كروموتوغرافيا الورق (Paper Chromatography (PC

تستخدم هذه التقنية في التعرف على المواد المفصولة وكذلك دراسة سرعة التفاعلات الكيمياوية . حيث تستخدم الورقة كمادة داعمة ونظرا لاحتواء الورقة على (2-5%) رطوبة فهذه الكمية من الرطوبة تمثل الطور الثابت. ولكون الورقة مسامية فالفصل يكون متجانس وسريع ولا يستغرق وقتاً طويلاً وكذلك يمكن قص البقع الظاهرة عليها بسهولة لإنجاز تحليلات إضافية أخرى باستخدام كروموتوغرافيا الغاز مثلاً .

أساس الفصل:

يسمى كروموتوغرافيا الورق بال paper partition chrom لأنه اساس لتوزيع المركبات بين الطور السائل المتحرك والطور الثابت (الماء) الموجود في المادة السليلوزية (الورقة).

الكروماتوغرافيا الورقية:-

هذا النوع من الكروماتوغرافيا يتم الفصل للمركبات باستخدام طورين هما:

1- الطور المتحرك (Mobile phase) ويكون مادة سائلة عادة

2- الطور الساكن (Stationary phase) ويكون في الغالب سائل أيضاً محمول على الألياف السليلوزية للورقة , لذلك يطلق عليها أسم كروماتوغرافيا الورق .

أقسام الكروماتوغرافيا الورقية:-

تنقسم هذه الطريقة إلى قسمين حسب اتجاه سريان المذيب على الورقة إلى :

أ- الطريقة التصاعدية Ascending حيث يتجة سريان المذيب من أسفل إلى اعلي

ب- الطريقة التنازلية Descending حيث يتجة سريان المذيب من أعلى إلى أسفل الورقة

أساسيات الكروماتوغرافيا الورقية

1- تفصل مكونات المخاليط على أساس اختلاف معامل التوزيع.

2- يكون الوسط المتحرك إما مذيب واحد أو خليط من المذيبات.

3- تستعمل أشرطة ورق كروماتوكرافيا.

4- يتحرك الوسط الثابت خلال الوسط المتحرك بإحدى الطرق التالية :

أ-الخاصيه الشعريه من مركز الدائره إلى محيطها.

ب- الجاذبيه الأرضيه

يسمى الشكل الناتج بعد ترك الورقة لتجف كروماتوجرام. تسمى المسافه التي يقطعها المكون.(Rf) معامل الاعاقه

أنواع الورق المستخدم في الكروماتوغرافيا الورقية

1. الأوراق المشبعة بالمحاليل العضوية .
2. أوراق التبادل الأيوني.
3. أوراق كارهة للماء.
4. Whatman No.1 هذا النوع standard paper ويستخدم لفصل الحوامض الأمينه والسكريات

أختيار المذيب Choice of solvent

أن أختيار المذيب يعتمد على **معامل التوزيع** للمركبات بين مذيبات الطور المتحرك والثابت والمستعمل في التحليل. وعلى الباحث أجراء تجارب تمهيديه للتوصل الى معرفة المذيبات المناسبة. وأعلاها قطبيه هو الماء أما أوطأها قطبيه هو زيت البارفين. والمركبات التالية أذابتها 100% في الماء

1. كحول البيوتانول المشبع بحامض الهيدروكلوريك .
2. استيل أسيتون المشبع بالماء .
3. حامض الخليك الثلجي الحاوي على (5%) من كحول الميثانول
4. اثيل - مثيل كيتون .
5. كحول الميثانول .

أما المذيبات ألاخرى فتختلف درجة ذوبانها بالماء n-butyl acetale 0.5% , Phenol 6.7% Hexane 0.01%

ويمكن أستخدام مخاليط لهذه المذيبات لانجاح عملية الكروموتوغرافي الورق فمثلا عند فصل الاحماض الأمينة والببتيدات والفيتامينات الذائبه بالماء والمضادات الحيويه والحوامض العضويه والفلافونات يمكن أستخدام مزيج من

n-butanol + Acetic acid + Water (4+1+5 v/v)

تشخيص المركبات المفصوله

عامل الإعاقة (**R_f**) ويستفاد من تقنية كروماتوغرافيا الورق في تشخيص المركبات العضوية فقط , حيث يمكن معرفة قيمة عامل الإعاقة (R_f) للمركبات , ومن ثم مقارنته مع عامل الإعاقة للمركب القياسي (المعروف الهوية) فإذا تطابق كان المركب مماثل للمركب القياسي أي إن عامل الإعاقة(R_f) هو مقياس لسرعة حركة المكون نسبة إلى الطور المتحرك . ويتم قياس المسافة اعتبارا من خط الابتداء, أي من مركز البقعة.

$$R_f = \frac{D_{sample}}{D_{solvent}}$$

Distance تعني المسافه التي تقطعها العينة والمذيب

في عملية الفصل الكروماتوغرافي نضع قليلا من المخلوط الذي نود فحصه وذلك على الجزء الثابت, ومن ثم نضع هذا الجزء الثابت في سائل يكون عبارة الجزء المتحرك. حيث يقوم السائل بالسريان اخذا معه المخلوط . بطبيعة الحال ليست كل المواد ذات نفس سرعة الحركة على الجزء الثابت وذلك يرجع إلى عاملين اثنين رئيسيين:

1- ميل المادة إلى الالتصاق بالجزء الثابت.

2 - ميل المادة إلى الذوبان في الجزء المتحرك.

إذا لم تكن المادة قابلة للذوبان في الجزء المتحرك , أو إنها لا تلتصق بالجزء الثابت فإن عملية الفصل الكروماتوغرافي مستحيلة. وبما أن المخلوط المراد فحصه عبارة عن مواد ذات الفة كيماوية (ميل للالتصاق) مختلفة للجزء الثابت, وذات قدرة مختلفة على الذوبان في المذيبات المختلفة, فإن النتيجة تكون الفصل الفيزيائي بين المواد المكونة للمخلوط وذلك على سطح الجزء الثابت . وهكذا يمكن جمع المواد كل على حدة وفحص صفاتها وكمياتها.

خطوات العمل

1- يتم عمل خط بقلم الرصاص على ورق الترشيح على بعد 5 سم من حافة الورقة ثم ضع إشارات × على مسافات متساوية بعدد المحاليل المجهولة والتي يراد فصل مكوناتها مع كتابة اسم كل محلول أسفل هذه الإشارة
2- ارفع طرف الورقة من جهة الخط باستخدام ساق زجاجية مثلاً بحيث لا تلامس أي سطح أثناء وضع العينات عليها .

3- باستخدام ماصة (ميكروبيبيت) خذ 3 ميكروليتر من المحلول المجهول وضعه عند العلامة الخاصة به واتركها حتى تجف تماماً . كرر العملية عدة مرات لنفس المحلول مع وضع القطرات على نفس المكان .

4- كرر الخطوة الثالثة لبقية المحاليل الموجودة لديك مع التأكد من وضع كل محلول على العلامة الخاصة به . يمكن ثني الورقة على شكل اسطوانة ثم تدبيس أطرافها . بحيث يكون الخط المرسوم باتجاه الفتحة السفلى للأسطوانة .

5- ضع المذيب في الوعاء الزجاجي على ارتفاع 3 سم من قاع الوعاء ثم ضع ورقة الفصل بحيث تكون الجهة المرسوم عندها الخط مغموسة في السائل المذيب .

6- أغلق الوعاء واتركه لمدة 12 - 14 ساعة ثم أخرج الورقة وانزع الدبابيس عنها وعلم على المنطقة التي وصل إليها السائل .

7- اترك الورقة حتى تجف تماماً ثم رش الورقة بالمحلول المظهر بواسطة رشاش ثم ضع الورقة في فرن تجفيف عند 80 م لمدة 3 دقائق

تحديد مواقع البقع المفصولة على الورقة

بعداتمام عملية الفصل سيكون من السهولة تحديد المركبات الملونه ولكون اكثر المركبات البايلوجية غير ملونه فقد استخدمت عدة طرق فيزياوية و كيميائية .

طرق تحديد البقع

1. الفلورة

ان العديد من المركبات العضوية لها القدرة على امتصاص الاشعة فوق البنفسجية ذات الاطوال الموجية (240-260)نانومتر وبتالي يمكنها ان تشع طول موجي مرئي والذي يمكن من خلاله تحديد البقع المعتمه من خلال رسم حدود حول محيط تلك البقع .

2. النشاط الاشعاعي

بعض البقع المفصولة تحتوي على مركبات مشعة والتي يمكن الكشف عنها بسهولة بواسطة اجهزة تحسس اشعاعية مثل عداد كايكرمللر.

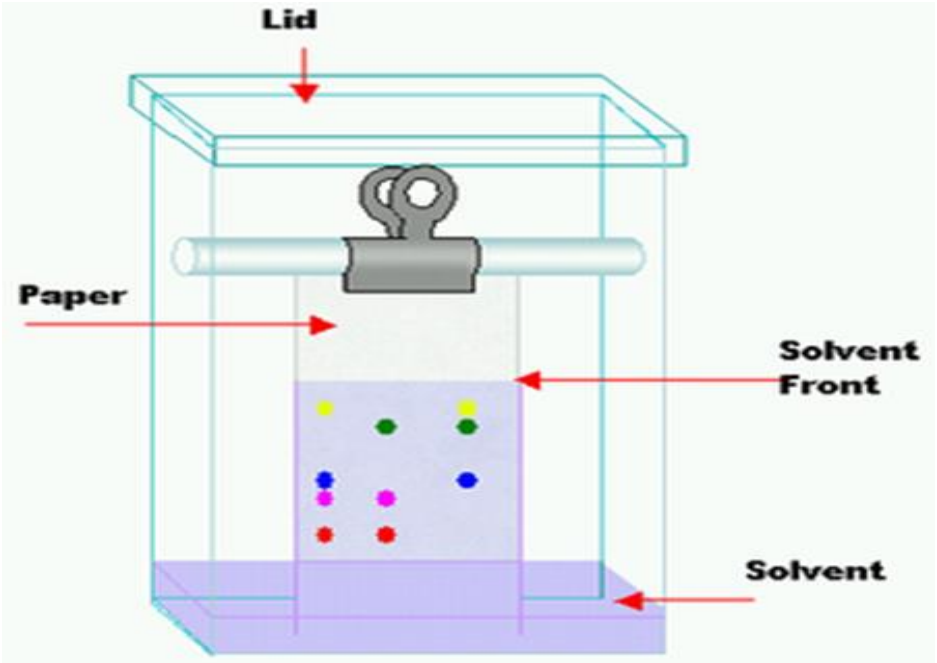
تتميز الطرق الفيزياوية بأنها لا تؤثر على المركبات المفصولة حيث تبقى كما هي دون ان تتحول الى مركب اخر .

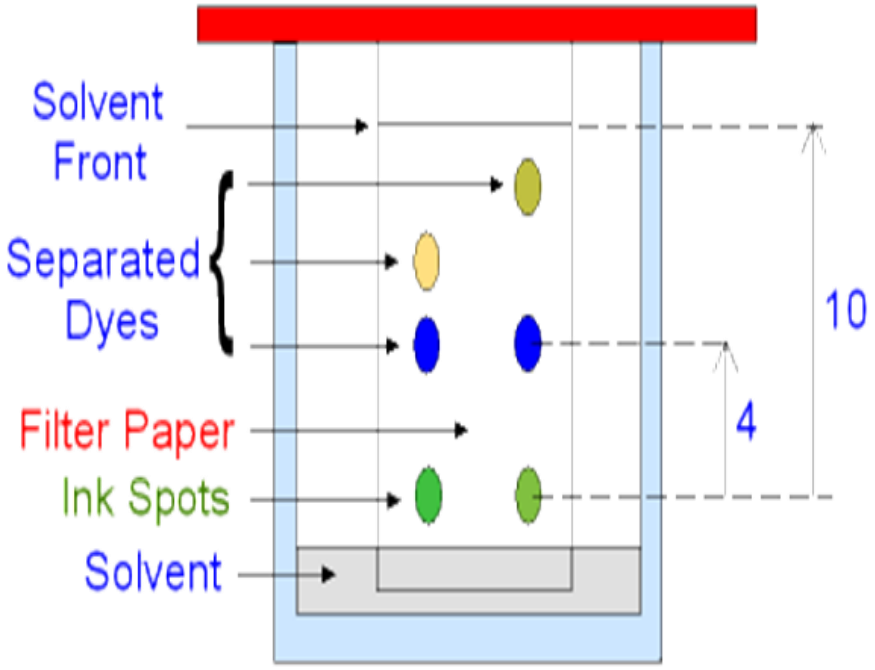
3. الطرق الكيمياوية:

وهي الاكثر شيوعاً حيث تتحول المركبات العديمة اللون على ورقة الكروموتوغرافي الى ونواتج ملونة عند رشها بكاشف من فوهة بخاخ .حيث يحدث تفاعل كيمياوي بين الكاشف والبقعة فيظهر لون مميز عن موقع وشكل البقعة . ومن الكواشف المستخدمة هي غاز كبريتيد الهيدروجين للكشف عن الايونات الفلزية و النهدرين وهو عبارة عن مادة بيضاء صلبة تذوب في مذيب مناسب كالاسيتون بتركيز 0.1- 0.25% وترش على الورقه حيث تستخدم للكشف عن مواقع الاحماض الامينية .

كما تستخدم نترات الفضة للكشف عن المواد المختزلة مثل الكلوكوز والمالتوز حيث تغمس الورقة في البداية في محلول قاعدي (NaOH 0.5 N) وبعد ذلك تغمس في محلول نترات الفضة حيث تختزل النترات على البقع المحتوية على السكر المختزل وتترسب الفضة معطية بقع قهوائية واضحه.

Paper chromatography




Solvent
Front
Separated
Dyes
Filter Paper
Ink Spots
Solvent
10
4