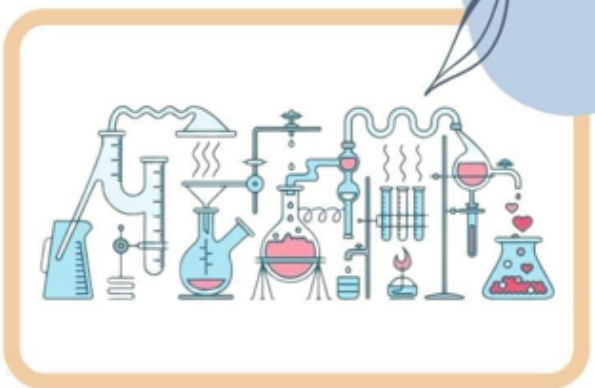
تفريغ تحليل آلي



اسم الموضوع: Chromatography (lec8+9)

إعداد الصيدلاني/ـة: Jeneen Alhasan

Soul Academy

لجان الدفعات

Chapter-26:

An Introduction to Chromatographic Separations

Introduction to Chromatography

Definition

Chromatography is a separation technique based on the different interactions of compounds with two phases, a *mobile phase* and a *stationary phase*, as the compounds travel through a supporting medium.

Components:

Mobile phase: a solvent that flows through the supporting medium

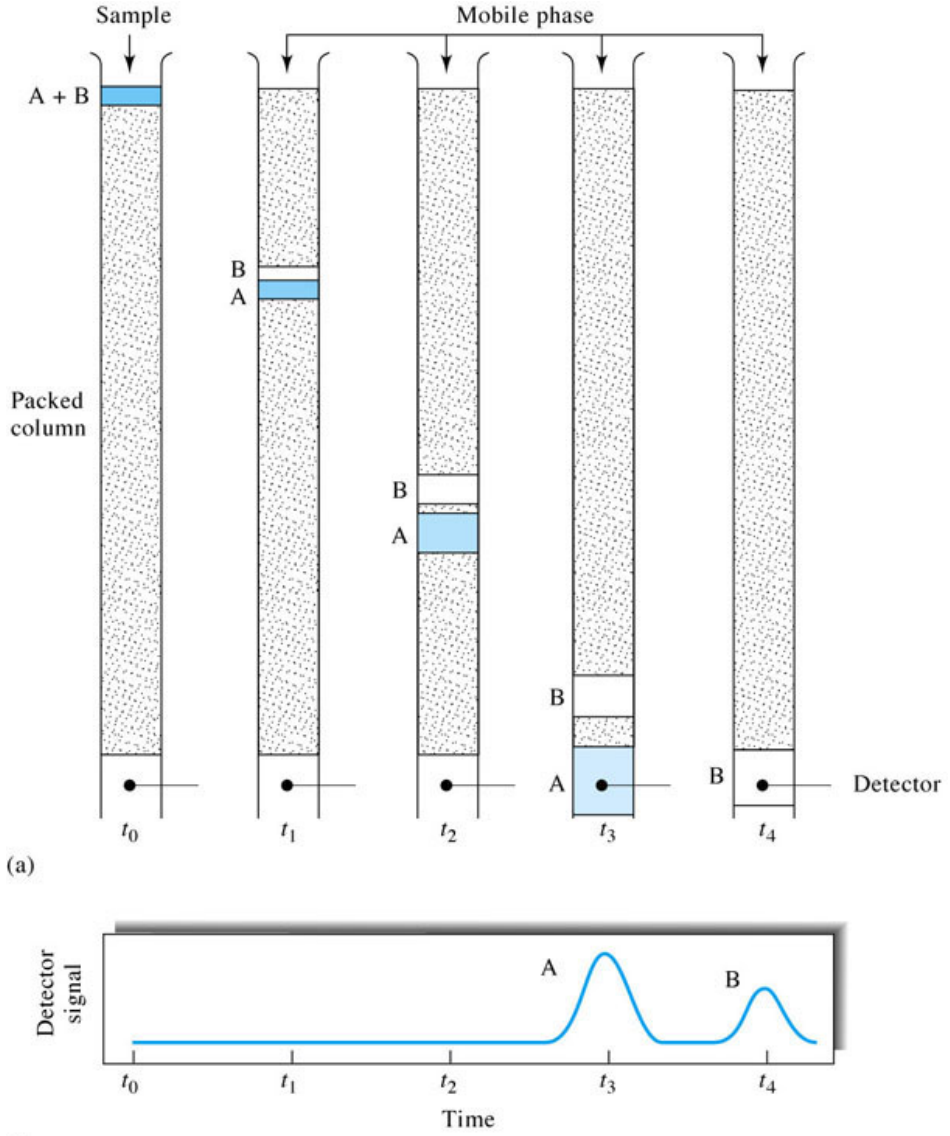
Stationary phase: a layer or coating on the supporting medium that interacts with the analytes

Supporting medium: a solid surface on which the stationary phase is bound or coated

Uses for Chromatography

Real-life examples of uses for chromatography:

- Pharmaceutical Company – determine amount of each chemical found in new product
- Hospital – detect blood or alcohol levels in a patient's blood stream
- Law Enforcement – to compare a sample found at a crime scene to samples from suspects
- Environmental Agency – determine the level of pollutants in the water supply
- Manufacturing Plant – to purify a chemical needed to make a product



The analytes interacting most strongly with the stationary phase (B) will take longer to pass through the system than those (A) with weaker interactions.

These interactions are usually chemical in nature, but in some cases physical interactions can also be used.

Types of Chromatography

1) The primary division of chromatographic techniques is based on the type of mobile phase used in the system:

Type of Chromatography	Type of Mobile Phase
Gas chromatography (GC)	gas
Liquid chromatograph (LC)	liquid

انا عندي stationary phase و mobile phase

الanalyte بعمل علاقة مختلفة بين الstationary و الmobile لذلك بصير عندي فصل

اذا كان الmobile phase غاز فالفصل بكون gas chromatography

اذا كان الliquid : mobile phase فالفصل بكون liquid chromatography

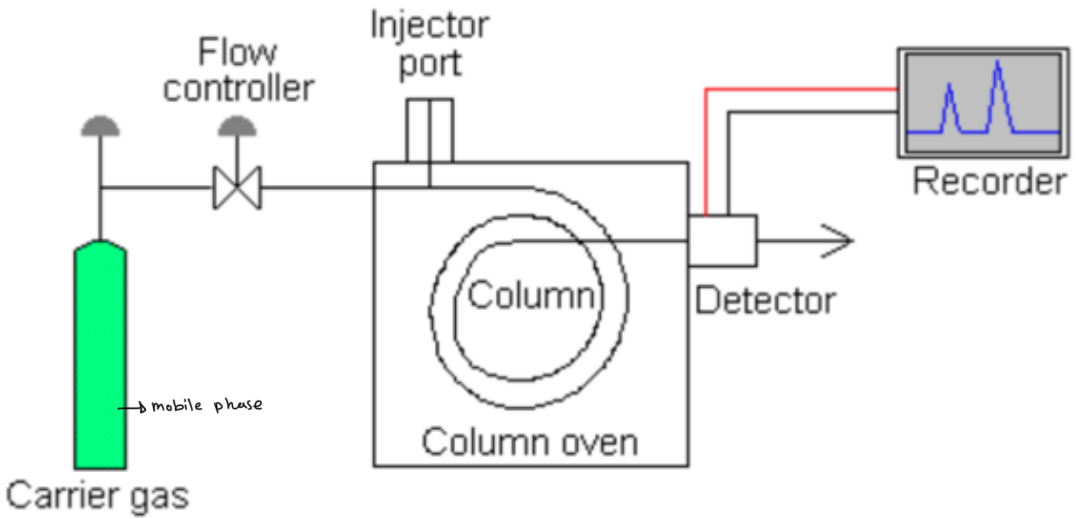
الHPLC هو liquid chromatography لأنه الliquid mobile phase

Types of Chromatography

2) Further divisions can be made based on the type of stationary phase used in the system:

Gas Chromatography (GC)

Name of GC Method	Type of Stationary Phase
Gas-solid chromatography	solid, underivatized support
Gas-liquid chromatography	liquid-coated support
Bonded-phase gas chromatography	chemically-derivatized support



Gas chromatography

- تصنيف الـ chromatography على اساس الـ Gas chromatography
  - الـ mobile phase هو الغاز و ممكن يكون نوع واحد او اكثر من نوع
  - الـ column عبارة عن capillary tube
    - ممكن يكون مفتوح من جوا او يكون مبطن و المبطن فيه على اطرافها pores تخليها مفتوحة
  - الـ analyte اللي بدي افصله لازم يكون volatile او gas و ما بقدر اخد solid و liquid (في حال كانت ما بتتطاير)
  - الـ mobile بجعل الـ sample و بدخلها على column
  - ابسط طريقة للفصل بال GC هو على اساس الـ total mass توضيح: ٣ اشخاص دخلوا للـ column و ماشين بسرعة و اتقل واحد بكون اله gravity اعلى ف رح يوصل للباب اولاً أما الخفيف رح يكون الـ gravity اقل فيوصل للباب اسرع
  - مثال:
    CH_4
    $CH_3CH_2CH_3$
    $(CH_3CH_2)_5CH_3$
    مين اللي رح يوصل أسرع او مين اللي بنشوفه بال detector اول اشي ؟
    ← اللي حجم اصغر اشي CH_4 لأنه عملية الجذب قليلة و وزنه خفيف ف رح يمشي بسرعة و يوصل الـ detector اسرع
  - مرات رح نضيف coated material تعيق حركة نوع من الركبات فممكن الاثقل يمشي اسرع
  - لو اثنين بالحجم size : برضه الـ CH_4 رح يمشي اسرع
  - ① Gas-solid chromatography
    - المادة تكون اما microtube فتحوي ما فيها اشي (غاز) او تكون coated بـ solid و بسميه gas-solid أي انه stationary → solid و mobile → gas
  - ② Gas liquid chromatography
    - مرات منحط بدل الـ solid و مرات بحطها coated material بتسحب العينة
  - ③ bonded gas chromatography
    - يعني المادة solid بس فيها bond بتمسك الـ analyte اللي ماشية بال mobile phase
    CH_4
    CH_3CH_3
    ما عندهم فرق كبير بال weight فحتى اقدر اعطيهم نزيد المسافة توضيح: بس اجيب سيارتين وبخلوا ماشين بمسافة قصيرة فاللي ماشي بسرعة 80 و اللي ماشي 75 الـ 2 رح يكونوا قريبين من الوصول بس لو اعطيهم مسافة اكبر اللي ماشي 80 رح كتير عن الـ 75 بالسرعة
    طول الـ column بالعادة بكون 12 m و موجود في oven حتى ازيد السرعة او بزيّد حتى اقلل السرعة
  - نوع الغاز اللي بستخدمه بال mobile phase : O_2 , H_2 , He , N_2 و الأكثر استخدامًا هو الـ He و N_2

Liquid Chromatography (LC)

Name of LC Method	Type of Stationary Phase
Adsorption chromatography	solid, underivatized support
Partition chromatography	liquid-coated or derivatized support
Ion-exchange chromatography	support containing fixed charges
Size exclusion chromatography	porous support
Affinity chromatography	support with immobilized ligand

Liquid chromatography

← مثال عليه الـ HPLC

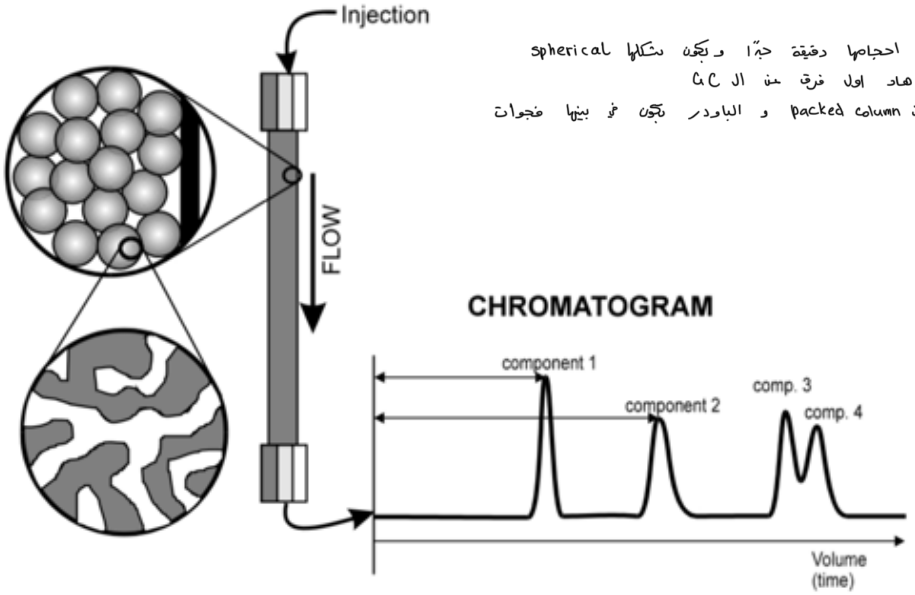
← المادة اللي بدي اضخها تتجمّع احجامها دقيقة جدًا و يتجمّع بشكلها spherical

← الـ mobile بتكون liquid و هاد اول فرق من الـ GC

← الـ Stationary بتجمّع عبارة عن packed column و الباودر بتجمّع في بينها فجوات

← تصنف الى:

1. Adsorption
2. partition
3. Ion exchange
4. size exclusion
5. Affinity



هاد السستم اسمه normal phase

المادة الsolid اما بتكون packed عشكل بودرة او بتكون coated زي الTLC

الstationary بكون polar عبارة عن SiO

Adsorption Chromatography

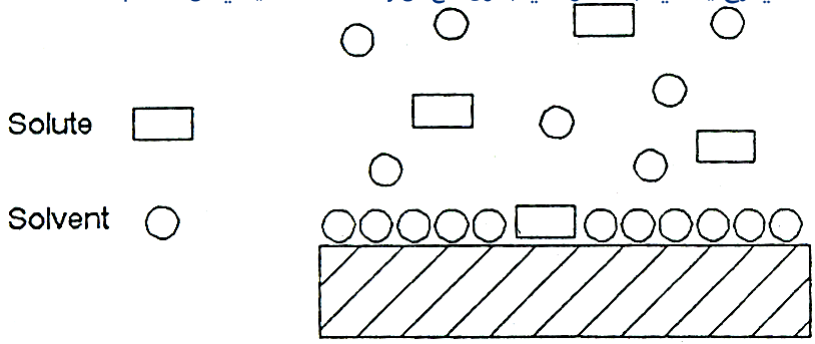
الmobile بكون non polar

العينة هي الsolute

الsolvent هو اللي بتحرك اما بصعد عالTLC او بدخل مع العينة عالcolumn

اللي رح يمشي ابطأ هو اللي بكون مع الstationary يعني الpolar

Separation based on their adsorption onto the surface of solid (stationary phase).



Normal phase-like separation

Nonpolar mobile phase for polar, non-ionic compounds

اذا كانت العينة فيها polar و non polar فالpolar رح يمسك عالسطح و يمشي ببطئ

الاقل polarity رح يكون مع الsolvent لأنه non polar و يمشي اسرع

Ex; Column chromatography TLC, HPLC

فالفصل هون ع اساس polar او non polar

CH_3CH_3 CH_3OH

اذا حكا السؤال انه في عندي normal phase chromatography و عندي 2 compounds مثلا ميثانول و ايثان ، مين اللي رح يخرج اسرع ؟
تقريبا همة قريبين كتير من ناحية الtotal mass بس الكحول polar و الايثان non polar فالايثان هو اللي رح يكون اسرع لأنه بحب يكون مع الmobile مش الstationary

هون ال polar و ال non polar انفصلوا

هون بفصل مركبات ال non polar

ال polar قريبين جدا لبعض او ال non polar قريبين جدا لبعض

Partition Chromatography

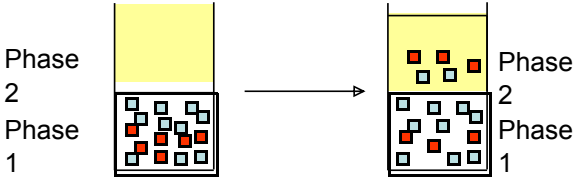
اذا كانوا المركبين non polar بكونوا متقاربين كتير و ما بقدر افكهم بال adsorption فبفكهم بال partition

كيف اصنف المركبات على اساس partition coeffecient؟ بجيب Cylinder . و بحط مي و octanol-1 .. الاوكتانول مش رح ينمزج مع المي و بطلع .. مثلا اخدت دوا ال diclofenac و ضفته عليهم و عملت تحليل by weight

Weight of octanol/weight of water

و حسبت log p من

Solute are separated based on their partition between a liquid mobile phase and a liquid stationary phase coated on a solid support.



Normal – analyte is nonpolar organic; stationary phase MORE polar than the mobile phase

Ex : TLC, Paper Chromatography

اذا كان الرقم اكبر من واحد فهو low polarity لأنه كل ما زدت log p بتقل ال polarity

مثلا المركبات السامة ، log p الها اعلى من ٤ و عشان هيك اذا تسمم شخص من مادة يا منحكي انه المادة مشعة او منحكي انه log p اربعة .. و هاي المادة بمتصها الجسم و بتدخل ال cell و ما بتطلع و بتتراكم جوا الخلية لحد ما يموت الشخص لانه المادة ال polarity الها قليلة

Reverse – analyte is polar organic; stationary phase LESS polar than the mobile phase

Ex : HPLC

المركبات اللي الها log p اعلى من واحد تصنف non polar و اللي اقل من واحد تصنف polar

بهاد السستم رح يتوزع بطبقة الاوكتانول و طبقة المي حسب ال polarity

هون بدي افصل مركبات الpolar

Ion Exchange Chromatography

لانه polar فواحد منهم شحنته + و واحد منهم شحنته - فبدي افصل ال- عن ال+ فبدخلهم بcolumn

في مادة جوا الcolumn بضيفلها acid و بحولها ل- و بضيف العينة اللي فيها شحنات - + .. اللي رح يطلع اول اشي هو - لانه بصير تنافر مع الشحنة - اللي بالcolumn و ال+ بضل .. بعد ما طلعت كل ال- بضيف base فبتحول الشحنة اللي بالcolumn ل+ فنتيجة التنافر رح تطلع الشحنات الموجبة و ينفصلوا

Use ionic stationary phase

ions separated on the basis of their tendency to displace counter ions adsorbed on stationary phase (Depends on charge, hydration, “solubility”

Used for analysis of aminoacids and its base pair.

Anionic stationary phases: used for cation separation

Cationic stationary phases : for anion separation for ionic compounds

- Ex : HPLC

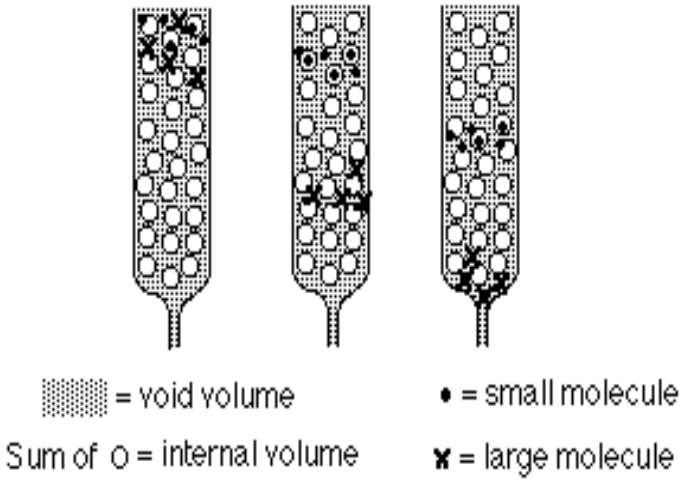
هون بفصل مادتين non polar او مادتين polar

Size Exclusion Chromatography

سواء مادة polar قريبين من بعض او non polar قريبين من بعض بقدر افصل اللي حجمهم كبير عن اللي حجمهم صغير

لازم تكون المادة عبارة عن باودر spherical و فيها pores

- Separation is a result of "trapping" of molecules in the pores of the packing material
- Very large molecules can't get into the pores – unretained
- Very small molecules get hung up in to pores for a long time - most retained – longest retention time
- stationary phase is a porous matrix
- Ex: GC, HPLC



من خلال الpores بمسك اللي حجمهم صغير و بطلع الكبير و حتى اطلع اللي حجمهم صغير بزيد ضغط الmobile phase و رح يطلعهم بسبب الضغط

Extremely expensive

Affinity chromatography

بكون في column و spacer و الR هو الspace

يستخدم لتحليل فيروس covid

اخدوا covid و هو كفيروس الغشاء تبعه بكون فيه تسلسل للDNA و بكون في فجوة فراحوا صمموا spacer مادة كيميائية بتنجذب للفيروس

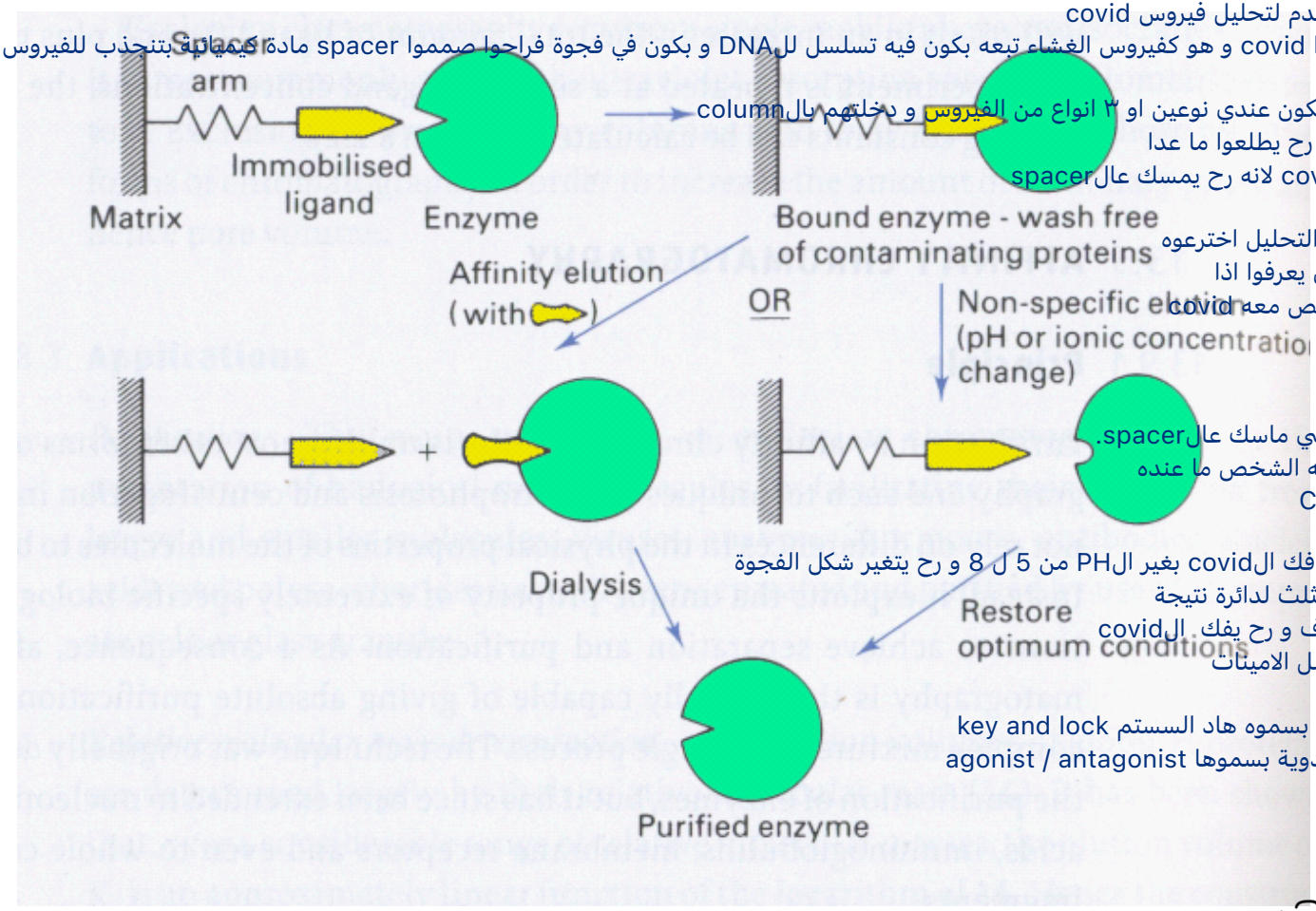
بس يكون عندي نوعين او ٣ انواع من الفيروس و دخلتهم بال column
كلهم رح يطلعوا ما عدا
الcovid لانه رح يمسك عال spacer

فهاد التحليل اخترعوه
عشان يعرفوا اذا
الشخص معه covid
او لا

اذا ما
في اشي ماسك عال spacer.
معناته الشخص ما عنده
Covid

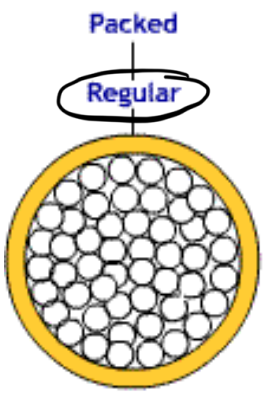
حتى افك الcovid بغير الPH من 5 ل 8 و رح يتغير شكل الفجوة
من مثلث لدائرة نتيجة
اختلاف و رح يفك الcovid
تسلسل الامينات

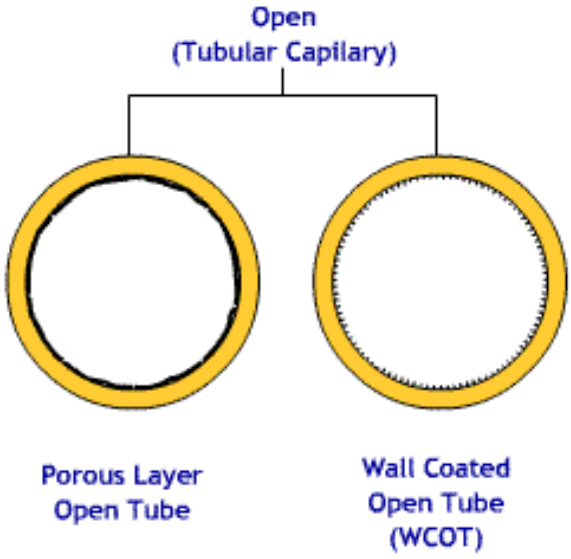
احيانا بسموه هاد السستم key and lock
و بالادوية بسموها agonist / antagonist



3) Chromatographic techniques may also be classified based on the type of support material used in the system:

Packed bed (column) chromatography ex: LC
Open tubular (capillary) chromatography ex: GC
Open bed (planar) chromatography ex: TLC





Some chromatography terms

Analyte العينة اللي بدي احللها

- Substance that is to be separated during chromatography

Immobilized phase بتكون stainless steel ما بتأثر بالمادة ولا بتتأثر بالcoat

- Stationary phase which is immobilized on the support particles or on the inner wall of the column tubing

Mobile phase

- Phase which moves in a definite direction. (liquid/gas/fluid).
- Consists of the sample being separated/ analyzed and the solvent that moves the sample through the column.

اول اشي رح يطلع من الcolumn هو الmobile phase بدون اي عينة لذلك بسميه effluent مهم رح يجي عليه سؤال

Effluent

- Mobile phase leaving the column.

Elution: is the process of removing analyte from stationary phase by mobile phase

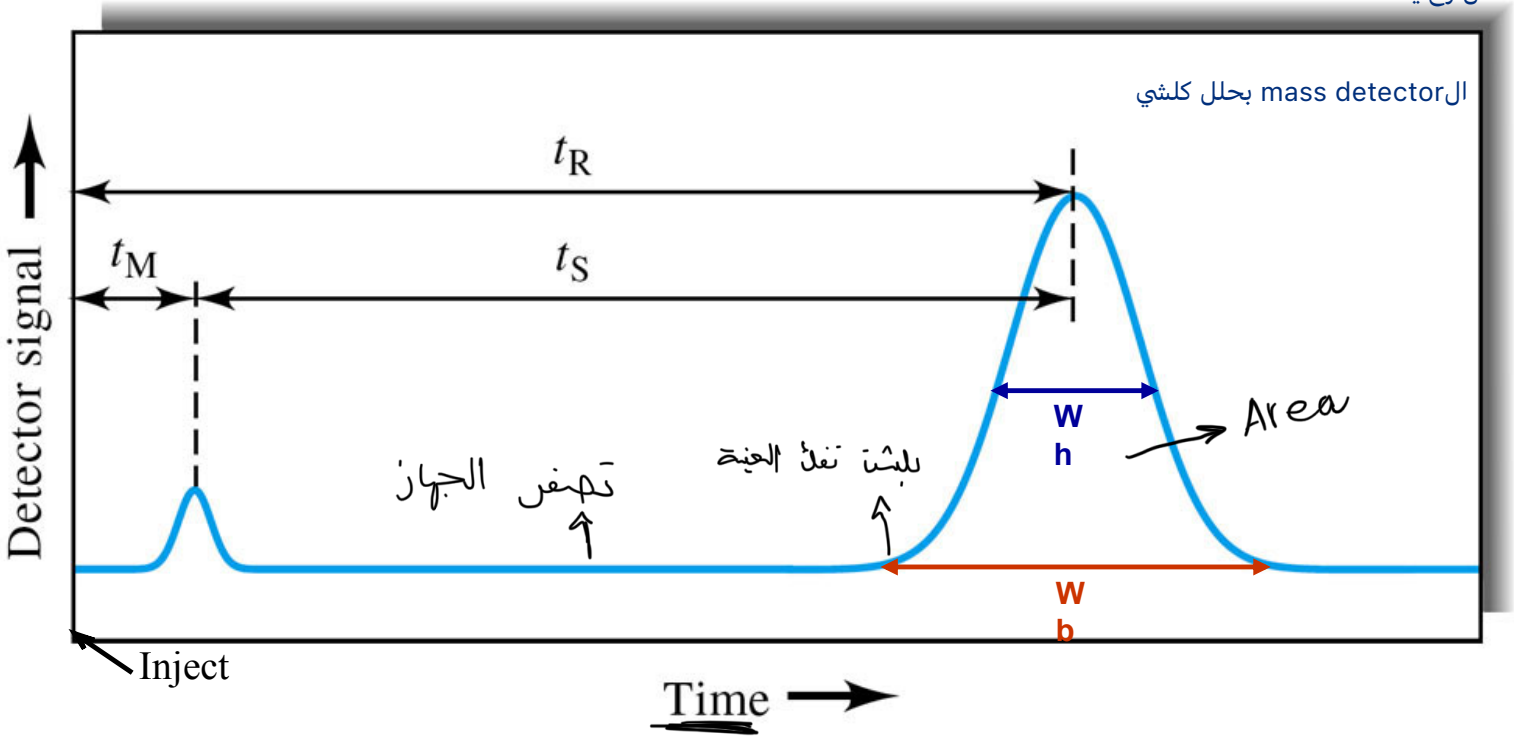
هاد السلايد مهم و رح يجي عليه اسئلة يعني احفظوا التعريفات

حسب نوع الdetectot
اذا كان UV-vis detector
و المركب ما فيه chromophore
مش رح يحلله

1) Typical response obtained by chromatography (i.e., a chromatogram):

chromatogram - concentration versus elution time

ال mass detector بحلل كلشي



Where:

tR = retention time *tS* = solute retention time

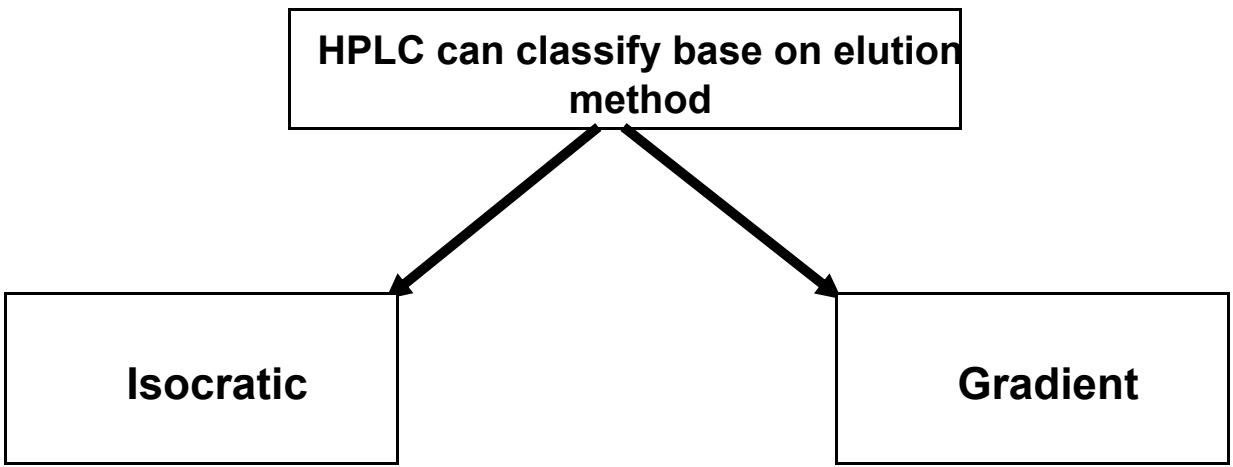
tM = void time for mobile phase اللي بهفس عليه الجهاز

Wb = baseline width of the peak in time units

Wh = half-height width of the peak in time units

High performance liquid chromatography

- HPLC is an extension of conventional liquid chromatography.
- Powerful tool in analytical techniques
- Columns are tightly packed, and the eluent is forced through the column under high pressure(up to 5,000 psi) by a pump.
- Allows to use a very smaller particle size for the column packing material which gives a much greater surface area for interactions between the stationary phase and the molecules flowing through it.
- Allows a much better separation of the components of the mixture.



اذا ٢ mobile phase او اكتر يعني استخدمت mixture و الاجهزة الحديثة ممكن توصل ل 8 solvent مختلفين .. اذا كانت نسبة الsolvents من بداية البرنامج لنهايته ثابتة يعني 50:50 او 10:90 او 20:80 يعني ثابتة طول البرنامج بغض النظر عن النسبة بسميه isocratic شو ما كان عدد الmobile يعني نوع واحد لأنه خلطتهم من بداية البرنامج و ضلهم ممزوجين لنهاية البرنامج

Liquid Chromatography: Adsorption chromatography

هاي المصطلحات مهمة و بيجي عليها بالامتحان

Isocratic

mobile phase solvent composition remains constant with time

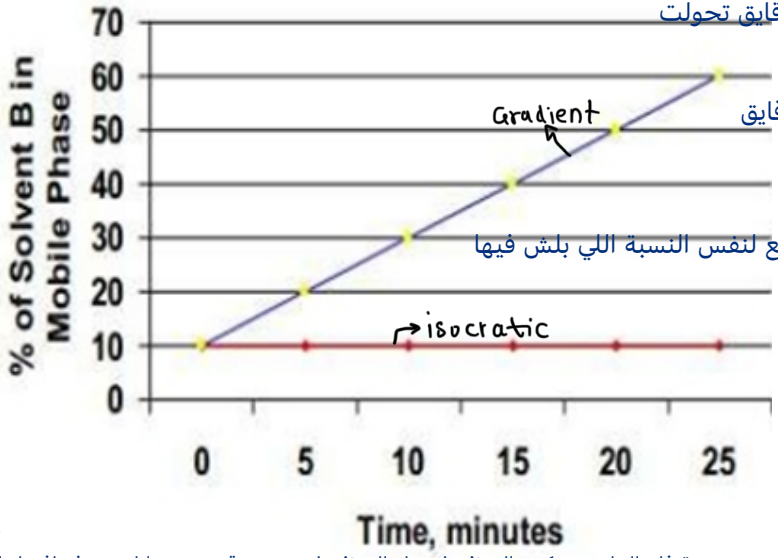
- Best for simple separations
- Often used in quality control applications that support and are in close proximity to a manufacturing process

Gradient

mobile phase solvent ("B") composition increases with time

- Best for the analysis of complex samples
- Often used in method development for unknown mixtures
- Linear gradients are most popular (for example, the "gradient" shown at right)

الgradient انه الmobile phase مع الوقت يتغير .. يعني مثلا
A 20
B 80
بعد ٣ دقايق تحولت
A 30
B 70
بعد ٥ دقايق
A 50
B 50
و بعد
فترة برجع لنفس النسبة اللي بلش فيها



تصنيف حسب صعوبة فك المادة و بتكون الpolarity او الnon polarity قريبين جدا لبعض ف افضل اشي اغير بالmobile phase polarity

الsolvents اللي بستخدمهم بالHPLC او ~~liquid chromatography~~ همة ٣ انواع
Water , methanol , acetonitrile

الpolarity للacetonitrile مش عالية

اذا كان في 20% methanol و 80% acetonitrile يعني المركب low polar يعني ما رح يفك الا ب low polar

الميثانول بستخدمه حتى افك polar organic hydrocarbon و الwater بستخدمه للorganic و الinorganic

المحدد ل اي type of chromatography بالliquid هو الstationary و الmobile

HPLC can be classified based on separation mode to

اذا كان الpolar : stationary ، الmobile رح يكون عكسه : non polar و هاد منسميه ..normal phas مثال بالTLC كان عنا aluminium layer مطلية coated ب silica SiO2 و هو الstationary phase و الmobile حطيناه بjar و سكرنا عليه و السولفنت كان dichloromethane Ch2Cl2

- **1- Normal Phase;** when the stationary phase is more polar than the mobile phase

و هو non polar و ممكن استخدام CCl4 لأنه non polar كمان

اذا بدي تحليل qualitative باخد الunknown و المتوقع انه urine لمريض و فيه دوا فبحلل و بعمل spot من الunknown عالTLC و بشوف مين من الstandard اللي حطيتهم جنب الunknown بعطيني نفس الارتفاع تبع الunknown

- **2- Reverse Phase;** when the mobile phase is more polar than the stationary phase

اذا كانت المركبات ملونة بقدر اشوفها بالvisible اما اذا كان ببين بالUV ما بقدر اشوفت بعيني و بحطه تحت الuv lamp و هيك عرفت نوع المركب و حللت qualitative و بالTLC ما بقدر احلل quantity

- **Reverse phase chromatography;** The silica gel is polar and to be used for the reverse phase separation, its polar surface has to be changed. This can be done by attaching different functional groups such as hydrocarbons mostly C-8 and C18 (none polar).

الquantity اكتر اشي بستخدمة بالHPLC

- As a result we create a none polar phase. This type is used more than the Normal Phase, and the reason why it is more popular is that its weak mobile phase is the high polar water, therefore, the samples are applied in this weak mobile phase i.e applied in aqueous status such as biological compounds

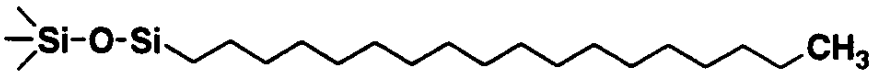
الreverse يعني عكس الnormal فالstationary رح يكون non polar و الsolvent رح يكون polar بعد الSi--SiO بتيجي C18 و بتربط عالسيليكا و بتخليها non polar

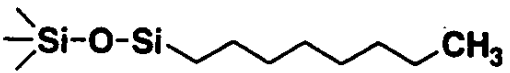
- This makes it especially attractive in clinical chemistry for drug confirmation, amino acid analysis and hormone separations.

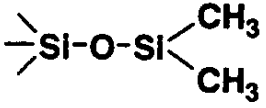
مركبات راكبة عليها اجزاء non polar فبتشتغل بالreverse

Common Reverse Phase (RP) Packings

المادة اللي بحطها بالعينة اذا كان normal phase هي SiO سيليكا و اذا كان reverse بكون SiO--hydrocarbons ممكن تكون طويلة C18 او قصيرة C8 و ممكن تكون dimethyl

Octadecyl - 

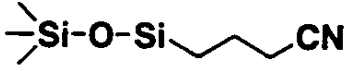
Octyl - 

Dimethyl - 

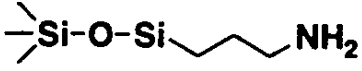
اذا بدي احلل مركب hydrophobic يعني log p فوق ال٢-٣
يعني non to low polar بستعمل C18 و C8 و dimethyl

يعني الpolar بحلله polar phase و الnon polar بحلله بالnon polar phase

NORMAL PHASE:

Cyanopropyl - 

بحللوا الpolar

Aminopropyl - 

هدول بتكون الpolarity الهم اعلى من المجموعات اللي فوق

High performance liquid chromatography بسبب الضغط اللي بتولد و بسبب تغير الموبايل مع الوقت

الhigh performance لأنه بعطي ضغط عالي للفصل

عدد الmobile phase بتوصل ل 8

الTLC بفرق عن الHPLC انه ال٢ liquid chromatography بس الTLC مش عالي الكفاءة (high performance) و ما بكون في اي ضغط و اذا تشابهوا المركبين بالpolarity ما بقدر افصلهم بالTLC

HPLC Technique

لأنه بستخدم solvent واحد و ما بستخدم اي physical forces

الفرق بين الHPLC و الGC هو نوع الmobile phase ليكويد او غاز

- Utilizes liquid mobile phase to separate the mixture
- Analytes are first dissolved in a solvent then through the column under high pressure of up to 400 atm
- Mixture is resolved into its components in the column
- The total separation time is often 5 or 10 minutes rather than hours or even days required for some separations by gravity flow with the larger systems.

الHPLC و الGC ال٢ فيهم oven بس الGC بوصل 100c و الHPLC بوصل 50c

الcolumn بالHPLC بوصل طوله من 5 الى 15 cm بس الGC بوصل 12meter

Liquid chromatography
Mobile phase : solvent

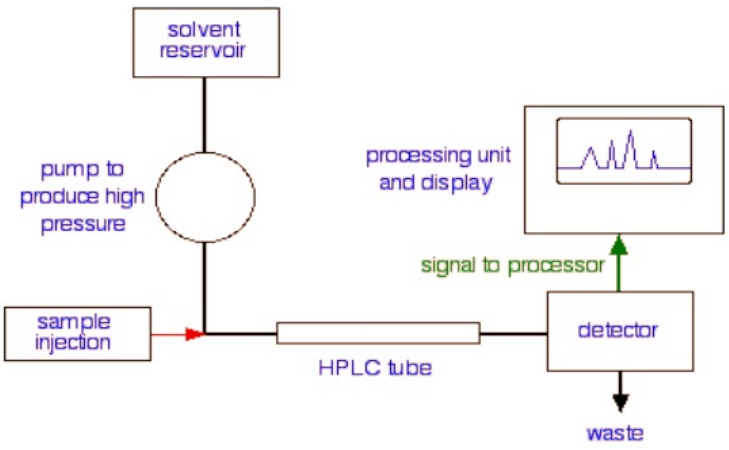
Qualitative + quantitativeمهم رح يجي عليه سؤال

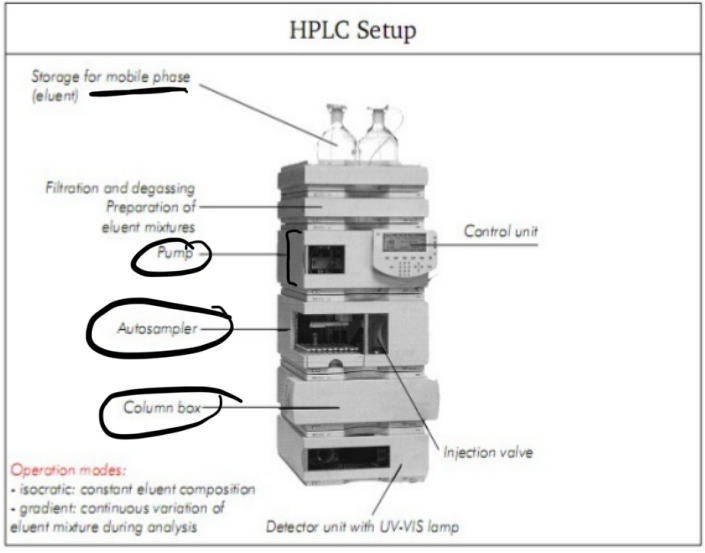
Components of HPLC

العينة ما بصير فيها و بتدخل الcolumn و بتنفصل و بتطلع
يعني non destructive analysis

- Pump
- Injector
- Column
- Detector
- Recorder or data system

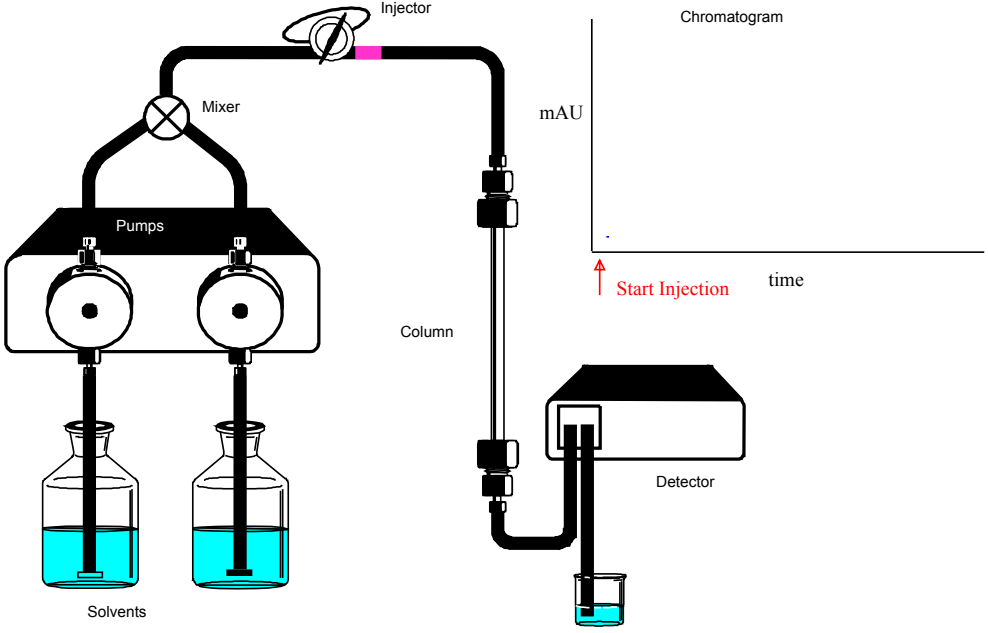
A Flow Scheme for HPLC





لو معطيني السؤال log p للمركبات
1.9
3.8
6.5
و الmobile phase ميثانول و الstationary
هو C18 ف اول واحد بطلع هو اللي اله اقل log p لأنه الpolarity اعلى بس اذا استخدمت non polar compound ف اول مركب رح يخرج هو
الnon polar لأنه بستخدم non polar mobile phase اللي هو الacetonitrile و الحل كله هون حسب جهاز الHPLC

Separations

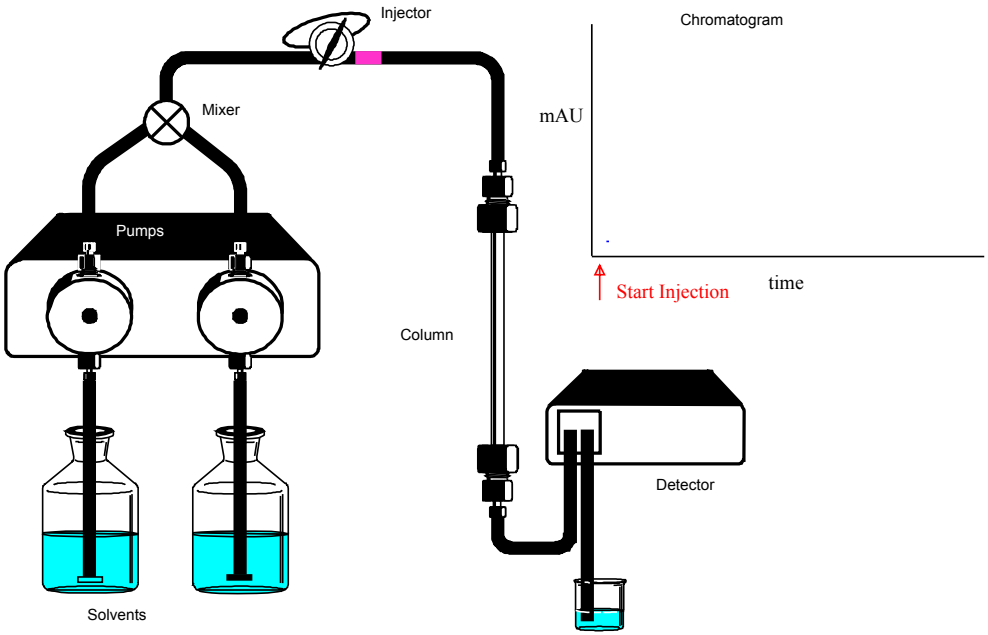


High Performance Liquid Chromatograph

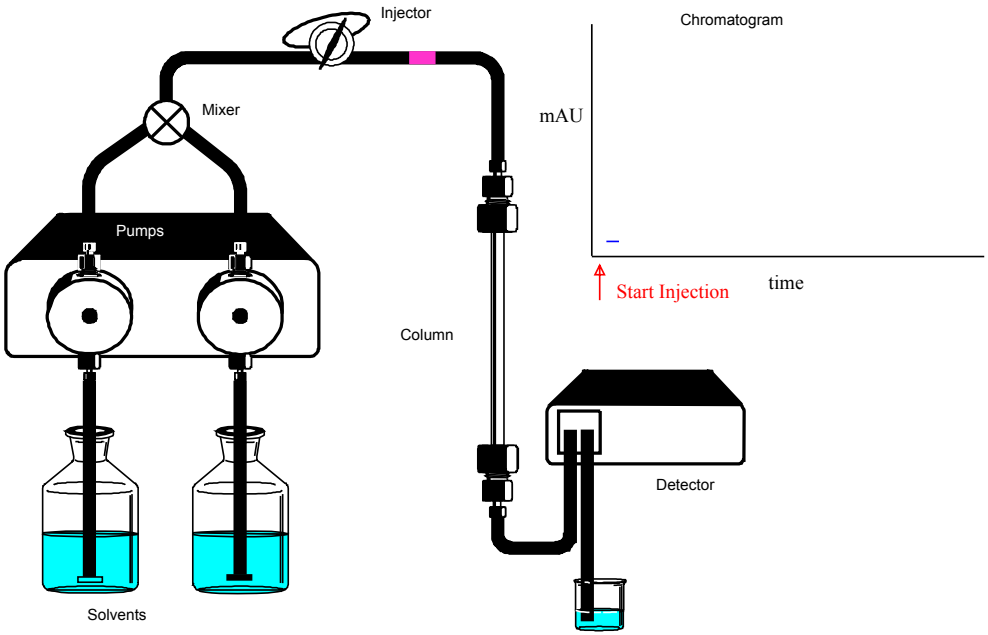
20 80
acetonitrile : methanol اذا عندي مركبين polar و بدي افكهم بستخدم

80 20
acetonitrile : methanol اذا كان non polar بستخدم

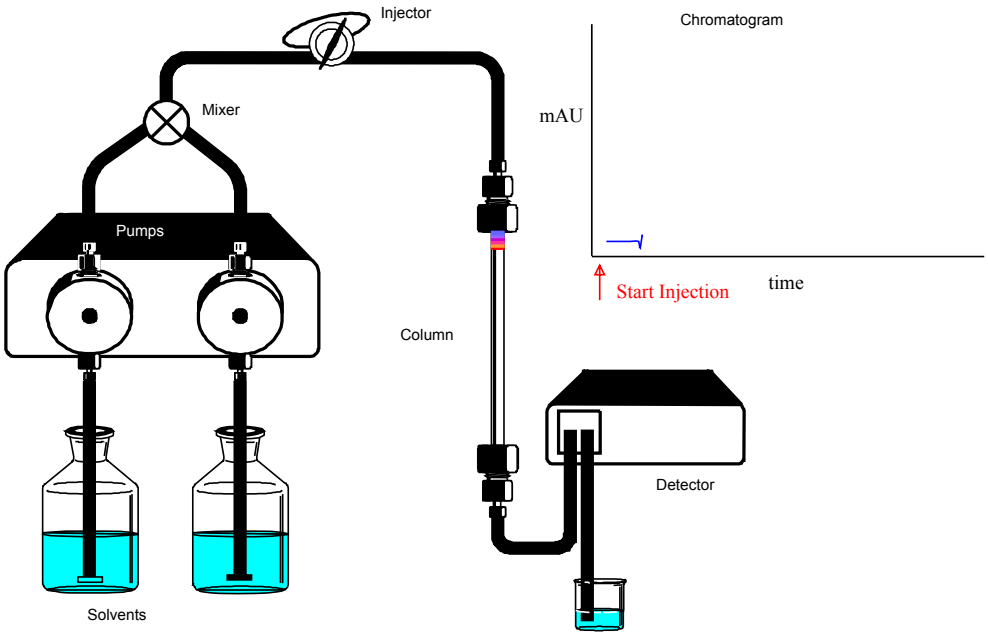
Separations



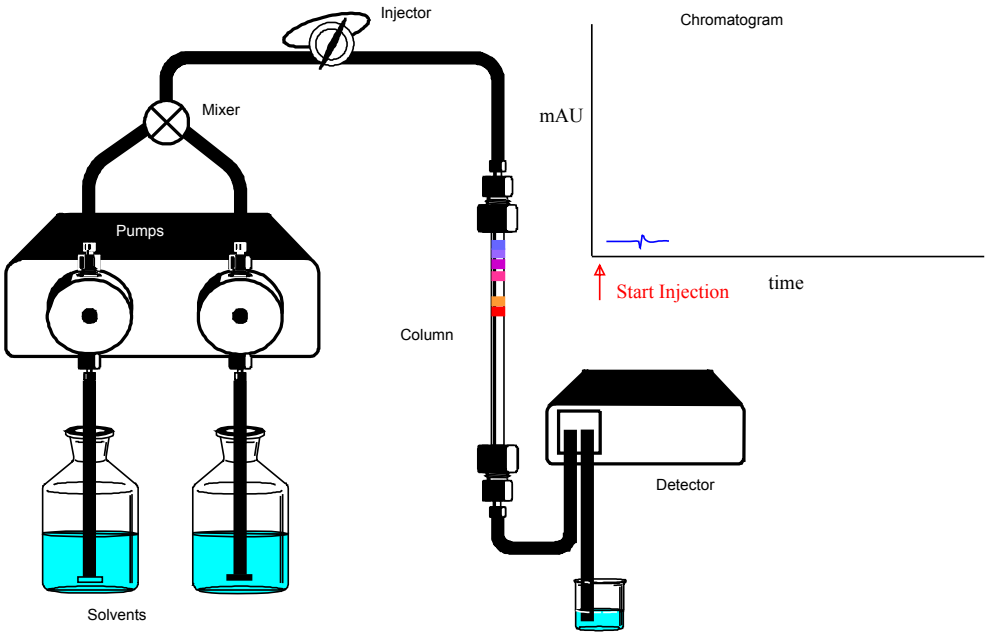
Separations



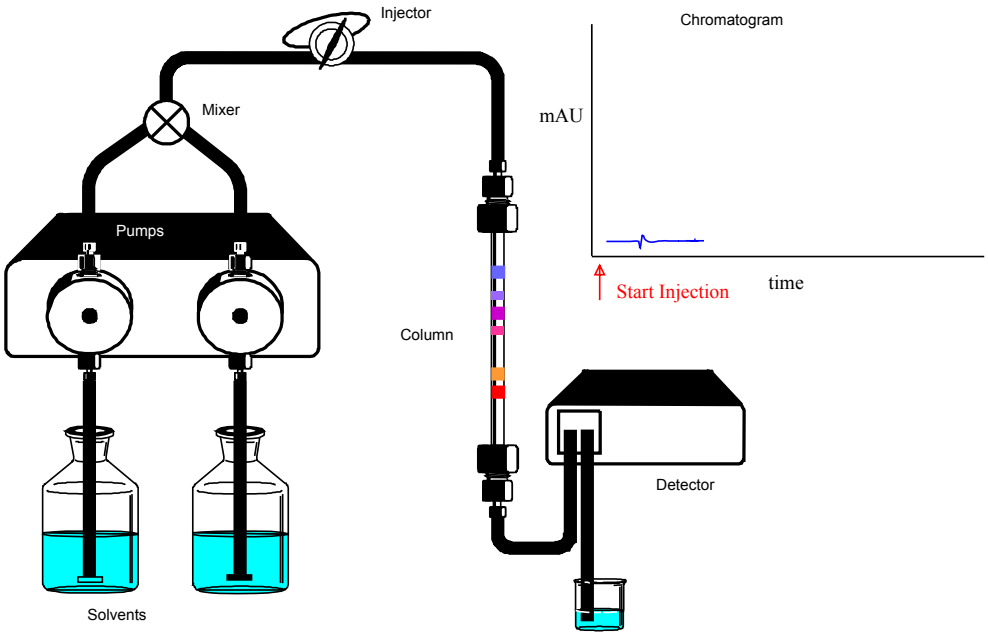
Separations



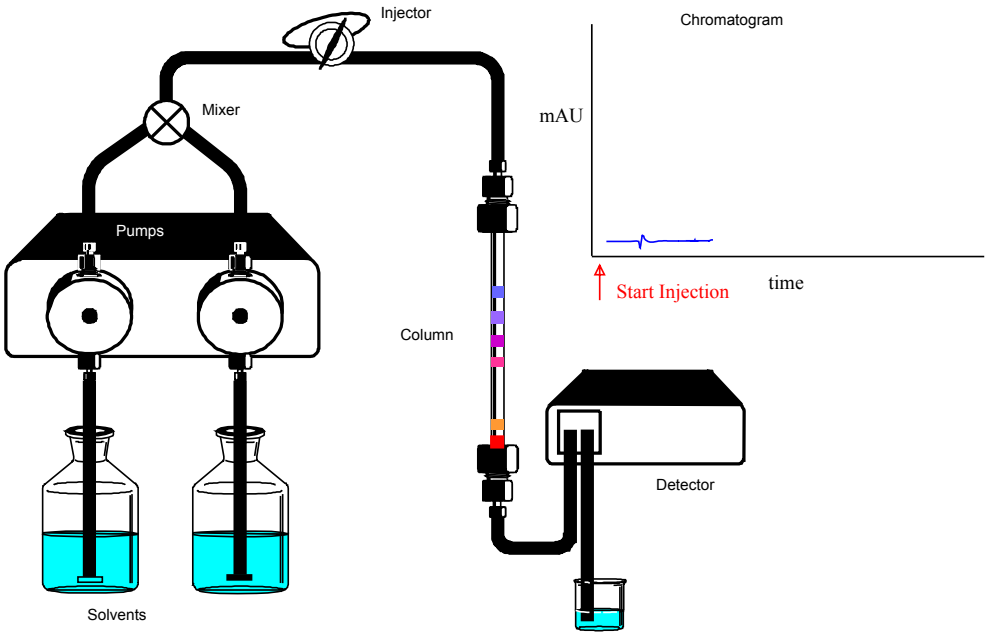
Separations



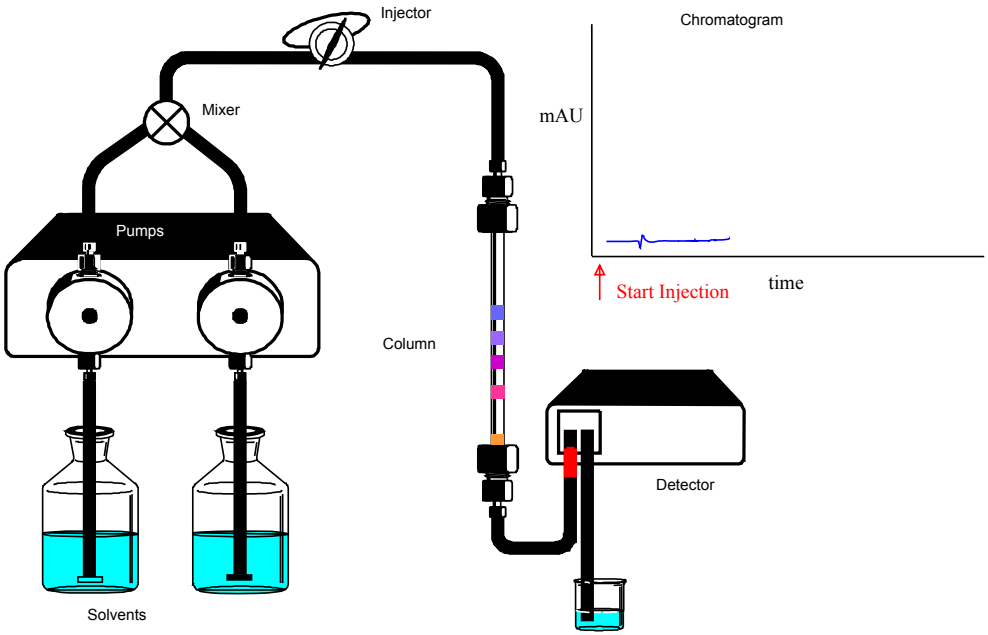
Separations



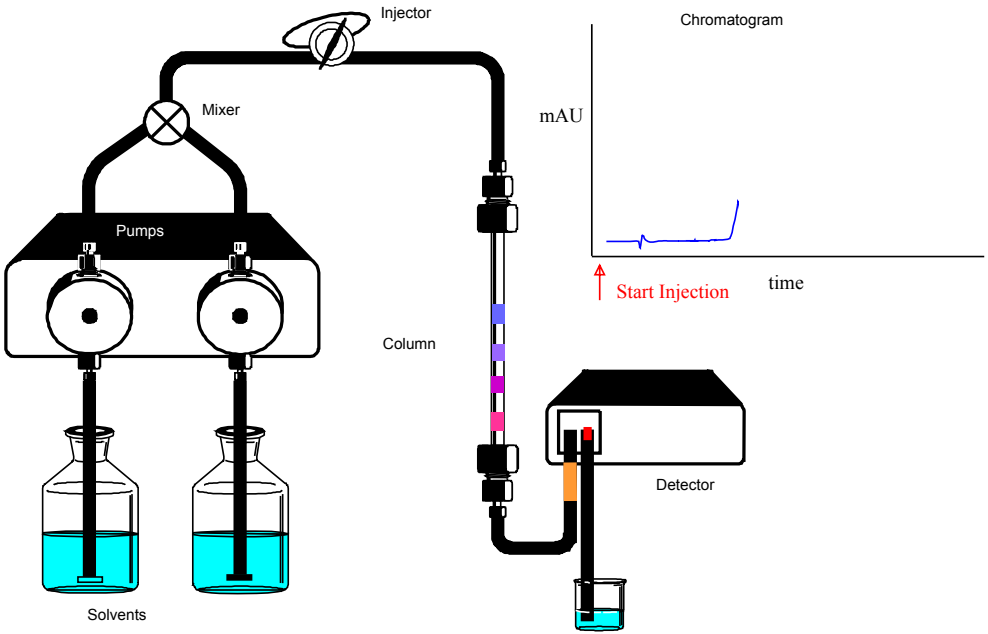
Separations



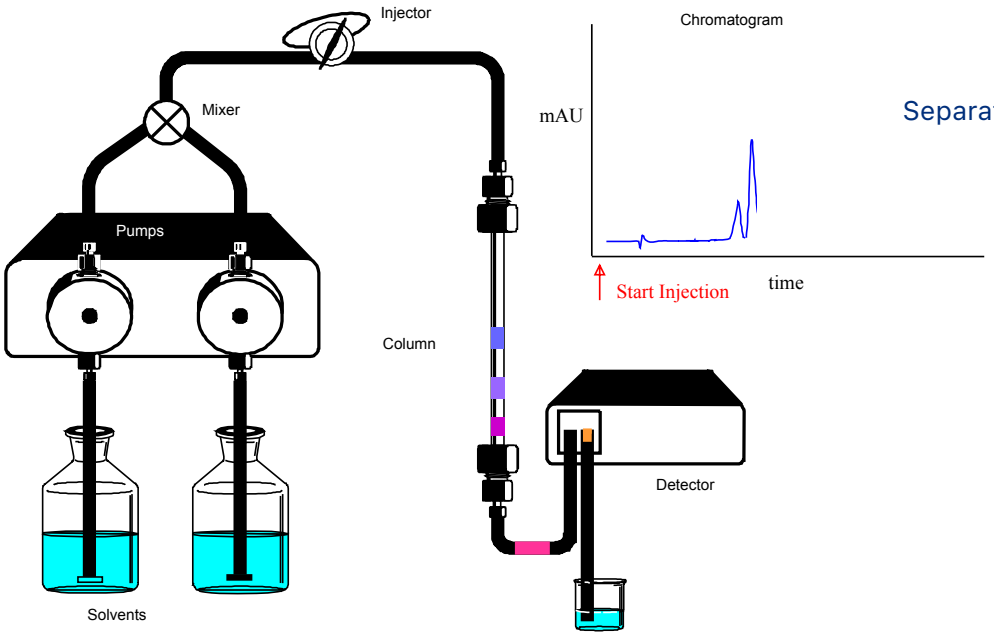
Separations



Separations

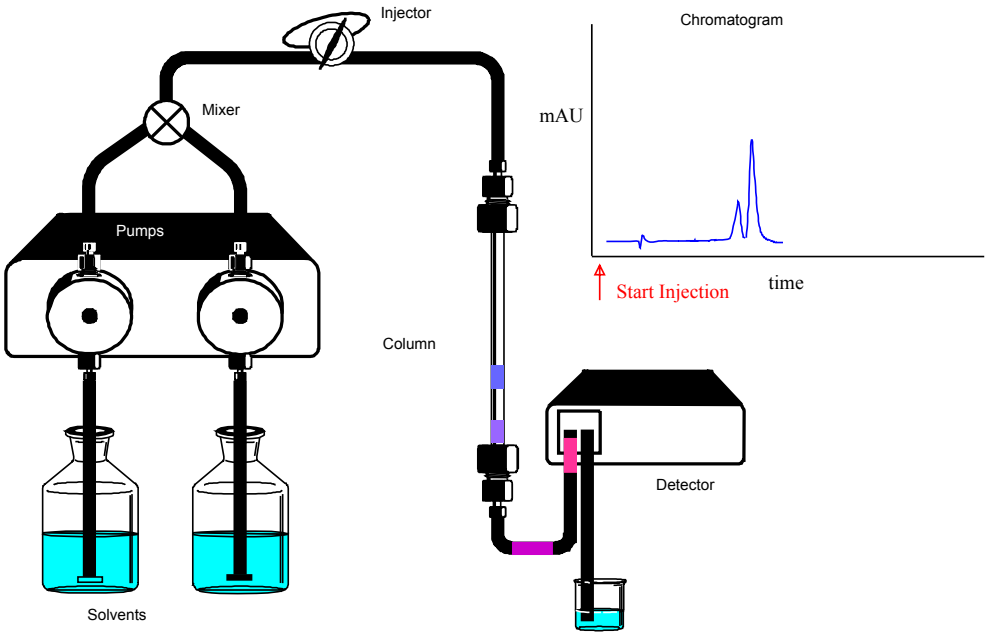


Separations

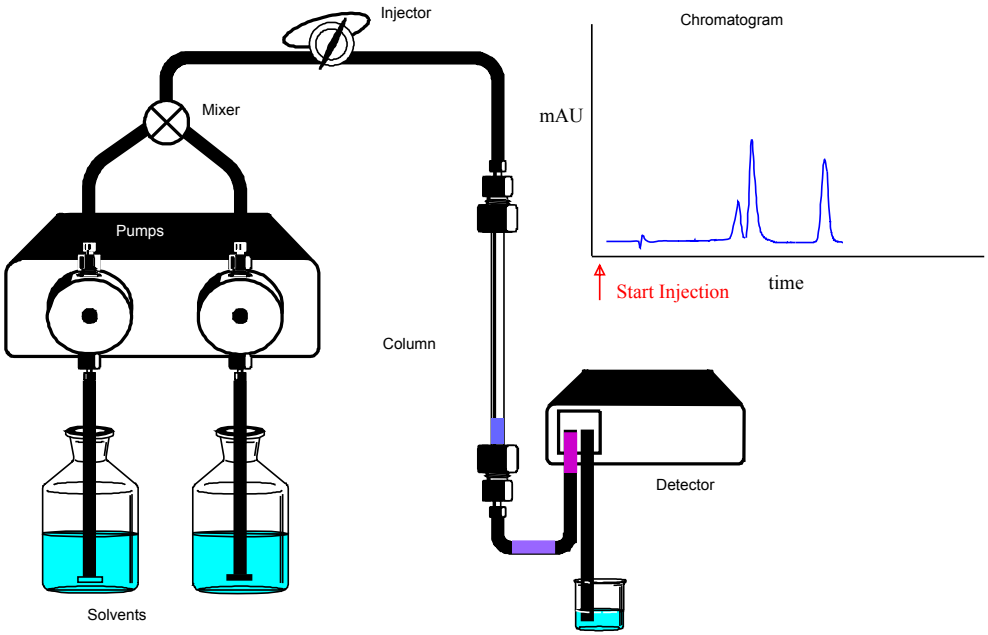


Separation + detection

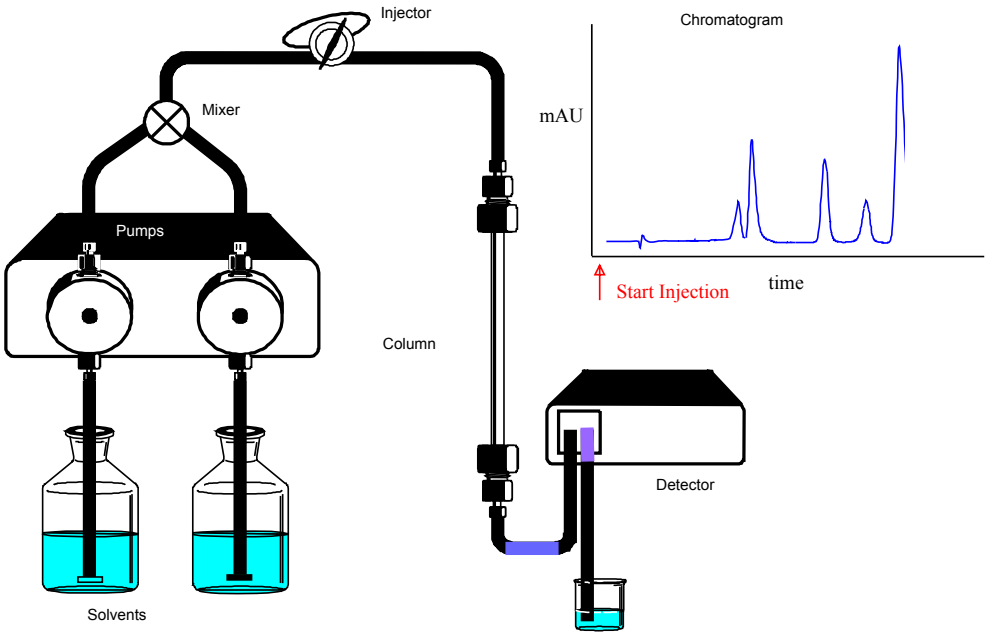
Separations



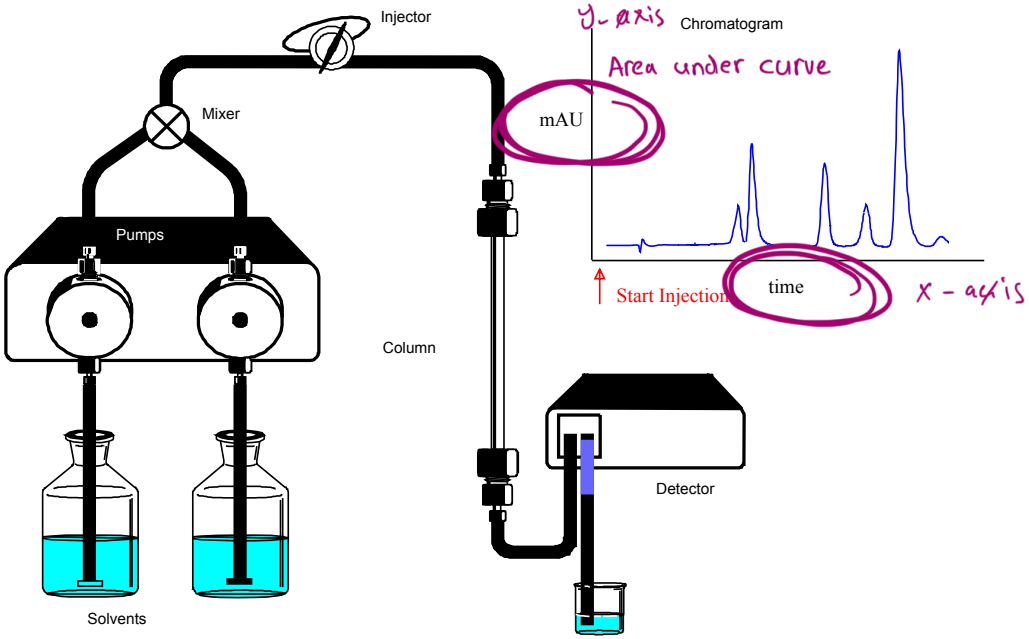
Separations



Separations



Separations

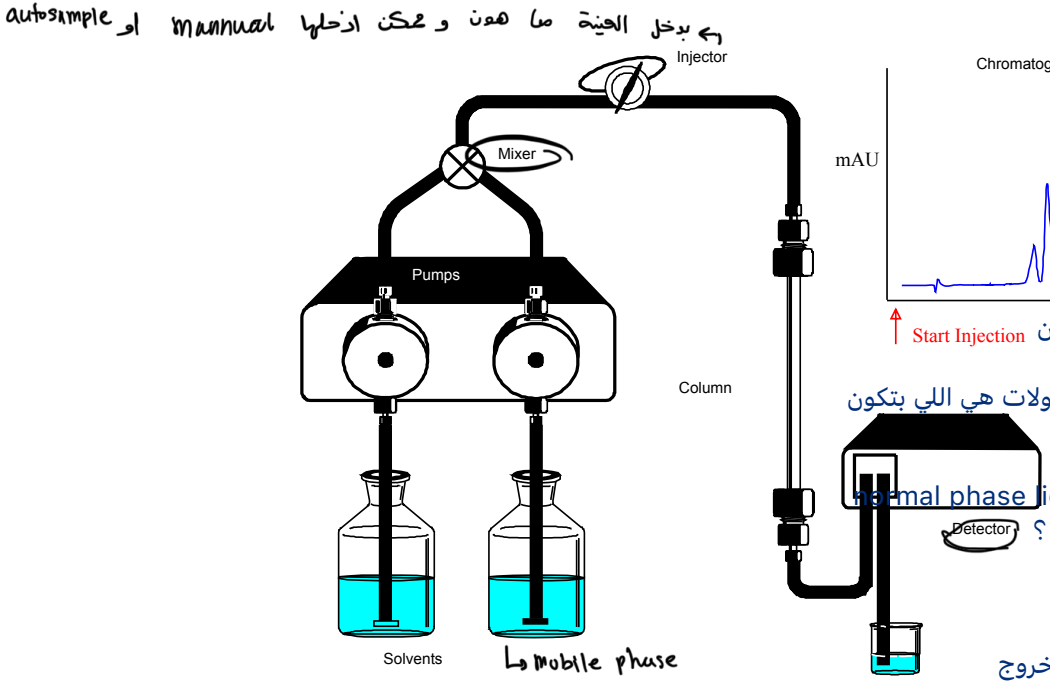


حددنا المكان اللي بدنا نوخد منه الsample فبتيجي needle بتسحب و بتروح للcolumn

قبل ما ادخل بكون السستم شغال فقط mobile phase و بس ابلش احقن العينة رح تكون liquid و رح تبلش تنمزج مع الmobile phase و تدخل

Separations

اذا الmobile phase كان polar ف اول اشي رح يطلع هو polar



لو حكالي السؤال انه عندي مركبات A B C و الsolvent كان ميثانول او polar solvent فمين العينة اللي رح تطلع اول

A acetone

B ch3ch3

C ch3oh

هدول mixture و عملتلهم injection بالHPLC اللي رح يخرج اول واحد هو الكحول لانه اكتر اشي polar (ما رح يخربط بالاسئلة بين مثلا كحول و حمض كربوكسيلي يعني بكون واضح مين المركب الpolar) و اغلب الاحيان الكحولات هي اللي بتكون More polar

لو حكالي انه استخدمت normal phase liquid chromatography و مدخل هدول المركبات فمين اول مركب رح يطلع ؟

Ch3Ch3

لأنه اكتر اشي non polar

المركبات بتختلف بالretention time و هو وقت خروج المركبات من الcolumn يعني elution time

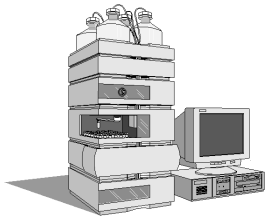
mobile phase → injector → column → detector → Chromatograph

الarea الها علاقة بالتركيز و بحدد نوع المركب qualitative عن طريق الretention time

التركيز بحسبه عن طريق calibration curve

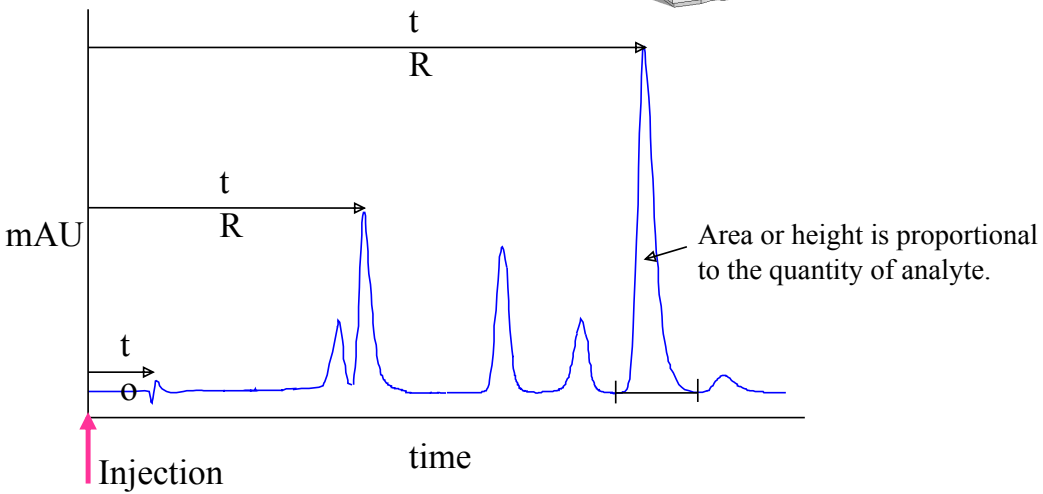
التراكيز الستاندرد اللي بدخلها عشان اطلع الcalibration curve لازم تكون اقل من 0.01 M لأنه شغال على beers law

The Chromatogram



to - elution time of unretained peak

tR- retention time - determines sample identity



Applications

- Monitoring materials that may jeopardize occupational safety or health
- Monitoring pesticide levels in the environment.
- To survey food and drug products,
- To identify confiscated narcotics
- To determine the amount of such chemical compounds found in new drugs in pharmaceutics

Summary

- The modern day technique is greatly enhanced in terms of selectivity, resolution, through miniaturization and the use of very elaborate stationary phases.
- Therefore HPLC is widely used for separation of molecules in biological, pharmaceutical, food, environmental and industrial process

advantages of HPLC

- Small diameter, reusable stainless steel columns
- Column packing with very small particles
- Control flow of mobile phase
- Precise sample introduction
- Good pumping system
- Special continuous flow detectors- can handle small flow rates and detect very small amounts
- Rapid analysis
- High resolution

disadvantages of HPLC

- Cost
- Complexity
- Low sensitivity for some compounds
- Irreversibly adsorbed compounds not detected
- Co-elution difficult to detect

انه اكتر من مركب يفكوا بنفس الوقت فلازم اغير
بالmobile phase عشان ما يفكوا مع بعض

Detectors used in HPLC

mg > µg > ng > pg > fg > ag > zg > yg
10^{-3} 10^{-6} 10^{-9} 10^{-12} 10^{-15} 10^{-18} 10^{-21} 10^{-24}

Type	Principle	Detection limit	Comments
Spectro-photometer UV	Measure absorbance of light	<1 ng	Analyte must absorb UV or visible light
Fluorometers	Measures fluorescence	pg to ng	Analyte must fluoresce
Electro-chemical detectors	Electrochemically measures oxidized/ reduce analyte	pg to ng	Useful for catecholamines
Mass spectrometer	Detects ions after separation by mass-to-charge ration	fg to ng	Analyte must be converted to ionized form
Refractometer	Measure change in refractive index	1 µg	Detection of most compounds but relatively low sensitivity

Submultiples		
Value	SI symbol	Name
10^{-3} g	mg	milligram
10^{-6} g	µg	microgram
10^{-9} g	ng	nanogram
10^{-12} g	pg	picogram
10^{-15} g	fg	femtogram
10^{-18} g	ag	attogram
10^{-21} g	zg	zeptogram
10^{-24} g	yg	yoctogram

ما بحلل الا اذا فيه chromophore

اذا ما في pi ≥ 3 ما بحلل

نفس اشي

اذا ما كان المركب polar ما رح بحلل

افضل واحد الوصل اني بحلل كلشي

هاد الجهاز طوروه و صغروا من حجمه حتى يقدروا يستخدموه رواد الفضاء و يحللوا اشياء مرجودة على سطح القمر

Liquid Chromatography
Instrumentation – Detectors

الصورة عبارة عن quartz cell مفتوحة من الجوانب و الضو بفوت اما فوق تحت او من الجنب المهم في ضو بدخل للdetector و دخل ال mobile phase اذا كان اله chromophore بصفر عليه و اذا ما اله مش رح يصفر عليه بعدين بدخل العينة مع ال mobile phase و بنفصلوا حسب الوقت اللي طلعوا فيه من الcolumn و المركبات اللي بوصلوا للcell تبع الdetector لازم يكونوا مفصولين و غير هيك مش رح اقدر احللهم

١ • UV Absorption Detectors

ال UV بعتمد على ال beers law

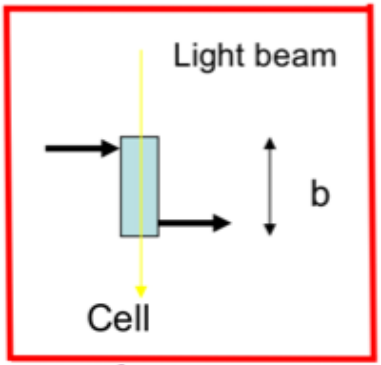
- The most common type of detector
- Principle: absorption of ultraviolet (or visible) light
- Follows Beer's Law: $A = -\log(I/I_o) = \varepsilon bC$
  - I = intensity of light (I_o for blank)
  - ε = molar absorptivity (constant)
  - b = path length
  - C = concentration

ال absorbance لازم ما تزيد عن واحد و ما تقل عن 0.001

- Best results for $0.001 < A < 1$
- Fast response – sensitivity trade off in path length (can select cell volumes)

① Non destructive

② Not universal يعني ما بجلل كلشي



③ qualitative + quantitative

← ① ② ③ رح يجي عليهم اسئلة اكيد كمقارنة مع بقية الـ detectors

• UV Absorption Detectors

المركب اللي فيه رابطة باي وحدة مو اي جهاز بقدر يلقطها فلازم تكون عالاقل رابطتين باي بالمركب

– Sensitivity to Compounds (ε values)

- Best for compounds with conjugated double bonds, aromatic groups or strongly absorbing functional groups (e.g. R-NO2, R-I, R-Br)
- Poor response for compounds with few or weakly absorbing functional groups (worst for R-CN, R-NH2, R-F; poor for R-OR', R-OH, R-COOH, R-COOR')

– Solvents:

- Requires use of solvents that absorb poorly in UV

Absorbance detectors

UV/Visible detectors

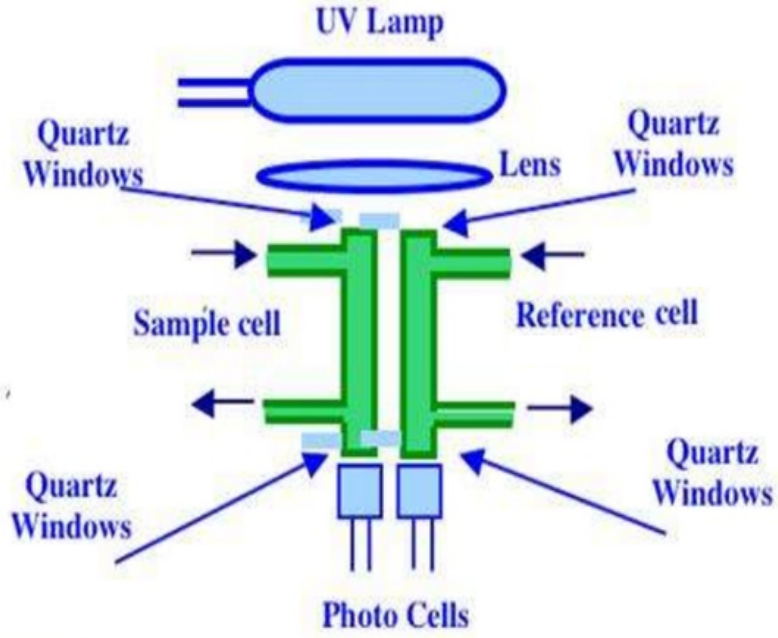
- Solute property detector
- Three types
  1. - Fixed wavelength detector one λ
  2. - Variable wavelength detector multiple λ
  3. - Diode array detector all λ 200-780

كلهم لازم المركب يكون chromophore و highly intense حتى يشتغلوا

ما بقدر يحلل غير مركب واحد و اذا بدي احلل اكتر من مركب لازم كل مرة اعيد و اغير ال λ

Fixed Wavelength detector

- 254nm
- Higher detection capacity.
- Hg vapour lamp(discharge lamp)
- Focus of light through two absorption cells.
- Volume of cell is kept constant.



Variable Wavelength Detectors

- Relatively wide band pass UV-Visible spectrophotometer coupled to a chromatographic system.
- Offers a wide selection of UV & Visible wavelengths with increased cost.
- For complete spectrum, eluent flow must be stopped to trap the component of interest in the detector cell.

Diode Array Detector

ب اول نوع detectorالضو رح يروح عالprism و يفكك الاطوال الموجية و يوخد طول موجي واحد

- Scanning Wavelength Detector

تاني نوع كان بس يفك كان يوخد ماكسمم ٣ اطوال موجية و بعدين وداهم ل monochromator حتى يختار طول موجي ل ٣ اطوال مع التطور

- Required to obtain a real time spectrum of each solute as it elutes

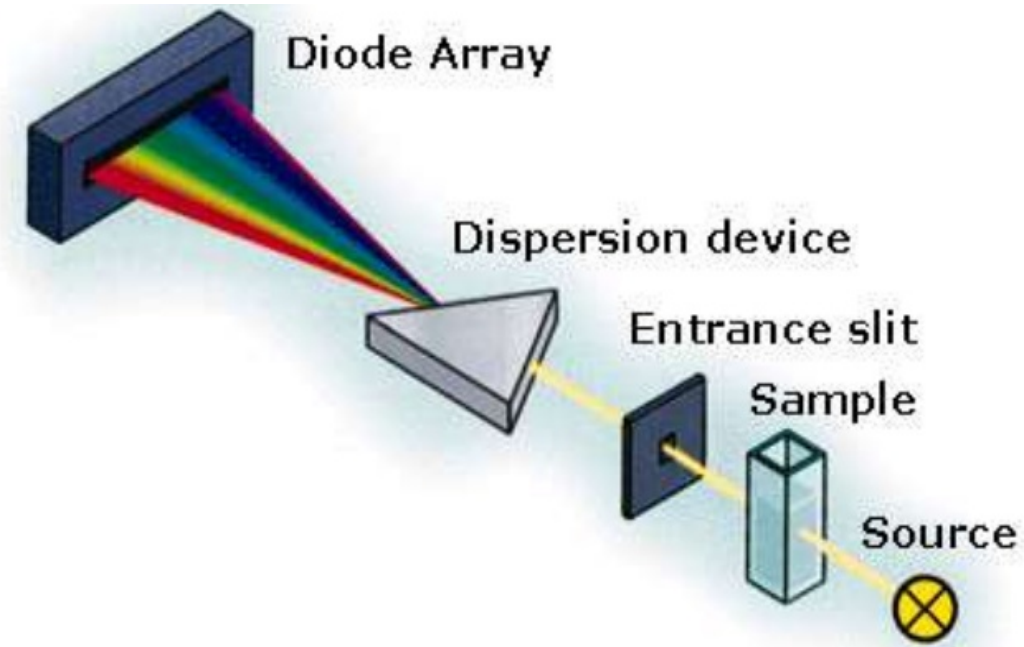
تالت نوع بدل ما يودي الاطوال الموجية لmonochromator بدخله ع shift electron فبشوفهم كلهم مرة وحدة

- Work in parallel, monitoring all wavelength
- Xenon lamp

جهاز الUV هو فقط detector ما بفصل المواد

- Complete development of chromatogram

Most expensive



Refractive Index Detectors

كل مادة في الطبيعة الها physical property اللي هي الانكسار

Principle:

- liquids with different refractive index will diffract light differently
- Composition will determine refractive index
- Any compound with a refractive index different than the solvent's is detectable

Advantage:

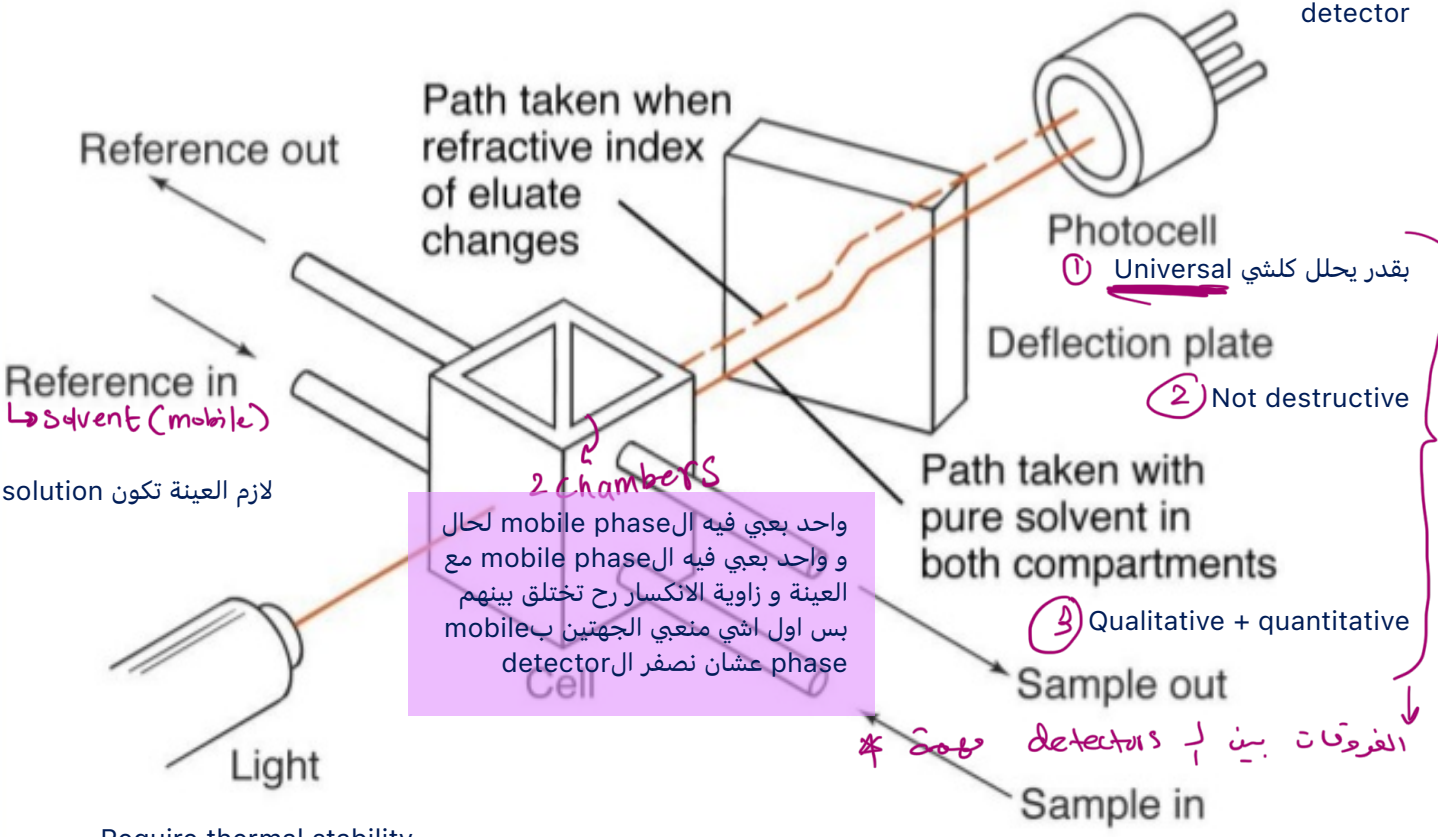
- Most universal detector (can detect weakly absorbing compounds)

Disadvantages:

- Gradients are not possible
- Requires thermal stability
- Generally not very sensitive

لو عندي كاسة glass transparent فيها مي و كاسة تانية فيها Ch3OH و سقطت عال٢ نفس الضو و نفس الزاوية و نفس الglass

الكاسة اللي فيها مي رح ينكسر الضو و يخرج بزاوية معينة و الميثانول رح تنكسر بزاوية مختلفة فحسب اختلاف زاوية الانكسار لكل مركب بستخدمه ك detector



بقدر يحلل كلشي Universal ①

② Not destructive

③ Qualitative + quantitative

لازم العينة تكون solution

واحد بعبي فيه الmobile phase لحال و واحد بعبي فيه الmobile phase مع العينة و زاوية الانكسار رح تختلق بينهم بس اول اشي منعبي الجهتين بmobile phase عشان نصفر الdetector

الفروقات بين الـ detectors

Require thermal stability , transparence and one mobile phase

Unstable

الاستجابة مش ثابتة مع الوقت و خصوصا اذا استخدمت اكتر من mobile phase

لازم isocratic فقط و ما بزبط gradient

3. Fluorescence Detectors

$$M + h\nu \rightarrow M^*$$

$$M^* \rightarrow M^{*\prime} \text{ (lower vibrational level)}$$

$$M^{*\prime} \rightarrow M + h\nu'$$

Detection Principle:

Light promotes molecules to excited electronic state

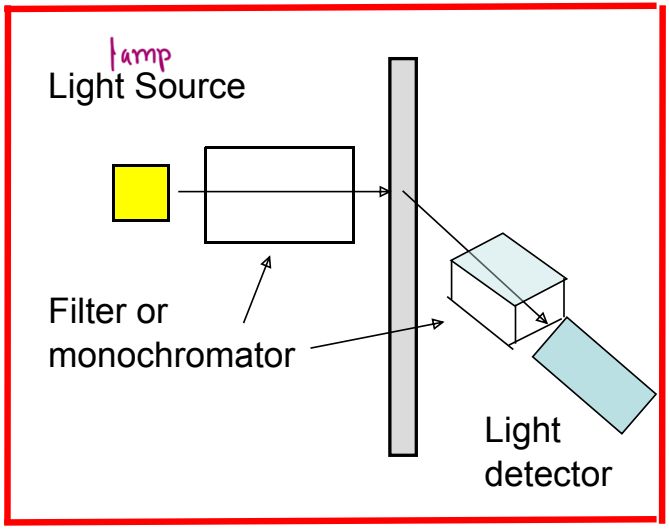
Excited molecules transition from lowest excited state back to the ground state and emit light in the process $\lambda > 380$ nm vis

Equipment:

High intensity light source

Filters or monochromators to select wavelengths (before and after cell)

Sensitive light detector



الاضاءة بتكون lamp و بسخن عنصر الtungsten فبتهيج الvalence electron و بتصعد للexcited و بس يرجع بصيرله emission و بعطيني visible light بس ما برجع بخطوة وحدة برجع بالتدريج ف ما بحتاج طاقة عالية للemission فسموا السستم energy stable

الflourensce فيها غاز و مولد حرارة اللي بهيج الغاز

المادة اللي بتشتغل بهاد السستم فيها conjucation عالي ≥ 3 pi و بسميهم florophore

Advantages:

الintensity بتكون لأني بعطي اكتر من طول موجي

Greater sensitivity possible (for molecules with high fluorescence efficiencies) becaus noise easy to detect small signal against zero background (see below)

Much greater selectivity because few molecules fluoresce, particularly at selected wavelengths florophores لـ المركبات اللي ما فيها ما بتتحلل

Disadvantages:

Limited to relatively few molecules (although derivatization is also possible) florophore فيها مش كل المركبات

كل الflorophore تعتبر chromophore بس مش كل الchromophore بتكون florophore

chromophore : at least one pi
Florophore : 3 pi or more

مقارنة بباقي الdetectors
1. Qualitative + quantitative
2. Not destructive
3. Not universal

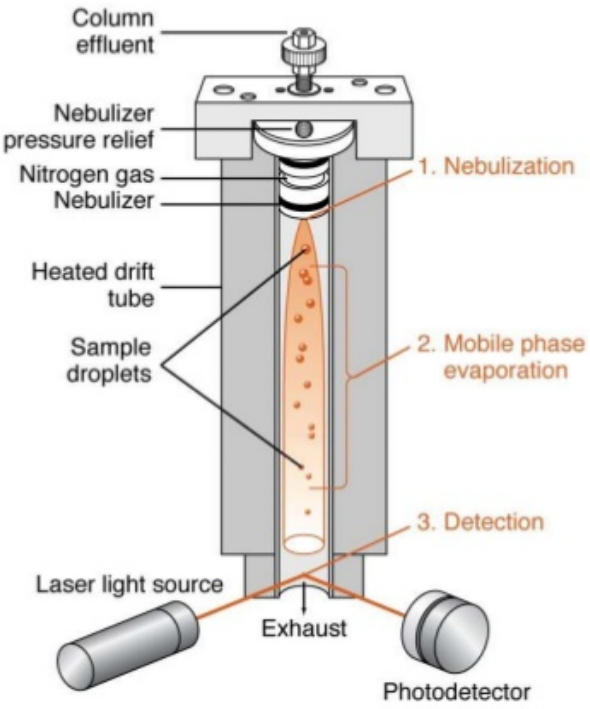
refraction نفس مبدأ الـ

• ELSD (Evaporative Light Scattering Detector)

Physical property

(refraction → solution) بس solute (solid)
(تشتت)

- Universal, destructive
- Useful for large molecules and wide linear range.
- Analytes are de-solvated in the detector.
- Molecules pass through a large cuvette for a UV-VIS instrument.
- The reduction in light intensity detected (due to scattering by the analytes) is measured.



Universal

Destructive

كل مادة الها صفة scatter مميزة عن غيرها فهي physical property

Quantitative + qualitative

Ion Exchange Chromatography

بين الcolumn و الdetector بكون في unit فيها + - فبستخدم non polar solvent ك effluent بعدين بدخل الpolar مع الموبايل فبصير توصيل للالكترونات

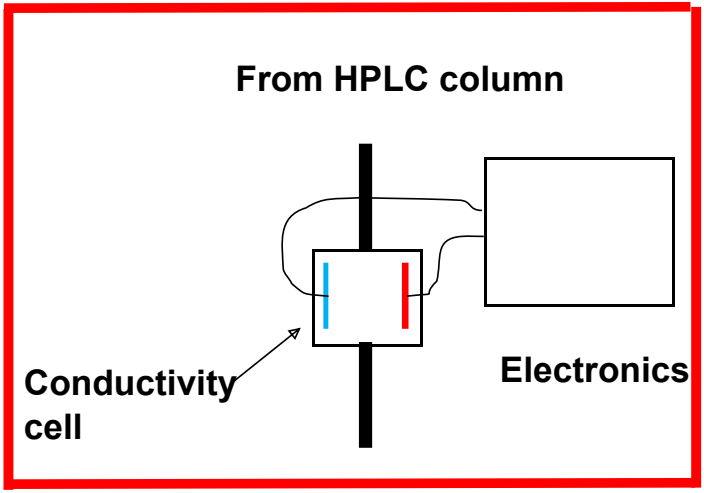
Not universal
لأنه لازم يكون polar

Not destructive

Types of Instruments:
- Single column
- With analytical plus suppressor columns

Detection in Single Column Instruments
- Other detection methods (fairly common)
- Conductivity detection

Conductivity Detector
- Resistance measured (AC circuit)
- Conductivity = 1/(resistance)
- Ions in solution create conductance
- Conductivity depends on ion concentration and size



بتحلل الnon polar عن طريق انه بتدخلها على unit بتعمللها oxidation و بتخليها polar

Universal

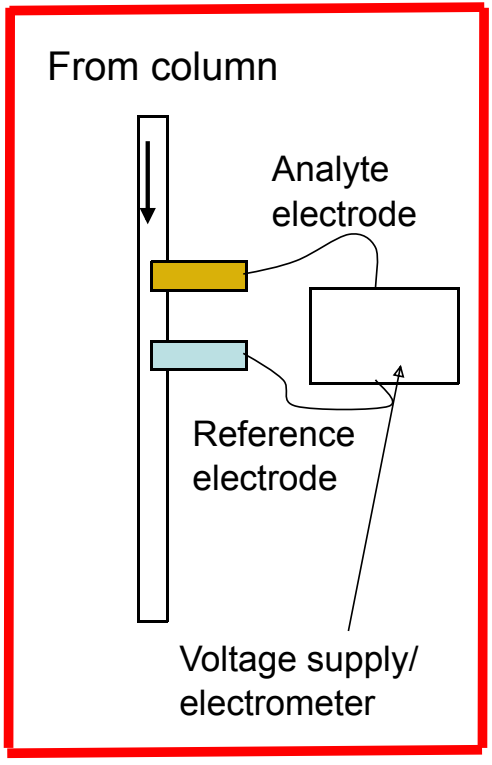
Destructive

Qualitative + quantitative

Electrochemical Detectors

Principle:

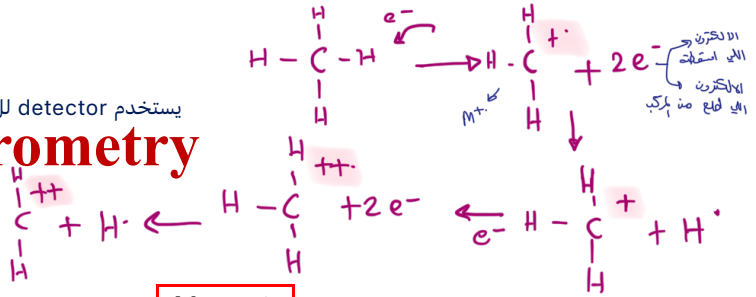
- Redox reactions occur at electrodes following column
- Potential cycle used to periodically oxidize/reduce analytes at electrode
- Current depends on concentration of analyte being reduced or oxidized (similar to A in UV detector)
- Electrode potential determines classes of compounds that are detectable (similar to λ in UV detector)



1. Qualitative
2. Universal

يستخدم detector للHPLC

• Mass Spectrometry



Bonds in **cation radicals** begin to break (fragment)

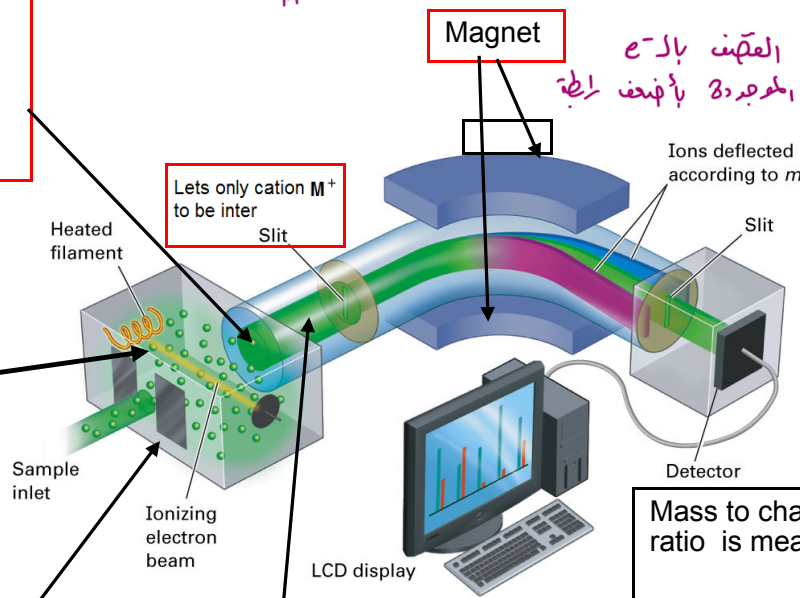
$M^{+\cdot} \longrightarrow M^{+} + M^{\cdot}$

Cation radical — fragment

Sample vaporized and subjected to bombardment by electrons that remove an electron creating a cation radical

$M \xrightarrow{e^-} M^{+\cdot} + e^-$

Organic molecule — Cation radical



Mass to charge (*m/z*) ratio is measured

Molecular ion (M+) shows **molecular weight**

Acceleration

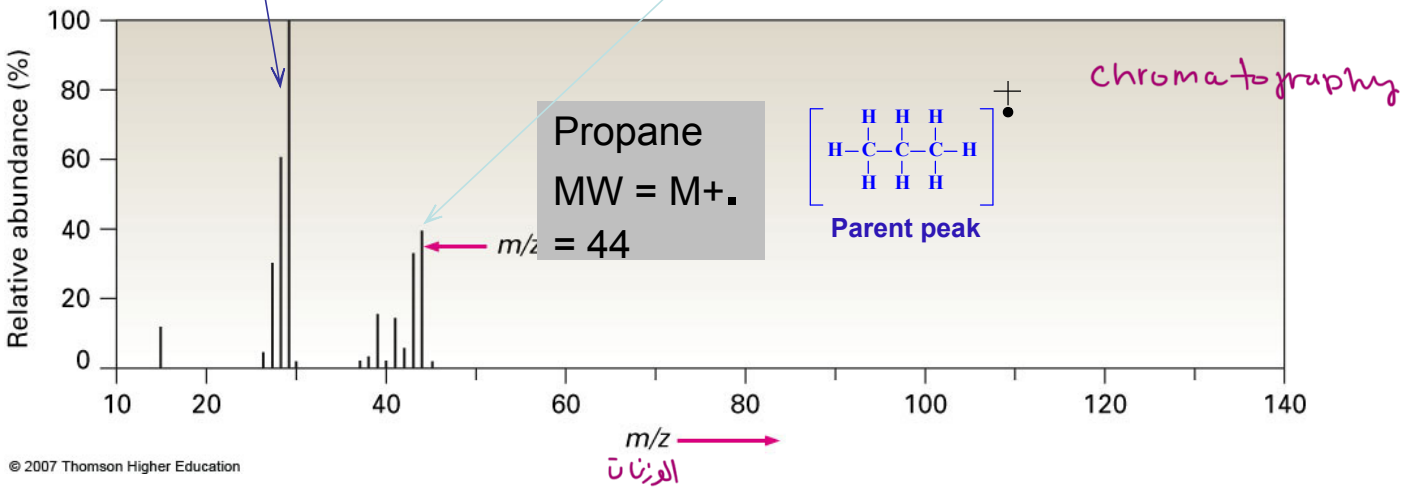
Ionization unit

بصير في تسخين و بتتحول المادة لبخار بعدين بسلط عليه (بقصفه) ب الكترونات

قسم من المادة بتتأين و قسم منها ما بتتأين و منمرر الايونات على magnet فبوزنهم على اساس الgravity و اللي ما تأين رح ينشفط و يطلع من السستم فالجهاز رح يشوف الجزيئات اللي تأينت فقط

The Mass Spectrum

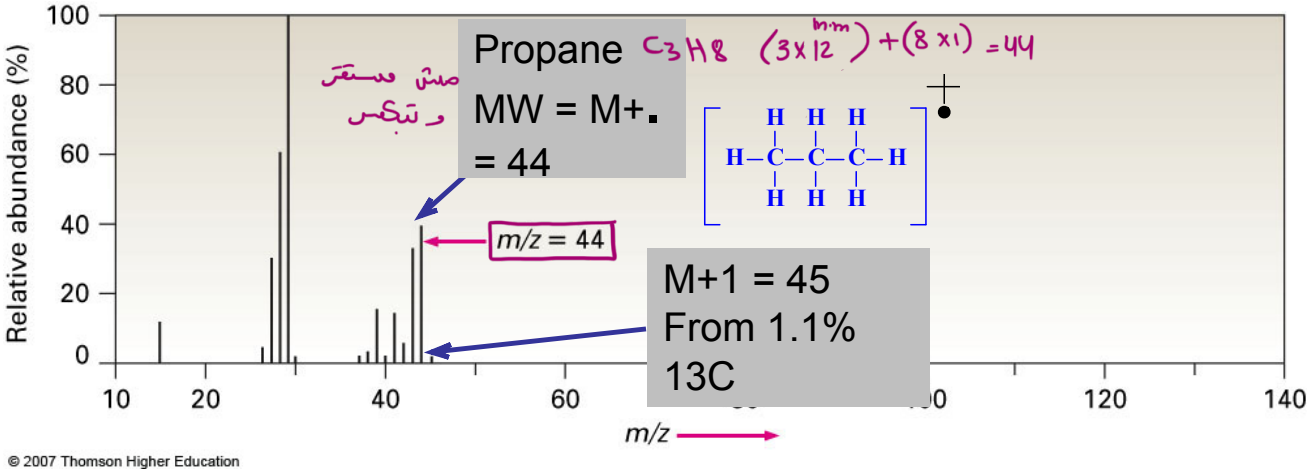
- Plot mass of ions **(m/z) (x-axis)** versus the intensity of the signal (roughly corresponding to the **number of ions) (y-axis)**
- Tallest peak is **base peak** (100%)
- Other peaks listed as the % of that peak
- Peak that corresponds to the unfragmented **radical cation [M]+. is parent peak**



Determining the molecular formula
M and M+n peak :

Peaks above the molecular weight appear as a result of naturally occurring heavier isotopes in the sample

- M 12C (98.9%) and (M+1) from (1.1%) of 13C in nature
- (M and M+2) in (75.8%) /(24.2%) ratio = 35Cl and 37Cl
- (M and M+2) in (50.7%) /(49.3%) ratio = 79Br and 81Br



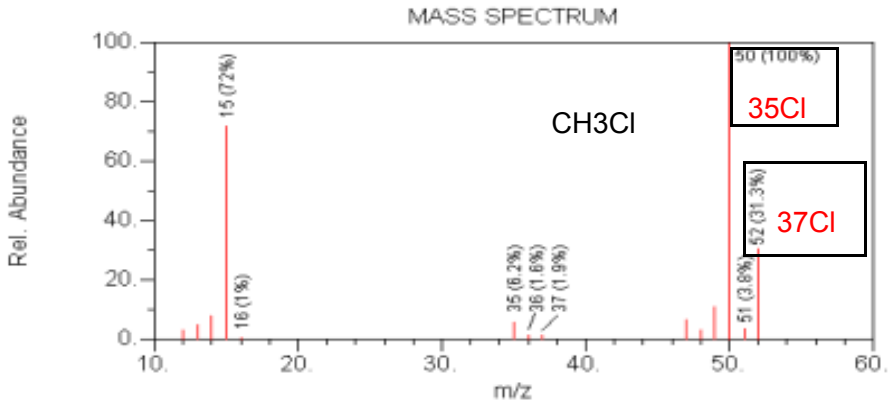
Natural abundances of Isotopes of some common elements

Element	Major Isotope	RA	M + 1 Isotope	RA	M + 2 Isotope	RA
Hydrogen	^{1}H	100				
Carbon	^{12}C	98.9	^{13}C	1.1		
Nitrogen	^{14}N	99.6	^{15}N	0.4		
Oxygen	^{16}O	99.8			^{18}O	0.2
Fluorine	^{19}F	100				
Sulfur	^{32}S	94.8	^{33}S	0.8	^{34}S	4.4
Chlorine	^{35}Cl	75.8			^{37}Cl	24.2
Bromine	^{79}Br	50.7			^{81}Br	49.3
Iodine	^{127}I	100				

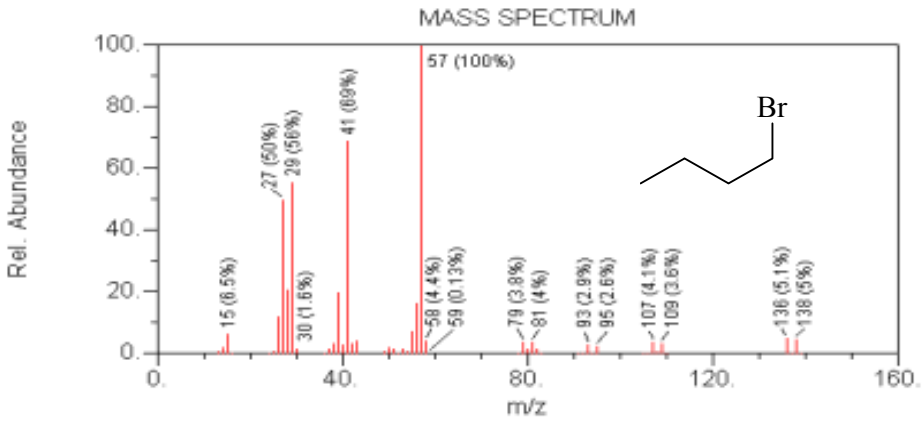
The relative abundance (RA) of the most abundant isotope is listed as 100, and the abundances of the other isotopes are listed relative to that number. The M + 1 isotope is the one that is responsible for the peak at *m*/*z* one unit higher than the peak for M^{+}.

M+ peak: Halides

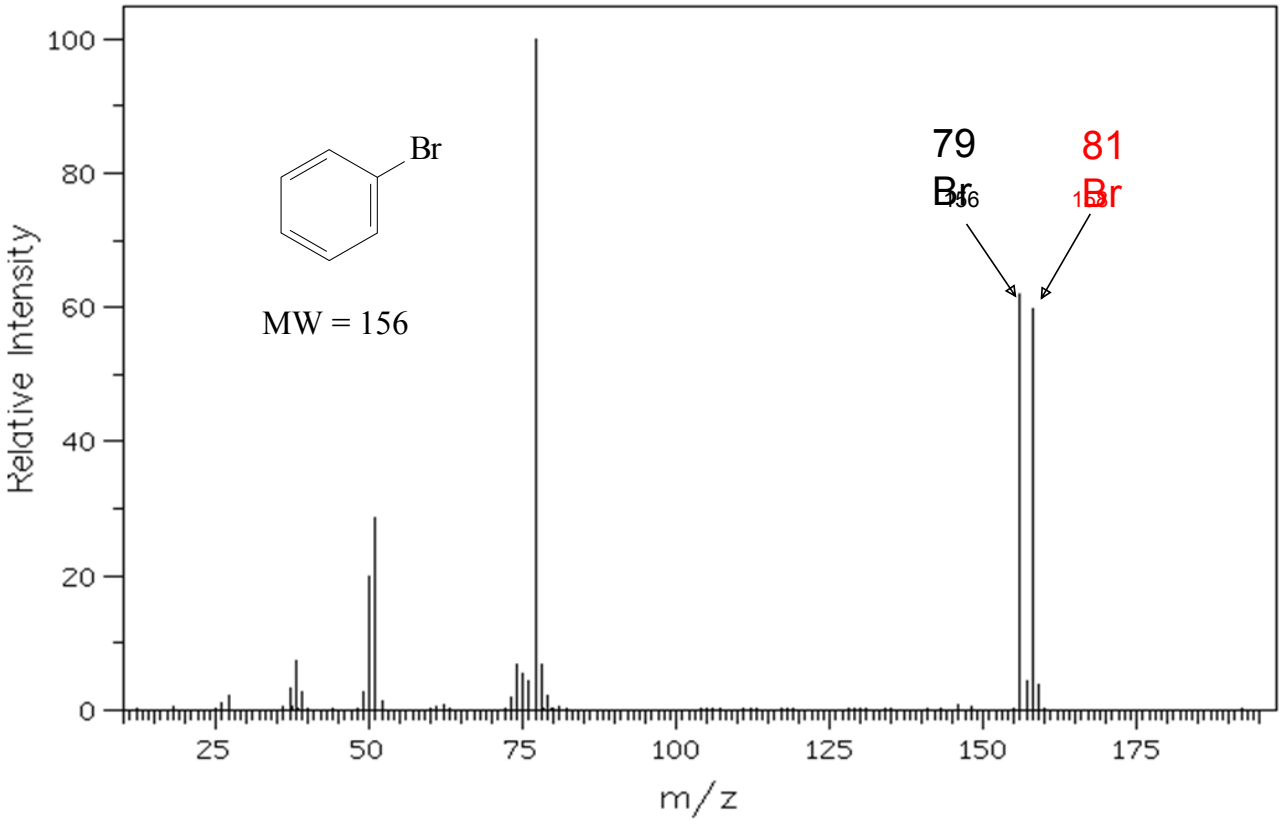
M+ and M+2 in
75.8%: 24.2% (~ 3:1)
ratio
= 35Cl and 37Cl



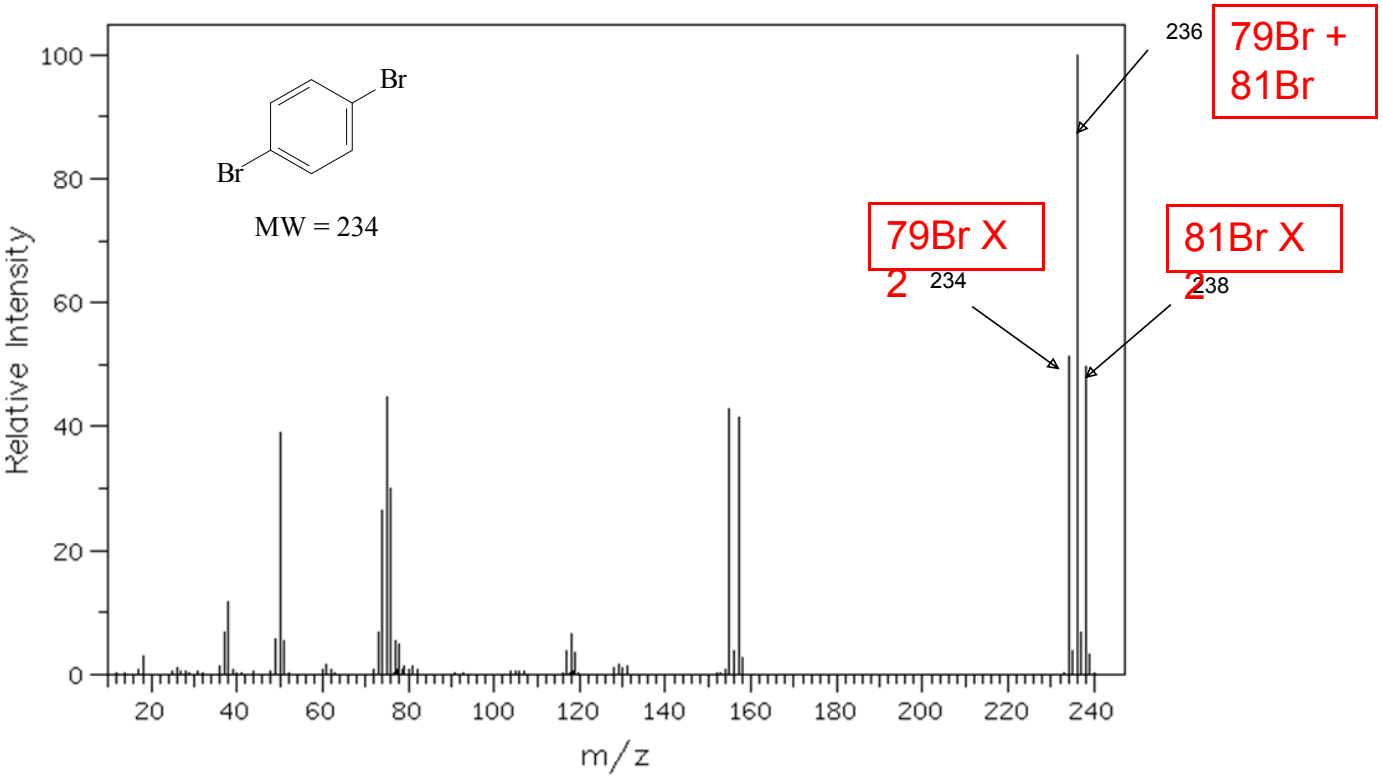
M+ and M+2 in
50.7%: 49.3% (~ 1:1)
ratio
= 79Br and 81Br



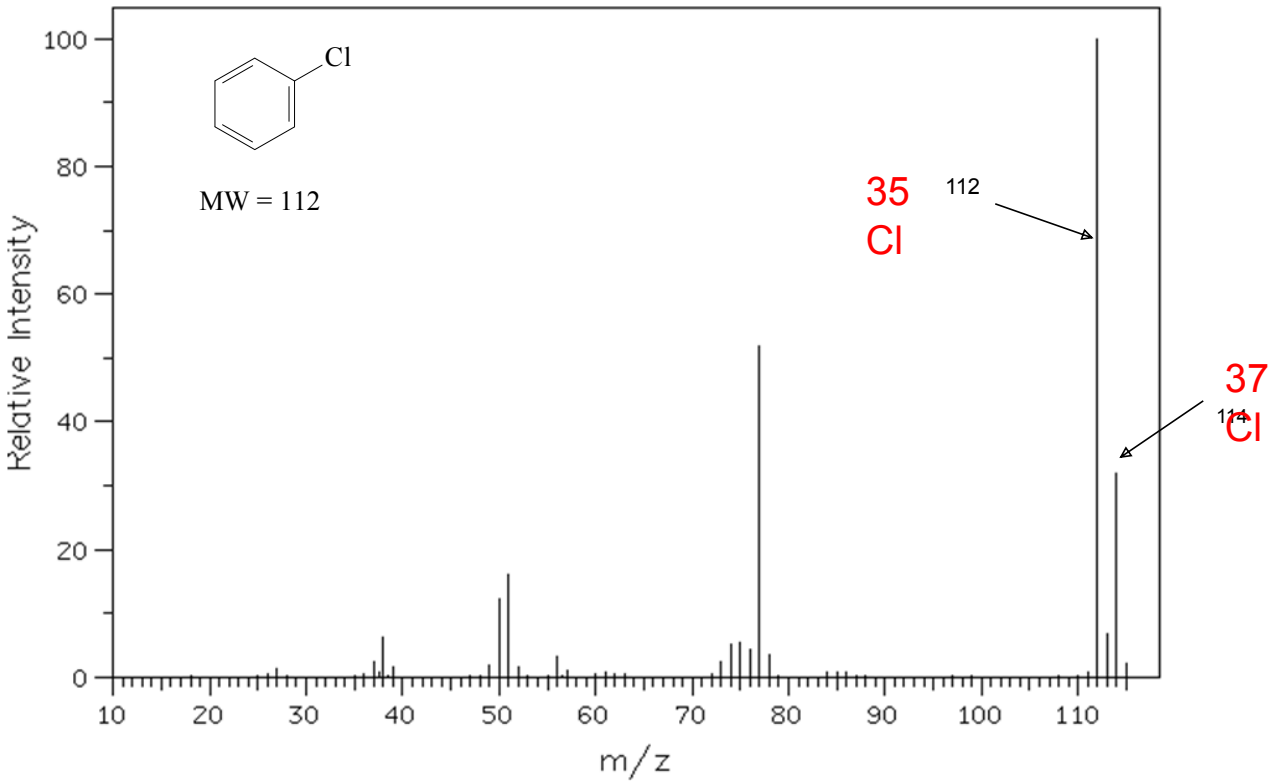
Determining the molecular formula



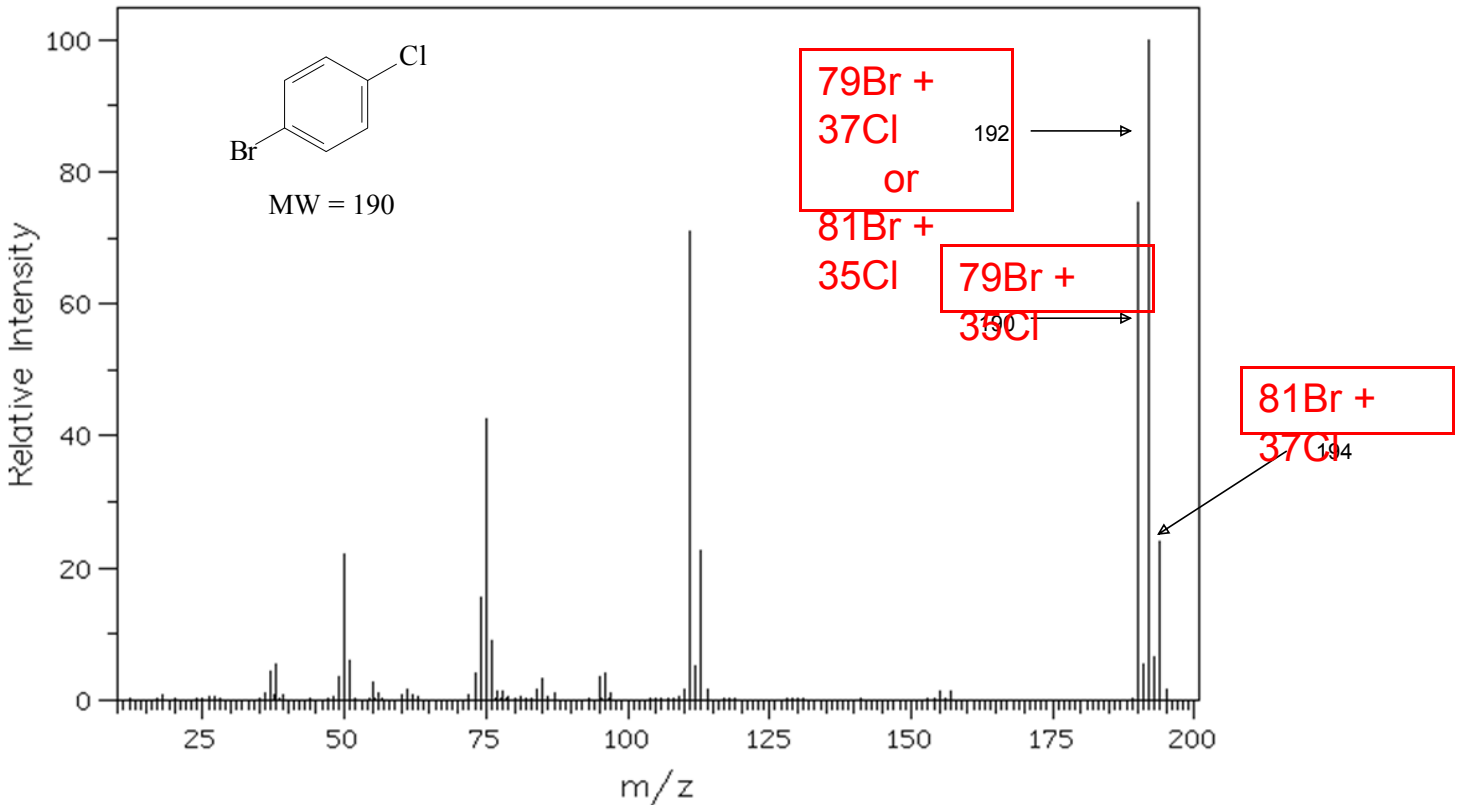
Determining the molecu



Determining the molecular formula



Determining the molecular formula



Determining the molecular formula