Chapter-26:

An Introduction to Chromatographic Separations

Introduction to Chromatography

Definition

الكروماتوغرافيا هي تقنية فصل تعتمد على التفاعلات المختلفة للمركبات مع طورين، طور متحرك وطور ثابت، أثناء انتقال المركبات عبر وسط داعم.

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.

الطور المتحرك: مذيب يتدفق عبر الوسط الداعم.

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

الطور الثابت: طبقة أو غلاف على الوسط الداعم يتفاعل مع المواد المراد تحليلها.

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

الوسط الداعم: سطح صلب يرتبط به الطور الثابت أو يُغطى به.

Uses for Chromatography

Real-life examples of uses for chromatography:

- Pharmaceutical Company – determine amount of each chemical found in new product

  شركة أدوية - تحديد كمية كل مادة كيميائية موجودة في منتج جديد

- Hospital – detect blood or alcohol levels in a patient's blood stream

  مستشفى - الكشف عن مستويات الدم أو الكحول في مجرى دم المريض

- Law Enforcement – to compare a sample found at a crime scene to samples from suspects

  إنفاذ القانون - مقارنة عينة تم العثور عليها في مسرح الجريمة بعينات من المشتبه بهم

- Environmental Agency – determine the level of pollutants in the water supply

  < وكالة بيئية - تحديد مستوى الملوثات في إمدادات المياه

- Manufacturing Plant – to purify a chemical needed to make a product

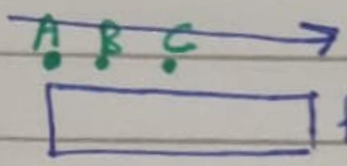
  زي المبيدات

  < مصنع تصنيع - تنقية مادة كيميائية لازمة لصنع منتج

Subject _____ Day _____ Date _____

chromatography (sepration)

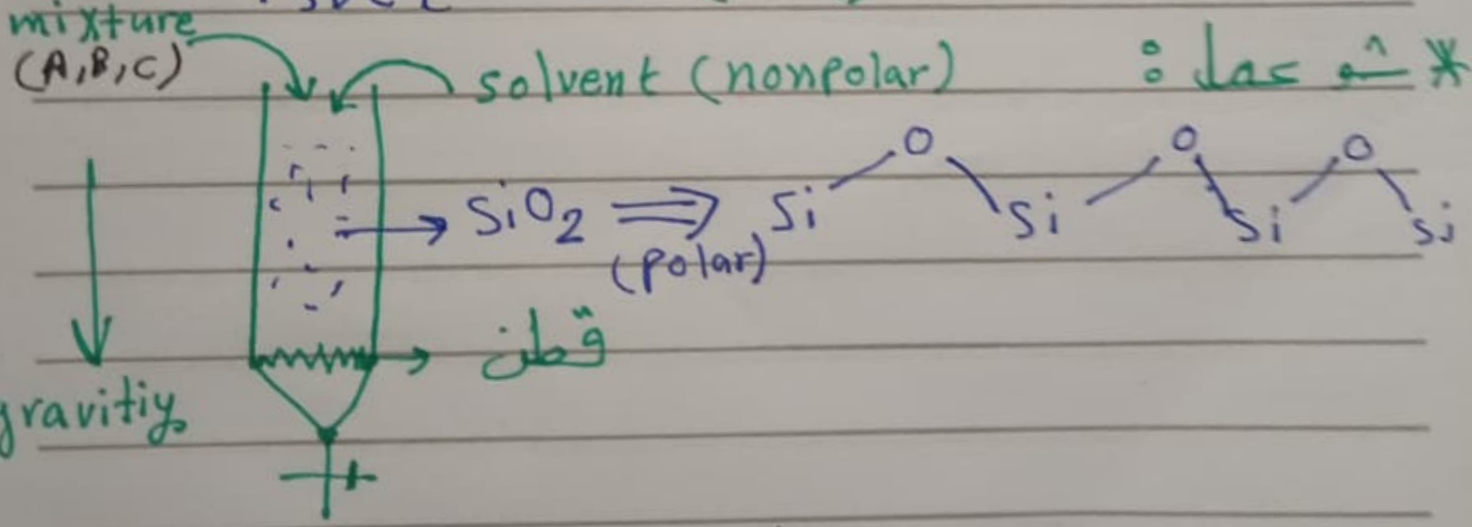
mobile phase
stationary phase
supporting phase → الي يحمل الـ stationary phase مثل الألمنيوم

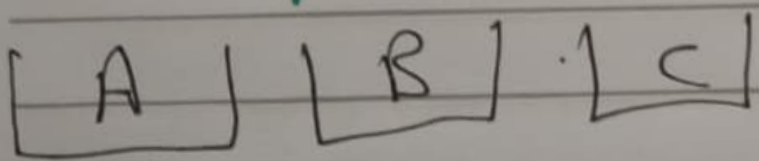


A, B, C are the samples (analytes)
mobile or stationary phases لهم affinity مختلفة تجاه

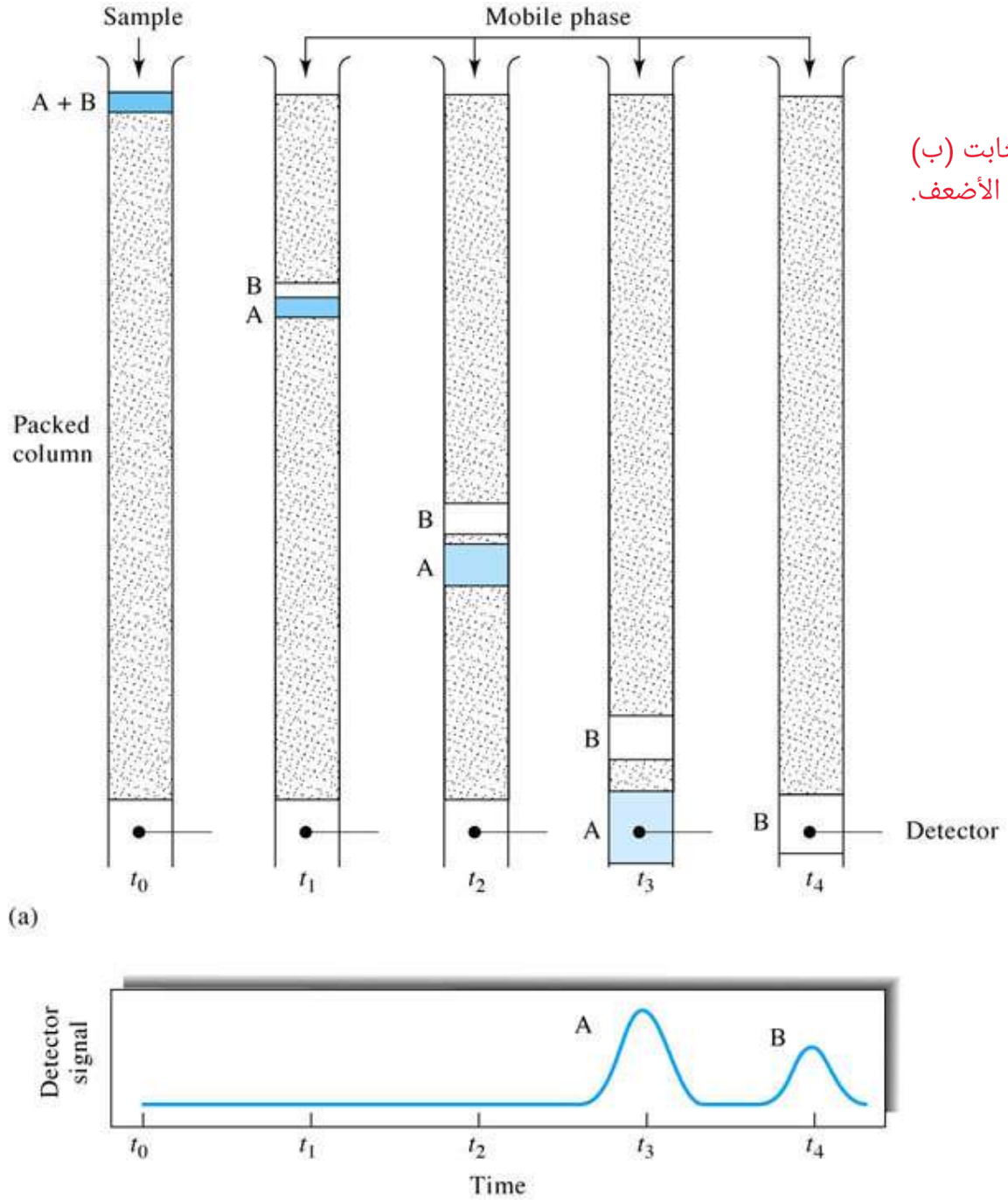
* اسم اللي اخترع chromatography ← Mikhail Tsvet (tool)

* شو عمل:





* كل ما كانت المادة polar كل ما علقت بال SiO_2 أكثر وتأخرت بنزولها.



تستغرق المواد المراد تحليلها التي تتفاعل بقوة مع الطور الثابت (ب) وقتًا أطول للمرور عبر النظام مقارنةً بتلك (أ) ذات التفاعلات الأضعف.

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.

عادةً ما تكون هذه التفاعلات كيميائية بطبيعتها، ولكن في بعض الحالات يمكن استخدام التفاعلات الفيزيائية أيضًا.

Types of Chromatography

1) يعتمد التقسيم الأساسي لتقنيات الكروماتوغرافيا على نوع الطور المتحرك المستخدم في النظام:

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
1-	Gas chromatography (GC)	gas
2-	Liquid chromatograph (LC)	liquid

Subject _____ Day _____ Date _____

* It's qualitative and ~~quantitative~~ quantitative

Type(1) : GC (mobile phase is gas)

* المادة يجب أن تكون بحالة الغاز

* اذا ما كانت volatile بنسخنها عند ال injector point

* بستخدم inert gas مثل mobile SAr, He

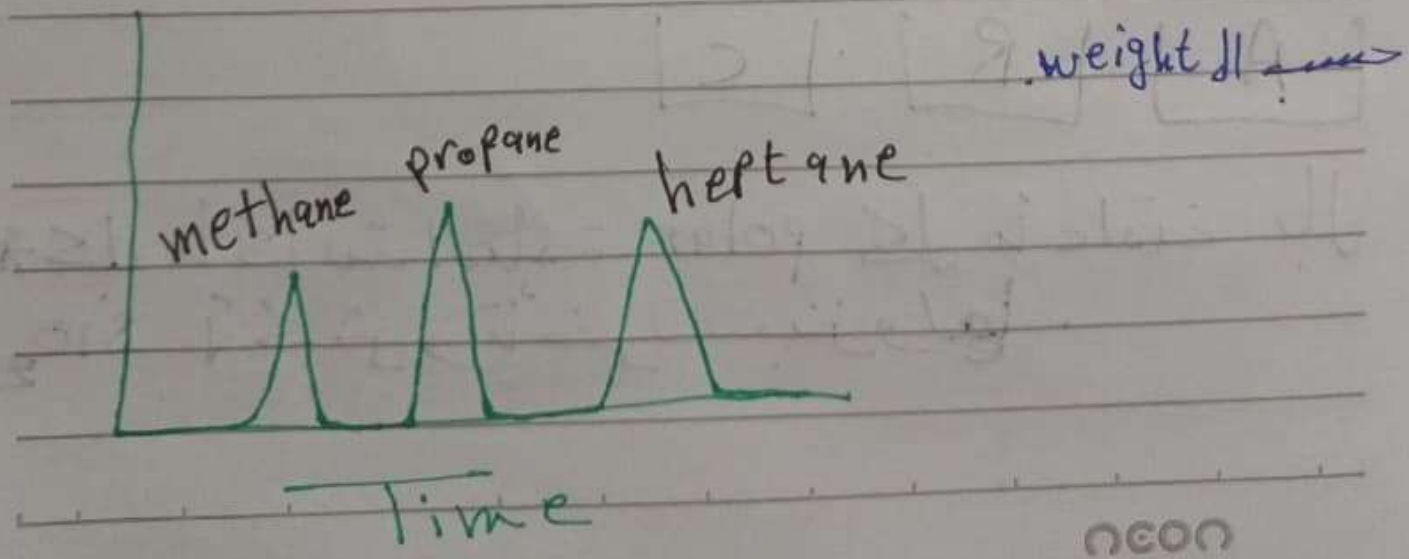
* Stationary phase is a capillary.

* اللي رح يمشي أسرع هو ال mobile و الأول weight

* بستخدم بكثرة بال hydrocarbons

* for example: a Mixutre of methane, propane and heptane analyzed with GC using He as a mobile phase.

رتب ظهور هم.



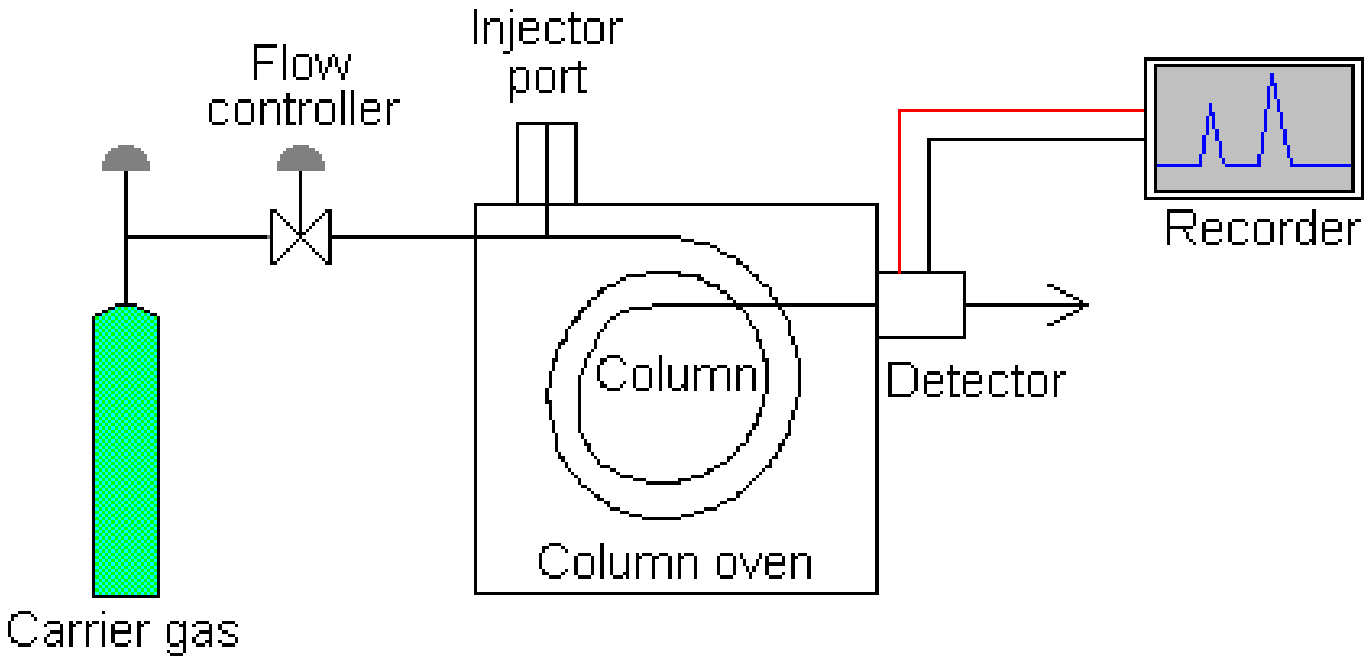
Types of Chromatography

2) يمكن إجراء تقسيمات إضافية بناءً على نوع الطور الثابت المستخدم في النظام:

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

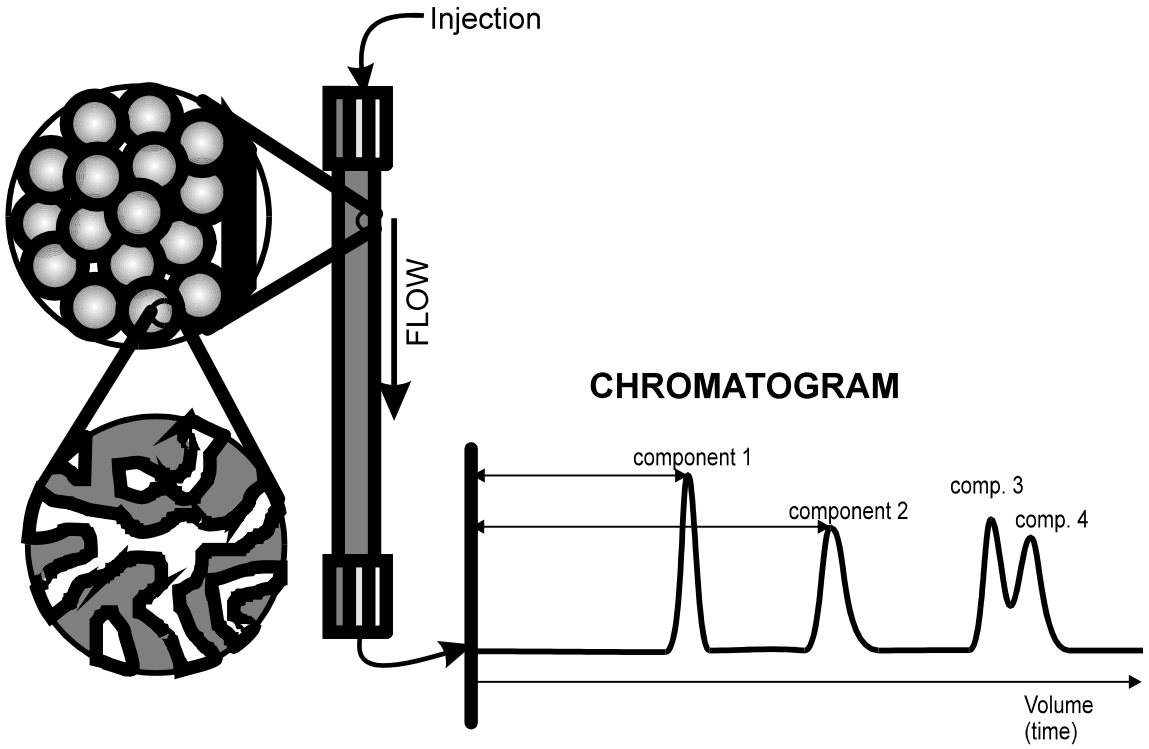
Gas Chromatography (GC)

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



Liquid Chromatography (LC)

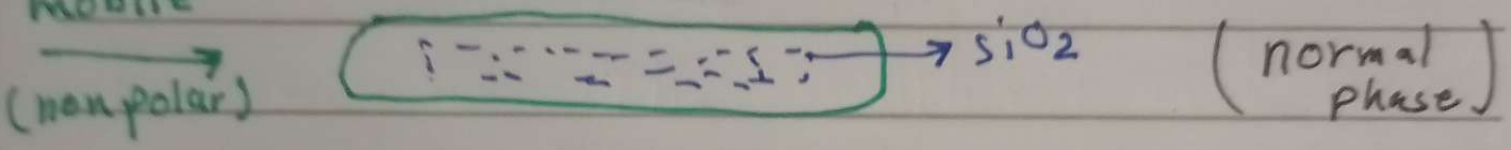
Name of LC Method	Type of Stationary Phase
Adsorption chromatography	solid, underivatized support
Partition chromatography	liquid-coated or derivatized support
Ion-exchange chromatography	support containing fixed charges
Size exclusion chromatography	porous support
Affinity chromatography	support with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



Subject _____ Day _____ Date _____

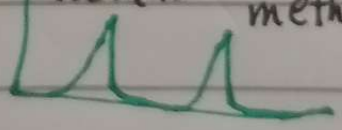
Type 2: LC (liquid is the mobile phase)

* stationary phase is cylinder packed with SiO_2 (Polar)
* mobile phase is liquid



* ال polar بمسك بال SiO_2 ولذلك بتأخر على عكس ال nonpolar .

ex: A mixture of methanol and hexane analyzed with LC using a non polar mobile phase.

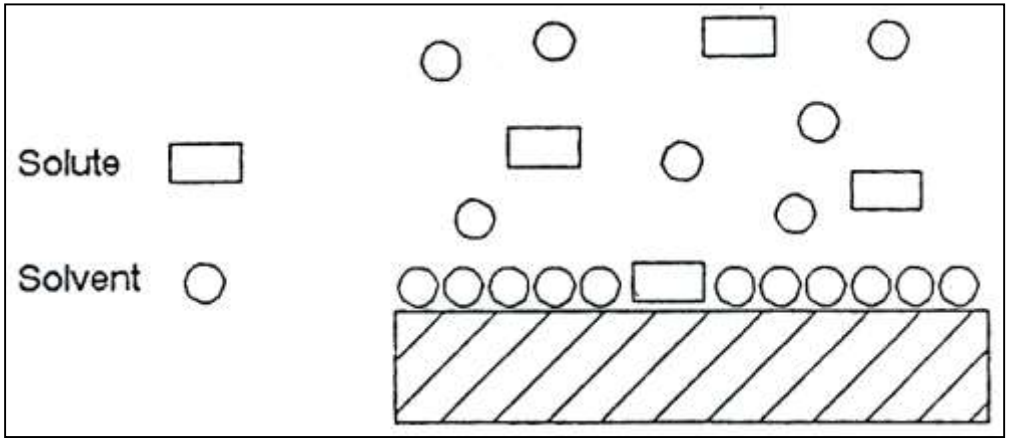


Adsorption Chromatography

الفصل القائم على امتزاز
المواد على سطح مادة
صلبة (الطور الثابت).

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

بقدر استنتج من الرسمه انه هون ال solute هو nonpolar بحالة
ال normal phase لانه التصاقه قليل بال stationary



Normal phase-like separation

Nonpolar mobile phase for polar, non-ionic compounds

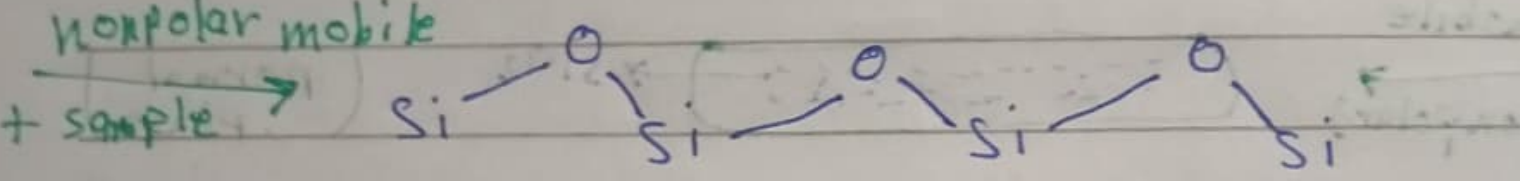
طور متحرك غير قطبي للمركبات
القطبية غير الأيونية

Ex; Column chromatography TLC, HPLC

Subject _____ Day _____ Date _____

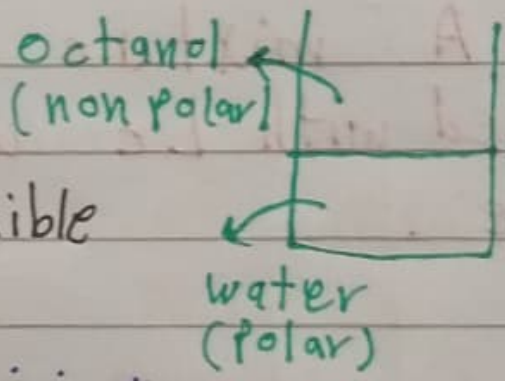
① Adsorption

* normal phase → SiO_2 (polar) (stationary)
→ nonpolar mobile



* لل polar اذ طلا .

② partition



* Test tube with 2 immisible liquids.

* تنظيف sample فيها polar and nonpolar

* ال polar بنوب بال water (polar) .

* ال nonpolar بنوب بال octanol .

* partition coefficient log P

$$\log P = \frac{[\ ]_{octanol}}{[\ ]_{water}}$$

اذا logP اعلى من 4 المادة toxic

If $\log P > 1 \longrightarrow$ nonpolar

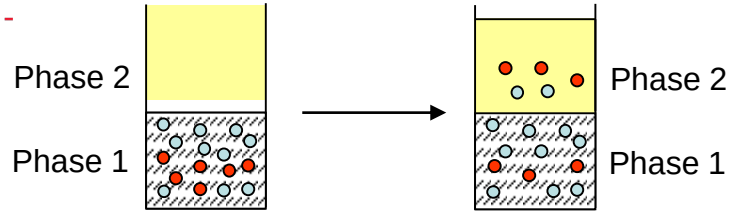
If $\log P < 1 \longrightarrow$ polar

Partition Chromatography

يتم فصل المواد المذاب بناءً على توزيعها بين طور متحرك سائل وطور ثابت سائل مُغطى على دعامة صلبة.

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

- عادي: المادة المراد تحليلها عضوية غير قطبية، والطور الثابت أكثر قطبية من الطور المتحرك.



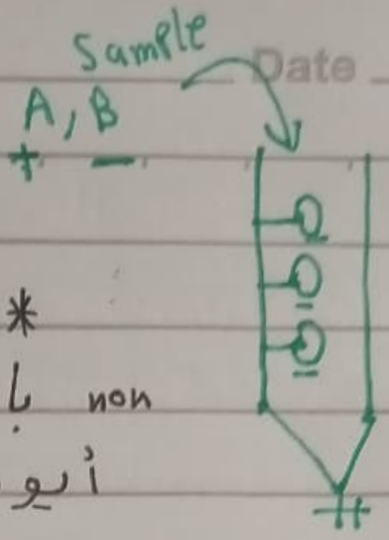
- Normal – analyte is nonpolar organic; stationary phase MORE polar than the mobile phase
- Ex : TLC, Paper Chromatography

- Reverse – analyte is polar organic; stationary phase LESS polar than the mobile phase
- Ex : HPLC

- عكسي - المادة المراد تحليلها عضوية قطبية، الطور الثابت أقل قطبية من الطور المتحرك - مثال: HPLC

Subject _____ Day _____ Date _____

③ Ion exchange



* بعد ما حللنا العينة ل Polar و بال partition ممكن يكون عينة polar فيها non أيونات + و − فبدي أفصلهم

* The resin → acidic (−) → الشحنة الموجبة بتمسك بال resin

→ basic (+) → الشحنة السالبة بتمسك بال resin

* في المثال اللي عنا بالرسمة ال resin سالب فالشحنات السالبة (B) بتنزل بسرعة بسبب قوى التنافر والشحنات الموجبة (A) تتجاذب مع ال resin

* عشان أسترجع الشحنات الموجبة بضيف wate حيث أخلي ال pH=7 و تنزل الشحنات الموجبة

Ion Exchange Chromatography

استخدام طور ثابت أيوني

- Use ionic stationary phase

يتم فصل الأيونات بناءً على ميلها لإزاحة الأيونات المقابلة الممتصة على الطور الثابت (يعتمد على الشحنة، والترطيب، و"الذوبانية").

  - 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.

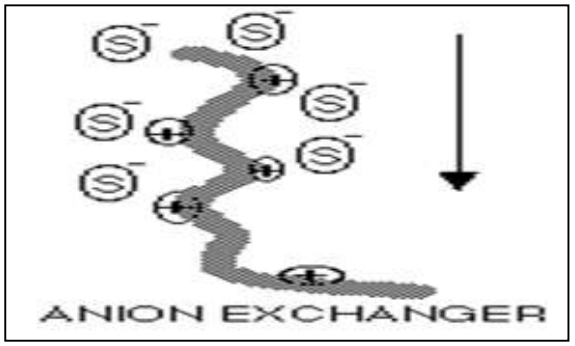
- يُستخدم لتحليل الأحماض الأمينية وقواعدها.

- Anionic stationary phases: used for cation separation
- Cationic stationary phases : for anion separation for ionic compounds

الأطوار الثابتة الأنيونية: تُستخدم لفصل الكاتيونات.

- Ex : HPLC

الأطوار الثابتة الكاتيونية: لفصل الأنيونات للمركبات الأيونية.



Size Exclusion Chromatography

الفصل هو نتيجة "احتجاز" الجزيئات في مسام مادة التعبئة

- 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

الجزيئات الكبيرة جدًا لا تستطيع الدخول إلى المسام - غير محتجزة.

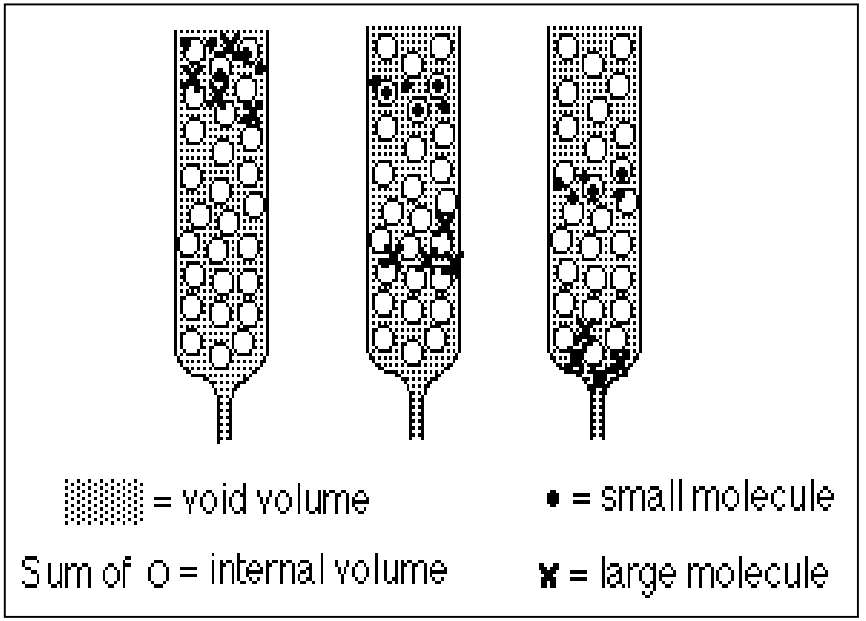
- Very small molecules get hung up in to pores for a long time - most retained – longest retention time

الجزيئات الصغيرة جدًا تعلق في المسام لفترة طويلة - الأكثر احتجازًا - أطول وقت احتجاز

- stationary phase is a porous matrix

الطور الثابت عبارة عن مصفوفة مسامية.

- Ex: GC, HPLC



Subject _____ Day _____ Date _____

④ size Exclusion

* بعد ما فصلتهم لنفس الحنات بس مختلفين بالحجم

* stationary phase ⟶ porous on normal pressure.

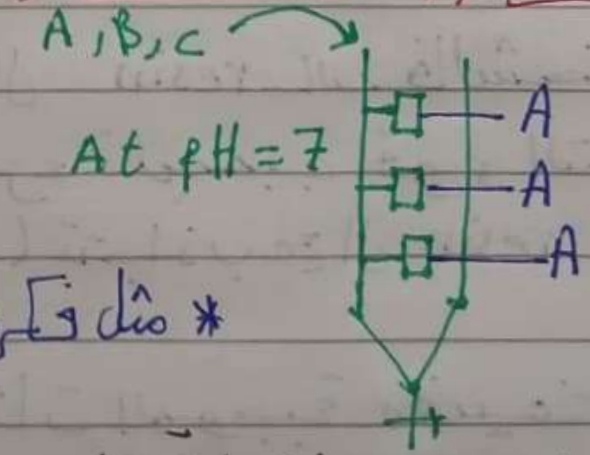
* الجزيئات الكبيرة يخرج ما بين ال porous أما الصغيرة رح تعلق (trapped) بال porous .

* عشان أسترجع الصغيرة بزيد ال pressure .

---

⑤ Affinity

(different virals)

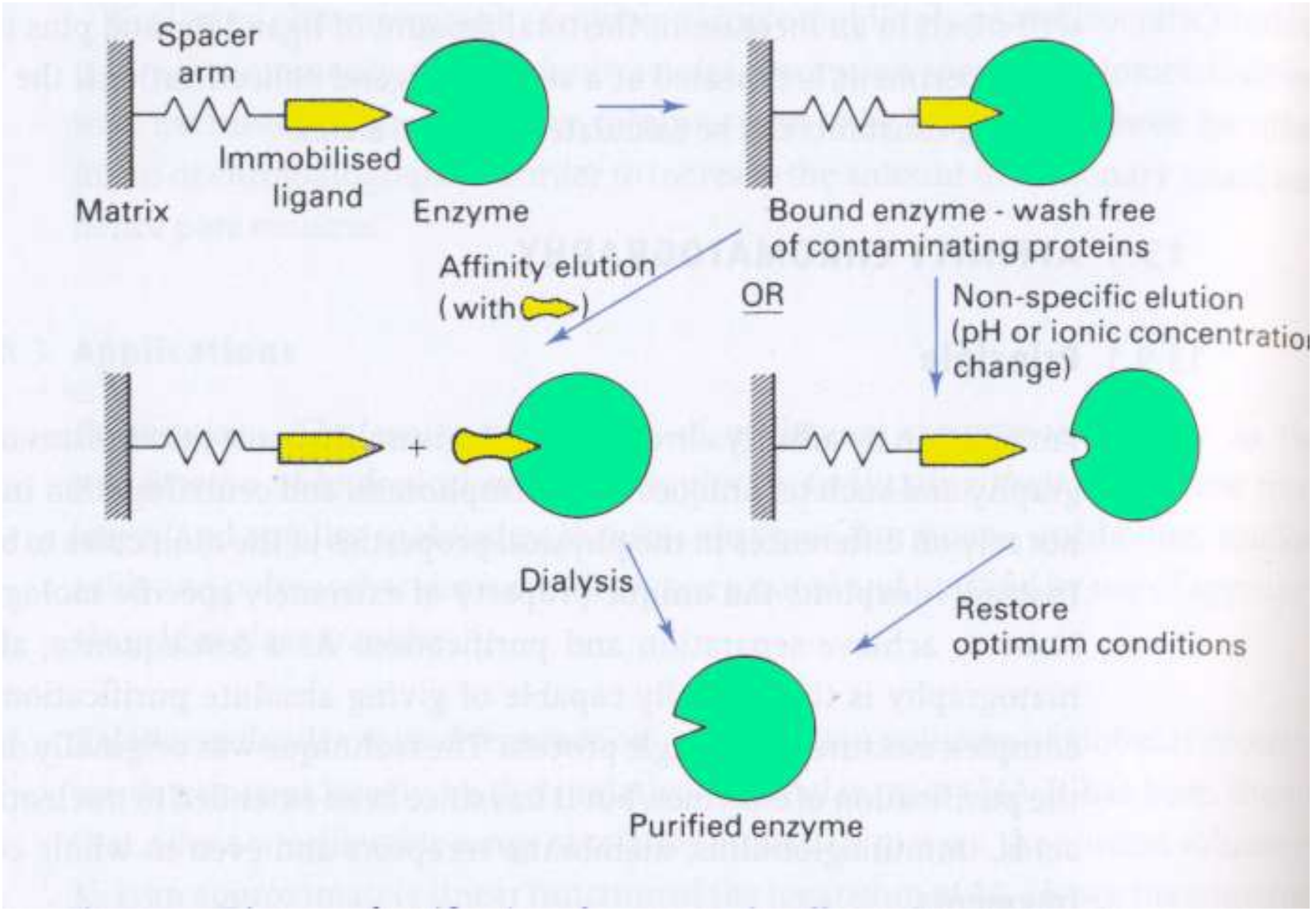


* مثل فكرة ال enzymes و ال active sites

* بنحط مواقع نشطة تناسب شكل ال viral اللي بدي ياه مثل A هون فـ A بعلق و B, C بخرجوا.

* عشان أسترجع A بغير ال pH مثلاً pH=9 فبتغير الموقع النشط ⇦ وبخلك .

Affinity chromatography

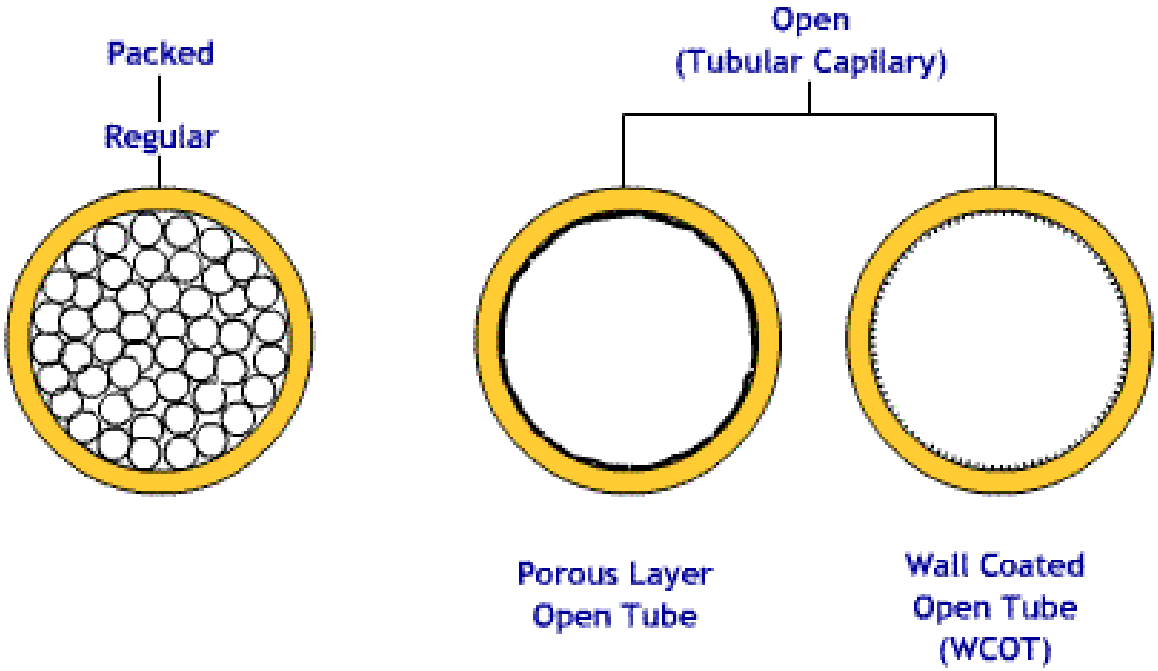


3) يمكن أيضًا تصنيف تقنيات الكروماتوغرافيا بناءً على نوع مادة الدعم المستخدمة في النظام:

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

1- **Packed bed (column) chromatography**
2- **Open tubular (capillary) chromatography**
3- **Open bed (planar) chromatography**

كروماتوغرافيا السرير المعبأ (العمود)
كروماتوغرافيا الأنبوب المفتوح (الشعيري)
كروماتوغرافيا السرير المفتوح (المستوي)



Some chromatography terms

Analyte

•Substance that is to be separated during chromatography

• المادة المراد فصلها أثناء الكروماتوغرافيا

Immobilized phase stationary

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

• الطور الثابت المثبت على جزيئات الدعم أو على الجدار الداخلي لأنبوب العمود

Mobile phase

• الطور الذي يتحرك في اتجاه محدد. (سائل/غاز/مائع).

•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.

• يتكون من العينة المراد فصلها/تحليلها والمذيب الذي ينقل العينة عبر العمود.

Effluent

•Mobile phase leaving the column.

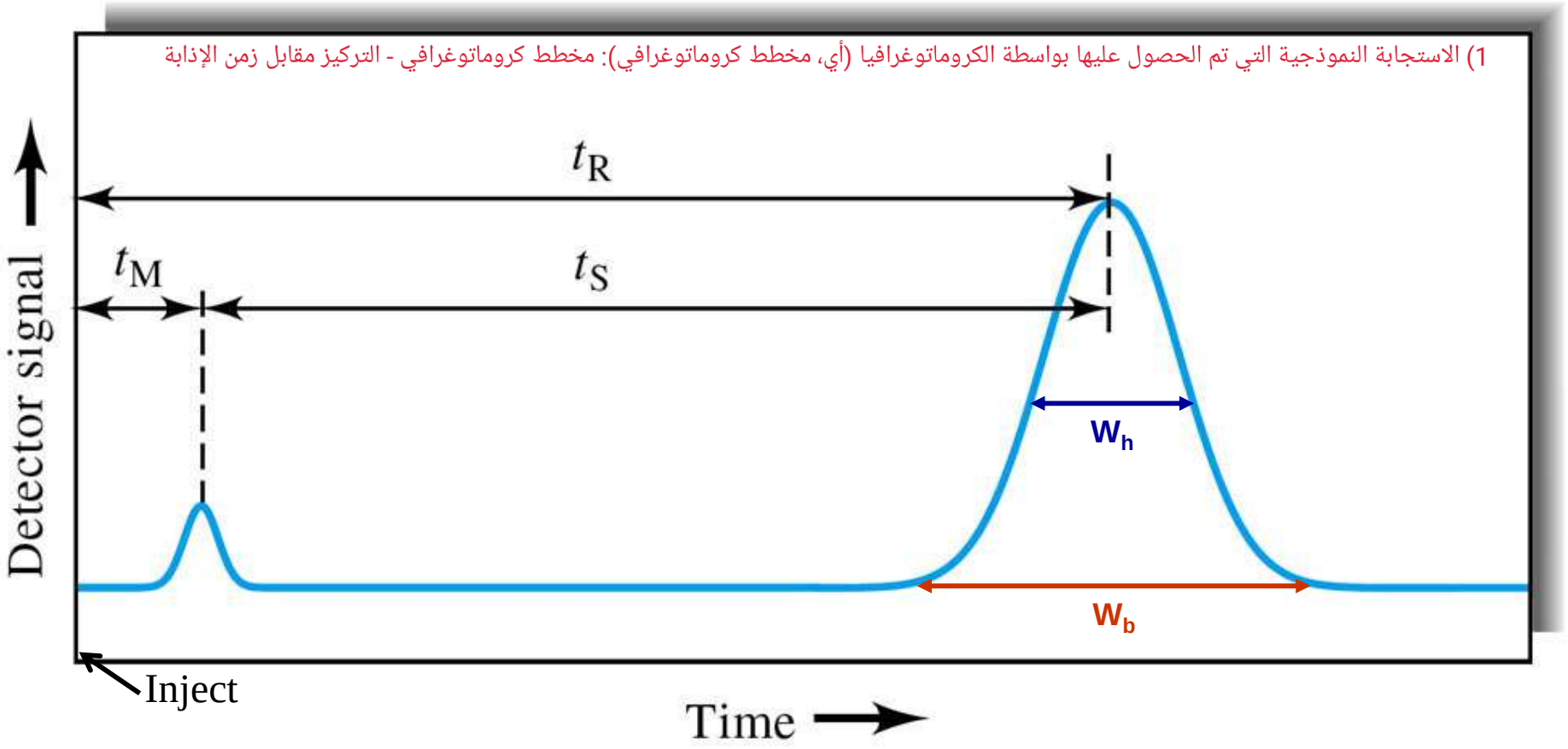
• الطور المتحرك الخارج من العمود.

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

الإذابة: هي عملية إزالة المادة المراد تحليلها من الطور الثابت بواسطة الطور المتحرك

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

chromatogram - concentration versus elution time



Where:

t_R = retention time t_S = solute retention time

t_M = void time

W_b = baseline width of the peak in time units

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

High performance liquid chromatography

يُعدّ HPLC امتدادًا للكروماتوغرافيا السائلة التقليدية.

- HPLC is an extension of conventional liquid chromatography.

• أداة قوية في التقنيات التحليلية

- 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.

• يتم تعبئة الأعمدة بإحكام، ويتم دفع المذيب عبر العمود تحت ضغط عالٍ (يصل إلى 5000 رطل لكل بوصة مربعة) بواسطة مضخة.

• يسمح باستخدام حجم جسيمات أصغر بكثير لمادة تعبئة العمود، مما يوفر مساحة سطح أكبر بكثير للتفاعلات بين الطور الثابت والجزيئات المتدفقة من خلاله.

- 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.

• يسمح بفصل أفضل بكثير لمكونات الخليط.

HPLC can classify base on elution method

نسب وانواع ال mobile phase ثابته طول ال run

Isocratic

نسب وانواع ال mobile phase متغيرة اثناء ال run

Gradient

Liquid Chromatography: Adsorption chromatography

يبقى تركيب مذيب الطور المتحرك ثابتًا مع مرور الوقت • الأفضل للفصل البسيط

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

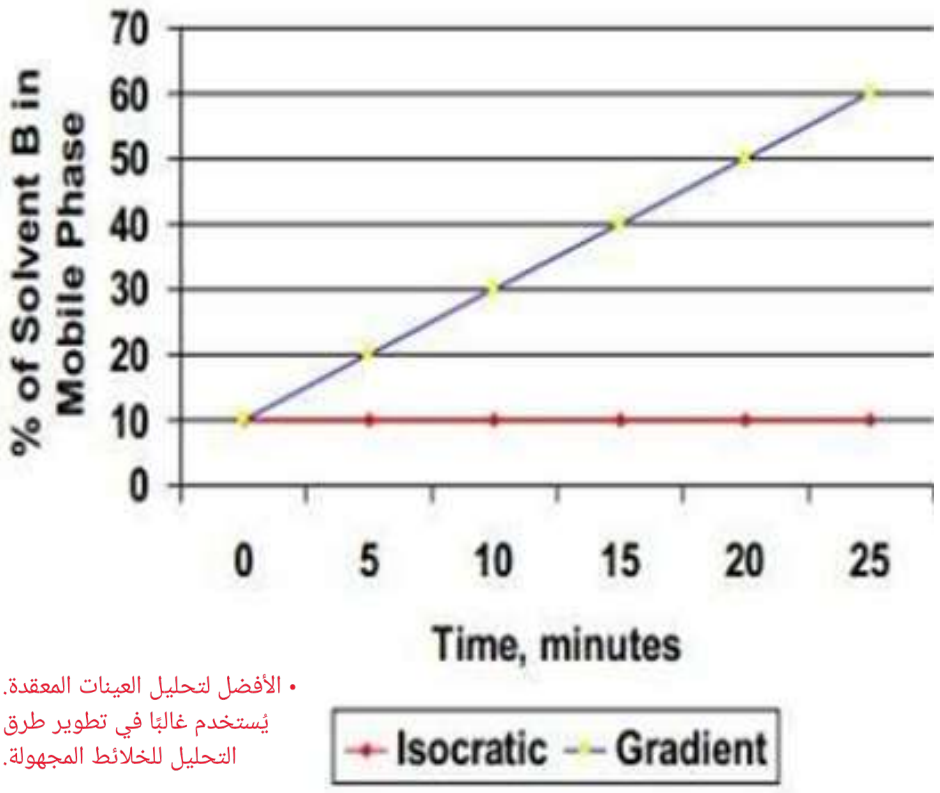
• تُستخدم غالبًا في تطبيقات مراقبة الجودة التي تدعم عملية التصنيع وتكون قريبة منها

Gradient

يزداد تركيب مذيب الطور المتحرك ("B") مع مرور الوقت

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)



• الأفضل لتحليل العينات المعقدة. يُستخدم غالبًا في تطوير طرق التحليل للخلائط المجهولة.

التدرجات الخطية هي الأكثر شيوعًا (على سبيل المثال، "التدرج" الموضح على اليمين)

HPLC can be classified based on separation mode to

1- الطور العادي، عندما يكون الطور الثابت أكثر قطبية من الطور المتحرك.

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

2- الطور العكسي، عندما يكون الطور المتحرك أكثر قطبية من الطور الثابت.

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

في كروماتوغرافيا الطور العكسي، يكون هلام السيليكا قطبيًا، ولاستخدامه في فصل الطور العكسي، يجب تغيير سطحه القطبي. يمكن تحقيق ذلك عن طريق إضافة مجموعات وظيفية مختلفة، مثل الهيدروكربونات، وخاصة C-٨ و C-١٨ (غير قطبية).

- **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).

- 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.

نتيجةً لذلك، نحصل على طور غير قطبي. يُستخدم هذا النوع أكثر من الطور العادي، ويعود سبب شيوعه إلى أن طوره المتحرك الضعيف هو الماء عالي القطبية، وبالتالي، تُطبق العينات في هذا الطور المتحرك الضعيف، أي في محاليل مائية، مثل المركبات البيولوجية.

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

هذا ما يجعله جذابًا بشكل خاص في الكيمياء السريرية لتأكيد الأدوية، وتحليل الأحماض الأمينية، وفصل الهرمونات.

Subject _____ Day _____ Date _____

* reverse phase in General :-

less polar [redacted] بحيث يصير Stationary ال بتحول
than mobile phase

بستخدم

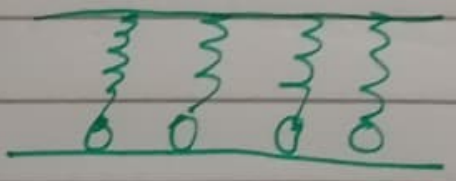
① Si–O–Si–C_{18}

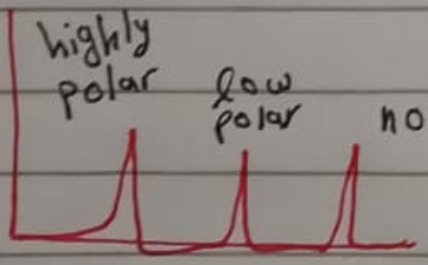
② Si–O–Si–C_8

③ Si–O–Si(–CH_3)(–CH_3)

* analyte is mixture of highly polar, low polar and non polar, mobile phase is methanol or H_2O (polar)

(polar) mobile + analyte →





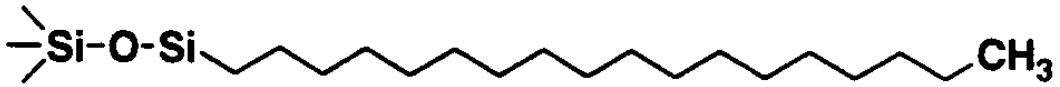
ترتيب خروجهم :

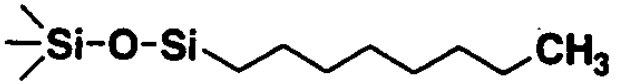
* مثال يخرج ال non polar بستخدم Asetonitrile (ACN)

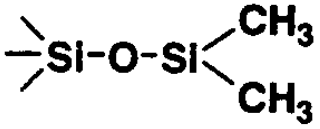
(non polar) $CH_3-C\equiv N$

neon

Common Reverse Phase (RP) Packings

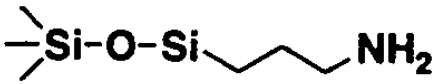
Octadecyl - 

Octyl - 

Dimethyl - 

NORMAL PHASE:

Cyanopropyl -

Aminopropyl - 

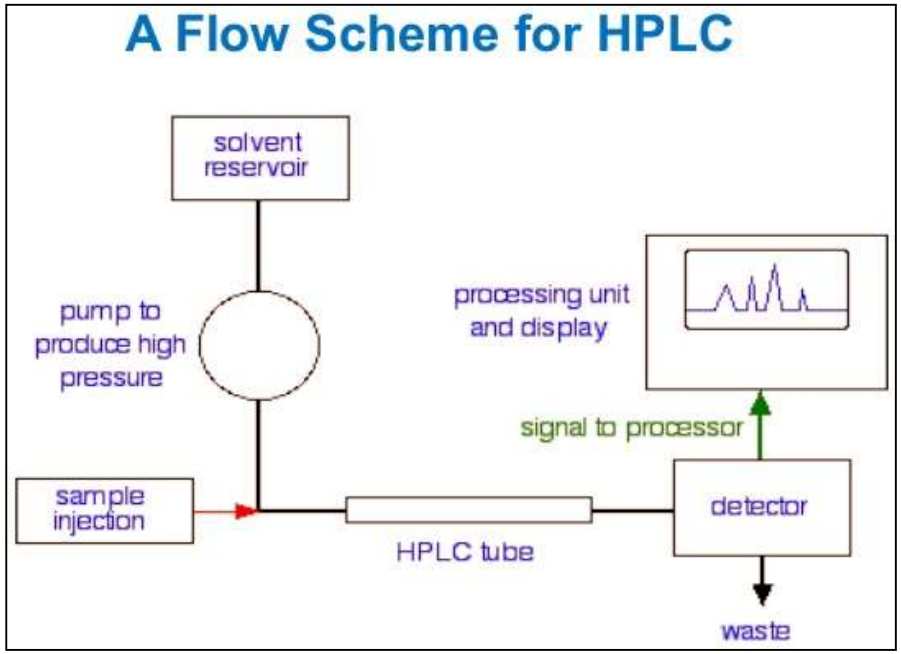
HPLC Technique

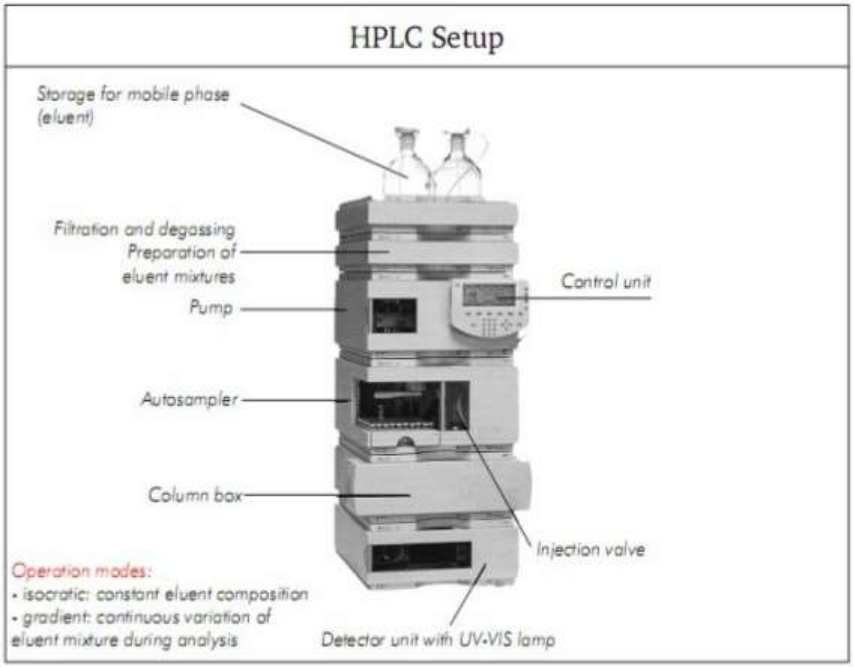
- Utilizes liquid mobile phase to separate the mixture
  - تستخدم طورًا متحركًا سائلًا لفصل الخليط
- Analytes are first dissolved in a solvent then through the column under high pressure of up to 400 atm
  - تُذاب المواد المراد تحليلها أولًا في مذيب، ثم تُمرر عبر العمود تحت ضغط عالٍ يصل إلى 400 ضغط جوي
- Mixture is resolved into its components in the column
  - يُفصل الخليط إلى مكوناته في العمود
- 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.
  - غالبًا ما يكون إجمالي وقت الفصل ٥ أو ١٠ دقائق، بدلًا من ساعات أو حتى أيام كما هو مطلوب في بعض عمليات الفصل بالتدفق الجاذبي باستخدام الأنظمة الأكبر حجمًا.

Components of HPLC

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

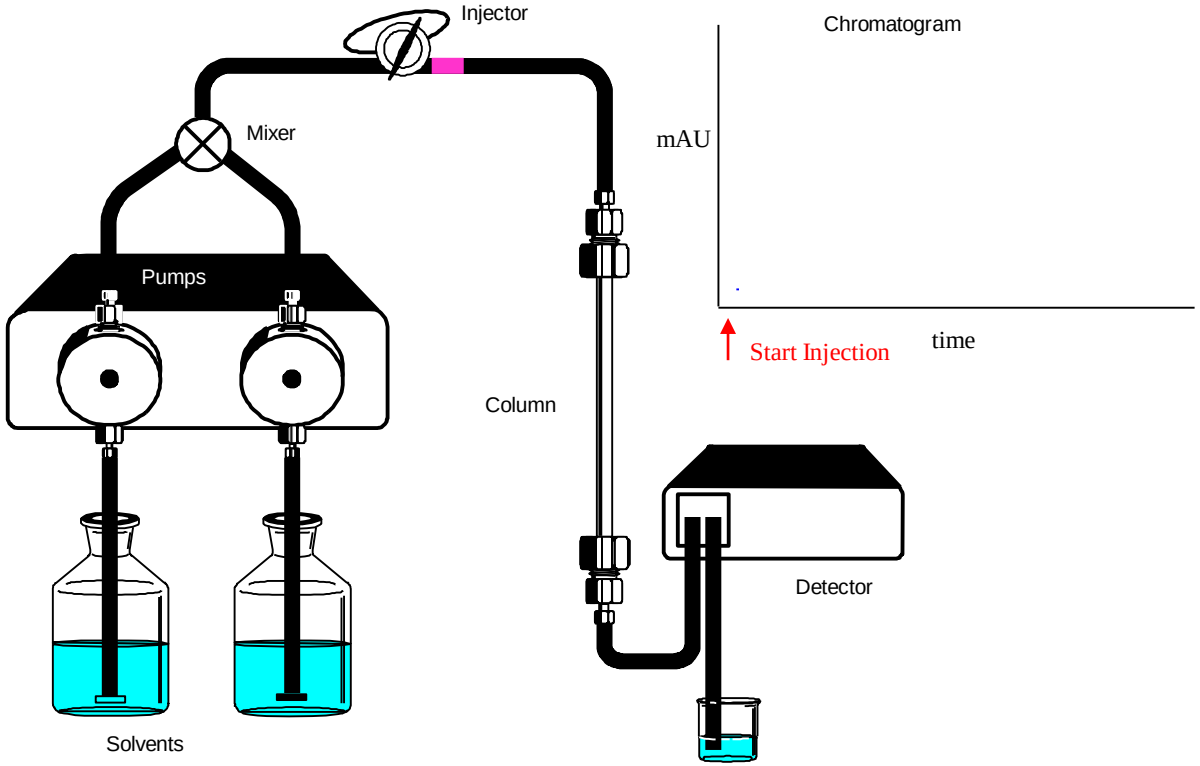
A Flow Scheme for HPLC





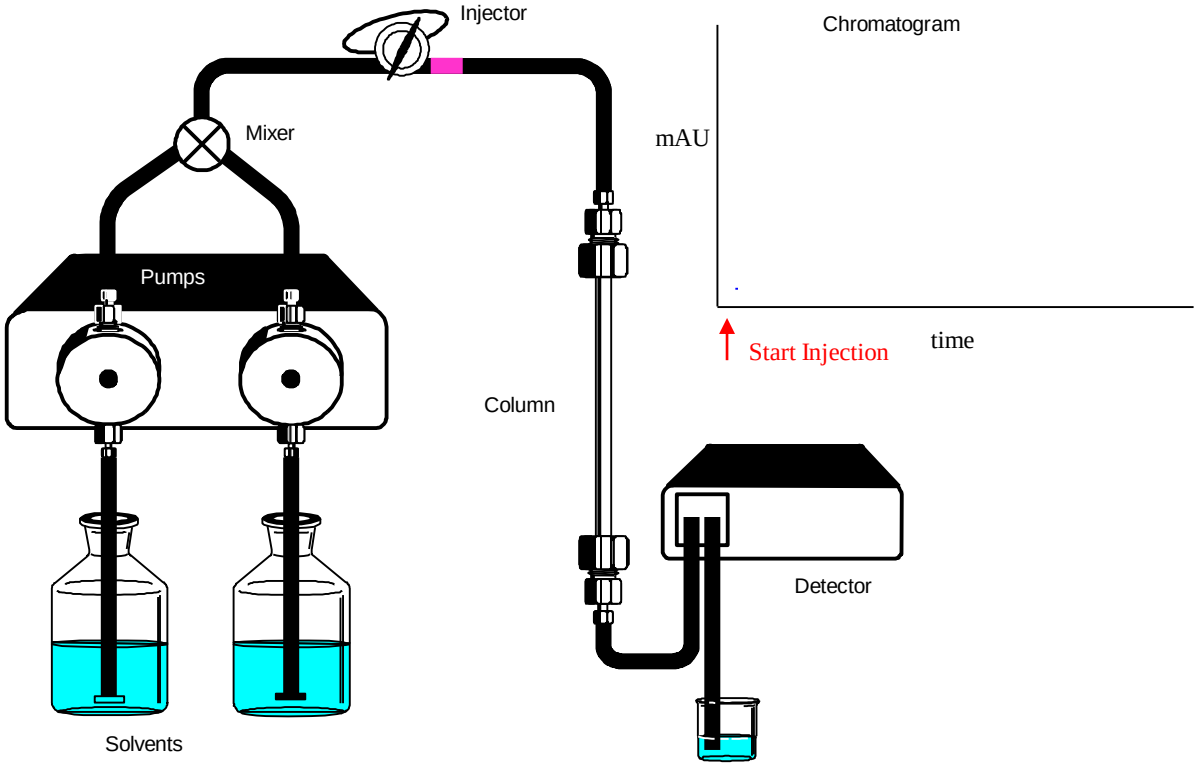
هاي السلايدات هي عبارة عن فيديو متحرك ف
هم نفسهم بس بورجينا كيف بشتغل

Separations

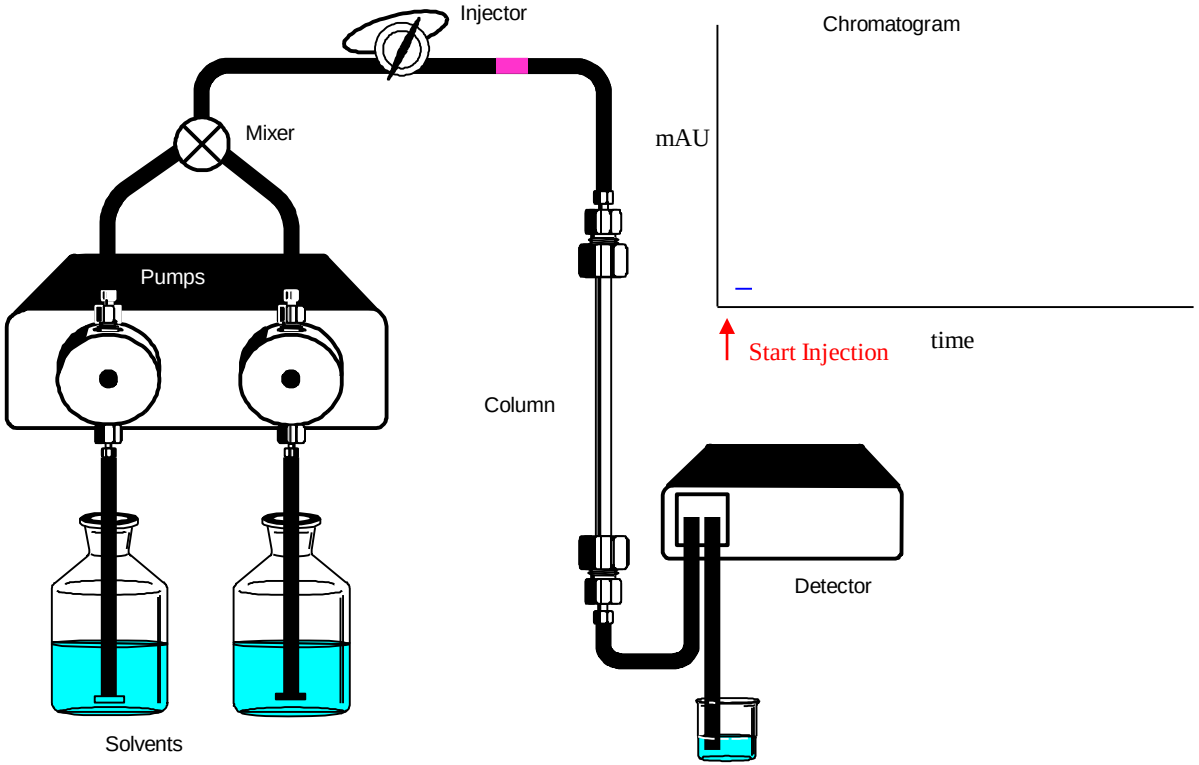


High Performance Liquid Chromatograph

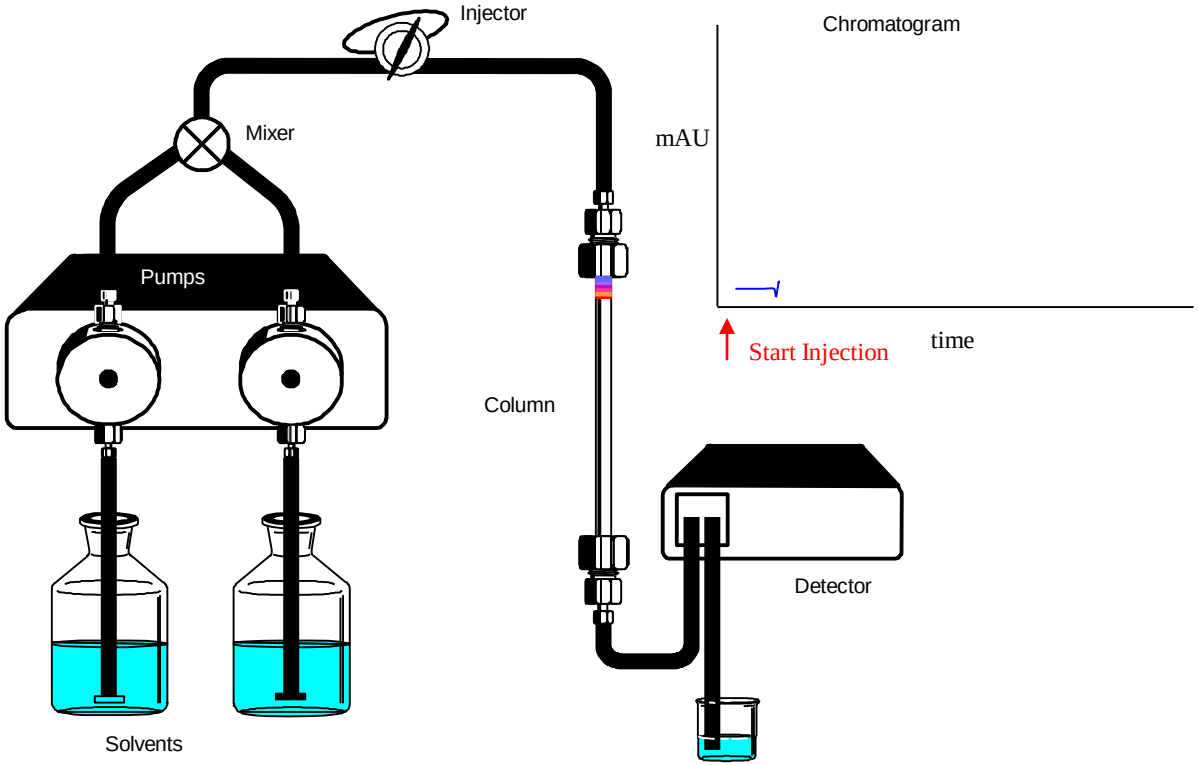
Separations



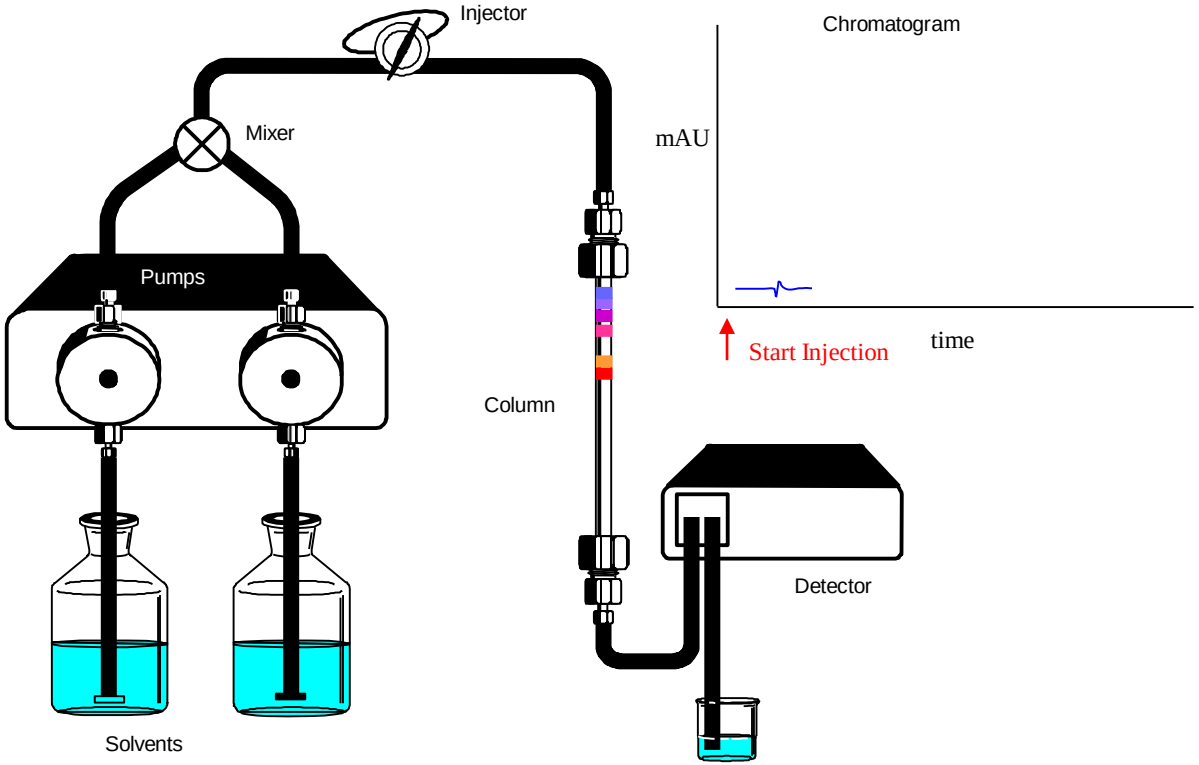
Separations



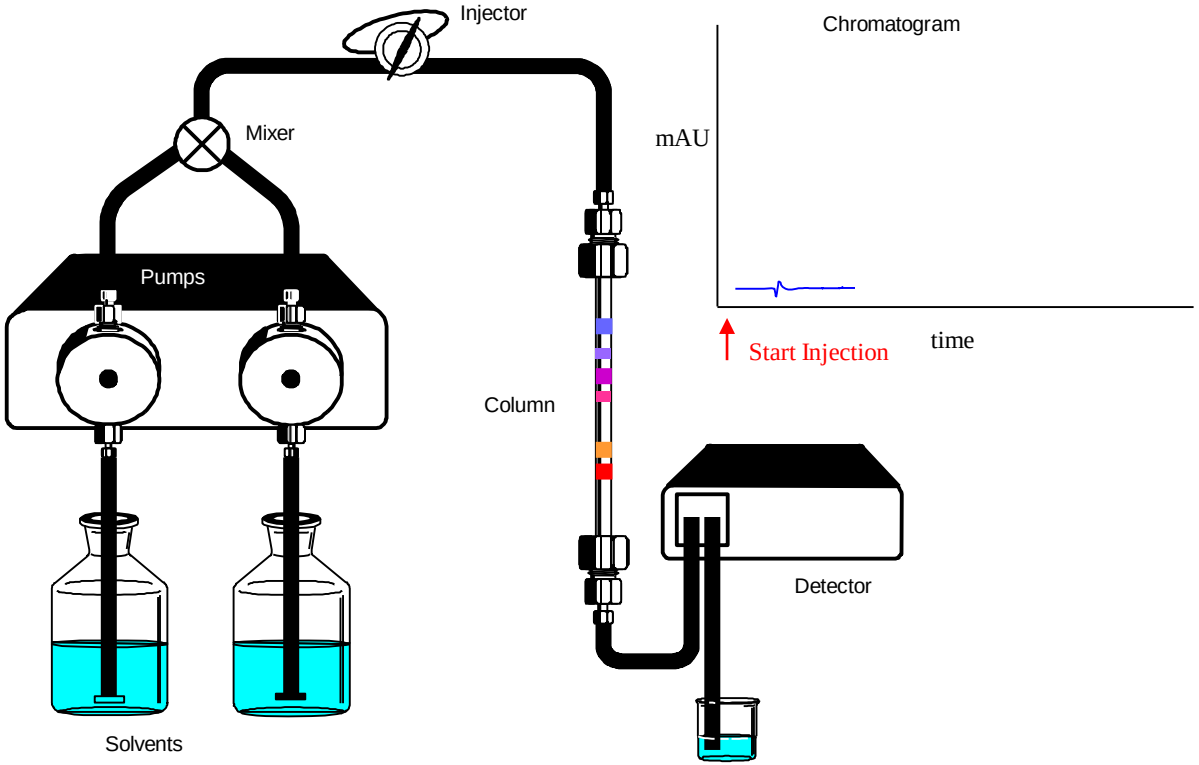
Separations



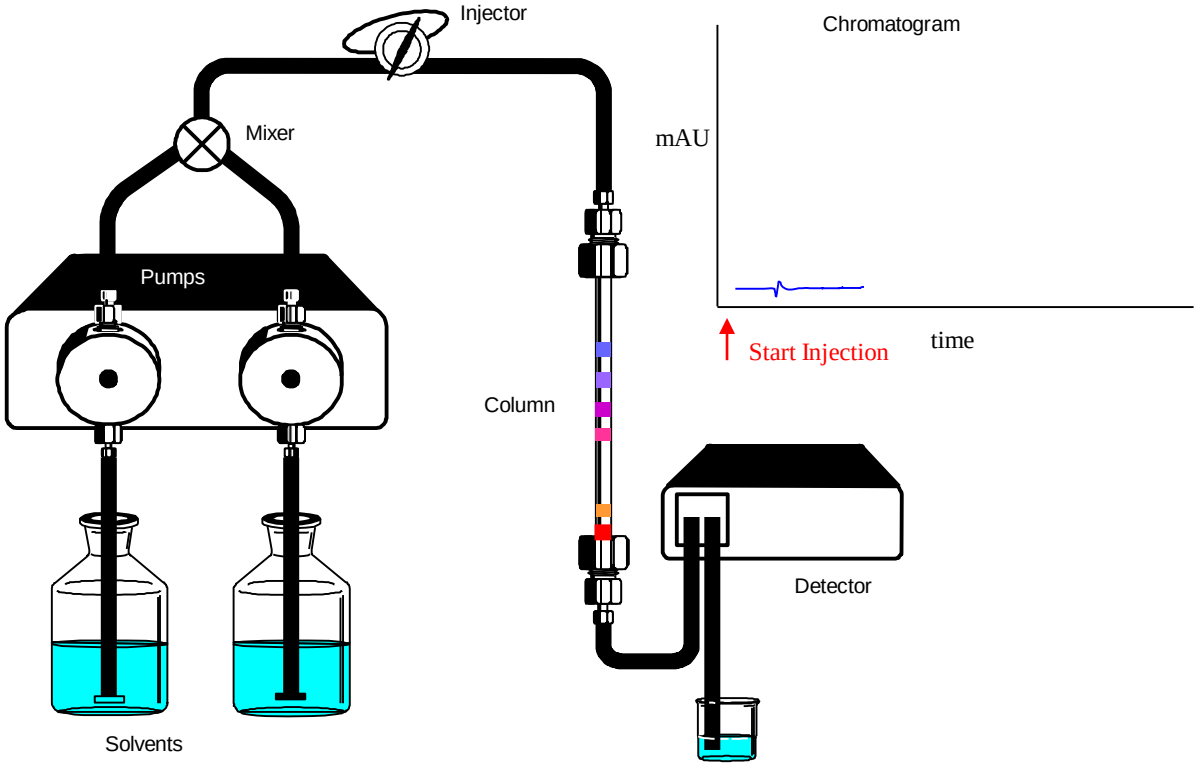
Separations



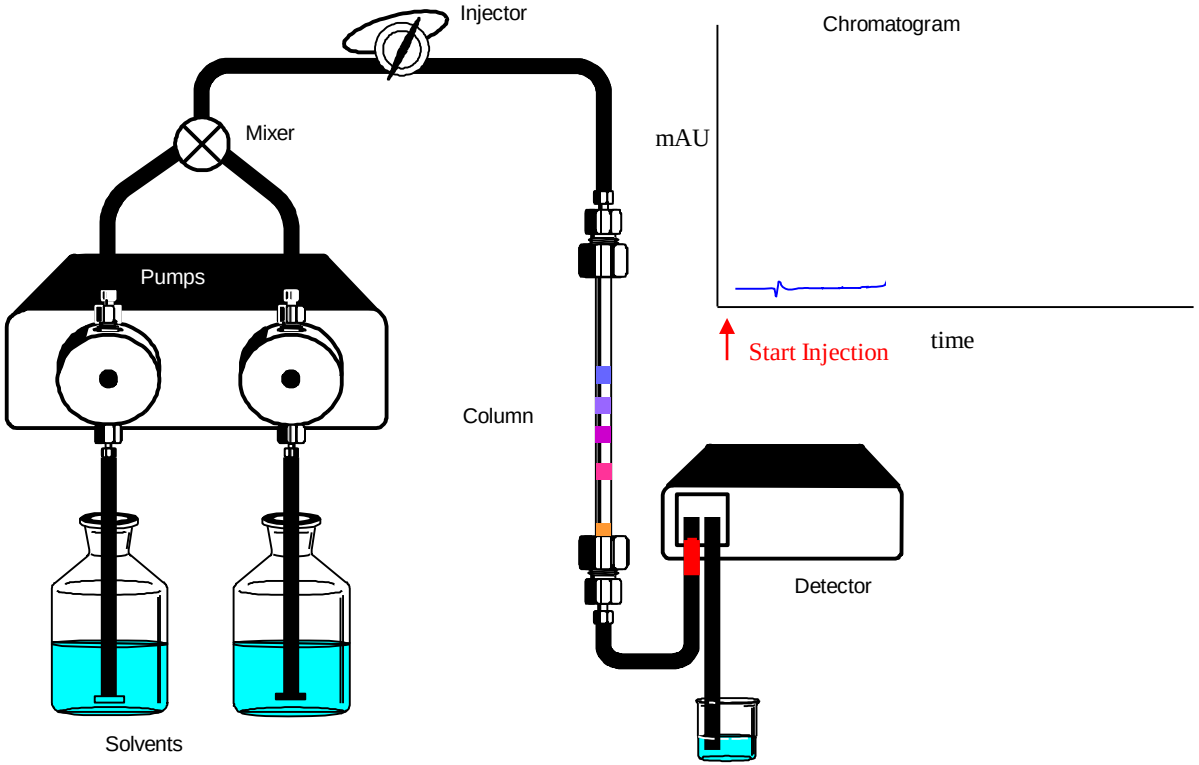
Separations



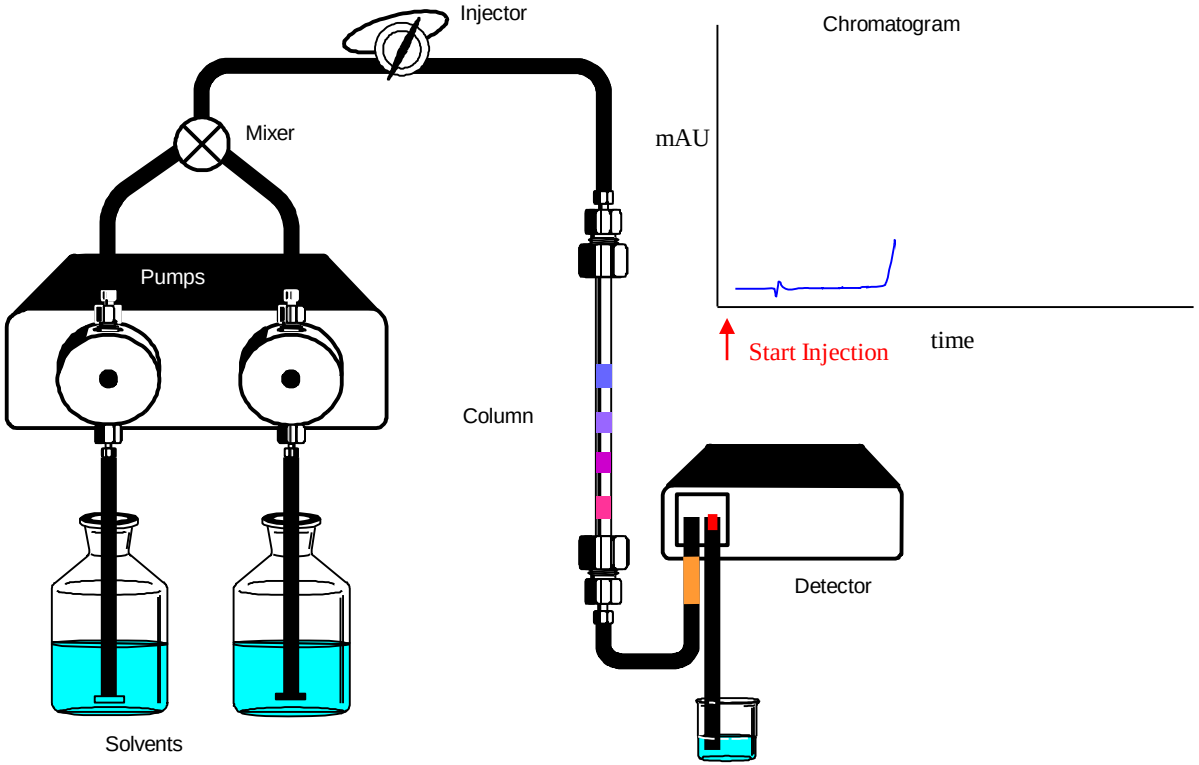
Separations



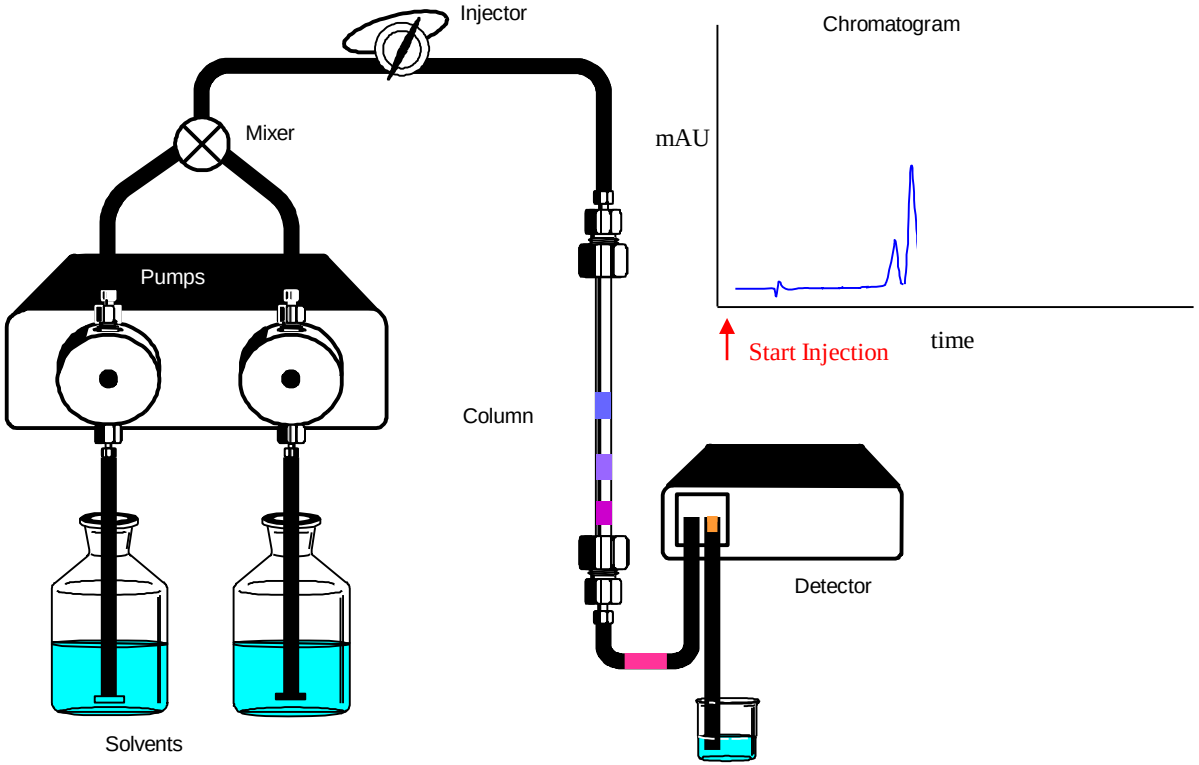
Separations



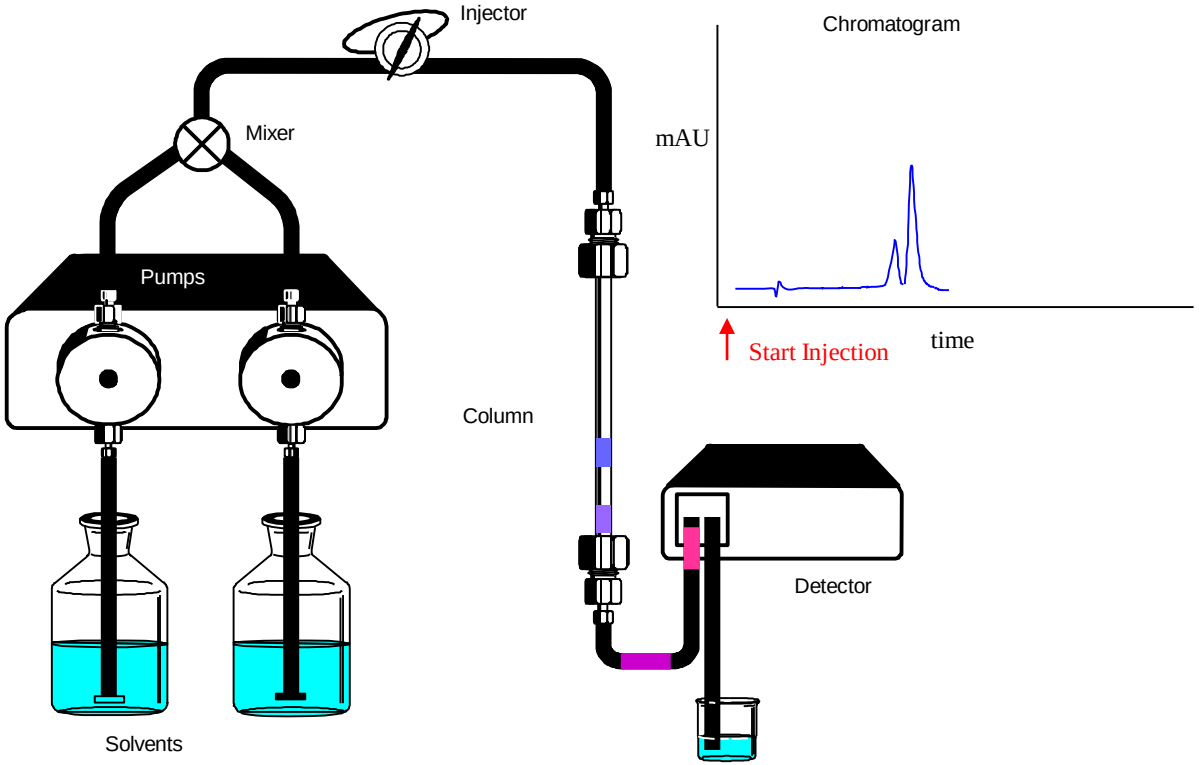
Separations



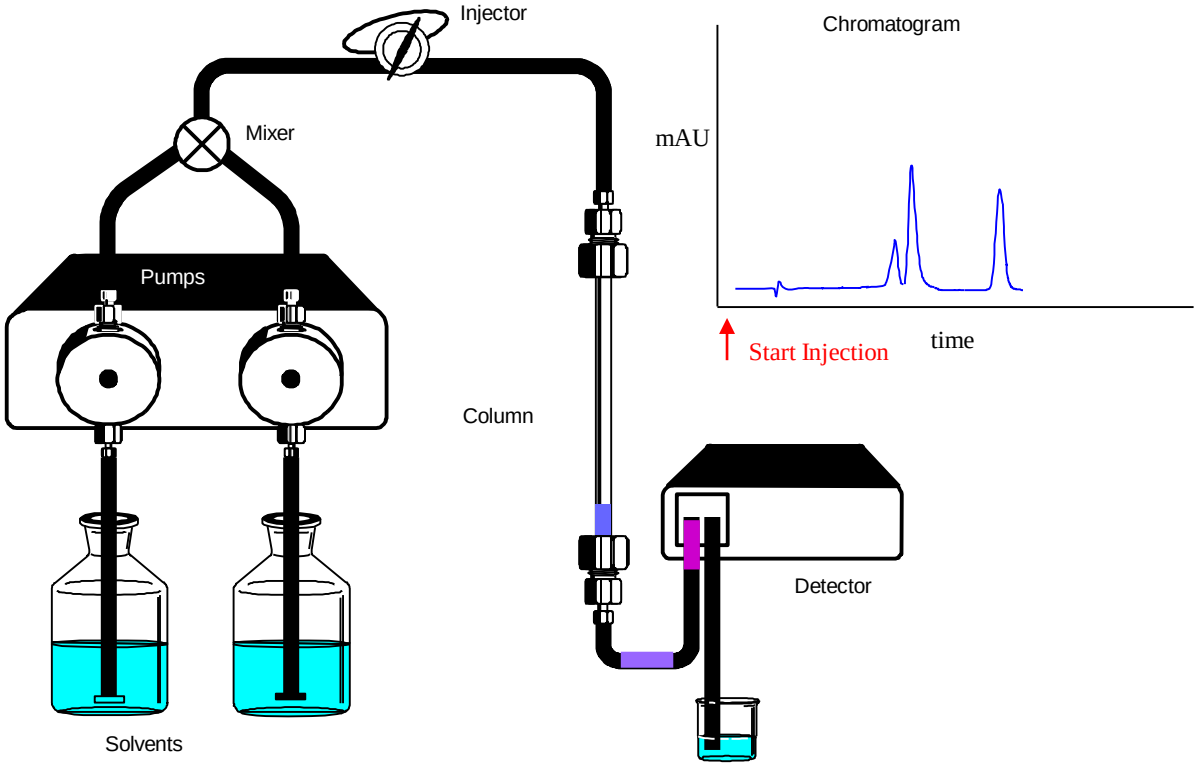
Separations



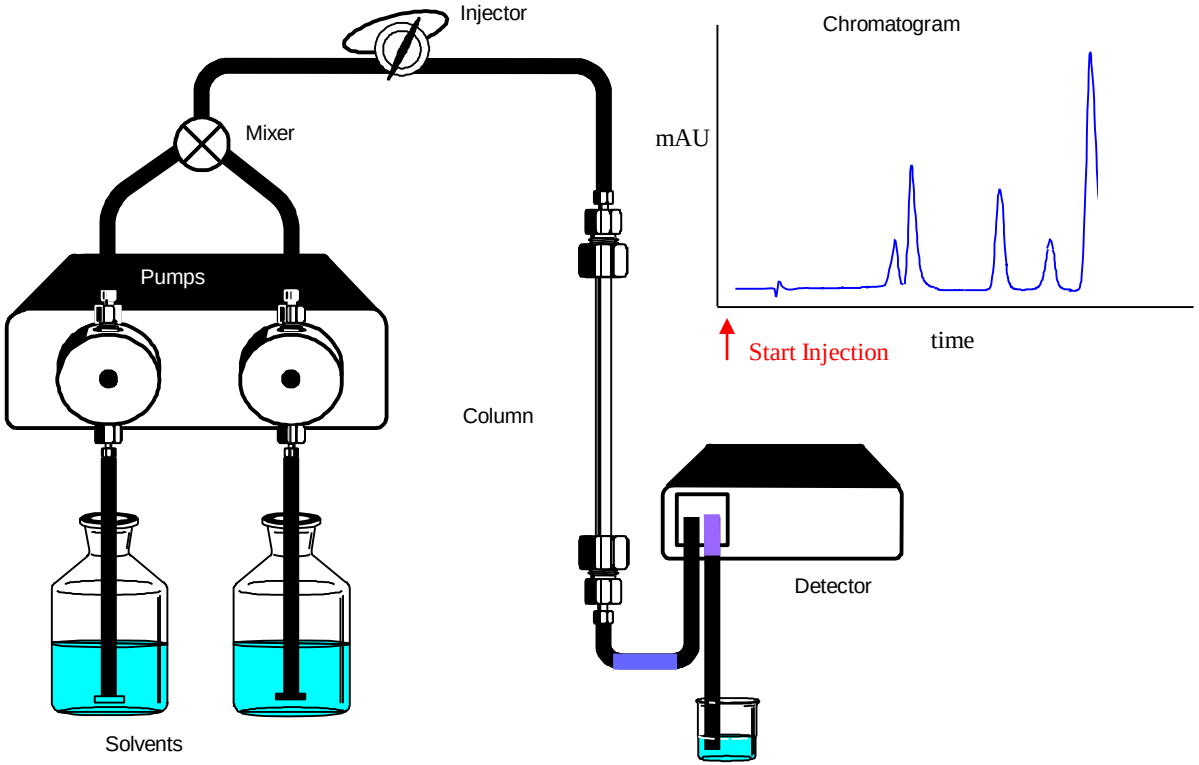
Separations



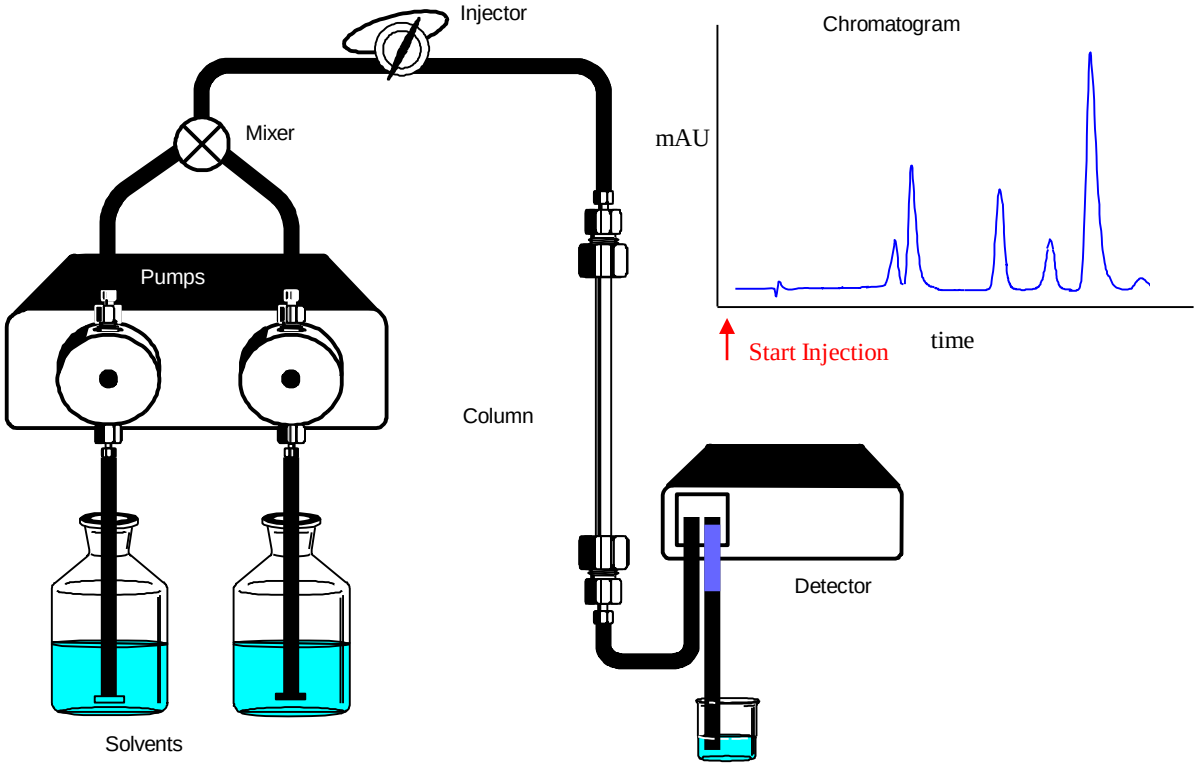
Separations



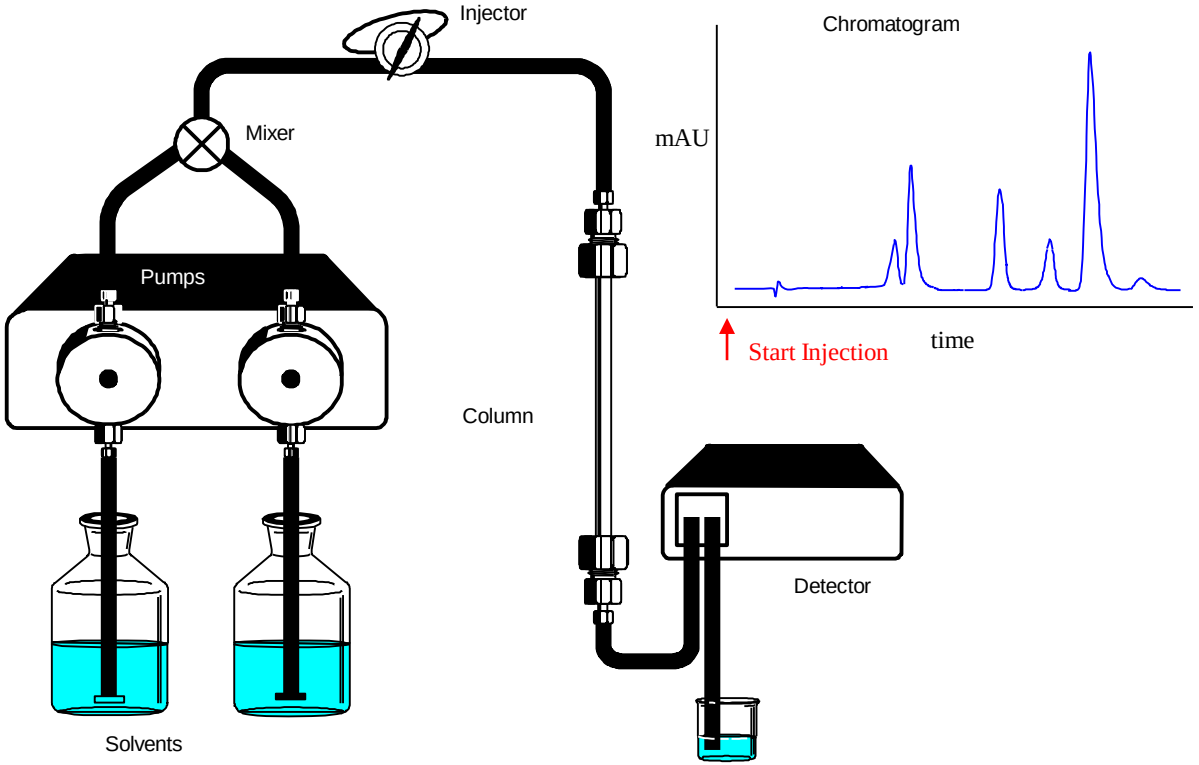
Separations



Separations



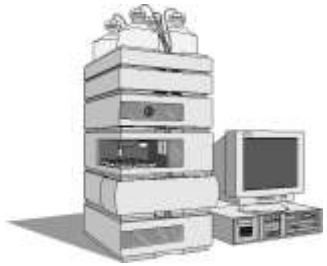
Separations

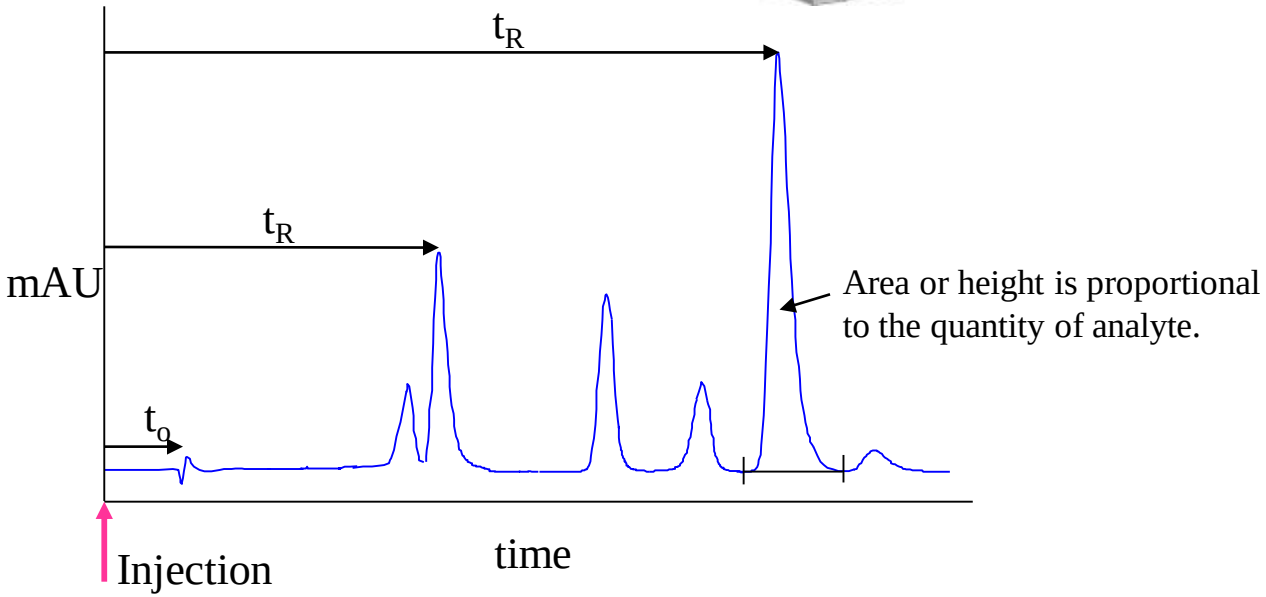


The Chromatogram

t_o - elution time of unretained peak

t_R- retention time - determines sample identity





مراقبة المواد التي قد تُعرّض السلامة أو الصحة المهنية للخطر
مراقبة مستويات المبيدات في البيئة.
لمسح المنتجات الغذائية والدوائية،
لتحديد المخدرات المصادرة
لتحديد كمية هذه المركبات الكيميائية الموجودة في الأدوية الجديدة في مجال الصيدلة

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

لقد تم تحسين التقنية الحديثة بشكل كبير من حيث الانتقائية والدقة، من خلال التصغير واستخدام أطوار ثابتة متطورة للغاية. لذلك، يُستخدم HPLC على نطاق واسع لفصل الجزيئات في العمليات البيولوجية والصيدلانية والغذائية والبيئية والصناعية

أعمدة من الفولاذ المقاوم للصدأ صغيرة القطر وقابلة لإعادة الاستخدام تعبئة الأعمدة بجزيئات صغيرة جدًا
التحكم في تدفق الطور المتحرك إدخال دقيق للعينة نظام ضخ جيد
كاشفات تدفق مستمر خاصة - يمكنها التعامل مع معدلات تدفق صغيرة والكشف عن كميات ضئيلة جدًا
تحليل سريع
دقة عالية

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

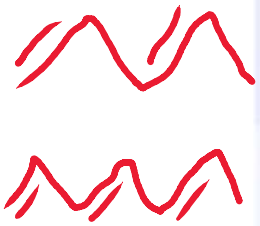
- Cost
- Complexity
- Low sensitivity for some compounds
- Irreversibly adsorbed compounds not detected
- Co-elution difficult to detect

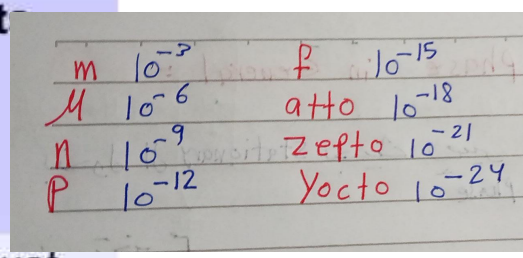
عيوب HPLC التكلفة التعقيد
حساسية منخفضة لبعض المركبات
لا يتم الكشف عن المركبات الممتزة بشكل غير قابل للانعكاس
يصعب الكشف عن التداخل في الذروة

Detectors used in HPLC

Type	Principle	Detection limit	Comment
Spectro-photometer	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

chromophore





Liquid Chromatography Instrumentation – Detectors

non-destructive
not universal
2π conjugated لانه بس بحلل الي فيه

Quartz cuvette فيها

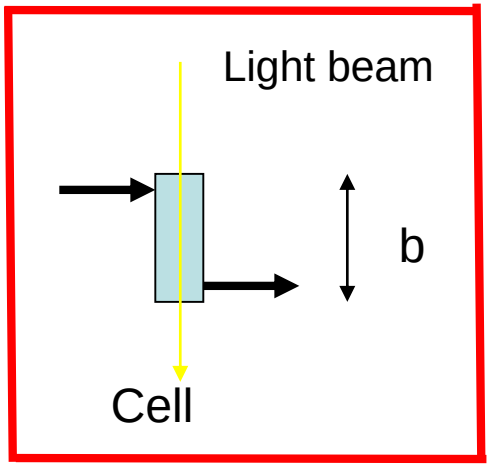
2π conjugated (2 chromophore) لازم المركب يحتوي على

• UV Absorption Detectors

النوع الأكثر شيوعًا من الكاشفات

- المبدأ: امتصاص الأشعة فوق البنفسجية (أو الضوء المرئي) يتبع قانون بير: شدة = A = -log(I/I,) = εbC • I (الضوء I, للعينة الفارغة) • معامل الامتصاص المولي = E • طول المسار = b • (ثابت) التركيز = C

– 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



– Best results for 0.001 < A < 1

أفضل النتائج لـ A<1 > 0.001

– Fast response – sensitivity trade off in path length (can select cell volumes)

استجابة سريعة - مفاضلة الحساسية في طول المسار (إمكانية اختيار أحجام الخلايا)

• UV Absorption Detectors

الحساسية للمركبات (قيم ε)

– Sensitivity to Compounds (ε values)

• الأفضل للمركبات ذات الروابط المزدوجة المترافقة، أو
مجموعات العطرية، أو المجموعات الوظيفية ذات الامتصاص
القوي (مثل R-NO، R-I، R-Br)

  - Best for compounds with conjugated double bonds, aromatic groups or strongly absorbing functional groups (e.g. R-NO_2, R-I, R-Br)
  - Poor response for compounds with few or weakly absorbing functional groups (worst for R-CN, R-NH_2, R-F; poor for R-OR', R-OH, R-COOH, R-COOR')

– Solvents:

• استجابة ضعيفة للمركبات ذات المجموعات الوظيفية القليلة أو ضعيفة الامتصاص (الأسوأ لـ R-F، R-NH، R-CN
وضعيفة لـ R-COOR، R-COOH، R-OH، R-OR'):

  - Requires use of solvents that absorb poorly in UV

• يتطلب استخدام مذيبات ذات امتصاص ضعيف في نطاق الأشعة فوق البنفسجية

يعني ال solvent المستخدم يفضل ما يحتوي على chromophore ويجب ما يحتوي على 2π conjugated

Absorbance detectors

كاشفات الأشعة فوق البنفسجية والمرئية

UV/Visible detectors

- Solute property detector

• كاشف خصائص المذاب

- Three types

كاشف الطول الموجي الثابت

maximum one wavelength – Fixed wavelength detector

maximum 3 wavelengths – Variable wavelength detector

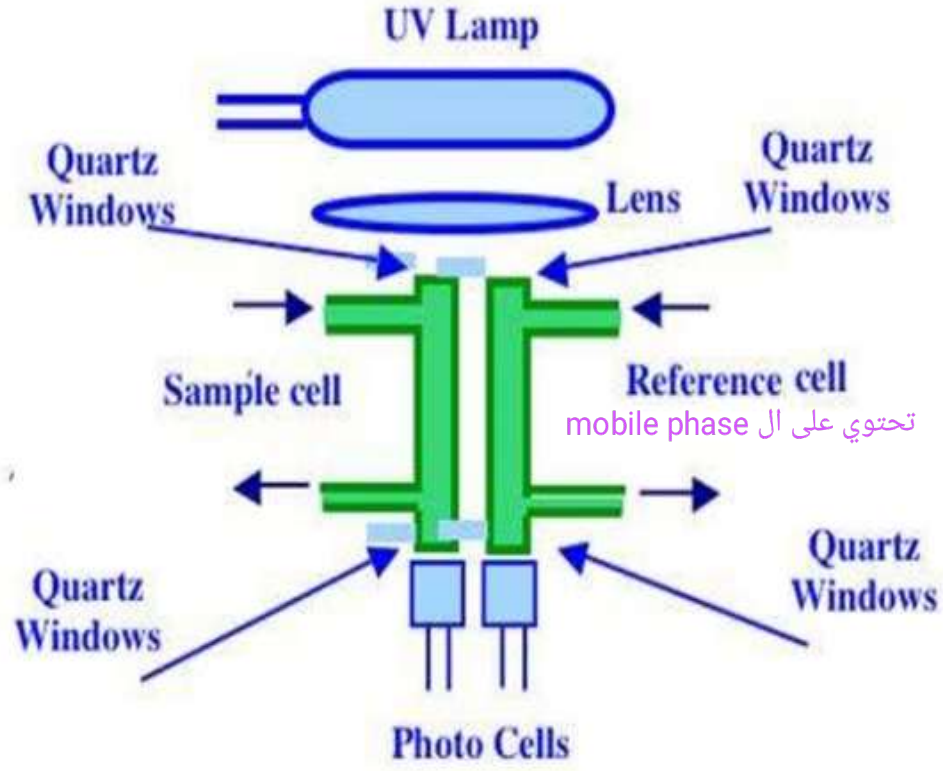
- كاشف طول موجي متغير

all wavelengths 200-800 – Diode array detector

- كاشف مصفوفة ثنائية

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.



• قدرة كشف أعلى.
•مصباح بخار الزئبق (مصباح تفريغ)
• تركيز الضوء من خلال خليتين امتصاص.
• حجم الخلية ثابت.

Variable Wavelength Detectors

• مطياف ضوئي للأشعة فوق البنفسجية والمرئية ذو نطاق تمرير واسع نسبيًا، موصول بنظام كروماتوغرافي.

- Relatively wide band pass UV-Visible spectrophotometer coupled to a chromatographic system.
- Offers a wide selection of UV & Visible wavelengths with increased cost.

يوفر مجموعة واسعة من أطوال موجات الأشعة فوق البنفسجية والمرئية، ولكن بتكلفة أعلى.

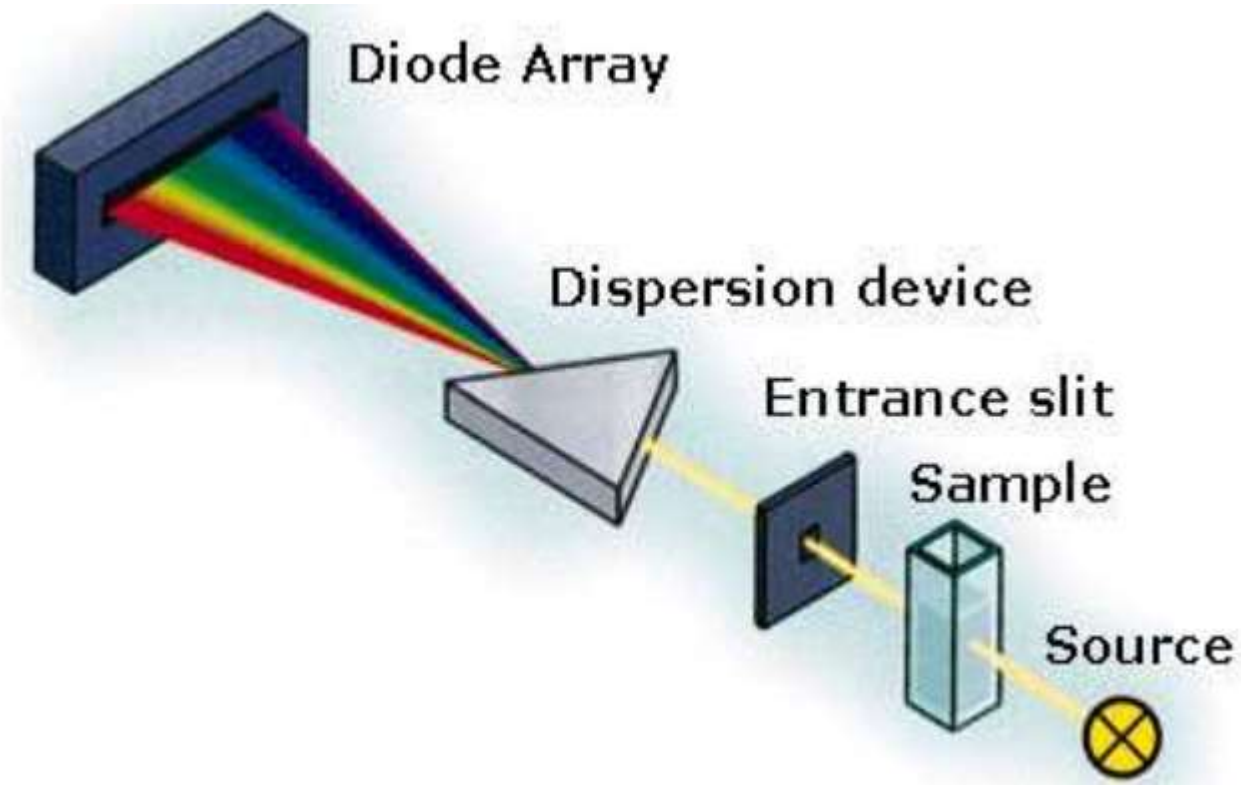
- For complete spectrum, eluent flow must be stopped to trap the component of interest in the detector cell.

• للحصول على طيف كامل، يجب إيقاف تدفق المذيب لحجز المكون المطلوب في خلية الكاشف.

Diode Array Detector

- Scanning Wavelength Detector كاشف الطول الموجي الماسح
- Required to obtain a real time spectrum of each solute as it elutes
- Work in parallel, monitoring all wavelength
- Xenon lamp
- Complete development of chromatogram

• مطلوب للحصول على طيف في الوقت الحقيقي لكل مذاب أثناء خروجه. العمل بالتوازي، ومراقبة جميع الأطوال الموجية • مصباح زينون • التطوير الكامل للكروماتوجرام



ما في stability بسبب السخونه اللي بتصير بسبب الليزر

• Refractive Index Detectors

الانكسار

• السوائل ذات معاملات الانكسار المختلفة تحيد الضوء بشكل مختلف
• التركيب يحدد معامل الانكسار
• يمكن الكشف عن أي مركب ذي معامل انكسار مختلف عن معامل انكسار المذيب -

– 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:

• الكاشف الأكثر شمولية (يمكنه الكشف عن المركبات ضعيفة الامتصاص).

- Most universal detector (can detect weakly absorbing compounds)

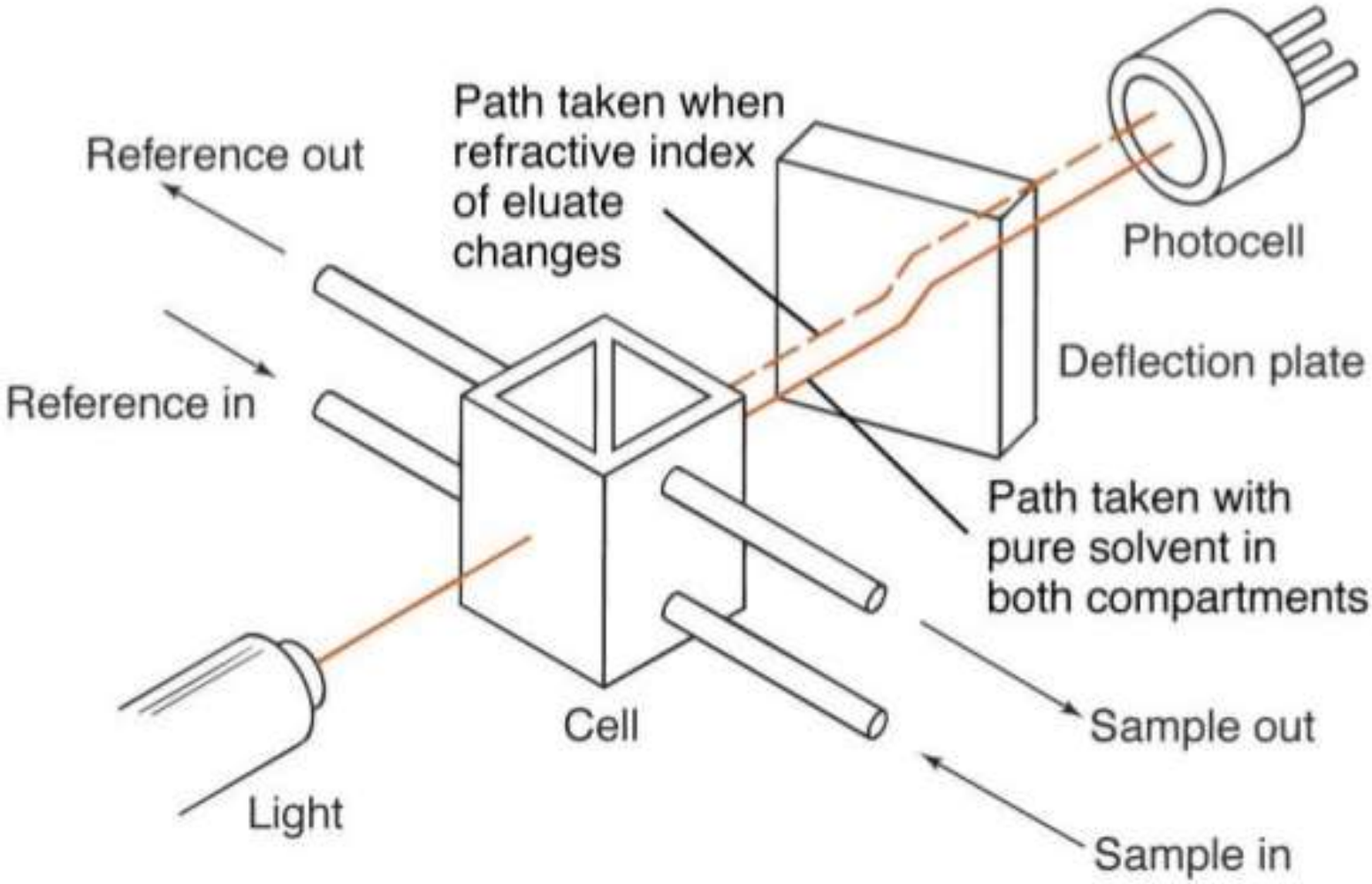
– Disadvantages:

- Gradients are not possible

ليش ؟ لانه ما بقدر استخدم two mobile phases لانهم رح يتداخلوا وتعمل مشاكل

- Requires thermal stability
- Generally not very sensitive

• التدرجات غير ممكنة.
• يتطلب استقرارًا حراريًا.
• بشكل عام، ليس حساسًا جدًا.


Reference out
Path taken when refractive index of eluate changes
Photocell
Reference in
Deflection plate
Path taken with pure solvent in both compartments
Cell
Sample out
Light
Sample in

• Fluorescence Detectors

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

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

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

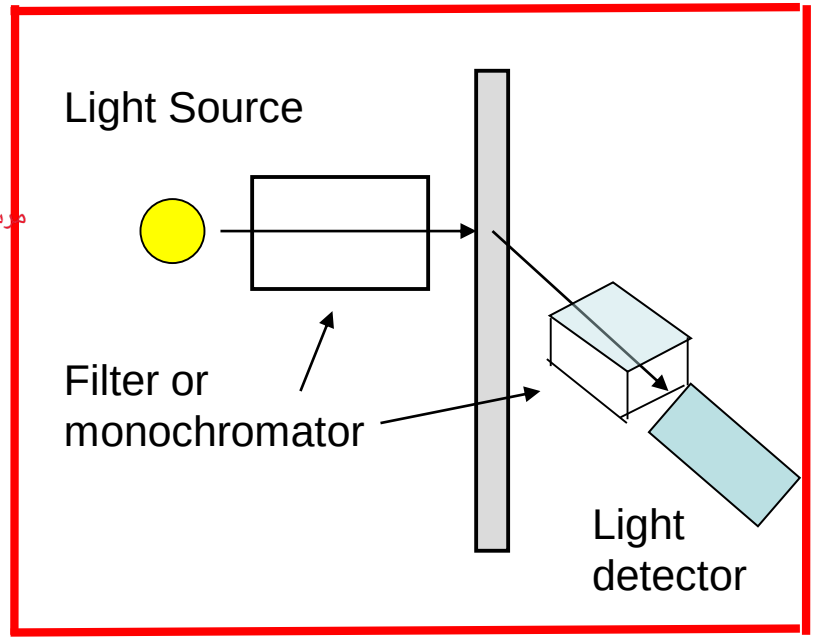
– Detection Principle:

الضوء يحفز الجزيئات إلى حالة إلكترونية مثارة

- Light promotes molecules to excited electronic state

تنتقل الجزيئات المثارة من أدنى حالة مثارة إلى الحالة الأرضية وتصدر ضوءًا في هذه العملية -

- Excited molecules transition from lowest excited state back to the ground state and emit light in the process



– Equipment:

• مصدر ضوء عالي الكثافة
مرشحات أو أحاديات اللون لاختيار الأطوال الموجية (قبل وبعد الخلية)
كاشف ضوء حساس

- High intensity light source
- Filters or monochromators to select wavelengths (before and after cell)
- Sensitive light detector

قد تكون الحساسية أكبر (للمواد التي لها كفاءة تألق عالية) لأن إشارة صغيرة سهلة الكشف مقابل خلفية صفر
(انظر أدناه) • انتقاء أعلى بكثير لأن عدد قليل من الجزيئات تتوهج، خاصة عند أطوال موجات معينة

– Advantages:

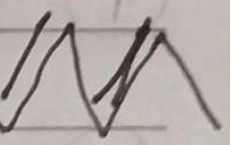
- Greater sensitivity possible (for molecules with high fluorescence efficiencies) because easy to detect small signal against zero background (see below)
- Much greater selectivity because few molecules fluoresce, particularly at selected wavelengths

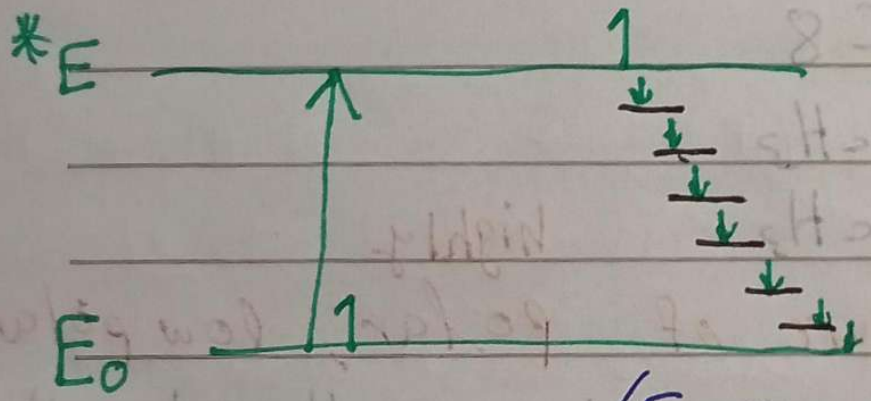
– Disadvantages:

يقتصر على عدد قليل نسبيًا من الجزيئات (على الرغم من أن الاشتقاق ممكن أيضًا)

- Limited to relatively few molecules (although derivatization is also possible)

* fluorescence detector:-

* 3π (double bond) conjugated 



* (Energy savior) جزيئات الطاقة
* qualitative and quantitative
* not-destructive
* not-universal
* كل fluorophore هو chromophore ولكن ليس كل chromophore هو fluorophore.

ال stability قليلة

بقيس التشتت ال scattering

بحول ال liquid لرذاذ

Liquid Chromatography Instrumentation – Detectors

• ELSD (Evaporative Light Scattering Detector)

عالمي، مُتلف

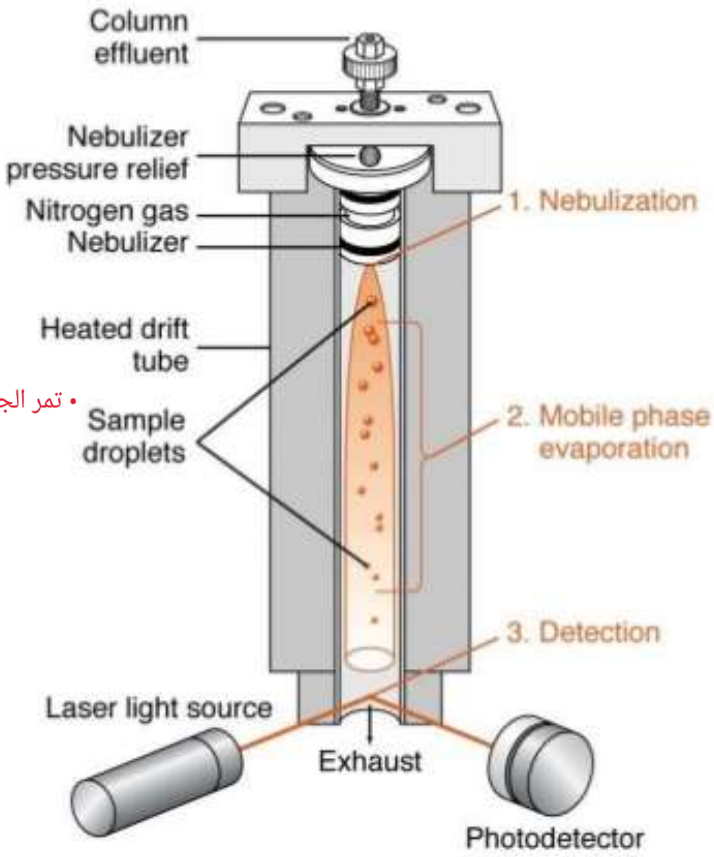
- Universal, destructive
- Useful for large molecules and wide linear range.
- Analytes are de-solvated in the detector.
- Molecules pass through a large cuvette for a UV-VIS instrument.
- The reduction in light intensity detected (due to scattering by the analytes) is measured.

مفيد للجزيئات الكبيرة ونطاق خطي واسع.

يتم إزالة المذيبات من المواد المراد تحليلها في الكاشف.

• تمر الجزيئات عبر خلية قياس كبيرة لجهاز الأشعة فوق البنفسجية والمرئية.

يتم قياس انخفاض شدة الضوء المُكتشف (نتيجة تشتت الضوء بواسطة المواد المراد تحليلها).



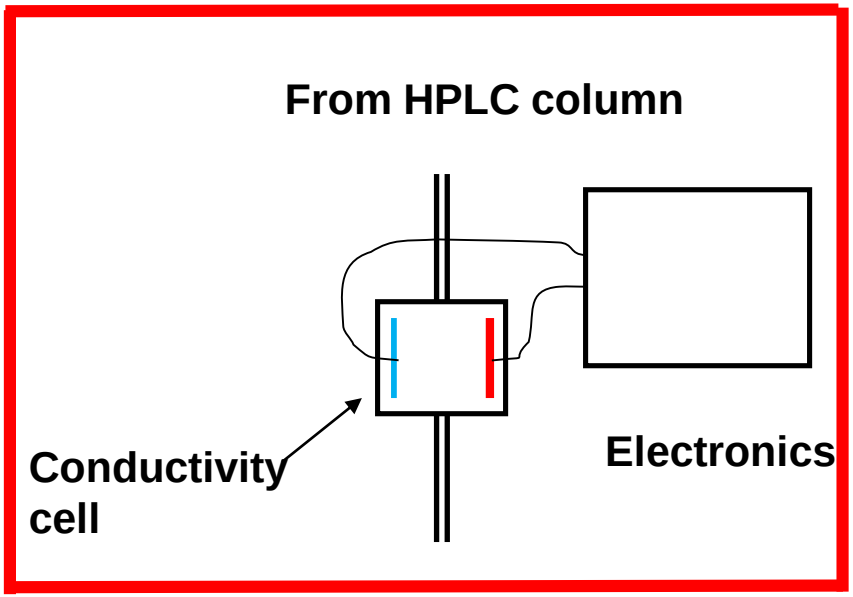
بعتمد على نقل الشحنات (polar)

none universal
destructive
qualitative and quantitative analysis

• Ion Exchange Chromatography

أنواع الأجهزة: عمود واحد - مع أعمدة تحليلية بالإضافة إلى أعمدة مثبطة. الكشف في أجهزة العمود الواحد. طرق الكشف الأخرى (شائعة إلى حد ما): الكشف عن التوصيلية. كاشف التوصيلية

- 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



قياس المقاومة (دائرة التيار المتردد) التوصيلية = 1/(المقاومة)
الأيونات في المحلول تخلق توصيلية تعتمد التوصيلية على تركيز الأيون وحجمه

عشانه كان بس يحلل ال polar راحوا ضافوا unit تعمل oxidation for non-polar وبالتالي صار universal بس destructive

• Electrochemical Detectors

– Principle:

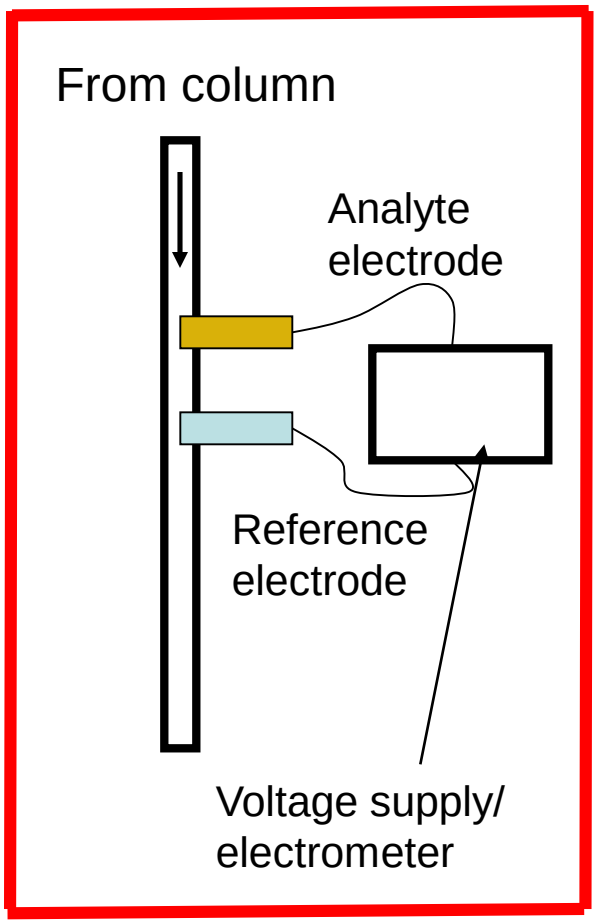
• تحدث تفاعلات الأكسدة والاختزال عند الأقطاب الكهربائية بعد العمود

- 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)

• تُستخدم دورة الجهد لأكسدة/اختزال المواد المراد تحليلها بشكل دوري عند القطب

• يعتمد التيار على تركيز المادة المراد تحليلها التي يتم اختزالها أو أكسدتها (مشابه لـ A في كاشف الأشعة فوق البنفسجية)

• يحدد جهد القطب الكهربائي فئات المركبات القابلة للكشف (مشابه لـ A في كاشف الأشعة فوق البنفسجية)



• Mass Spectrometry

تبدأ الروابط في الجذور الكاتيونية بالانكسار (شظية)

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

$M^{+\cdot}$ ⟶ M^{+} + $M^{\cdot}$

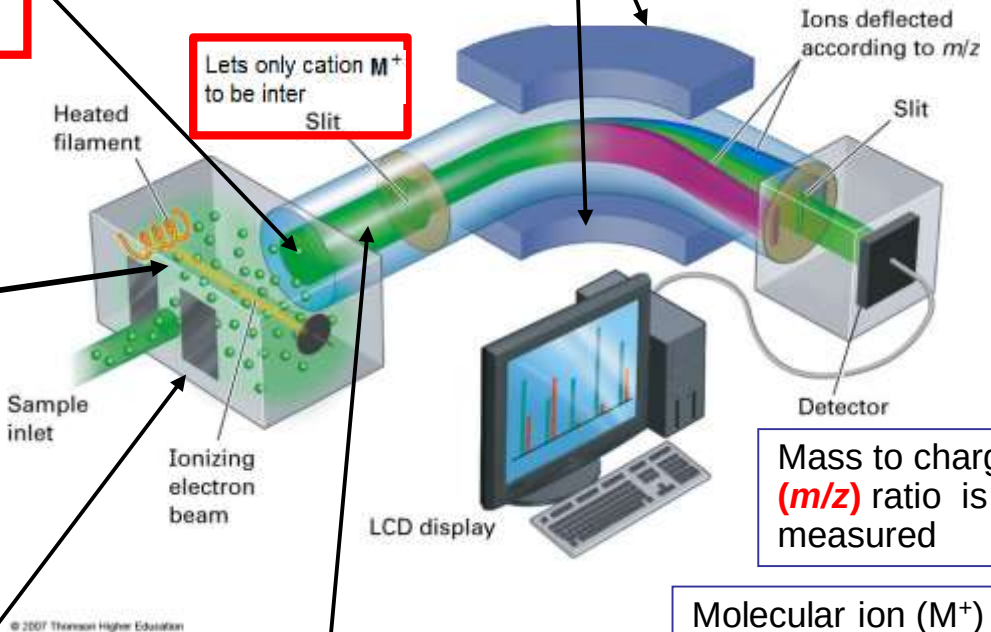
Cation radical — fragment

تبخير العينة وتعريضها لقصف إلكتروني يؤدي إلى إزالة إلكترون، مما ينتج عنه جذر كاتيون

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



Magnet

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

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

Acceleration

Ionization unit

Subject _____ Day _____ Date _____

* Mass spectrometry:

* المادة liquid سخنها وحولها ل Vapor باستخدام heated filament فزادت طاقتها الحركية

* وبعدين نقصفها بـ e^- باستخدام bombardment وهذا الـ e^- بقتلع e^- آخر من الـ Vapor وبطلع $2e^-$

ex:- $H \bullet\!\!-\!\!\bullet H \longrightarrow 2e^- + [M]^{\bullet +}$

e^- سريعة

* وبعدين دخلناه على الـ Magnet عشان أوزنه.
(مقدار الشحنة السالبة التي تعادل الشحنة الموجبة الناتجة)

* universal
* qualitative and quantitative
* destructive.

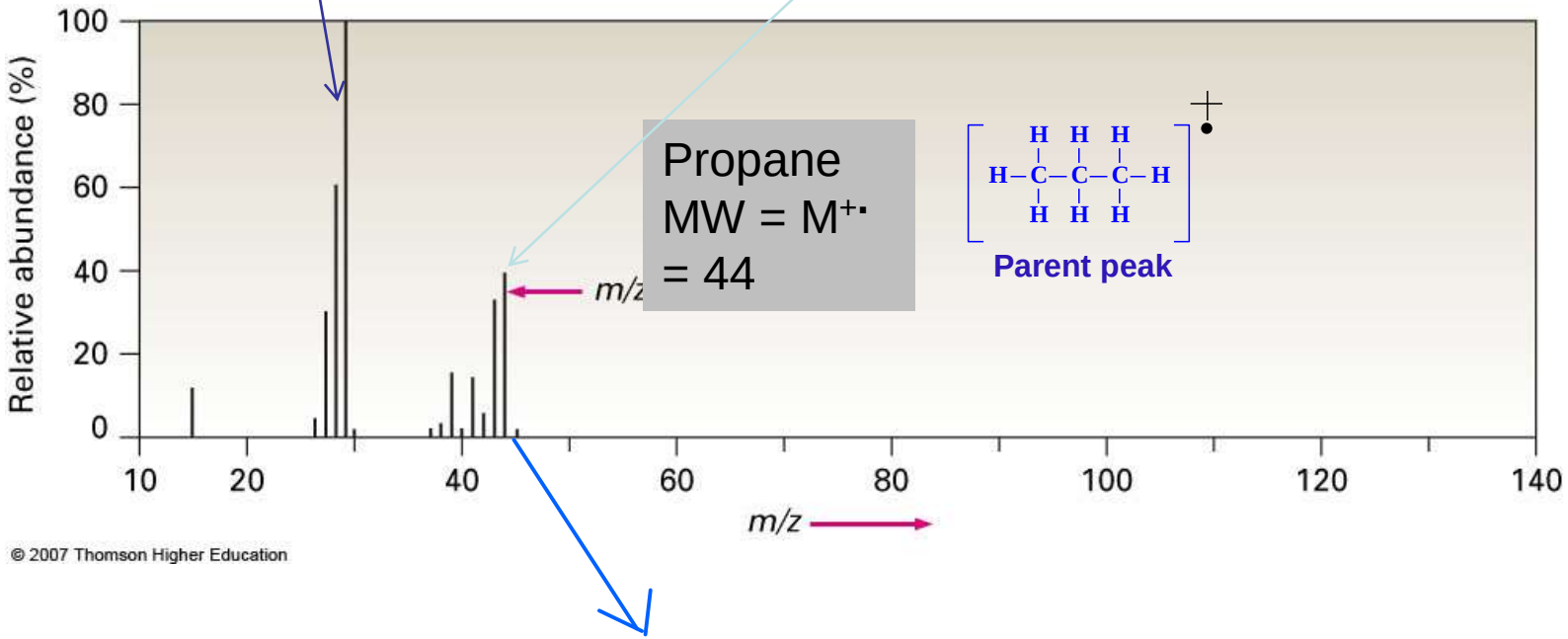
The Mass Spectrum

- 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 $[M]^{+\cdot}$ is parent peak**

• رسم كتلة الأيونات (mz) (المحور السيني) مقابل شدة الإشارة (التي تتناسب تقريبًا مع عدد الأيونات) (المحور الصادي). أعلى قمة هي قمة القاعدة (100%).

القمم الأخرى مدرجة كنسبة مئوية من تلك القمة.

القمة التي تتوافق مع الكاتيون الجذري غير المجزأ [M]+ هي القمة الأصلية.



هاي لل c13 لانه نسبتها ضئية جدا وبطلع 45

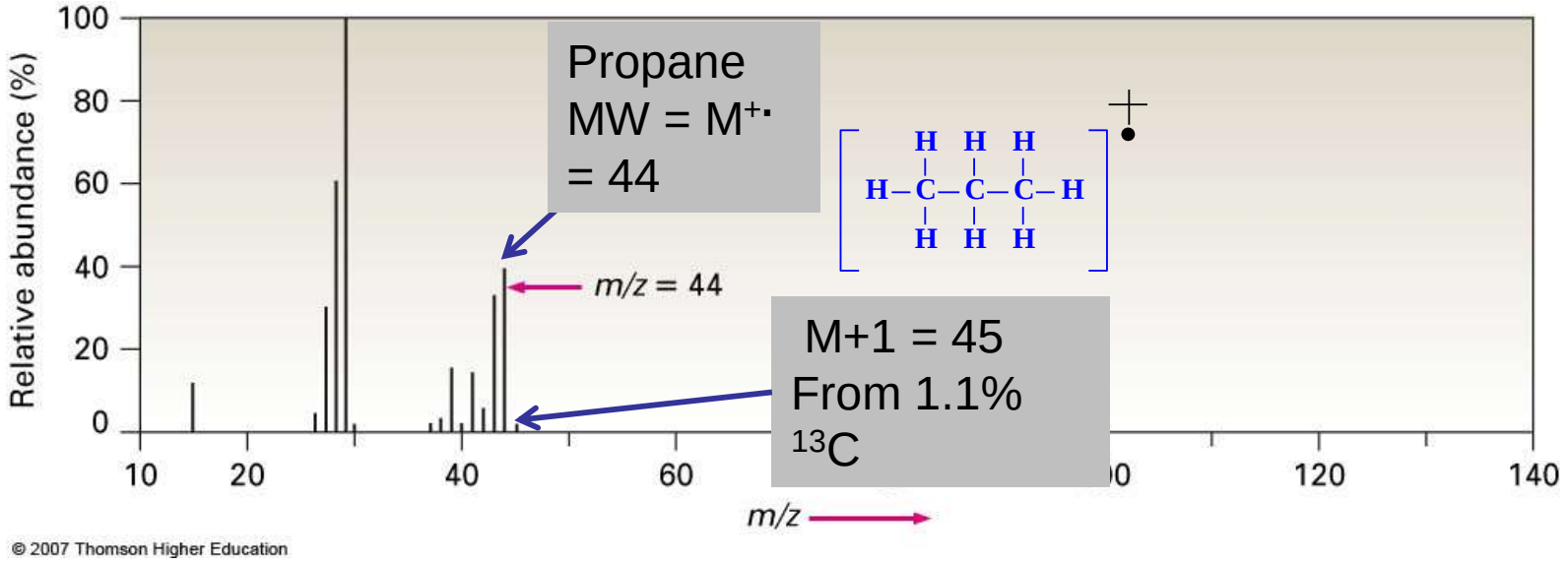
Determining the molecular formula
M and M+n peak :

تظهر القمم التي تزيد عن الوزن الجزيئي نتيجة لوجود نظائر أثقل بشكل طبيعي في العينة

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

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

- M 12C (٩٨.٩٪)و من (١.١٪) من (M+1) في الطبيعة 13C - (M و(M+2) ٧٥.٨٪) في (M - Cl و(M+2)37و 35Cl٪) نسبة = ٢٤.٢ (٤٩.٣٪) نسبة = Br 7°و Br81٪) (٥٠.٧في)



© 2007 Thomson Higher Education

Natural abundances of Isotopes of some common elements

حفظ

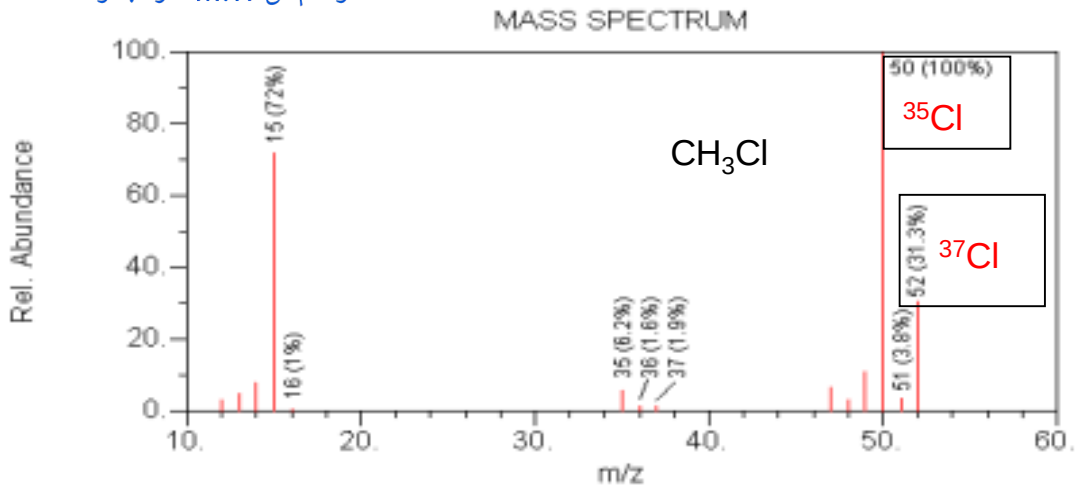
Element	Major Isotope	RA	M + 1 Isotope	RA	M + 2 Isotope	RA
Hydrogen	^{1}H	100				
Carbon	^{12}C	98.9	^{13}C	1.1		
Nitrogen	^{14}N	99.6	^{15}N	0.4		
Oxygen	^{16}O	99.8			^{18}O	0.2
Fluorine	^{19}F	100				
Sulfur	^{32}S	94.8	^{33}S	0.8	^{34}S	4.4
Chlorine	^{35}Cl	75.8			^{37}Cl	24.2
Bromine	^{79}Br	50.7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

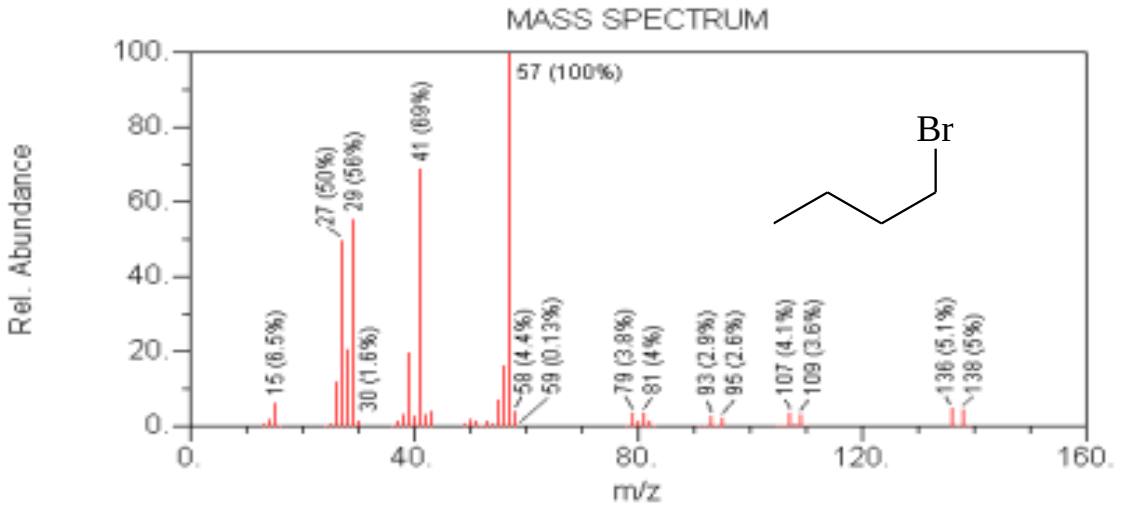
M^+ peak: Halides

هاي كلها امثلة ،
كيف بيجي السؤال عليها ؟ بكون محددلك على
وبقلك اعطيني من شو مكونة بالزبط او peak
الاحتمالات او كم ال M.W لمركب وهكذا

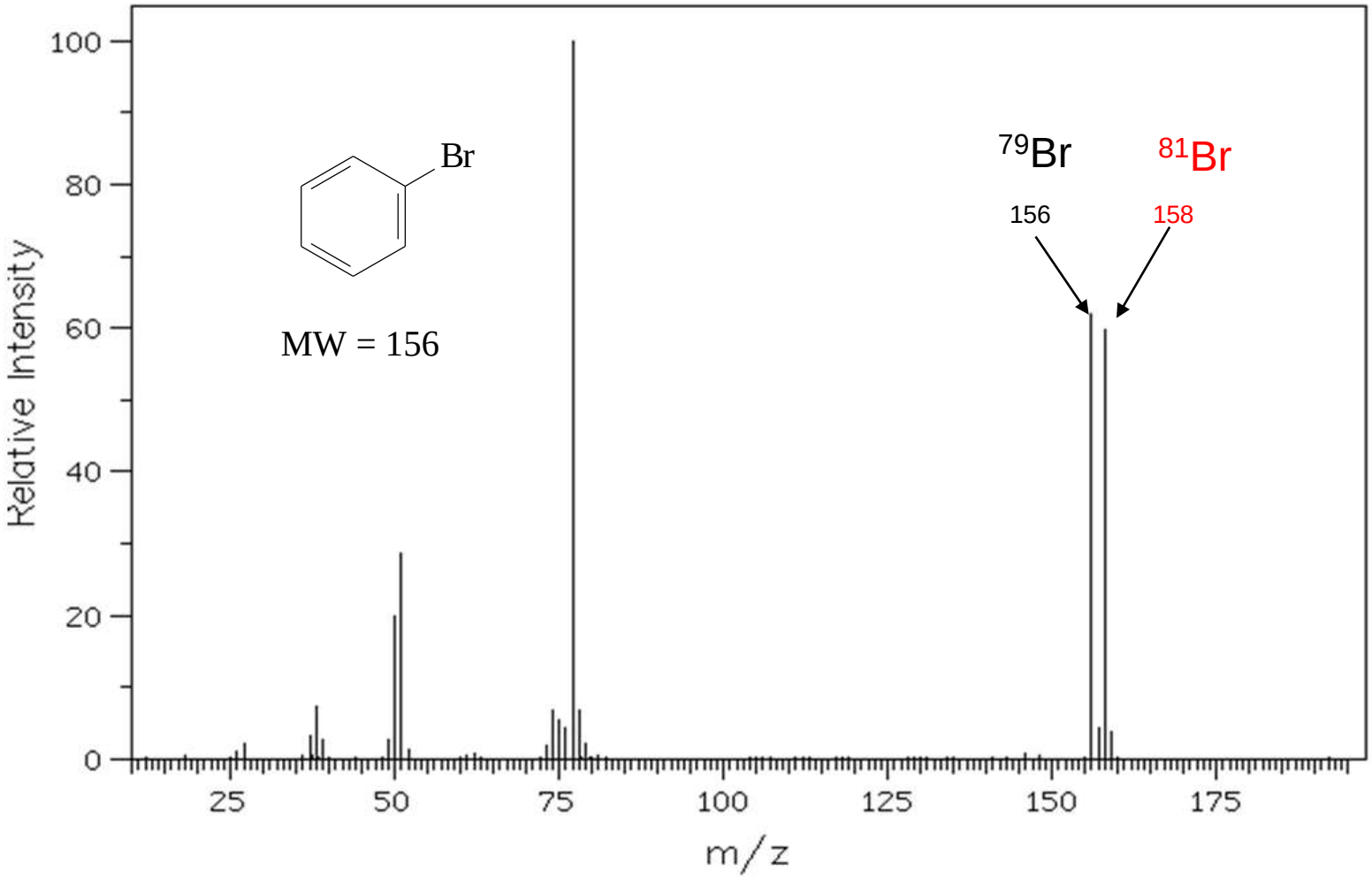
M^+ and M+2 in 75.8%:
24.2% (~ 3:1) ratio
= ^{35}Cl and ^{37}Cl



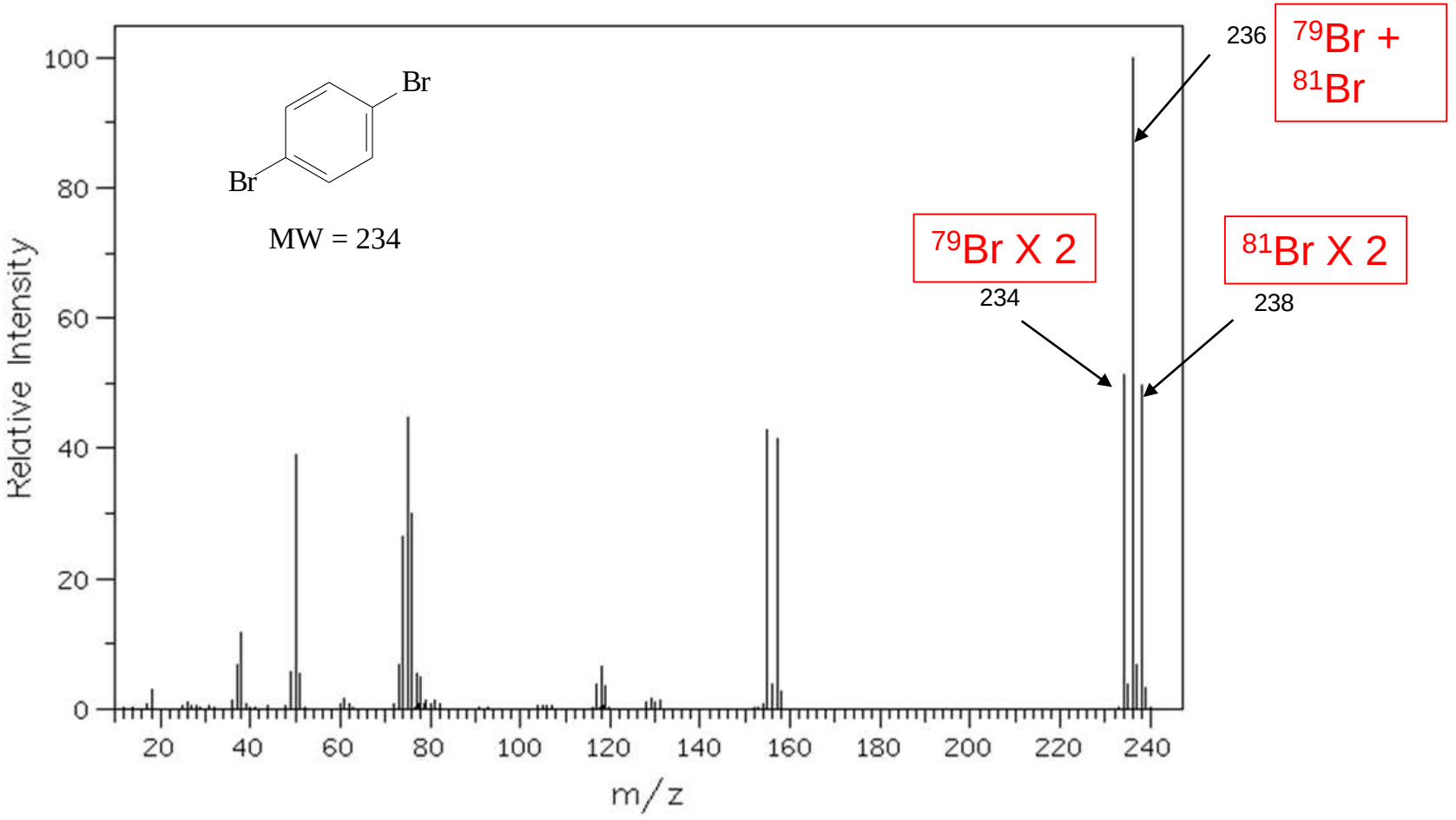
M^+ and M+2 in 50.7%:
49.3% (~ 1:1) ratio
= ^{79}Br and ^{81}Br



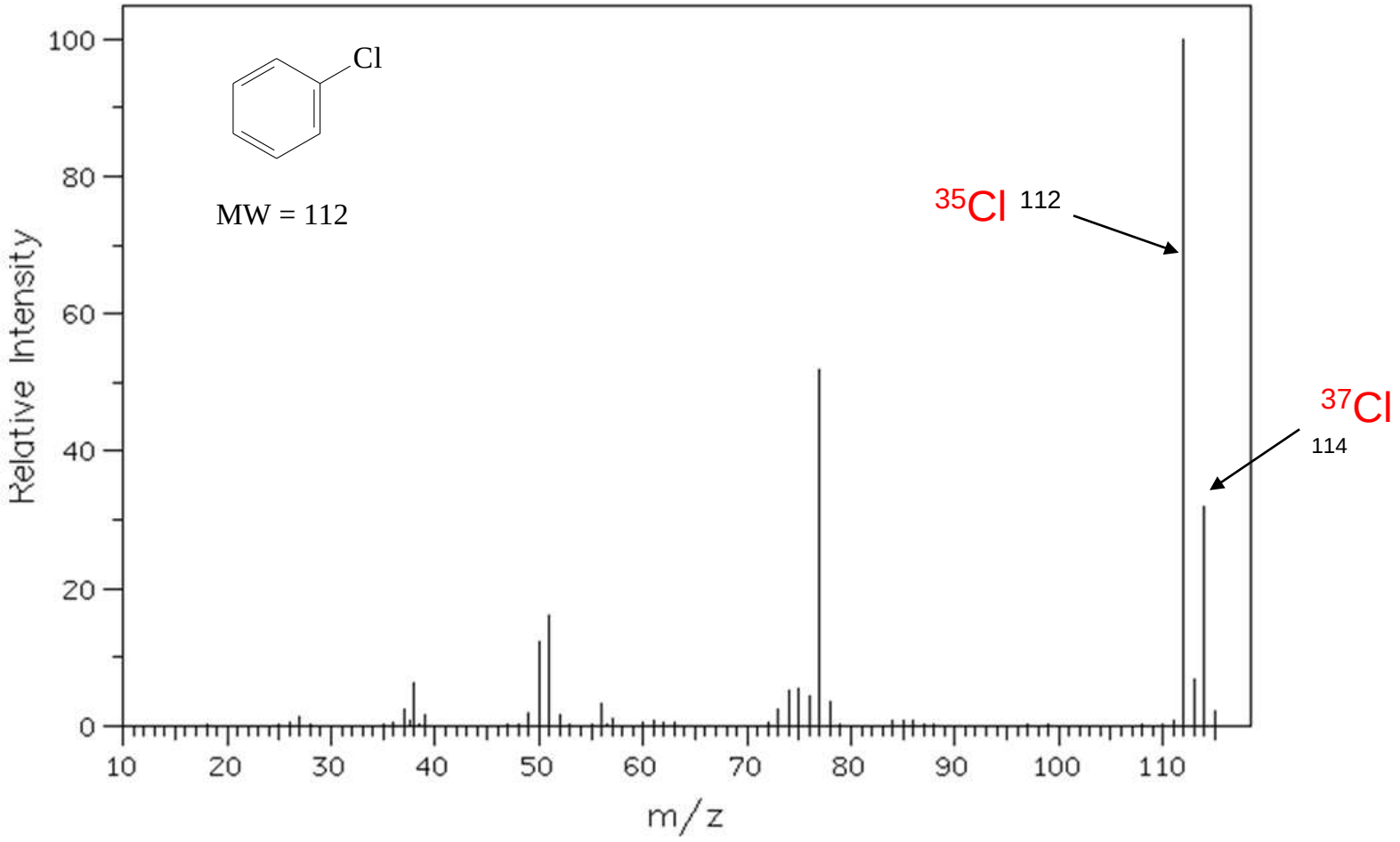
Determining the molecular formula



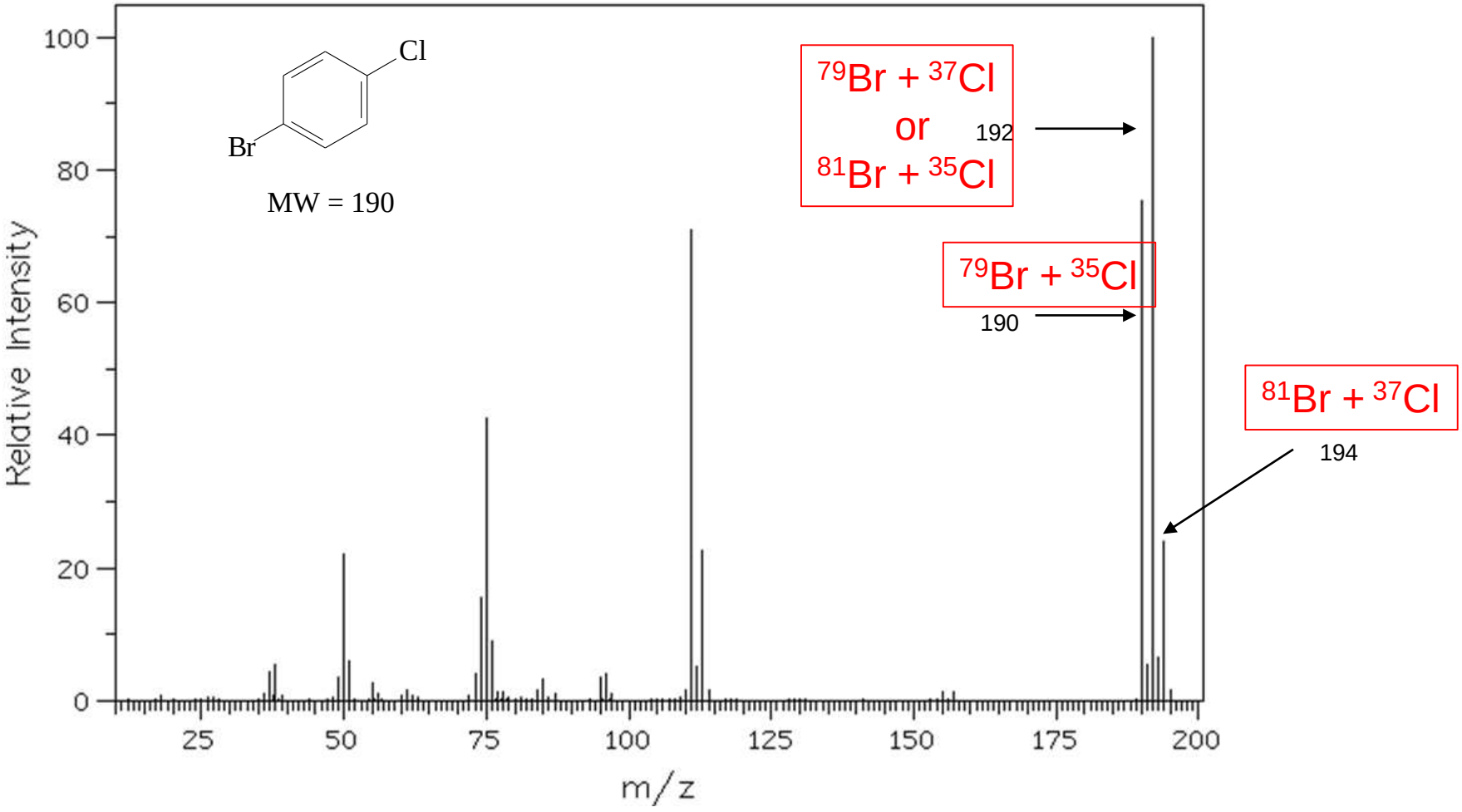
Determining the molecu



Determining the molecular formula



Determining the molecular formula



Determining the molecular formula