل المعروف لأن له القدرة على التعرف وتقدير مكونات العينة بسرعة فائقة². وتستعمل لفصل المركبات الغير متطايرة والثابتة حراريا ،حيث أن الطور الثابت لهذه التقنية هو عبارة عن دعامة صلبة من السيليكا (Silica) وأما الطور المتحرك هو مذيب أو مجموعة من المذيبات مختلفة في القطبية .

2- مبدأ عملها

يتم إذابة المركبات المراد فصلها في مذيب. ثم يتم حقنها في النظام الكروماتوغرافي. يقوم الوسط المتحرك (مذيب أو مجموعة من المذيبات مختلفة القطبية)، بنقل العينة إلى العمود الكروماتوغرافي (الطور الثابت) وذلك بإستعمال مضخة ضغط عالي تحت ضغط يقدر بـ 500br. وعندما تدخل المركبات إلى العمود فإنها تنفصل على حسب قطبيتها. إذا كان الطور الثابت غير قطبي فلهذا يجذب المركبات غير قطبية ويفصل المركب القطبي أولا ثم المركب غير القطبي ، وإذا كان الطور الثابت قطبي فإن المركب غير قطبي يفصل أولا³. وعند ربط HPLC بـ MS فإنه يتم فصل المركبات ثم يتم التحليل الكمي أو التحديد النوعي. وبعدها يقوم الكاشف بإعطاء إشارة لكل مكون من مكونات العينة، لتظهر النتيجة على هيئة كروماتوجرام، يبين العلاقة بين زمن المكوث وشدة الإشارة⁴.

3- جهاز HPLC-MS ومكوناته الأساسية:

يتكون جهاز (HPLC) من عدة مكونات أساسية، والشكل التالي يوضح أهم الأجزاء الموجودة فيه:

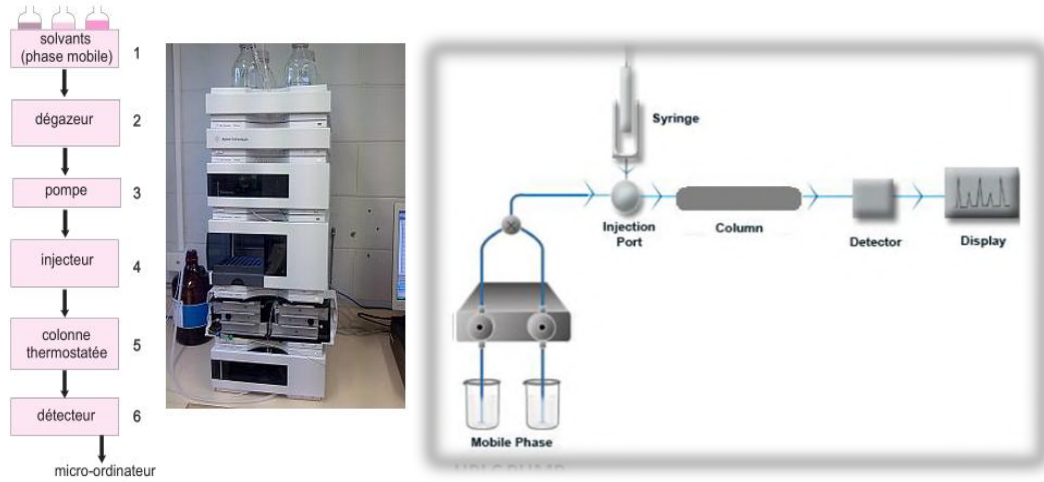
¹ - د. رضوان صدقي ، الطرق الحديثة لتحليل الاحماض الامينية وتقييم نوعية البروتين ، المكتبة الاكاديمية ، القاهرة - مصر (2004) ، ص 68-69 .

² - د. عوض عبد الحميد الحصادي ، د. محمد مصباح عمر الفرجاني ،مدخل الى التحليل الكيميائي والكروماتوغرافي ، دار الكتب الوطنية، بنغازي -ليبيا ، ط1، (2002)، ص139-140.

³ - Ankurchoudhory, principle of HPLC (liquid chromatography), 21/05/2021, <http://www.pharmaceuti cd guidelines.com>

⁴ - د. منذر سليم عبد الطيف ، مقدمة في التحليل الالي ، الفصل الثاني عشر، ص2

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

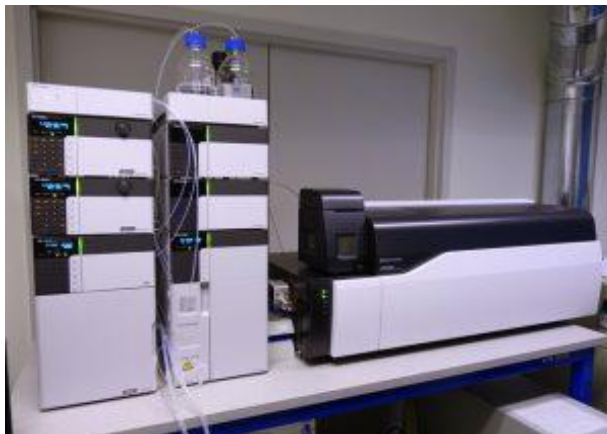


الشكل 52: مخطط توضيحي لجهاز HPLC وأهم مكوناته.

مكونات الجهاز

- 1 خزان الطور المتحرك Mobile phase reservoir
- 2 المضخة عالية الضغط High-pressure pump
- 3 الحقن injector
- 4 العمود column
- 5 الكاشف detector
- 6 المسجل Data output

والشكل التالي صورة للجهاز:



الشكل 53: صورة لجهاز HPLC-MS

III. 1.3 - خزان الطور المتحرك (Mobile phase reservoir):

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

وهو مجموعة من القارورات البلاستيكية أو الزجاجية .يتم ملؤها بالمذيب أو مجموعة من المذيبات مختلفة القطبية (الطور المتحرك)،ويتم توصيلها بالمضخة عالية الضغط بواسطة أنابيب بلاستيكية تكون مصنوعة من مواد خاملة كيميائيا ، وكذلك يتم توصيلها بأداة لتفريغ الهواء وطرده الغازات الذائبة في المذيبات¹. وذلك من أجل تفادي الأخطاء في التجربة.



الشكل 54: صورة القارورات المستعملة في الجهاز

III - 2.3 - المضخات عالية الضغط (High-pressure pump):

يشتمل أي تركيب (HPLC) على مضخة واحدة على الأقل، لإجبار مرور الطور المتحرك عبر العمود². بحيث أنها تؤمن تدفق ثابت ومحدد لطور المتحرك³. وعادة يكون بين 0.01 و 10 (مل/د). ويصل الضغط في هذه المضخات إلى أكبر من 350 بار⁴. وأما بالنسبة للأجهزة الحديثة فيصل الضغط إلى 1000 ضغط جوي، وفيها تستعمل أعمدة معبأة بجزيئات في حدود [1.7-1.8 ميكرومتر]، وتدعى هذه الأجهزة ب(UPLC)⁵.

¹- Francis Rouessac, Annick Rouessac, Daniel cruche, Claire Duverger-Arfulso, Arnaud Martel chimique, Analyse chimique (Méthodes et techniques instrumentales), 8^e édition, Paris, Dunod (1998;2000;2009;2006), pag 71

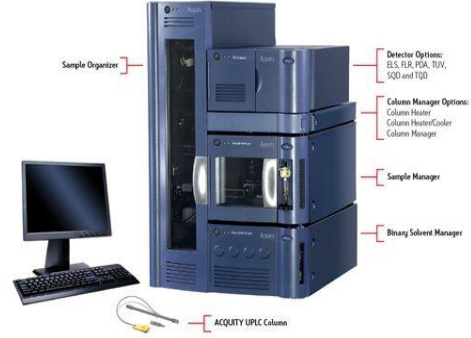
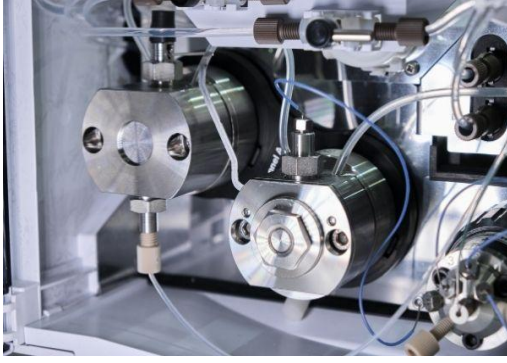
²- Francis Rouessac et al., Analyse chimique (Méthodes et techniques instrumentales), Dunod-Paris, pag 71.

³- د. فانتن شومان، محاضرة طرق الفصل (الكيمياء التحليلية الصيدلانية 2- لطلاب السنة الثانية صيدلة)، جامعة الشام الخاصة (2020)، الفصل السابع، ص 74.

⁴- HPLC Principe et appareillage, Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine-Académie de Rouen-Tous droits réservés mercredi 20 janvier 2010, <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9>, pag 9.

⁵- Waters (the science of what's possible), Beginner's Guide to UPLC, 30/04/2020, <http://www.waters.com>.

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي



الشكل 55: صورة لجهاز UHPLC الشكل 56: صورة لمضخات جهاز HPLC

III - 1.2.3 - مضخة الحقنة (syringe pump):

وهذا النوع من المضخات يستخدم بشكل هامشي في أجهزة ال HPLC العادية، لكنه يجد بعض التطبيقات في الأجهزة الآليّة، ومن اسم يمكن تخيل أن تلك المضخة تشبه الحقنة إلا أنها مصنوعة من الفولاذ الصلب المقاوم للصدأ¹. يتم العمل بها في النظام المتساوي (elution isocratic)².

والصور التالية لبعض أنواع المضخات الحقنة متفاوتة الحجم :



الشكل 57: صورة لمضخة الحقنة المستعملة في جهاز HPLC

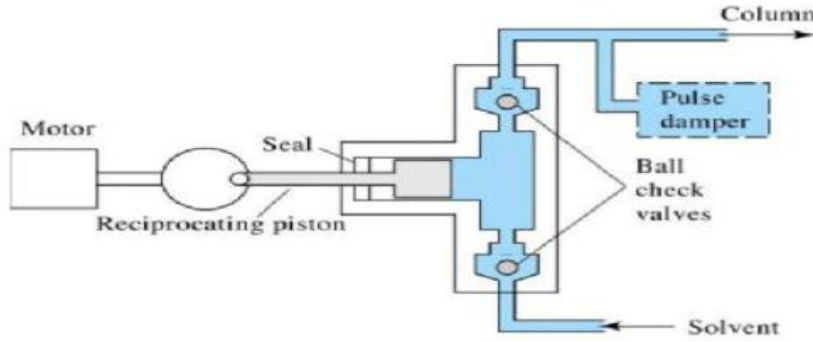
III - 2.2.3 - المضخات الترددية (reciprocating pump):

وهي المضخة المستعملة تقريبا بشكل تام في أجهزة HPLC، والشكل التالي يوضح تركيبها:

¹ - منذر سليم .ع. اللطيف، مقدمة في التحليل الآلي، الفصل الثاني عشر، ص2

² - Michel Martin, Gilbert Ble, Claude Eon, Georges Guiochon, The use of syringe-type pumps in liquid chromatography in order to achieve a constant flow-rate, Journal of chromatography, 112, Laboratoire de chimie Analytique physique, École polytechnique, Route de saclay, 91120 Palaiseau-France, 2001, pag 399.

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي



الشكل 58: رسم توضيح لمكونات مضخة الترددية في أجهزة HPLC

وتتكون من¹:

- الموتور الذي يقوم بتحريك المكبس الترددي .
- المكبس الترددي (piston) هو الذي يقوم بدفع الوسط المتحرك تباعا ويحيط به خاتم لمنع التسرب (seal).
- الصمامان (two check valves): عندما يعود المكبس إلى الخلف فإن الصمام المتواجد على خط الوسط المتحرك يسمح بمرور الطور المتحرك ، بينما يغلق الصمام الآخر المؤدي إلى الحاقن والعمود.
- مخمد (مثبط) النبضات (pulse dampers) : هو عبارة عن أنبوب لولبي من الفولاذ الغير قابل للصدأ، ويعتبر استخدامه مفيدا جدا في تخفيف حدة تغير معدل سريان الوسط المتحرك أثناء عملية الضخ.

وتكون جميع هذه الأجزاء مصنوعة من مواد غير قابلة لتآكل وتستبدل كل أشهر أو سنوات. والشكل التالي يوضح بعض هذه الأجزاء²:



الشكل 60: صورة المكبس وخاتم منع التسرب

الشكل 59: صورة مخمد النبضات

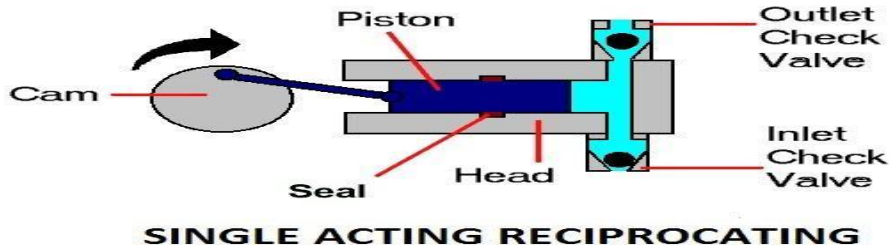
¹- أ.د منذر سليم عبد اللطيف، مقدمة في التحليل الآلي، لفصل الثاني عشر، ص 4.

²- د. منذر سليم عبد اللطيف، مقدمة في التحليل الآلي، الفصل الثاني عشر، ص 5

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

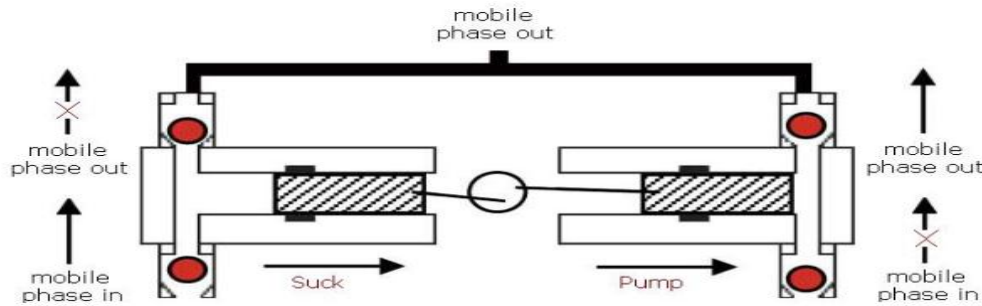
III - 1.2.2.3- أنواع المضخات الترددية : يوجد نوعين لهذه المضخات وهي :

✓ المضخات ذات الرأس الواحد (single head pump): وتحتوي هذه المضخات على مكبس واحد وصمامان، وهذا النوع لا يستعمل وذلك راجع لان نبضات تكون واضحة كثير. مما يجعل معدل سريان طور المتحرك غير مستمر²¹.



الشكل 61: رسم توضيحي لمضخة ذات رأس واحد

✓ المضخات مزدوجة الرأس : وتحتوي على مكسبين ،ومجموعتين من الصمامات. ويتم إستعمالها في أغلب الاحيان ، فألية عملها تسمح لها بتقليل التغير في معدل سريان الطور المتحرك. حيث أنه في الوقت الذي يسحب فيه المكبس إلى اليسار الوسط المتحرك (لا يضخ) ، فإن المكبس الاخر إلى اليمين يكون في موضع الضخ ،وليس السحب والعكس صحيح. ويتناوب المكسبان العمل ببلتظام³.



الشكل 62: رسم توضيحي لمضخة مزدوجة الرأس

III - 3.3- الحاقن (An injector):

¹ - AhmadAqellfseisi, High performance liquid chromatography, part5, youtube channel: <https://www.youtube.com/uer/MrAhmadaqel>. 15/04/2021

² - د. منذر سليم عبد اللطيف, مقدمة في التحليل الآلي, الفصل الثاني عشر, ص6

³ - د. منذر سليم عبد اللطيف, مقدمة في التحليل الآلي, الفصل الثاني عشر, ص7

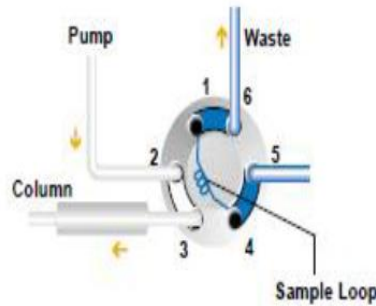
الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

وهو أحد مكونات الجهاز الرئيسية ، بحيث أنه يتواجد قبل عمود الفصل. ويستخدم في تقديم العينة (بحجم معين) ليتم فصلها في العمود، وهناك النوع العادي والوتوماتيكي¹. ويتم استخدام نوع واحد من الحاقن بشكل تقريبي في جهاز HPLC². هو حاقن معروف بـ Rheodyne injector، والذي يظهر في الشكل التالي:



الشكل 63: صورة الحاقن المستخدم في جهاز HPLC

ويتميز بوجود ستة فتحات ، واحدة لحقن العينة ، والثانية للمضخة ، والثالثة للعينة الزائدة ، والرابعة موصولة بالعمود ، أما الخامسة والسادسة بينهما أنبوب ملف العينة (sample loop)، كما في الشكل³:



الشكل 64: رسم توضيحي للحاقن ومواقع الفتحات الموجودة فيه

¹- د. فاتن شومان ، محاضرات طرق الفصل (الكيمياء التحليلية الصيدلانية 2)، جامعة الشام الخاصة 2020، الفصل السابع، ص 75 .

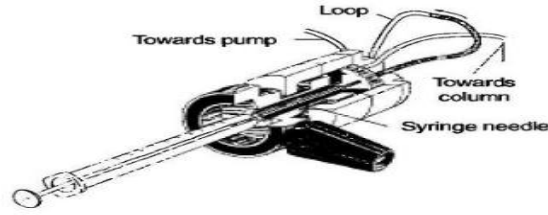
²- Francis Rouessac .et.ol. Analyse chimique,dunod,8é,paris,pag74.

³- د. منذر سليم عبد اللطيف ، مقدمة في التحليل الآلي، الفصل الثاني عشر، ص 8.

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

ويتم الحقن في وقت قصير، من أجل إحداث أقل قدر من التشويش على نظام دوران الطور المتحرك والذي يجب أن يكون مستقرا من العمود إلى الكاشف. ويوجد الحاقن العادي اليدوي والآلي. ويجب أن يتحمل الضغوط 30000 كيلو باسكال بإعتباره جزء دقيق جدا¹. ويعمل في خطوتين:

✓ **الخطوة الأولى:** وتدعى بوضع التحميل (Load) ويتم تحميل أو إدخال العينة في ملف العينة (أنبوبة رفيعة لها حجم ثابت) ، بواسطة حقنة³² (بتصرف). كما في الشكل التالي :



الشكل 65: رسم توضيحي لعملية الحقن



الشكل 66: صورة أنبوبة العينة

✓ **الخطوة الثانية:** وتدعى وضع الحقن (inject) وفيه يتم ضخ العينة إلى داخل العمود ليتم فصلها وذلك عبر تغيير مسار الضخ ليتم من المضخة إلى العينة ومن ثم العمود⁴. والشكل التالي يوضح الخطوتين (التحميل والحقن) :

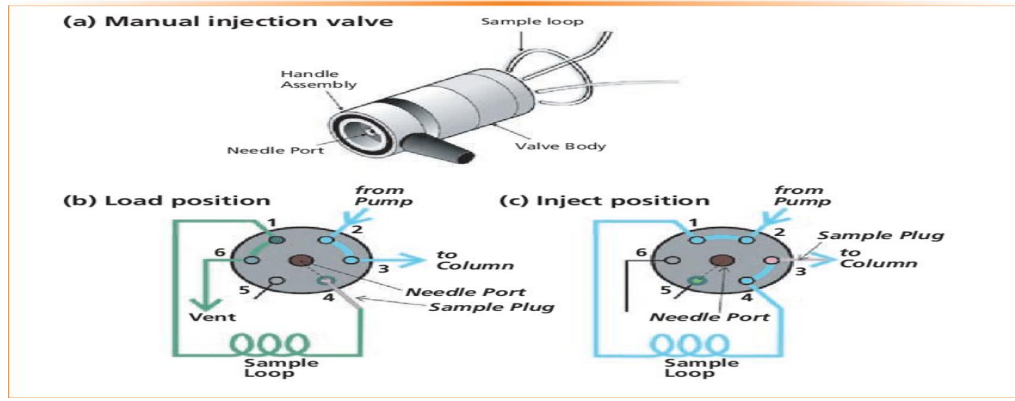
¹ - Francis Rouessac .et.ol. Analyse chimique, dunod, 8^e, paris, pag 74

² - د. منذر سليم عبد اللطيف, مقدمة في التحليل الآلي, الفصل الثاني عشر, ص 8.

³ - Francis Rouessac .et.ol , Analyse chimique, dunod, 8^e, paris, pag 74

⁴ - د. منذر سليم عبد اللطيف, مقدمة في التحليل الآلي, الفصل الثاني عشر, ص 9.

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي



الشكل 67: رسم توضيحي لخطوات عمل الحاقن

ويتم التحكم في الوضعين (inject وLoad) بإستعمال rotor disc، وهي عبارة عن إسطوانة .



الشكل 68: صورة الإسطوانة الموجودة في حاقن HPLC

وعند حقن العينة تستخدم إبرة إسطوانية بدلا من الإبرة مدببة، ويجب غسلها بمذيب مناسب وشطفها بالطور المتحرك وذلك قبل تعبئتها بالعينة والقيام بالحقن¹. والشكل التالي صورة للإبرة:



الشكل 69: صورة لنوع الإبرة الإسطوانية الخاصة لحاقن HPLC

¹- Ahmad Aqellfesi I, High performance liquid chromatography, part 5, <https://www.youtube.com/user/MrAhmadaqel.youtube.com>, 15/04/2021.

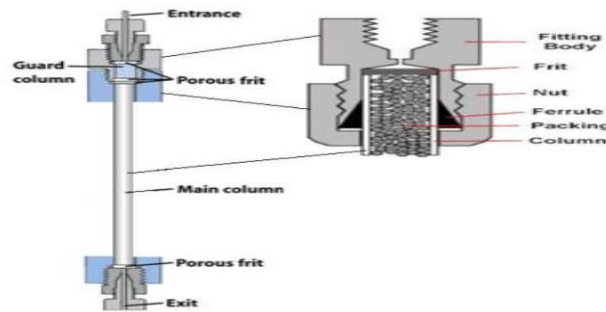
III 4.3 - العمود (chromatographic column) :

يعتبر عمود الفصل من أهم أجزاء جهاز HPLC، وهو يعد قلب الجهاز. والجزء الذي يحدث فيه عملية الفصل، ويحمل بداخله الطور الثابت. ولأهمية العمود في الجهاز فإن أغلب الدراسات البحث العلمي والتطورات الحادثة في علم الكروماتوغرافي تنصب جلها على تطوير والتحسين من كفاءة العمود¹.

وتتميز الأعمدة المستخدمة بأنها تكون مصنوعة دائماً من الفولاذ غير قابل للصدأ، وكذلك يوجد أنواع من الأعمدة المصنوعة من الزجاج أو من مادة الستانلس ستيل². وتكون سماكة جدرانها مناسبة لتحمل ضغوط كبيرة، وفي العادة تكون أقطارها في حدود 4.6mm، بينما الطول يتراوح بين 5-25cm³. ويتوقف طول العمود على حجم حبيبات التعبئة، إذ كلما قل قطر حبيبات التعبئة كلما كان طول العمود أقل⁵. وهذه بعض الأعمدة المستخدمة في جهاز HPLC. موضحة في الصورة التالية :



الشكل 70: صورة للأعمدة الفصل في جهاز HPLC مختلفة الأحجام والأنواع



الشكل 71: رسم توضيحي لأجزاء العمود المستخدم في جهاز HPLC

¹- Ahmad Aqellfseisi , High Performace liquid chromatography,part5 , [hptt://www.youtube.com/user/MrAhmadaaqel.youtube.com](https://www.youtube.com/user/MrAhmadaaqel.youtube.com) , 15/04/2021.

²- د. فاتن شومان, محاضرات طرق الفصل, جامعة الشام الخاصة 2020, الفصل السابع ص77.

³- د. منذر سليم عبد اللطيف, مقدمة في التحليل الآلي, الفصل الثاني عشر, ص11.

⁴- Francis Rouessac .et.ol.Analysechimique,dunod, paris, 8é,pag75.

⁵- د. منذر سليم .ع اللطيف , مقدمة في التحليل الآلي , الفصل الثاني عشر, ص11.

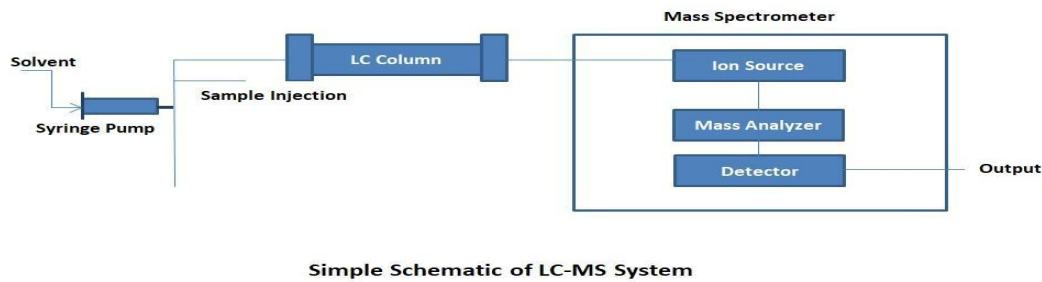
الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

يجب عدم السماح بوجود أية فراغات نتيجة التوصيل¹، وذلك لتفادي أية أخطاء في التحليل. وكذلك يتم ربط العمود بجهاز تسخين من أجل التحكم في درجة حرارته لأن بعض المركبات تنفصل في درجات حرارة عالية. ويتم التعبير عن العمود بهذه الصيغة:

C18, 4.6 X 250 mm, 5 μ m, 300 \AA
bonded phase column dimension particle size pore size

III 5.3 المكشاف المستعمل (MS):

لقد تم التطرق بشكل مفصل عن كيفية عمل جهاز MS في الفصل الثاني الخاص بـ GC-MC، لذا سوف نكتفي بشرح آلية عمله عند إقترانه بـ HPLC - MS. حسب المخطط التالي:



الشكل 72: رسم تخطيطي لكيفية ربط جهاز MS مع جهاز HPLC

III 1.5.3 آلية عمل HPLC-MS:

أصبح استخدام مطياف الكتلة كاشف لـ HPLC شائعاً، على الرغم من التكلفة العالية لمثل هذه الكواشف والحاجة إلى عمل متقن. إلا أن مطياف الكتلي ساهم في تطوير طريقة HPLC². أما بالنسبة إلى كيفية عمله فإنه بعد خروج المركبات المفصولة من العمود يتم إدخالها عبر واجهات خاصة، وهناك عدة أنواع من الواجهات ولكن أكثر الواجهات استعمالاً هي:

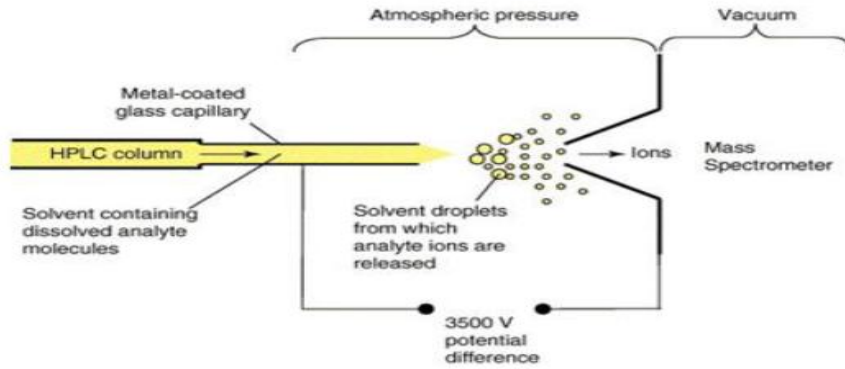
¹ - د. منذر سليم عبد اللطيف، مقدمة في التحليل الآلي، الفصل الثاني عشر، ص 11.

² - LLOYD R. SNYDER, JOSEPH J. KIRKLAND, JOSEPH L. GLAJCH, Practical HPLC method development, second edition, John Wiley & Sons, Inc., USA, 1997, chapter 3.

III 1.5.3 أ التأين بالرش الكهربائي (ESI) Electrospray ionisation

يتم إدخال المادة المفصولة الخارجة من عمود الفصل عبر أنبوب شعيري (إبرة الرش الكهربائي) والذي له فرق جهد عالي المطبق عليه (2.5-4 كيلو فولت) ، ليشكل رذاذ. وبعدها تنجذب القطرات المشحونة نحو فتحة أخذ العينات وفي هذه المرحلة يتم تبخير المذيب فتتقلص القطرة إلى أن تتفجر فتنتج قطيرات

أصغر¹



الشكل 73: رسم تخطيطي لعملية التأين بالرش الكهربائي

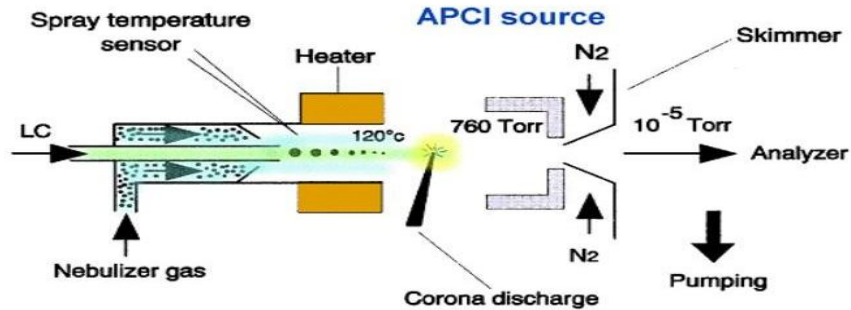
III 1.5.3 ب التأين الكيميائي للضغط الجوي Amospheric pressure chemical ionisation APCI

هو طريقة مماثلة للتأين الكيميائي (CI) الفرق المهم هو أن (APCI) يحدث عند ضغط الجوي ، حيث أنه أولاً يتم تحويل المادة التحليلية إلى رذاذ. ثم يتم تبخير المذيب عن طريق سخان وذلك لإنتاج جزيئات الطور الغازي تتفاعل هذه الجزيئات مع الإلكترونات ، فتشكل أيونات تفاعلية. هذه الأخيرة تعمل على تأين مركبات العينة². (بتصرف)

الشكل 74: رسم تخطيطي

لعملية التأين الكيميائي

تحت الضغط الجوي



¹ - Achille Cappiello, Advances in LC-MS instrumentation, Elsevier, First edition, Netherlands, 2007, pag28-29.

² - Robert E. Ardrey, Liquid chromatography-Mass spectrometry: an introduction, John wiley & sons. Ltd, in England, 2003, pag33-141.

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

بعد خروج الأيونات (من ESI و APCI) تتجه إلى المحلل ثم الكاشف. ولقد تطرقنا في الفصل السابق إلى كيفية عملهما لذا لن نكرر شرحهما.

III 6.3 المسجل Data output: تم ذكره في الفصل السابق.

III -4 الأطوار المميزة:

III 1.4 الطور الثابت (stationary phase) :

هو عبارة عن مادة قطبية ذات خواص إمتزازية جيدة، وتعتبر الالومينا وهلام السيليكا من أكثر المواد استخداما على الرغم من أن هناك العديد من المواد التي يمكن إستخدامها كطور ثابت. والجدول التالي لبعض الأنواع المستخدمة كطور ثابت¹:

الصيغة الكيميائية	أسم المادة
Al_2O_3	الالومينا
C	الفحم النباتي
Mg/SiO ₂	فلورسيل
SiO ₂	هلام السيليكا
MgCO ₃	كربونات المغنيسيوم
CaCO ₃	كربونات الكالسيوم
(C ₆ H ₁₂ O ₆) _n	النشاء
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	السكروز

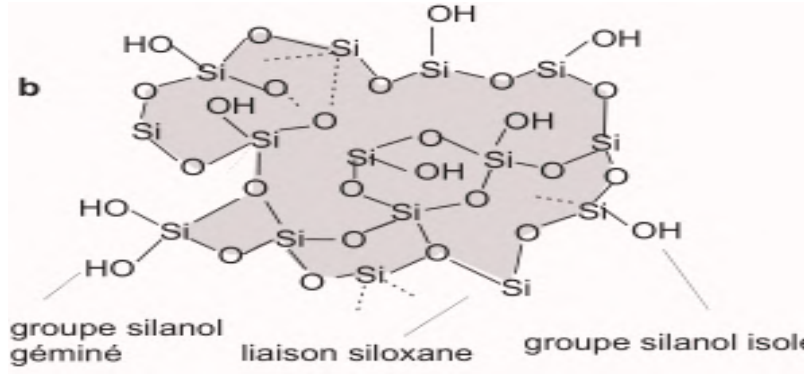
جدول 5: المواد المستخدمة لطور الثابت HPLC

¹ - د. فتن شومان, محاضرات طرق الفصل, جامعة الشام الخاصة, 2020, الفصل السابع, ص78.

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

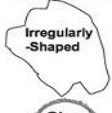









III 1.1.4 المادة الأساسية لطور الثابت (هلام السيليكا silica gel) :

من بين جميع المواد التي تم استخدامها والتي يتم استخدامها في صنع الاطوار الثابتة ، يحتل هلام السيليكا مكانة سائدة . هذه المادة الاساسية هي عبارة عن مادة صلبة غير متبلورة ولها الصيغة الكيميائية التالية $^1\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})_n$.



الشكل 75: بنية الكيميائية لهلام السيليكا

ونظرا لان أحد أسباب تطور تقنية HPLC عبر الزمن هو حجم المسامات لجزيئات تعبئة العمود². فالجدول التالي يبين مراحل وفترات الزمنية التي عرفت حجم المسامات³:

Year(s) of Acceptance	Particle Size	Most Popular Nominal Size	Plates / 15cm (Approximate)
1950's		100µm	200
1967		50 µm (pellicular)	1,000
1972		10 µm	6,000
1985		5 µm	12,000
1992		3-3.5 µm	22,000
1998*		1.5 µm*(non-porous)	30,000
1999		5.0 µm (pellicular)	8,000**
2000		2.5 µm	25,000
2003		1.8 µm	32,500
2007/2008		2.7 µm (pellicular)	32,000***

* non-porous silica or resins
** 300 A pore for protein MW 5,700
*** 90-120 A pore

جدول 6: مراحل تطور المسامات

¹ - Francis Rouessac .et.al. Analyse chimique ,dunod, paris, 8e', pag76

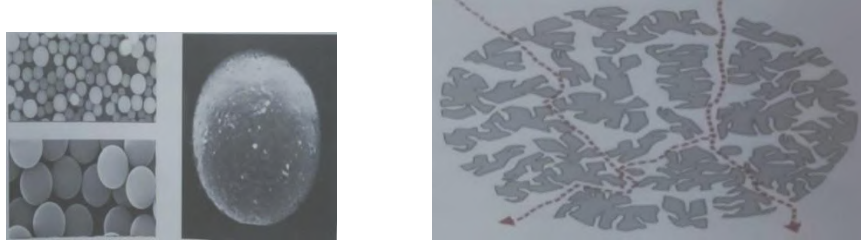
² - Ronold. E Majors, HPLC colum technology the first50 years, Lab compare , 28/09/2018, <http://www.Lapcompare.com>

³ - Celuia Henry Amaud, 50years of HPLC, C&EN , America chemical Society, 13/07/2016, <http://www.C&EN.com>, 01/03/2021.

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

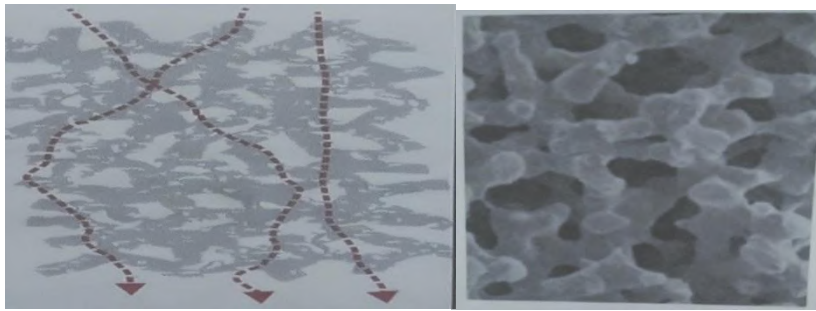
ويحتوي هلام السيليكا على مسام بلحجام مختلفة ، وذلك لملى العمود بطريقة متجانسة . وتكون على شكلين :

✓ **الشكل الاول:** micro- sphere وهو عبارة عن خرزات كروية دقيقة ، لها قطر ثابت في العمود . وتتواجد بإحجام أقطار ما بين 1 و 12 ميكرو متر . وشكل التالي يوضح مسامات ذات أقطار 5 ميكرومتر وتعتبر الأكثر استعمالاً¹. ومسارات التي يسلكها الطور المتحرك:



الشكل 76: جزيئات السيليكا من نوع مسامي 5 ميكرو متر

✓ **الشكل الثاني:** monolith silicique بمعنى أحادية. وسميت بهذا الاسم لأنها تكون على شكل طبقة واحدة في العمود . وتعتبر بديلا مثيرا للاهتمام، نظرا لكونها أكثر نفاية. تتمتع الأحاديات بقدرة فصل مماثلة لجزيئات التعبئة ذات 3 ميكروب متر² .



الشكل 77: صورة لمسامات من نوع الأحادية

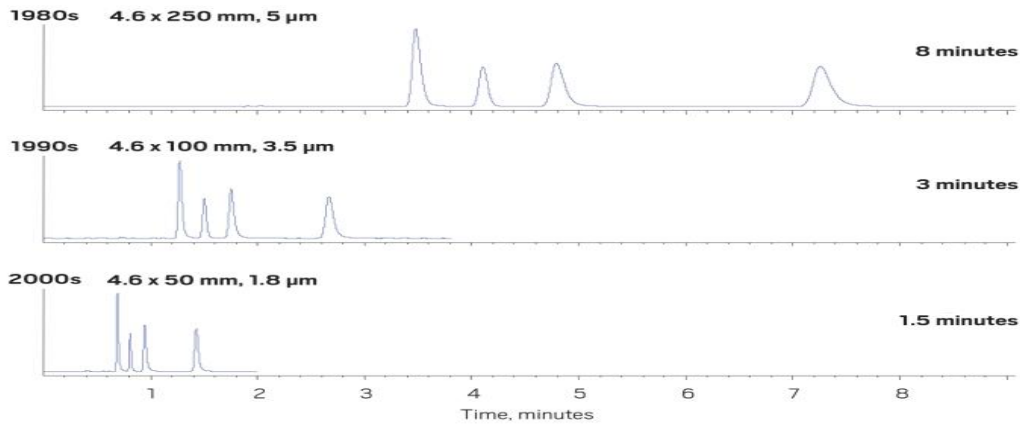
¹- Francis Rouessac et al., Analyse chimique, Dunod, Paris, 8^e édition, page 78.

²- Satinder Ahuja, Michael W. Dong, Handbook of Pharmaceutical analysis by HPLC, Elsevier Academic, Unred King dom, first edition, 2005, page 95-98.

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

وفي هذا المسام نجد نوعين حسب القطر فالأول يدعى Mesopores وقطرها في حدود (12nm). أما النوع الآخر قطره يبلغ (3um) ويدعى ب Macropores¹.

ومن الدراسات السابقة وجد أن الأعمدة الاقصر المعبأة بجسيمات أصغر أدت إلى فصل أسرع وأحسن. والشكل التالي يوضح ذلك²:



الشكل 78: كروماتوغرام لنفس مركبات في شروط مختلفة

حيث تم الحصول على الكروماتوغرام لمركبات خليط

1-methylxanthine ; 1,3-dimethyluric acid ; 3,7-dimethylxanthine ;
1,7- dimethylxanthine.

وذلك في نفس الشروط مع إختلاف حجم الجسيمات وطول العمود في فترات زمنية مختلفة.

III 2.1.4 أنواع الطور الثابت:

يتم تصنيف الطور الثابت حسب مجموعة الوظيفية المضافة إلى المجموعة السيليكا. وتصنف إلى نوعين هما :

4-1-2- أ طور ثابت قطبي (polar stationary phase):

¹ - Satinder Ahuja and Michal W. Dong, Handbook of Pharmaceutical analysis by HPLC, Elsevier Academic, Unred Kingdom ,first. e,2005,pag95-98.

² - Analytics-shop, Selection of a suitable HPLC colum,04/04/2021, <http://www.analytics-shop.com>.


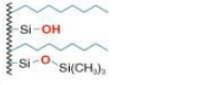
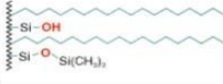



الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

وفي هذا النوع يتم تعديل السيليكا كيميائياً، بإضافة مجموعة قطبية. وفي هذه الحالة نسمي عملية الفصل (normal phase liquid chromatography) (NPLC)، حيث يكون الوسط المتحرك سائل غير قطبي. ويعد استخدام هذه الطريقة في التحليل قليل نسبياً وأندر الاستعمال. ومن أمثلة الاوساط الثابتة القطبية مثل (-OH، -NH₂، -Phenyl) ¹.

4-1-2-ب طور ثابت غير قطبي (non polar stationner phase):

ويتم تعديل قطبية السيليكا في هذا النوع بإضافة سلسلة هيدروكربونية مشبعة، بهدف تقليل من قطبية السيليكا (مادة قطبية) ومن الأمثلة على ذلك نجد C₃، C₈، C₁₈. وتعتبر C₁₈ هي أكثر استخداماً، لأنه تعطي فصل أفضل مقارنة بالأطوار الأخرى.

C₈ أوكتل، C₁₈أوكتاديسيل تطلق عليها هذه الأسماء وذلك للإشارة إلى طول السلسلة الكربونية المرتبطة بسطح السيليكا. والجدول التالي يبين بعض المراحل المرتبطة ²:

Phasenname	Formel	Aufbau	Anwendung	USP Nummer	Mögliche Materialien
Octylsilan (C8), non endcapped	-(CH ₂) 7-CH ₃		Mittelpolare Verbindungen	L7	Waters Symmetry C8
Octylsilan (C8), endcapped	-(CH ₂) 7-CH ₃		Mittelpolare Verbindungen	L7	Merck Chromolith Performance RP-8 endcapped
Octadecylsilan (ODS, C18), endcapped	-(CH ₂) ₁₇ - CH ₃		Apolare und mittelpolare Verbindungen	L1	Altmann Reprosil Pur C18-AQ
Phenyl	-(CH ₂) 3-C ₆ H ₅		Mittelpolare Verbindungen, ungesättigte Verbindungen	L11	Altmann Reprosil 100 Phenyl
Phenyl-Hexyl	-(CH ₂) 6-C ₆ H ₅		Ungesättigte Verbindungen, mittelpolare Verbindungen	L11	Waters XTerra Phenyl
Pentafluorphenyl (PFP)	-(CH ₂) 3-C ₆ F ₅		Ungesättigte Verbindungen, halogenierte Verbindungen, polare Verbindungen	L43	Altmann Reprosil Fluosil PFP

¹ د. منذر عبد اللطيف سليم , مقدمة في التحليل الآلي , الفصل الثاني عشر , ص 15.

² Analytics-shop, selection of a suitable HPLC Colum , 04/04/2021, <http://www.analytics-shop.com>.

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

جدول 7: بعض الأطوار الثابتة المعدلة كيميائياً

III 3.1.4 الاحتياطات الواجب مراعاتها أثناء اختيار الطور الثابت: لاختيار الطور الثابت المناسب يجب

1:

- ✓ عدم ذوبانه في المذيبات (الطور المتحرك).
- ✓ عدم تفاعله كيميائياً مع هذه المذيبات أو مع مكونات الخليط المراد فصله .
- ✓ أن يكون له فعالية إمتزازية جيدة .

III 2.4.4 الطور المتحرك (Mopile phase) :

الطور المتحرك هو عبارة عن مذيب الذي يحرك المذاب (العينة) عبر العمود. يستخدم في بعض الحالات مذيب واحد لفصل مكونات الخليط ، وأحياناً يستخدم خليط من المذيبات مختلفة القطبية لتخليص هذه المكونات من العمود . ويبدأ التخليص عادة بمذيب غير قطبي لتخليص المركبات غير قطبية من العمود ثم تزداد درجة قطبية المذيب بالتدرج لتخليص المركبات ذات القطبية الأعلى².

III 1.2.4 شروط المذيب المستخدم كطور متحرك⁴³:

- ✓ أن لا يخرج المكونات من العمود بسرعة لأن ذلك لن يؤدي إلى فصلها.
 - ✓ أن لا تكون سرعة التخريج بطيئة لأن ذلك يؤدي إلى الحصول على أزمنة استبقاء طويلة وتسبب تعريض السن (القمة).
 - ✓ أن يكون المذيب خالياً تماماً من كل الشوائب.
 - ✓ يجب أن يكون متوافقاً مع الكاشف المستعمل.
 - ✓ يجب أن يكون قادر على إذابة مكونات العينة.
- والجدول التالي يوضح بعض المذيبات المستعملة كأطوار ثابتة⁵ :

¹ - د. فانتن شومان ، محاضرة طرق الفصل ، جامعة الشام الخاصة (2020)، ص 78

² - محاضرة طرق الفصل ، جامعة الشام (2020) ، ص 79.

³ - تحليل الآلي، الفصل الثاني عشر، ص 29.

⁴ - محاضرة طرق الفصل ، جامعة الشام (2020) ، ص 80 .

⁵ - د. منذر سليم عبد اللطيف ، مقدمة في التحليل الآلي ، الفصل الثاني عشر ، ص 23.

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

Solvent	Polaeity	Eluent	P', Index
Cyclohexane	0.04		-0.2
n-Hexane	0.1		0.01
Toluene	2.4		0.29
Diethyl ether	2.8		0.38
Tetrahydrofuran	4.0		0.57
Choroform	4.1		0.40
Ethanol	4.3		0.88
Methanol	5.1		0.95
Acetonitrile	5.8		0.65
Ethylene glycol	6.9		1.11
Water	10.2		Large

جدول 8: بعض المذيبات المستعملة كأطوار متحركة

III 2.2.4 نوع وتركيبية الوسط المتحرك:

يمكن التعرف على نوع وتركيبية الوسط المتحرك المناسبة للفصل وذلك ب إستعمال العلاقات التالية، ولكن يجدر الإشارة إلى أنه في بعض الأحيان يمكن أن نحصل على قيم غير معقولة لقطبية الوسط المتحرك، كأن نحصل على قيمة أقل من 5.1 أو أكثر من 10.2 . وهذا يعني أنه لا يمكن إستخدام هذا الوسط المتحرك¹ (بتصرف).
العلاقة الأولى :

$$P'_{AB} = \varphi_A P'_A + \varphi_B P'_B$$

بحيث:

- P'_{AB} : يعبر عن قطبية الوسط المتحرك الناشئ عن خليط من A و B.
- φ_A : يعبر عن النسبة المئوية للمذيب A.
- P'_A : يعبر عن معامل قطبية المذيب A النقي.
- φ_B : يعبر عن النسبة المئوية للمذيب B.
- P'_B : يعبر عن معامل قطبية المذيب B النقي.

¹ - مقدمة في التحليل الآلي , الفصل الثاني عشر , ص 23-25.

العلاقة الثانية :

وأما في عمليات الفصل التي تستخدم ال RPLC، فقد قام السيد Knox ببناء المعادلة التالية حيث وجد :

$$\text{Log } k'_2/k'_1 = (P'_2 - P'_1) / 2$$

- k'_1 : معامل السعة للمركب 1.
- k'_2 : معامل السعة للمركب 2.
- P'_1 : معامل قطبية المذيب 1 النقي.
- P'_2 : معامل قطبية المذيب 2 النقي .

III 3.2.4 أنظمة تدفق الطور المتحرك:

وهناك نوعان من الأنظمة المستعملة في جهاز HPLC، هما :

أ- **النظام الثابت isocratic elution**: وهو نظام أحادي المضخة غير مكلف قادر على ضخ مرحلة متحركة غير متغيرة¹. ففي هذه الطريقة يبقى الطور المتحرك نفسه نقياً أو مزيج بنفس النسبة من أول عملية الفصل إلى آخرها².

ب **النظام المتدرج gradient elution**: في هذه الطريقة يختلف تركيب ونسبة المزيج للطور المتحرك أثناء عملية الفصل بالتدرج بحسب خطة موضوعة ، وهذه الطريقة تستخدم للعينات التي تحتوي على مركبات مختلفة القطبية بحيث تزداد القوة القطبية للطور المتحرك كي يستطيع إخراج المكونات الأكثر حجراً على الطور الثابت³. وكما يسمح هذا النظام بفصل الخلائط المعقدة من المركبات التي لا يتم فصلها بشكل جيد في النظام الثابت (متساوي)⁴.

III 3.4 **العينة** : العينة تكون سائلة حتى يتم حقنها في الجهاز، أما إن كانت العينة صلبة فيتم حلها بلستعمال مذيبات مناسبة وفي الغالب تكون من المذيبات المستعملة في الطور المتحرك ، وعادة تحقن كمية 5-10 ميكرو لتر.

¹- Marvin c. McMaster , LC- MS(a practical user' s guide) , john wiley& sons ,Inc. publication , America , 2005 , pag14.

² - محاضرة طرق الفصل ، جامعة الشام الخاصة ، 2020، الفصل السابع ص 76.

³ - محاضرة طرق الفصل ، جامعة الشام الخاصة ، 2020، الفصل السابع ص 77.

⁴ - Marvin c. McMaster , LC-MS(a practical user' s guide) , john wiley& sons , Inc. publication , America , 2005 , pag 15.

III 5- أنواع كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي HPLC:

لـ HPLC أربعة تقنيات رئيسية هي (IEX،SES،NP،RP) ، وتختلف هذه التقنيات حسب نوع التفاعلات و القوى بحيث توجد ثلاث قوى أساسية هي القوى القطبية، القوى الايونية وقوى التشتت¹. وسنشرح كل تقنية بالتفصيل :

III 1.5 الطور العادي NP:

يعتبر الفصل في NP عملية تنافسية، بحيث تتنافس جزيئات العينة مع جزيئات الطور المتحرك على مواقع الإمتزاز الموجودة على سطح الطور الثابت. فكلما كانت تفاعلات الطور المتحرك أقوى مع طور الثابت،أنخفض الفرق التفاعلات بين الطورالثابت وجزيئات العينة ،وبالتالي ينخفض الإحتفاظ بمركبات العينة. وتعتمد الأطوار المتنقلة في NP على المذيبات غير القطبية مثل الهكسان والهيبتان وما إلى ذلك وعادة ما تكون مواد التعبئة المستخدمة عبارة عن أكاسيد مسامية مثل(SiO)،(Al O). ويمكن أيضا إستعمالا لأطوار الثابتة المعدلة كيميائيا².

III 2.5 الطور العكوس RP:

عكس الطور العادي بحيث تنعكس ال أطوار المتحركة والثابتة. يستخدم RP قوى التشتت بشكل أساسي(تفاعلات كارهة للماء أو فان دير فال) ، يعد أكثر الأنماط شيوعا لأن لها القدرة على تمييز بين المركبات وسهولة تنويع الإستبقاء وكذا الإنتقائية³.

III 3.5 التبادل الأيوني IEX:

تعتمد على التقاربات المختلفة للأيونات التحليلية وللمراكز الأيونية ذات الشحنة المعاكسة في الراتنج أو في المرحلة الثابتة الكارهة للماء. ويعتبر الستايرين-ديفينيل بنزين هو المادة النموذجية لراتنج التبادل

¹- Yuri Kazakevich and Rosario LoBrutto , HPLC for Pharmaceutical scientists , John wiley& sons , Inc. publication , America, 2007, pag10.

² - Yuri Kazakevich and Rosario LoBrutto , HPLC for Pharmaceutical scientists, John wiley& sons .Inc. publication , America , 2007, pag10.

³ - Yuri Kazakevich and Rosario LoBrutto , HPLC for Pharmaceutical scientists, John wiley& sons .Inc. publication , America , 2007,pag11.

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

الايوني. وأما بالنسبة للأطوار المتحركة فيستعمل المحاليل المائية أو خليط من المذيبات (ماء - ميثانول) من أجل تحسين الشطف¹ (بتصرف).

III 4.5 الاستبعاد الحجمي SEC:

تتم عملية فصل لمكونات العينة بناء على حجم الجزيئات ، وليست قطبيتها أو أي خاصية أخرى. ولها أيضا أسماء أخرى مثل كروماتوغرافيا التخلل GPC و كروماتوغرافيا الترشيح GFC، وتستخدم هذه التقنية بشكل واسع لفصل المركبات كبيرة الحجم . بحيث أن الجزيئات الكبيرة تغادر العمود بشكل أسرع بينما تقضي الجزيئات الصغيرة وقتاً أطول في العمود².

III 6- العوامل المؤثرة :

III 1.6- العوامل المؤثرة على الكفاءة :

من العلاقة $N = L/H$ فإن

- الكفاءة تزداد بزيادة طول العمود، كما تزداد أيضاً عندما تقل قيمة H^3 .

III 2.6 العوامل المؤثرة على قدرة الفصل : تتأثر قدرة الفصل على ثلاث عوامل أساسية هي⁴:

- الكفاءة (N): وهي عدد الطبقات النظرية ولقد تطرقنا إلى تأثيرها في الفقرة السابقة.

- الاختيارية : والتي يجب أن تكون أكبر من الواحد.

- معامل السعة K' : وهو يعبر عن زمن مكوث المركب داخل عمود الفصل.

ومن خلال هذه العوامل تم التوصل إلى العلاقة التالية :

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

¹- Francis Rouessac. et. ol, Analyse chimique ,dunod, 8é, pag 97.

² - مقدمة في التحليل الآلي , الفصل الثاني عشر , ص 27.

³ - مقدمة في التحليل الآلي, الفصل الثاني عشر, ص 17.

⁴ -HPLC Principe et appareillage (Ressources pédagogique et –Biochimie Biomoléculaire) , Academie de Rouen- tousdroitreseresmercdin 20/1/2010, <http://biotecl.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9> ,pag9.

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

III 3.6 - تأثير طول السلسلة الهيدروكربونية: تؤثر السلسلة الهيدروكربونية على أداء العمود بحيث¹:

- يزداد زمن المكوث بزيادة طول السلسلة الهيدروكربونية للطور الثابت.
- تقل الكفاءة بزيادة طول السلسلة الهيدروكربونية.

III 4.6 - تأثير درجة الحموضة PH:

تؤثر درجة حموضة وسط المتحرك على الطور الثابت الذي يحوي Si-O-C- القابلة إلى الذوبان في الأوساط الحامضية والقاعدية لذا يجب اختيار أوساط متحركة ذات درجة حموضة ما بين 3 و 9².

III 7- أبرز المعوقات في التحليل :

ومن أبرز المعوقات التي تصادفنا في التحليل هو اتساع منحنى الإشارة وتتمثل أسبابه في نوعين هما:

III 1.7 - أسباب تتعلق ببناء وتركيبه العمود: ومن بين الأسباب نجد :

- تأثير المسارات المتعددة : تسلك جزيئات المذاب مسارات مختلفة , وبالتالي فإن أزمنة المكوث تختلف من جزيء إلى آخر ، ما ينتج عنه ظاهرة الانتشار والتي بدورها تعتمد على حجم الجسيمات و إنتظام الحشوة العمود³ .
- الانتشار الطولي (تم ذكرها في فصل العموميات).
- مقاومة الجزيئات (تم ذكرها في فصل العموميات).

III 2.7- أسباب لا تتعلق بالعمود :ومن أهم الأسباب نجد⁴:

- الحجوم الضائعة نتيجة التوصيلات : تنشأ بسبب استخدام توصيلات مصنعة من شركات مختلفة ، التي تؤدي إلى فراغات فينتج عنها زيادة انتشار المادة المفصولة .

¹- Ahmad Aqellfseisi , High performance liquid chromatography , part5 , Ahmad Aqel 15/04/2021.youtube channel: <https://www.youtube.com/user/MrAhmadaqel>

²- د. منذر سليم عبد اللطيف , مقدمة في التحليل الآلي , الفصل الثاني عشر , ص 19.

³- HPLC principe et appareillage (Ressources pédagogiques- Biochimie et Biomoléculaire) , Academie de Rouen- Tous droits réservés , 20/01/2010, pag5.

⁴- د. منذر سليم عبد اللطيف , مقدمة في التحليل الآلي , الفصل الثاني عشر , ص 20-22.

الفصل الثالث: كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي المقترن بالمطياف الكتلي

- الانتشار الناشئ عن طول وقطر الأنابيب المستخدمة في التوصيلات المختلفة.
- حجم خلية المكشاف: يجب أن يكون حجم خلية المكشاف صغير جدا ، ويشترط أن يكون ما بين (2- 10 ميكرو لتر).
- حجم المادة المحقونة: من البديهي أنه كلما زاد حجم المادة المحقونة في العمود ، كلما زاد الحجم الذي تشغله من العمود. وبالتالي يزداد اتساع منحنى الإشارة .

III 8-الحلول لبعض المعوقات :

- استخدام توصيلات مصنعة من نفس الشركة .
- استخدام أقل حجم متوفر من الخلية المكشاف.
- حقن أقل حجم ممكن من العينة المراد فصلها.
- استخدام الحدى الأدنى من طول انابيب التوصيل و ذات أقطار صغيرة .

III 9- تطبيقات HPLC/MS:

تستعمل تقنية في عدة مجالات من بينها :

- التطبيقات الصيدلانية: كالكشف عن benzodiazepines
- تطبيقات البيوكيميائية: التعرف على البروتين
- تطبيقات الغذائية: التعرف على السموم الفطرية في الغذاء ، تحديد الفيتامين
- تطبيقات البيئية: كشف عن المستويات المنخفضة من carbaryl في الغذاء
- تطبيقات الطب الشرعي : كالكشف عن المواد غير المشروعة ، المواد سامة .
- التطبيقات السريرية : كشف عن حساسية العالية من thioridazine و trimipramine .

الختامة

من خلال البحث الذي قمنا به نستنتج مايلي:

بالنسبة ل GC-MS:

- في الكروماتوغرافيا الغاز المتصل بمطياف الكتلة GC-MS يستعمل الغاز كطور متحرك حيث الطور المتحرك عبارة عن غاز واحد عالي النقاوة .
- يتم إجراء عملية الفصل GC-MS في درجات حرارة مرتفعة يمكن الاحتفاظ بها عند قيمة ثابتة (متساوية الحرارة) أو متغيرة وفقا لما يقرره برنامج درجة الحرارة GC-MS .
- يتم إجراء عملية الفصل بشكل اساسي على مركبات تتراوح في أوزان جزيئية تصل الى بضع مئات ، تنفصل هذه المركبات عن الاختلافات في تطايرها (درجة التبخر) وتبقى مستقرة عند درجات حرارة عالية.
- تعتمد كروماتوغرافيا الغاز بشكل كبير على المبادئ المدمرة.
- تحليل GC-MS أقل تكلفة .

بالنسبة ل HPLC-MS:

- تستخدم لفصل المركبات البيولوجية والبوليمرات الاصطناعية و الطبيعية وكذلك الأحماض الامينية و الأدوية والمنشطات و التربينويدات و المبيدات الحشرية .
- تعتبر مناسبة لفصل المركبات الغير متطايرة.
- يعتمد الاحتفاظ بالمذابات في HPLC على تفاعلها مع كل من الطور المتحرك والثابت .
- أكثر مرونة من ناحية تحسين عمليات الفصل وتغيير الطور الثابت والمتحرك.
- من المعوقات الشائعة في HPLC اتساع منحنى الاشارة.
- متعددة الاستخدامات ودقيق للغاية عندما يتعلق الامر بتحديد وقياس المكونات الكيميائية.

وفي الأخير نأمل أن نكون قد أبرزنا أهمية جهازي HPLC-MS و CPG-MS في تحليل

العينات.

قائمة المصادر

والمراجع

المراجع العربية

1. أمل ناجي وادي, زينب محمد عبد الله, هادي كريم دحام, تطبيقات المواد البلورية السائلة في كروماتوغرافيا الغاز - السائل: مجلة جامعة النهرين/ المجلد 16 /العدد 2, دائرة بحوث المواد, وزارة العلوم والتكنولوجيا, بغداد - العراق ص 11.
2. أحمد سعيد محمود, الكروماتوغرافيا وتطبيقاتها (الكروماتوغرافيا الغازية), من الموقع الإلكتروني: <http://www.researchgate.net> بتاريخ 2021/04/6.
3. أحمد بيروتي, تطوير حامل كروماتوغرافي من البيلون الحلبي المطعم بالأوكتان واستخدامه في التحليل الكروماتوغرافي الغازي, رسالة ماستر, جامعة حلب 2017.
4. روبرت بكسوك توماس كارنز, دونالد شيلدز ايان مكوليام, ترجمة " باسم محمد سعدي, مقداد عبد الستار مهدي", الطرائق الحديثة للتحليل الكيميائي: مكتبة المرشد, الطبعة الأولى, كروماتوغرافيا الغاز ص 127.
5. د. رضوان صدقي, الطرق الحديثة لتحليل الأحماض الأمينية وتقييم نوعية البروتين, المكتبة الأكاديمية القاهرة - مصر (2004), ص 68 - 69 .
6. سعود وهران منعم, كروماتوغرافيا الغاز:(جامعة الأنبار/ كلية العلوم/ قسم الكيمياء), ص 1.
7. سرحان علي سلمان, التحليل الآلي: المرحلة الرابعة, طباعة أنور عبد الوهاب خلف, (جمهورية العراق وزارة التعليم العالي والبحث العلمي/ جامعة تكريت/ كلية العلوم/ شعبة الإعلام), المحاضرة الثالثة في كروماتوغرافيا الغاز ص 3.
8. د. عوض عبد الحميد الحصادي, د. محمد مصباح عمر الفرجاني, مدخل إلى التحليل الكيميائي والكروماتوغرافي, دار الكتب الوطنية, بنغازي- ليبيا, الطبعة الأولى (2002), الصفحة 139-140.
9. علاوي مسعودة, محاضرة كروماتوغرافيا الغاز: كلية الرياضيات وعلوم المادة, جامعة قاصدي مرباح ورقلة 2019.
10. غدامسي.س - بن عامر.م, تقدير الفعالية المضادة للأكسدة للمركبات العضوية المكونة للزيوت الأساسية لبعض النباتات الطبية, مذكرة ماستر, قسم الكيمياء, كيمياء عضوية, كلية الرياضيات و علوم المادة, جامعة قاصدي مرباح ورقلة 2020, ص 91- 97 - 112 - 121.
11. فاتن شومان, الكيمياء التحليلية الصيدلانية 2 (طرق الفصل) لطلاب السنة الثانية صيدلة: جامعة الشام الخاصة, الجزء النظري 2020.

12. كتاب طرق الفصل الكيميائي (الكروماتوغرافيا): الفصل الثالث كروماتوغرافيا الغاز GC, ص 48.
13. منذر سليم عبد اللطيف, مبادئ التحليل الآلي, مكتبة الفيزياء كوم, 2018.
14. محمد يونس, الدليل المخبري في المعهد العالي لبحوث البيئة/ التجهيزات والأجهزة التحليلية الموجودة في المخبر 4/ جهاز كروماتوغرافيا الغازية مع كاشف طيف الكتلة, جامعة تشرين المعهد العالي لبحوث البيئة, التجهيزات والأجهزة التحليلية الموجودة في المخبر 4, جهاز كروماتوغرافيا الغازية مع كاشف طيف الكتلة, 1 حزيران 2014, اللاذقية سوريا.
15. <http://www.researchgate.net> بتاريخ 2021/05/5.
16. نديم المهنا, أمجد المدني, ثناء الحداد, تشخيص المتماكبات الأروماتية وتحديد البنية بالطرائق الطيفية, التشخيص باستعمال مطياف الكتلة مربوط بكروماتوغرافيا غازية GC-MS: مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية/ المجلد 30/ العدد الثاني, قسم الكيمياء, كلية العلوم, جامعة دمشق, سورية, 2014, ص 46 - 47.
17. منذر سليم عبد اللطيف, مبادئ التحليل الآلي, قسم الكيمياء, الجامعة الإسلامية بغزة عام 2017.

المراجع الأجنبية

1. Ankurchoudhory , princiuple of HPLC (liquid chromatography)
انظر الرابط <http://www.pharmaceuti cd guidelines.com>, 21/05/2021,
2. Ahmad Aqallfseisi, High performance liquid chromatography, youtube channel: <https://www.youtube.com/uer/MrAhmadaqel>. 15/04/2021
3. Achillecappiello , Advances in LC-MS instrumetation , Elsevier , First edition ,Netherlands , 2007,pag 28-29.
4. Analytics-shop, Selection of a suitable HPLC colum,04/04/2021
<http://www.analytics-shop.com>
5. Celuia Henry Amaud, 50years of HPLC, C&EN , America chemical Society13/07/2016, <http://www.C&EN.com>, 01/03/2021.
6. Francis Rouessac , Annick Rouessac , Avec Daniel Cruché , Claire Duverger-Arfuso, Arnaud Martel , Analyse Chimique (Méthodes et techniques instrumentales) , 8^eédition , Paris ,dound , (1998,2000, 2009 , 2006) ,pag 69-99.
7. Gas Chromatography - Mass Spectrometry : <http://www.gmu.edu>

8. Introduction à la Chromatographie, Université de Paris, PARIS 7 UFR de Chimie, Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG), page 20.
9. LLOYD Snyder, Joseph J. Kirkland, Joseph L. Glajch, Practical HPLC method development , second edition, John Wiley & Sons, Inc. , USA 1997, chapter 3.
10. Michel Martin, Gilbert Ble, Claude Eon, Georges Guiochon, The use of syringe-type pumps in liquid chromatography in order to achieve a constant flow-rate , Journal of chromatography, 112, Laboratoire de chimie analytique physique , École polytechnique, Route de Saclay, 91120 Palaiseau-France, 2001, page 399.
11. Miao et al , Applications of HPLC/MS in the analysis of Traditional Chinese medicine, school of medicine, china , volume 1, Issue 2, 2011, page 81-91.
12. Marvin C. McMaster , LC- MS (a practical user's guide) , John Wiley & Sons Inc. publication , America , 2005 , page 14.
13. Marie-Paule Bassez, Chromatographie en phase gazeuse: page 16.
- Pr. M.N. BENNANI, Techniques d'Analyses Chromatographiques, Formes des pics en chromatographie, Université Moulay-ismail Faculté des sciences-Mecknés Département de chimie, page 12.
14. Pr. MECHABAR Rachid: la chromatographie page 14.
15. Robert E. Ardrey , Liquid chromatography-Mass spectrometry: an introduction John Wiley & Sons, Ltd, in England , 2003, page 33-141.
16. Ronald E. Majors, HPLC column technology the first 50 years, Lab compare , 28/09/2018, <http://www.Lapcompare.com>
17. Satinder Ahuja , Michael W. Dong, Handbook of Pharmaceutical analysis by HPLC, Elsevier Academic, United Kingdom, first edition, 2005, page 95-98.
18. Shashank Gorityala , David, Michael W. Dog, Bioanalysis of small-molecule drugs and metabolites in physiological samples by LC-MS: part 1 LCGC North America , 2021, volume 39, Issue 06 , page 263-271.
19. Spectrometry Book home: latest MS full chapter. Doc, Spectrometry Work Book page 1.
20. Waters (the science of what's possible), Beginner's Guide to UPLC 30/04/202 <http://www.waters.com> .
21. Yuri Kazakevich and Rosario LoBrutto , HPLC for Pharmaceutical scientists John Wiley & Sons , Inc. publication , America, 2007, page 10.

22. Y.FRACONS, Licence Professionnelle Industries Chimiques et Pharmaceutiques, Chromato-graphie en Phase Gazeuse CPG: Aspect théorique.