وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية
كلية العلوم

قسم الكيمياء

عنوان البحث

فصل وتنقية وقياس خليط من محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم وبرمنغنات البوتاسيوم بطريقتين: كروماتوغرافيا العمود والطريقة الطيفية المرئية

إعداد الطلبة

جعفر صادق حتوف　　آلاء علي مطلك　　أماني أسعد جابر

المشرف التدريسي

م. د. حسن محمد لعيبي

الهدف من البحث

Aim Of Research

1- التدرب والتعلم على العمل المختبري لإنجاز بحث، ويشمل ذلك الاستخدام الامثل للمختبر بدأً بالسلامة المختبرية وتحضير المحاليل القياسية بدقة والأستعمال الصحيح للمستلزمات المختبرية والتعامل بحذر مع المواد الكيميائية المستخدمة وأخيرا أخذ القياسات للمواد القياسية والنماذج باستخدام الاجهزة المختبرية.

2- التدرب والتعلم على استخدام طريقتين مختلفتين لنفس النموذج في الكيمياء التحليلية :

كروماتوغرافي العمود وهي احدى طرق الكروماتوغرافيا (وتم فيها ايضاً استخدام التحليل الحجمي كمكمل للطريقة) والطريقة الطيفية (المرئية) .

٣- فصل وتنقية والاحتفاظ بالنموذج بأستخدام طريقة كروماتوغرافيا العمود .

٤- المقارنة مابين الطريقتين وكذلك المقارنة مع الطرق الاخرى التي قاست نفس النموذج.

٥- التعرف على كثير من تقنيات الكروماتوغرافيا من عدة نواحي كمبدأ عملها واستخداماتها وتطبيقاتها والتي لم نسمع بها سابقاً.

٦- كيفية حساب النتائج والقياسات في الطريقتين المستخدمتين .

٧- التعلم على الطريقة الصحيحة والحديثة في كتابة البحث العلمي.

٨- الاعتماد على مصادر رصينة وحديثة لكتابة جميع فصول البحث لكي تكون مرجع لأي باحث يحتاج معلومات علمية رصينة حول المواضيع التي تناولها هذا البحث.

ABSTRACT الخلاصة

١- تم في هذا البحث فصل وتنقية وتقدير خليط من محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم وبرمنغنات البوتاسيوم بطريقتين مختلفتين هما كروماتوغرافيا العمود والطريقة الطيفية المرئية.

٢- تم قياس البرمنغنات والدايكرومات بالطريقة الاولى بعد فصلهما بعمود الكروماتوغرافيا، باستخدام التحليل الكمي الحجمي بواسطة المعايرة مع المحلول القياسي لكبريتات الحديدوز 0.1M، وكانت النتائج مقبولة ومتطابقة مع تراكيز مكونات الخليط المعلومة والمجهولة التركيز حيث بلغت نسبة استعادة Recovery% اعلى من ٩٠% لمادة الدايكرومات، واعلى من% ٩٥ لمادة البرمنغنات، وتم التوصل الى هذه النتائج بإعادة عملية الفصل والمعايرة عدة مرات لتثبيت الظروف المثلى للطريقة، وكذلك لكي تكون النتائج اكثر ضبط ودقة.

٣- تم قياس البرمنغنات والدايكرومات بالطريقة الثانية باستخدام الطريقة الطيفية المرئية، بالطولين الموجيين(nm ٤٤٠، nm ٥٤٥)، و تمت الطريقة بثلاث خطوات، الأولى يتم فيها حساب معامل الامتصاصية المولارية للبرمنغنات، والثانية حساب معامل الامتصاصية المولارية للدايكرومات، والثالثة قياس امتصاصية الخليط المجهول عند هذين الطولين الموجيين، وباستخدام قانون بير لامبيرت بشكل مباشر لحساب الامتصاصية المولارية للمادتين، ومن ثم نقوم باشتقاق هذا القانون لكي يمكن تطبيقه لحساب تركيزي المادتين المجهولتين في الخليط، وكانت النتائج مقبولة حيث كانت القيم متطابقة تقريباً مع المادتين المعلومة والمجهولة التركيز، حيث بلغت نسبة الاسترجاع للمادتين بهذه الطريقة اكثر من ٨٠%، وتم التوصل الى هذه النتائج بإعادة هذه الطريقة عدة مرات لتثبيت الظروف المثلى للطريقة، وكذلك لكي تكون النتائج اكثر ضبط ودقة.

٤- ولغرض المقارنة بين نتائج الطريقتين، فان نتائج الطريقة الاولى افضل لأنها تقوم بتنقية المادتين عن طريق الفصل بواسطة تقنية كروماتوغرافيا العمود وبذلك يكون قياس تركيزهما افضل وادق، ونسبة الاسترجاع للمادة المجهولة اعلى، وهذا ينطبق على كميات خليط النموذج عندما تكون كبيرة نسبياً اما عند الكميات التي تكون قليلة نسبياً فتظهر الطريقة الطيفية افضل، بالإضافة لذلك فان الطريقة الطيفية ادق من الطريقة الحجمية في قياس النماذج خصوصاً في الكميات الصغيرة نسبيا.

٥- يمكن مقارنة الطريقة الأولى المبنية على الفصل بتقنية كروماتوغرافيا العمود مع تقنيات الكروماتوغرافيا الاخرى حيث تتميز هذه الطريقة بالمحافظة وبنسبة استرجاع وبنقاوة عالية للنموذج، اما بقية التقنيات الكروماتوغرافيا فلا يمكنها استعادة النموذج مثل كروماتوغرافيا (الورقية والطبقة الرقيقة والغاز والسائل والايونية ....الخ).

١- المقدمة:-

(١-١) **بداية ظهورالكروموتوغرافيا وتطورها:**

بداية ظهور هذه الطريقة في فصل المكونات كانت لفصل المكونات المختلفة للصبغات ومعرفة تكوينها؛ نشأت فكرة التحليل الاستشرابي على يد العالم الروسي تسويت سنة١٩٠١ م عندما حاول فصل الصبغات النباتية الملونة، ولهذا أسماها الكروماتوغرافي (كلمة chroma باللغة اللاتينية معناها **لون** وgraphy تعني **الكتابة**) عام ١٩٠٦، إلا أن هذه الطريقة تتبع الآن بنجاح في فصل جميع المواد غير الملونة من مخاليطها سواء الصلبة أو السائلة أو الغازية.**[1]**

فصل تسويت صبغات النبات (كلوروفيل) بصبّ الأثير النفطي المستخلص من الأوراق الخضراء على عمود مغطى بطبقة من كربونات الكالسيوم المطحون في أنبوب زجاجي عمودي، و أثناء سير المحلول خلال العمود فإن مكونات الخليط تتفاوت في سرعتها في الوصول إلى أسفل العمود و بالتالي يصبح العمود معلما بحلقات أفقية ملون كل منها يمثل احد مكونات الخليط فكل حلقة تمثل صبغة مختلفة، واستخدم هذه الطريقة الكيميائيون الذين يُحضِّرون الصبغات لكي يختبروا الصبغات المختلفة التي يتم تحضيرها وقياس جودتها. حيث استخدموا ورق الفلترة لوضع قطرةٍ من الصبغة عليها، وعند انتشار الصبغة على الورقة تظهر الألوان المختلفة للمواد التي تُكوِّن الصبغة. فريتز بيرير Fritz Prior طور في الكروماتوغرافيا الغازية الصلبة المملوكة للدولة في عام ١٩٤٧. آرتشر جون بورتر مارتن، حصل على جائزة نوبل لعمله في تطوير كروماتوغرافيا سائل - سائل (١٩٤١) وكروماتوغرافيا الورق (١٩٤٤) اوالاستشراب الورقي ، والتي وضعت الأساس لتطوير الكروماتوغرافيا السائلة وأنتج في وقت لاحق الكروماتوغرافيا الغازية السائلة (١٩٥٠). اريكا كريمر Erika Cremer وضع الأساس وأشرف على الكثير من بحوث تقنيات الكروماتوغرافيا بعد ذلك.**[2]**

قام بعض الكيميائيون بمحاولة فهم كيفية عمل هذه الطريقة والسبب في ظهور دوائر مختلفة الألوان على أوراق الفلترة عند وضع قطرة من الصبغة عليها. بعد ذلك في بداية القرن العشرين تعرف العالم ميخائيل تسويت على الأساس الفيزيائي الكيميائي للفصل، وقام بتطبيقه بطريقة منظمة في فصل بعض أصباغ النباتات. يرجع الفضل لهذا العالم الروسي في معرفة الأساس الذي تعمل به هذه الطريقة وتعدد التطورات فيها فيما بعد، إلى أن أصبحت من أهم الطرق المستخدمة في العديد من المجالات. حيث ظهر فيما بعد الفصل بالسيليكا جيل، وطريقة فصل الغازات، والفصل باستخدام طبقة رقيقة (chromatography thin-layer) وغيرها العديد.**[٤,3]**

(١-٢) **الكروماتوغرافيا أو الاستشراب**

الكروماتوغرافيا أو الاستشراب أو التفريق اللوني أو الكروماتوجرافيا طريقة لفصل وتنقية المواد الكيميائية المختلطة. تعتمد الطريقة على أن مكونات المخلوط توزع نفسها بنسب مختلفة بين مكوني نظام ثنائي أحدهما متحرك والآخر ثابت.يمكن تصنيف طرق الاستشراب (الكروماتوغرافيا)المختلفة على أساس مكونات النظام الثنائي، فمثلا كروماتوغرافيا:

الصلب-سائل تستخدم مكونا صلبا كالسيليكا أو الألومينا وأوراق الترشيح ومكونا سائلا متحركا كأي مذيب كالماء أو المذيبات العضوية، وكروماتوغرافيا الصلب-غاز تستخدم سائلا مدمصا على صلب كمكون ثابت وأحد الغازات كمكون متحرك. [5]

(١-٣) أنواع التحليل الكروماتوغرافي:

ويمكن تقسيم التحليل الكروماتوغرافي حسب نوع القوى المسؤولة عن الفصل التي تتوقف بدورها على الطور الساكن المستخدم إلى ثلاثة أنواع:

أ- كروماتوغرافيا الادمصاص (الامتزاز) : Adsorption

ويقصد به التحليل الكروماتوغرافي عن طريق الإدمصاص على السطح, والطور الساكن هنا مادة صلبة عارية.

ب- كروماتوغرافيا التوزيع : Partition

ويقصد به التحليل الكروماتوغرافي عن طريق الاختلاف في انحلالية المادة المراد فصلها مابين الطورين الساكن والمتحرك، ويشترط في الطور الساكن أن يكون سائل مشرّب أو مطعم على مادة صلبة.

ج- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني : IEC Ion-exchange Chromatography:

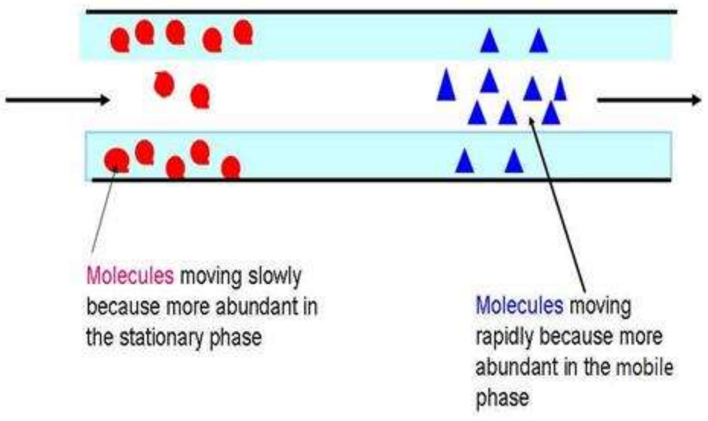
ويقصد به التحليل الكروماتوغرافي عن طريق تبادل الأيونات بين المادة المراد فصلها وبين أيونات السطح الذي يُحدث عملية التبادل وهي مادة كيميائية راتنجية ويمثل الطور الساكن.**[6,5]**

(١-٤) أهمية الفصل الكروماتوغرافي أو الاستشرابي:

طرق الفصل التقليدية مثل الترشيح والتقطير والترسيب غالبا ما نستخدم فيها التسخين والأحماض والقلويات، وهذه الطريقة تستغرق كثيرا من الوقت وكثيرا من الكواشف كما أن جزءا كبيرا من المادة يفقد في أثناء هذه العملية بجانب أن المركبات البيولوجية مثل بروتينات الدم مثلا. ويعد التحليل الكروماتوجرافي من أهم طرق الفصل الحديثة كطريقة سهلة وسريعة تحافظ على كيان المركبات المراد فصلها وتصلح لفصل مكونات أي مخلوط سواء كان في الحالة الصلبة أو السائلة أو الغازية وكان لهذا النوع من التحليل الفضل الأول في التقدم الملموس في كيمياء البروتينات والمضادات الحيوية والهرمونات والفيتامينات....الخ**[7,6]**.

<u>(١-٥) مبدأ عمل الكروماتوغرافيا:</u>

إحدى الأساسيات التي يعتمد عليها الكروماتوجرافي هي الانتقال المستمر للجزيئات المراد فصلها بين الوسط المتحرك والوسط الثابت. يحدث هذا التحرك المستمر بسبب أن الجزيئات تقوم بالارتباط بالوسط المتحرك لبعض الوقت ثم ترتبط بالوسط الثابت لبعض الوقت، وتختلف مدة الارتباط على حسب المادة. الوقت الذي تستغرقه الجزيئات في الارتباط بأحد الوسطين هو ما يحدد سرعتها في التحرك للأمام. حيث تكون الجزيئات التي ترتبط بالوسط المتحرك لوقتٍ أطول أسرع من تلك التي ترتبط لوقتٍ أقل بالوسط المتحرك، ووقتٍ أطول بالوسط الثابت، حيث يعطل الارتباط لوقت طويل بالوسط الثابت الجزيئات التي ترتبط به مما يؤدي إلى تخلفها عن الجزيئات الأخرى. بهذه الطريقة يتم الفصل بين المواد المختلفة، فإذا كان لدينا خليط من عدة مواد ونريد فصل هذه المواد عن بعضها البعض، نقوم بتحديد الخصائص المختلفة لكلٍّ من المواد في الخليط، بعد ذلك نحدد الوسط المناسب لفصل هذه المواد عن بعضها البعض بحيث يكون ارتباط المكونات المختلفة بالوسط يختلف من مادة لأخرى، كما موضحاً ذلك بالشكل المبسط ذو الرقم (١) **[9,8]**.



الشكل رقم (١) – يمثل مبدأ عمل الكروماتوغرافيا بشكل مبسط.

(١-٤)استخدامات الكروماتوغرافيا:

تعتمد الكثير من العلوم والصناعات المختلفة على الكروماتوغرافيا في الفصل بين المواد مثل الأحياء والكيمياء والصناعات البترولية. حيث يستخدم في الأحياء لمعرفة المكونات الكيميائية للمواد العضوية واللاعضوية وأيضا لفصل هذه المواد المختلفة من بعضها البعض لدراستها بطريقة أسهل وأكثر فعالية.

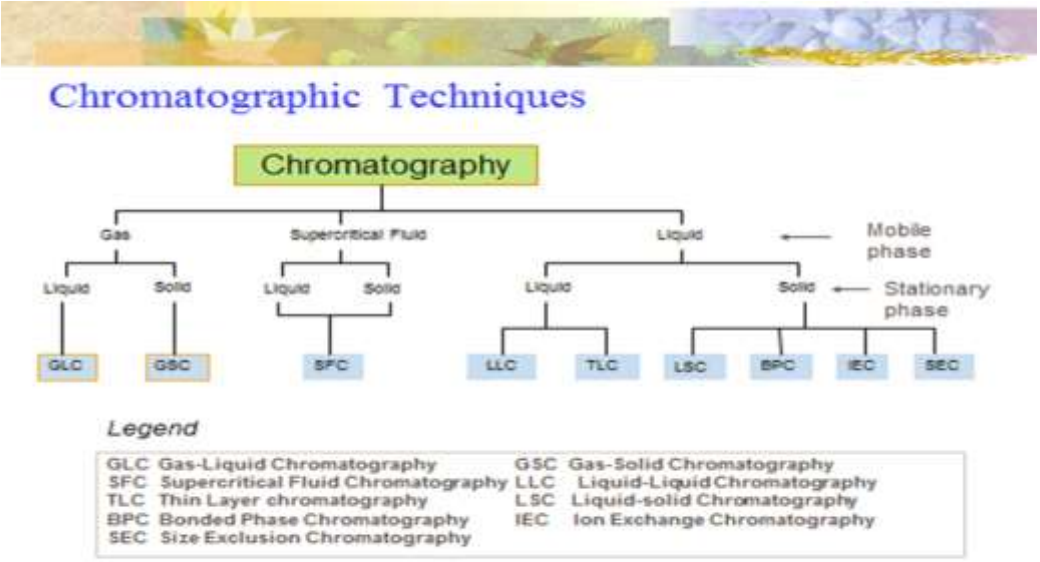
إستخدامه في صناعة البترول لفصل خليط الهيدروكربونات المعقدة وإتاحة طريقة لتحليله ومعرفة مكوناته وقياس تلك المكونات. وفي الكيمياء تستخدم هذه الطريقة لفصل المكونات المختلفة من بعضها البعض لتحليلها ومعرفة ماهيتها أو فصلها لإستخدامها في تطبيق ما أو لدراسة خصائص المكونات المختلفة.

تتمثل أهمية الكروماتوغرافي في التطبيقات بأنه قادرٌ على فصل الكميات الصغيرة جدًا في الخليط واكتشافها وتقديرها، كما يمكنه فصل المواد بدون التغيير في خصائصها، أيضًا يمكن لهذه الطريقة الفصل بين العديد من المكونات في وقتٍ واحد دون الحاجة لاستخدام عدة طرق.

لا تقوم هذه الطريقة بفصل مكونات السوائل فقط ولكن يمكنها أيضًا فصل مكونات الغاز من بعضها البعض وكل خليط من المواد يكون له طريقة مختلفة عن الأخرى.[١٠،٦]

(١-٥)أنواع تقنيات الكروماتوغرافيا:

يوجد العديد من التقنيات في الكروماتوغرافيا المستخدمة وكلٌ منها له استعمالاته الهامة كما في الشكل رقم (٢) **[11,6]**.



شكل رقم (٢) – يمثل جميع تقنيات الكروماتوغرافيا حسب الاطوار الثابتة والمتحركة.

سنتناول أدناه هنا أهم وأشهر التقنيات الكروماتوغرافيا المستخدمة في مختبراتنا وهي:

(١-٥-١) الكروماتوغرافيا الورقية:

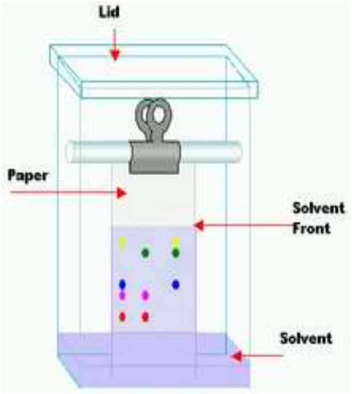
في هذا النوع من الكروماتوغرافيا يتم الفصل للمركبات باستخدام طورين هما:

١)الطور المتحرك (Mobile phase) ويكون مادة سائلة عادة.

٢)الطور الساكن (Stationary phase) ويكون في الغالب سائل أيضاً محمول على الألياف السليلوزية للورقة , لذلك يطلق عليها أسم كروماتوغرافيا الورق. كما مبين في الشكل رقم (٣). تقسم هذه الطريقة إلى قسمين حسب اتجاه سريان المذيب على الورقة إلى :**[12]**

أ- الطريقة التصاعدية Ascending حيث يتجه سريان المذيب من أسفل إلى اعلى الورقة.

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

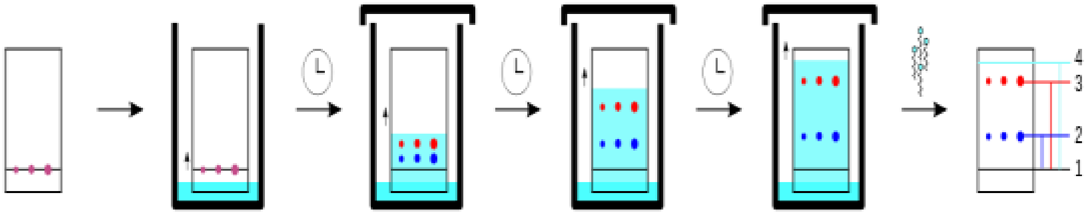


الشكل رقم (٣) – يمثل رسم توضيحي لعمل تقنية كروماتوغرافيا الورقية.

(١-٥-٢) كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة:

عملية مشابهة لكروماتوغرافيا الورقية مع ميزة السرعة، الفصل ألافضل، والاختيار بين مراحل مختلفة ثابتة، بسبب بساطته وسرعته غالبا ما تستخدم[TLC] لرصد تفاعل كيميائي وللتحليل النوعي لمنتجات التفاعل، وهي طريقة لفصل المواد غير الطيارة في المخاليط، وهي طريقة لفصل وتنقية المواد الكيميائية المختلطة. باستعمال لوح من الزجاج او البلاستيك اوالمعدن وتكون مغطاه بمادة ممتزة تساعد على الفصل.

و تتم عملية الفصل على طبقة رقيقة من مادة الوسط الثابت المفروشة على الواح في الغالب مصنوعة من الالمنيوم . كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة نقوم بفصل الخليط لمعرفة ألوانه لكن لا نحصل على مادة اللون بشكل محسوس كما في الشكل (٤).**[13,12]** .



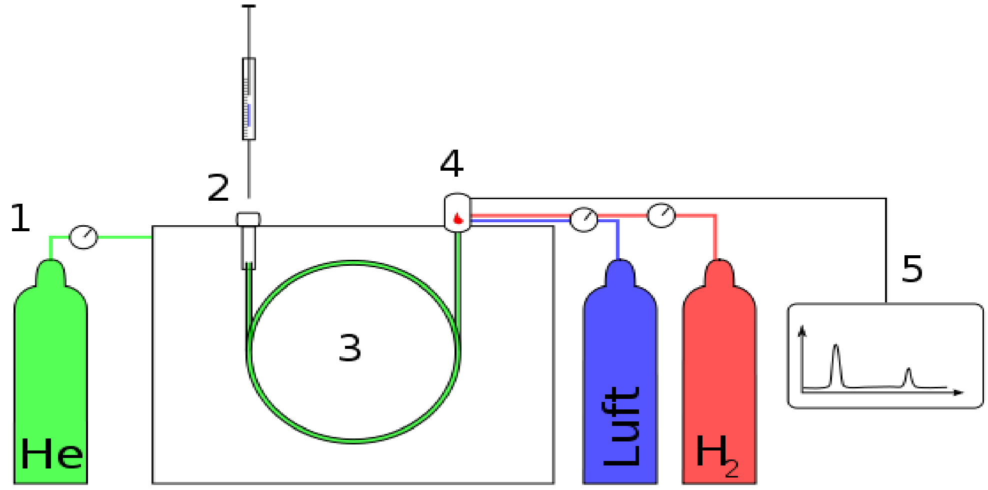
الشكل رقم (٤) – يمثل مراحل فصل مركبين باستخدام تقنية الطبقة الرقيقة.

(١-٥-٣) كروماتوغرافيا الغاز:

تتيح فصل والكشف عن المركبات العضوية القابلة للتطاير ومزيج غازي من مركبات لا عضوية مختلفة. وهي تعتبر تقنية مفيدة جداً اكتشفت أول مرة عام1940 م حيث أدخلت فيما بعد كأداة أولية استخدمت في مختبرات عديدة. وقدمت تطور تقني واضح في مجال الالكترونيات والنظم المؤتمتة. تقنية الكروماتوغرافيا الغازية هامة جدا حيث استخدمت في معظم الصناعات:- البيئية، والصيدلانية، والبترول، والكيمائية، والطبية، وعلم الأطعمة، ومجالات أخرى متعددة. ومن مميزاتها هي:-

- اختبـار نقـاوة مـادة معينـة.   فصـل مكونـات خلـيط.   قيـاس نسـبة كـل مكـون مـن مكونـات خلـيط. التعرف على مركب ما.

يستخدم الكيميـائيون هذه الطريقة لفصل مزيج من الغـازات، وفيها يتم تبخير العينـة المراد تحليلهـا، وتنقل محمولة بدفق من تيار غاز خامل يمثل الطور المتحرك كالنتروجين او الهيليوم، عبر أنبوب (عمـود الفصـل) يحوي مادة صلبة حُبيبية ساندة للطـور الثابت وهو سائل دائمـاً، حيث تسري مكونـات العينـة الغازيـة عبر حبيبات العمود بسرعات متباينة فيجري ادمصاص لبعض أجزاء هذا المزيج الغـازي علـى سطح الحبيبـات، بينما تستمر مكونات العينة الأقل ادمصاصاً في التدفق عبر العمود حتى تصل نهايته، وهذه الأجزاء الغازيـة التي انفصلت من العينة تدخل تباعاً إلى كاشف (Detector) للتعرف على نوع الغازات المكونـة للنـاتج من خـلال ربـط مسجل او حاسوب لغرض رسم الكروموتوكرامـات والحزم الخاصـة لكل مكون من مكونـات الخليط، كما موضح في الشكل رقم(٥).**[15,14]**



الشكل رقم (٥) – يمثل الرسم التخطيطي المبسط واهم الاجزاء الرئيسية لتقنية كروماتوغرافيا الغاز

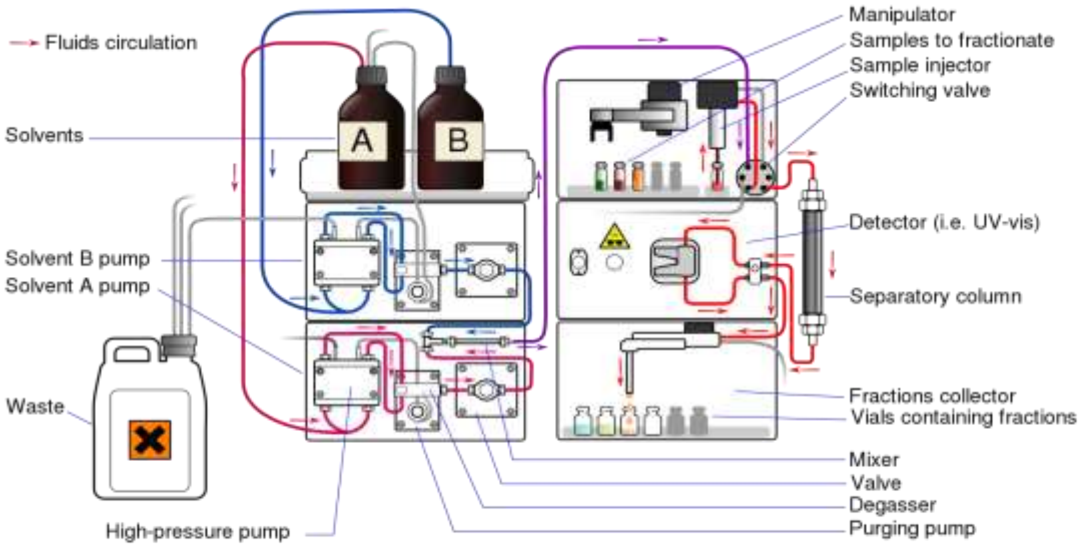
(١-٥-4) كروماتوغرافيا السائل العالية الاداء:

وهي تقنية لفصل مكونات مزيج مـا كل علـى حدة، وعـادة تفضـل طـرق الكروماتوغرافيـا السـائل فـائق الأداء (High-performance liquid chromatography HPLC) على الطرق المتبعة الأخرى في التحليل الكمي، وذلك لنوعيتها المثالية للمـادة analyte أو المواد المـراد فصلها، بحيث نحصـل علـى فصـل نـوعي دقيق لمكونات المزيج المـراد التعرف عليـه. (كروماتوغرافيا سـائلة عاليـة الضـغط HPLC)هو شكل من أشكال الكروماتوغرافيا العمودية وغالبا ما تستخدم في الكيميـاء الحيويـة والكيميـاء التحليلية لفصـل وتحديـد، وقيـاس المركبـات فـي مخلـوط واحـد . تسـتخدم عمـود يحتـوي علـى الطـور الثـابت (stationary Phase) ومضخة تحرك الطـور المتنقل المراد تحليله (Mobile Phase) و كاشف لتحديد زمـن الاحتبـاس لكل مـادة.

زمن الاحتباس يختلف من مادة لأخرى بسبب الاختلاف في الروابط البينية بين المادة المراد تحليلها والمادة الثابتة في العمود مما يؤخر ظهور المادة على الكاشف.

ومبدأ عمل هذه التقنية هو يتم ادخال المادة المراد تحليلها في تيار المادة الناقلة ، وسرعة تحرك المادة داخل العمود تتحدد بحكم الروابط الفيزيائية أو الكيميائية بينها وبين المادة الساكنة . كمية المادة المنحبسة او المحتجزة داخل عمود الفصل تعتمد على تركيب المادة وتركيب المادة الساكنة والمادة الناقلة أو المتحركة . الوقت الذي تستغرقه المادة المحتجزة داخل العمود لكي تصل للطرف الاخر للعمود و تظهر على الكاشف يسمي وقت الاحتجاز(Retention Time Rt) .

لقد تطور استخدام الـHPLC بشكل كبير خلال العقود الماضية ففي الستينات تم وضع الأسس والمبادئ النظرية لهذه التقنية، وأدى التطور في مواد تعبئة عمود الاستشراب في السبعينات إلى تطور الاستشراب بالطور العكوس. وفي الثمانينات أدى التطور في الحواسيب والأتمتة إلى سهولة استخدام الـ HPLC . وفي التسعينات طورت أعمدة الاستشراب الميكرونية (الصغيرة) وأعمدة الاستشراب المتخصصة لاستعمال محدد ، المشعرات (الكواشف) Detector الثابتة، بالإضافة إمكانات الحصول على البيانات المتكاملة وتخزينها واسترجاعها ، مما أدى إلى الزيادة الكبيرة في فعالية وسرعة أجهزة الـ HPLC كما موضح في الشكل رقم (٦،٧). **[17,16]**



الشكل رقم (٦) – يمثل الرسم التوضيحي للاجزاء الرئيسية في تقنية HPLC .

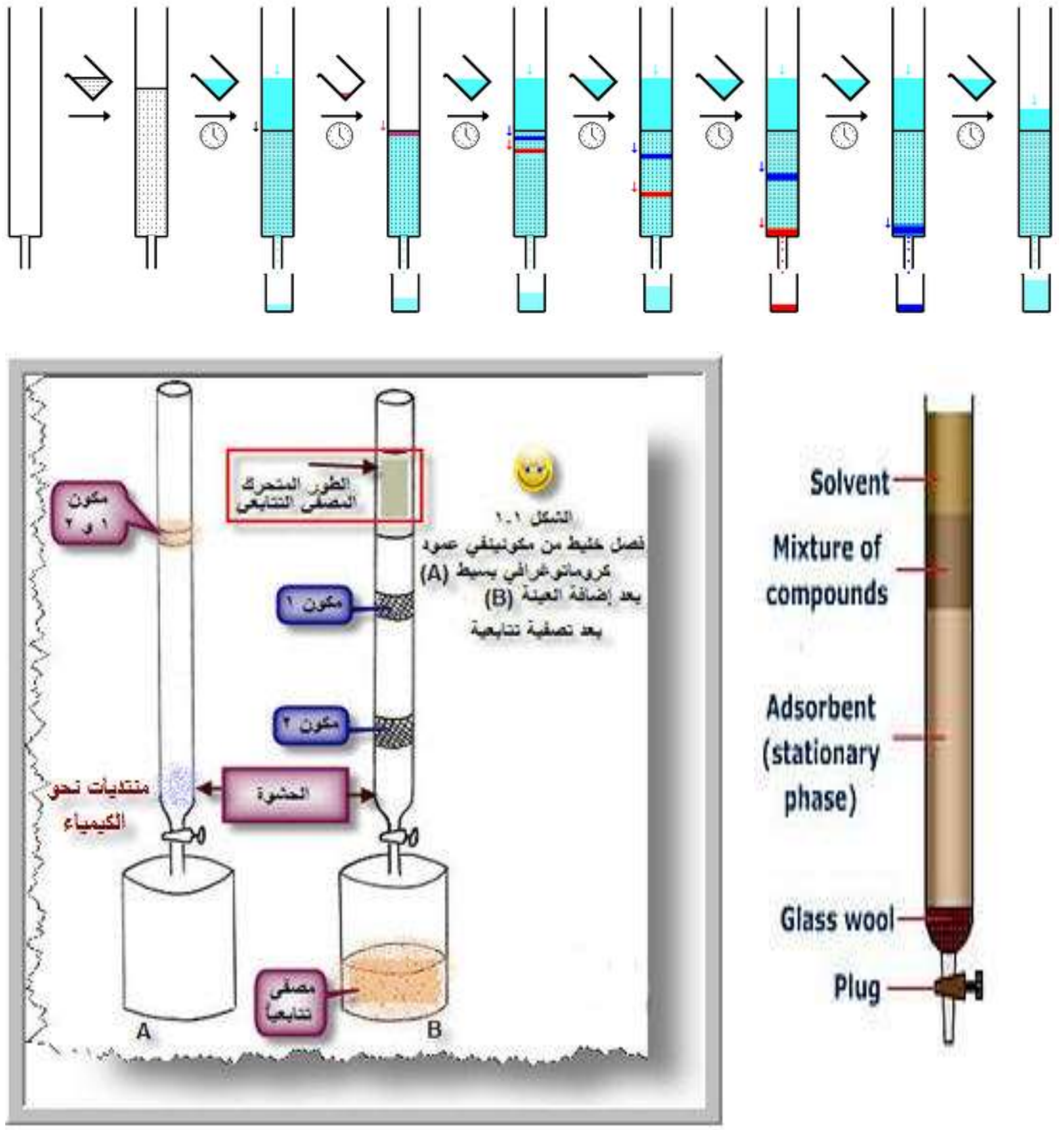
الشكل رقم (٧) – جهاز تقنية HPLC لاحدى الشركات المصنعة للاجهزة المختبرية.

(١-٥-5) كروماتوغرافيا الأعمدة Column Chromatography: (التقنية قيد الدراسة)

هي طريقة تستخدم لفصل مكونات مركبات كيميائية من خليط من المركبات. وغالبا ما تستخدم في التطبيقات التحضيرية على مقاييس دقيقة تبدأ من ميكروغرام وتصل إلى كجم. والميزة الرئيسية لكروماتوغرافيا العمود هو التكلفة المنخفضة نسبيا.

يستعمل في الكروموتوغرافيا العمودية عادة الزجاج لدعم الطور الصلب ، حيث يحضر الطور الصلب مسبقاً وبنشط إذا لزم الأمر بتسخينه إلى درجة حرارة معينة، ويغسل في حالة راتينج المبادل الأيوني أو يبلل بالماء لينتفخ في حالة الترشيح الهلامي وتضاف العينة المراد فصلها إلى أعلى العمود ثم تلفظ بمذيب ملائم .

الكروماتوغرافيا العمودية تستخدم هذه الطريقة أساسا للفصل الكمي حيث يكون: عمود الفصل عبارة عن عمود من الزجاج يشبه السحاحة قطرة ٣ سم وطوله حوالي ٥٠ سم وفي نهايته صنبور (صمام) كما يوضع في طرفة السفلي قطعة من القطن أو الصوف الزجاجي ويملا العمود إما بحبيبات من الألومينا « Al_2O_3 » **(قيد الدراسة)** أو السليكا جل والتي تمثل الطور الثابت أو الحبيبات الدعامة الصلبة المغطاة بطبقات رقيقة من سائل يمثل الطور المتحرك، بعد ذلك توضع المادة المراد فصلها على هيئة محاليل مذابة في الماء في قمة العمود ويفتح الصنبور فينساب المذيب حتى يتم امتزاز أو تجزئة المواد المراد فصلها حسب نوع الطور الثابت المستخدم، ثم يضاف قليل من المذيب أعلى العمود فتأخذ المواد المراد فصلها في التحرك بسرعات نسبية مختلفة وتظهر بعد ذلك عدة مناطق ملونة بعد ان كانت منطقة واحدة أعلى العمود وبمرور الوقت يحدث الفصل التام لمكونات المادة المراد فصلها ويصبح لكل مادة منطقة خاصة بها كما مبين في الاشكال الثلاثة المتجمعة في الشكل رقم(٨)، وفي حالة استخدام مواد غير ملونة فان هذه المناطق لا ترى بالعين المجردة ولكن يستدل على وجودها باستخدام الكواشف الكيميائية. تصنيفها يعتمد على تقنية الفصل المستخدمة. [١٨،١٩،٢٠]



الشكل رقم (٨) – يمثل ثلاثة اشكال لمراحل والاجزاء الرئيسية تقنية كروماتوغرافيا العمود.

(١-٦) برمنغنات البوتاسيوم:

برمنغنات البوتاسيوم هو مركب كيميائي صيغتة الكيميائية KMnO4 وفي هذا المركب يكون المنغنيز في حالة تأكسد +٧، وهي أعلى حالة أكسدة لذلك العنصر، ومن ذلك جاءت تسمية فوق باللغة العربية او PER باللغة الانكليزية، ويكون شكل بلوراته بنفسجية محمرة لها بريق معدني. يعتبر أيون البرمنغنات عامل مؤكسد قوي للعديد من المركبات العضوية واللاعضوية و له القدرة على الذوبان في الماء ليعطى محلول ذو لون قرمزي غامق، وتبخير محلوله يعطي بلورات قرمزية –سوداء موشورية، كما في الشكل (٩). [٢٢،٢١]

الشكل رقم (٩): يمثل بلورات برمنغنات البوتاسيوم.

(١-٦-١) الاستخدامات

التعقيم ومعالجة المياه

استخدم مركب فوق برمنغنات البوتاسيوم في السابق من أجل معالجة مياه الشرب مياه المسابح والخزانات. كما يمكن أن تستخدم محاليله المائية من أجل معالجة حالات متوسطة من مرض الفاقوع pompholyx، والتهاب الجلد Dermatitis (طفح). وفي حالات إصابة الأطراف بالفطريات.

استخدامات طبية حيوية

استعملت محاليل البرمنغنات فيما مضى من أجل علاج مرض السيلان، ويستعمل للآن من أجل علاج مرض داء المبيضات. يؤدي حضن أنسجة مثبتة بفوق منغنات البوتاسيوم إلى منع أميلويد amyloid AA من تلطيخ صباغ أحمر الكونغو، في حين أن الأنواع الأخرى من الأميلويد لا تتأثر بذلك.

الاصطناع العضوي

يستعمل فوق منغنات البوتاسيوم من أجل الاصطناع العضوي للعديد من المركبات العضوية. فعلى سبيل المثال تستهلك كميات كبيرة منه لتحضير حمض الأسكوربيك وكلورامفينيكول والسكارين وحمض إيزو النيكوتينيك وحمض البيرازينويك.[٢٣]

(١-٧) ثنائي كرومات البوتاسيوم:

استخدم ثنائي كرومات البوتاسيوم اول مرة كعامل مؤكسد من قبل وليام هنري بيركن في أكسدة الأنيلين غير النقي للحصول على أول صباغ يحضر بشكل مصطنع وهو الموفين.

(١-٧-١) الخصائص العامة

يكون ثنائي كرومات البوتاسيوم على شكل بلورات برتقالية اللون، غير حاوية على ماء التبلور، وليست ذات قابلية للاسترطاب، وذلك على العكس من مركب ثنائي كرومات الصوديوم.

لثنائي كرومات البوتاسيوم خصائص مؤكسدة قوية، وخاصة في الأوساط الحمضية، إذ أنه في الأوساط القلوية يكون أنيون الكرومات CrO_4^{-2} هو السائد. عندما يضاف كاشف قلوي إلى محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم البرتقالي فإن اللون يتحول إلى الأصفر بسبب تشكل أنيون الكرومات، كما في الشكل (١٠). [٢٤،٢٥]

الشكل رقم (١٠): يمثل بلورات دايكرومات البوتاسيوم.

(١-٧-٢) الاستخدامات

يستخدم ثنائي كرومات البوتاسيوم بشكل واسع في المختبرات الكيميائية، حيث يدخل ككاشف في العديد من الاختبارات الكيميائية مثل تحديد نسبة الإيثانول واختبار الفضة واختبار ثنائي أكسيد الكبريت، ويستخدم في مجال الدباغة وذلك كمركب طليعي لشب الكروم، وكذلك يستخدم في مجال معالجة الخشب من أجل التلطيخ اللوني لبعض الأنواع الخاصة مثل الماهوجني.[٢٥،٢٦]

(١-٨) بعض التطبيقات على فصل مكونات خليط باستخدام تقنية كروماتوغرافيا العمود:

١- تم فصل الفيروسين والاسيتل فيروسين بأستخدام الكروماتوكرافيا العمود، واستخدمت السيليكا جل كطور صلب وتم استعمال الهكسان كطور متحرك. [٢٧]

٢- استخدام كروماتوكرافيا الاعمدة لفصل السيس والترانس آزوبنزين، واستعمل بتروليوم ايثر (٦٠-٨٠) كمذيب و الالومينا كطور ثابت. [٢٨]

٣- تم استخدام كروماتوكرافيا العمود لفصل المثيل البرتقالي والمثيل الازرق، واستخدم اوكسيد الالمنيوم المنشط كطور ساكن والماء المقطر كطور متحرك لأزاحة الميثيل البرتقالي والأيثانول كطور متحرك لأزاحة الميثيل الازرق. [٢٩]

(١-٩) طريقة التحليل الطيفي :

يعتمد التحليل الطيفي على ظاهرة امتصاص الطاقة الضوئية المرئية أو فوق البنفسجية أو تحت الحمراء بالمادة المراد تحليلها، وذلك طبقاً لقواعد ثابتة ومعروفة، تحدد على أساسها طول الموجة الممتصة ومدى شدة هذا الامتصاص. وينتج الامتصاص الطيفي في منطقتي الضوء المرئي وفوق

البنفسجي بسبب إثارة إلكترونية في الجزيئات ويقع ذلك في مدى طول موجي بين ٢٠٠ إلى ٨٠٠ نانوميتر (١٠ -٩ متر) .

ويعتمد التحليل الكمي الطيفي على العلاقة الرياضية بين الامتصاص الطيفي وتركيز المادة الماصة للضوء وذلك طبقاً لقانون «لامبرت بير» abc = a حيث a الامتصاص، a معامل الامتصاصية، b طول المسار الضوئي، c التركيز والامتصاص الطيفي في المنطقة المرئية وفوق البنفسجية له استخدامات كثيرة منها حساب ثابت التأين k لدلائل الأحماض والقواعد بواسطة تغير الامتصاص مع تغير الرقم الهيدروجيني، وهناك تطبيق آخر هو تعيين أو ترجيح أحد الاحتمالات المتعددة لتركيب المتراكبات. [٣١،٣٠]

(١-٩-١) جهاز التحليل الطيفي في مجال الأشعة المرئية وفوق البنفسجية:

يسلك الضوء المرئي سلوك الضوء فوق البنفسجي في كثير من مظاهره حيث أن كلاهما ينتج عن إمتصاصة إثارة إلكترونية في الجزيئات . كما أن أغلب الأجهزة التي تستخدم في طرق التحليل الطيفي في مجال الأشعة المرئية هي نفسها التي تستخدم في طرق التحليل الطيفي في مجال الأشعة فوق البنفسجية . لذا فقد جرت العادة على دراستهما معاً . ويغطي هذان الطيفان المجال من ٢٠٠ إلى ٨٠٠ نانو ميتر (ميلي ميكرون) .

(١-٩-٢) مطيافية فوق البنفسجية والمرئية UV and Visible Spectroscopy :

المطيافية الإلكترونية هي أحد أنواع الدراسات الطيفية والتي تعتمد على إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية أو المرئية ، ولقد سميت بهذا الإسم لأن إمتصاص الأشعة في هاتين المنطقتين يؤدي إلى إثارة الإلكترونات في الجزيء الذي يمتص تلك الأشعة[٣٢].

(١-٩-٣) الأطياف الإلكترونية Electronic Spectra :

الطيف الإلكتروني لمركب ما عبارة عن منحنى يوضح تغير شدة الإمتصاص (الإمتصاصية) مع تغير طول موجة الأشعة المارة في محلول المركب تحت الدراسة . ويهمنا من هذا المنحنى معرفة طول الموجة التي تكون عندها شدة الإمتصاص أكبر مايمكن ويرمز لها بالرمز λ max وكذلك معامل الإمتصاص المولي ε عند هذه الموجة . وترتبط شدة الإمتصاص (A) بتركيز المحلول (C) وطول الخلية (L) بالمعادلة التالية : $A = \varepsilon cl$

وتعرف هذه المعادلة أحياناً بإسم قانون لامبرت- بير ومنها يتضح أن شدة الإمتصاص للمركب (أو إمتصاصية المركب) تتناسب تناسباً طردياً مع كل من التركيز المولي (C) وطول الخلية (L) ، وأن معامل الإمتصاص المولي لمركب ما يساوي شدة الإمتصاص لمحلول المركب الذي تركيزه ١ مول / لتر وموضوع في خلية طولها ١ سم . ويعتبر كلاً من λ max و ε من الثوابت الفيزيائية التي تميز المركبات العضوية عن بعضها . ولا تصلح هذه العلاقة في حالة التركيزات المرتفعة جداً . لذا ينصح في التطبيق العملي إستعمال المنحنى العياري (Calibration curve) للإمتصاص بدلالة التركيز عند قمة الإمتصاص الضوئي للمركب . كما يمكن تقدير الكثير من المواد التي لا تمتص الضوء مباشرة وذلك بإضافة مركبات معينة لتكون متراكبات ماصة للضوء أو تكون مجموعة إمتصاص (Chromophore) [٣٥،٣٤،٣٣] .

(١-٩-٧) تطبيقات طيف الأشعة المرئية وفوق البنفسجية[٣٦] :

يعتبر طيف إمتصاص الأشعة في المجال المرئي وفوق البنفسجي وسيلة مفيدة لتأييد دليل على تركيب بنائي معين لمركب ما ويندر وجود إمتصاص مختار يعطي برهاناً قاطعاً على تفاصيل تركيب معين لكن بالطبع يمكن أن تساعد في ترجيح أحد الإحتمالات المتعددة . وعلى سبيل المثال فإن عدم وجود إمتصاص في المجال ٢٧٠ – ٢٨٠ نانو ميتر يعتبر دليلاً قاطعاً على عدم وجود حلقة بنزين في المركب. كما أن إنعدام الإمتصاص من ٢١٠ نانوميتر حتى المجال المرئي دليل قاطع على عدم وجود روابط ثنائية متناوبة. وإن عدم وجود الإمتصاص حتى ١٨٠ نانوميتر فإن هذا دليل على عدم وجود رابطة ثنائية في المركب.

(١-١٠) التحليل الكمي الحجمي

المعايرة هي إضافة محلول قياسي معلوم التركيز إلى محلول مجهول التركيز لمعرفة تركيزه عن طريق معلومية حجم المحلول القياسي والمجهول.

نقطة التكافؤ هي النقطة التي تتكافأ عندها كمية المحلول القياسي مع المحلول المجهول (يكون عندها التفاعل تاما).

نقطة النهاية هي النقطة التي يتغير فيها لون الدليل (نقطة النهاية = نقطة التكافؤ).

يتم الكشف عن نقطة النهاية بطريقتين هي:

١- طريقة نظرية (الأدلة): تغير مفاجئ يحدث في لون الدليل من وسط لآخر.

٢- طريقة آلية : مثل المعايرات الطيفية (تعتمد على الضوء).

هناك أربعة أنواع للمعايرات المستخدمة في التحليل الحجمي وهي

١- **معايرات الحموض والقواعد (معايرات التعادل):** وتتضمن اتحاد أيونات الهيدروجين مع أيونات الهيدروكسيل لتكوين الماء ويمكن الكشف عن نقطة النهاية باستخدام دليل حساس للتغير في الرقم الهيدروجيني أو عن طريق قياس التغير في الرقم الهيدروجيني باستخدام جهاز مقياس الرقم الهيدروجيني.

٢- معايرات الترسيب: وفيها يتحد الكاشف مع المادة المعايرة ليكون راسب شحيح الذوبان ويتم الكشف عن نقطة النهاية فيها باستخدام دليل مناسب يتغير لونه في المحلول بتغير تركيز إحدى المواد المتفاعلة أو عن طريق قياس التغير في جهد المحلول.

٣- معايرة المتراكبات (المعقدات): وفيها يتحد الكاشف (غالبا ما يكون عامل تعقيد كلابي) مع المادة المعايرة (أيون الفلز) لينتج مركب معقد ذائب في الماء ويتم الكشف عن نقطة النهاية فيها باستخدام الأدلة الفلزية.

٤- معايرات الأكسدة والاختزال: (قيد الدراسة) وفيها يعاير محلول عامل مؤكسد بمحلول قياسي من عامل مختزل أو العكس ويتم الكشف عن نقطة النهاية فيها باستخدام دليل مناسب أو بقياس التغير في جهد محلول المعايرة باستخدام جهاز مقياس الجهد.

المحلول القياسي هو محلول مرجعي معلوم التركيز بدقة يحضر من مادة قياسية أولية

المادة القياسية الأولية هي مادة ذات درجة نقاوة عالية جدا ولها مواصفات أو اشتراطات أو متطلبات هي:

١- أن تكون نقية ١٠٠ % .

٢- أن تكون مستقرة (ثابتة في الهواء وعند التجفيف ولا تمتص CO_2 أو الرطوبة ولا تتأكسد ولا تتحلل عند التجفيف ١١٠ ْم في الفرن).

٣- أن تكون ذات وزن جزيئي عالي لتلافي (لتقليل) الخطأ التحليلي.

٤- أن تكون متوفرة وذات تكلفة منخفضة .

٥- أن تكون لها الخواص اللازمة للمعايرة.

المتطلبات الأساسية لتفاعل المعايرة:

١- تفاعل اتحادي (اتحاد الكاشف مع المادة تحت الاختبار بنسبة معينة ثابتة ومحددة في تفاعل موزون).٢- تفاعل سريع .٣- تفاعل مميز أو انتقائي . ٤- تغير حاد وواضح عند نقطة النهاية ٥- تفاعل تام وكمي. **[٣٧, 7]**

٢- طرق العمل

(1-2) طريقة عمل فصل وتنقية وتقدير خليط من محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم وبرمنغنات البوتاسيوم بواسطة كروموتوغرافيا العمود والتحليل الحجمي. [٣٨،٣٩]

(٢-١-١) المواد الكيميائية ومحاليلها القياسية:

1- حمض النتريك 0.5M

2- حمض الكبريتيك 0.1M

3- برمنغنات بوتاسيوم 0.02M

4- ثنائي كرومات البوتاسيوم 0.017M

5- كبريتات حديدوز قياسي 0.1M

6- دليل ثنائي فينيل أمين 0.5%

٧- الومينا Mesh 200 Micron (For Column Chromatography)

(٢-١-٢) الادوات المستخدمة:

١- عمود فصل كروماتوغرافي

٢- سحاحة

٣- دوارق حجمية بسعات مختلفة

٤- بيكرات باحجام مختلفة

٥- دوارق مخروطية باحجام مختلفة

٦- ماصات باحجام مختلفة

٧- صوف زجاجي

٨- اسطوانة مدرجة احجام مختلفة

(٢-١-٣) الاجهزة المستخدمة:

١- ميزان حساس اربعة مراتب بعد الفارزة

٢- جهاز لقياس الطيف المرئي

(٢-١-٤)ظروف طريقة العمل:

١- حمض النتريك هو الطور المتحرك لأزاحة البرمنغنات.

٢- حمض الكبريتيك هو الطور المتحرك لأزاحة الدايكرومات.

٣- الطور الساكن مادة الألومينا

٤- حجم الخليط ١٠ مل (احجام متساوية)

٥- معدل السريان للطور المتحرك 2ml/min

(٢-١-٥)خطوات طريقة العمل:

١- نملأ العمود بمادة الألومينا (الطور الساكن) بارتفاع حوالي ١٥سم وذلك بوضع ٤٠غم منها في ٠,٥M من حمض النتريك والذي يمثل الطور المتحرك، على ان لا يقل ارتفاع الطور المتحرك أعلى العمود عن ١ سم.

٢- نضف ١٠ مل من خليط برمنغنات البوتاسيوم ومحلول ثنائي كرومات البوتاسيوم الى قمة العمود ونفتح الصنبور.

٣- نغسل مادة العمود بحمض النتريك 0.5 M كطور متحرك (حوالي٢٥مل) واضبط سريان الطور المتحرك بمعدل 2ml/min.

٤- نواصل استعمال حمض النتريك كطور متحرك، نلاحظ بعد فترة زمنية تحرك البرمنغنات الى أسفل العمود.

٥- نستعمل محلول حمض الكبريتيك المخففM ٠,٥ كطور متحرك لأزاحة ثنائي كرومات البوتاسيوم ونجمعها في دورق مخروطي اخر .

٦- نعاير كل من برمنغنات وثنائي الكرومات (5ml) باستخدام محلول كبريتات الحديدوز القياسي 0.1 M.

٧- نكرر الخطوة (٦) ثلاثة مرات. [٤١،٤٠،١٢]

(٢-٢) طريقة عمل قياس خليط من محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم وبرمنغنات البوتاسيوم بواسطة الطريقة الطيفية المرئية: [39,٤٠،٤٢]

(٢-٢-١) المواد الكيميائية ومحاليلها القياسية:

1- حامض الكبريتيك المركز.

2- فوق ايودات البوتاسيوم KIO_4.

3- محلول قياسي من برمنغنات البوتاسيوم (0.02M).

4- محلول قياسي من دايكرومات البوتاسيوم (0.017M)

(٢-٢-٢) الادوات المستخدمة:

١-دوارق حجمية بسعات مختلفة

٢- بيكرات باحجام مختلفة

٣- ماصات باحجام مختلفة

٤- اسطوانة مدرجة احجام مختلفة

(٢-٢-٣) الاجهزة المستخدمة:

١- ميزان حساس اربعة مراتب بعد الفارزة

٢- جهاز لقياس الطيف المرئي

(٢-٢-٤)خطوات عمل قياس خليط من محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم وبرمنغنات البوتاسيوم بواسطة الطريقة الطيفية المرئية:

أ- تحديد معامل الامتصاص المولاري للبرمنغنات:

١- ننقل الأحجام التالية :25 ml , 15 , 10 من محلول البرمنغنات القياسي الى ثلاث دوراق مخروطية سعة 250ml بها 50ml ماء.

٢- نضف لكل دورق 10ml من حمض الكبريتيك المركز بحذر شديد باستخدام مبخار مدرج ثم نضف 0.5 g من فوق أيودات البوتاسيوم KIO_4 لكل دورق .

٣- نسخن كل الدوراق حتى الغليان لمدة عشر دقائق .

٤- نبرد ثم ننقل محتوى كل دورق مخروطي الى دوارق قياسية سعة 250 ml واكمل بالماء المقطر حتى العلامة .

٥- نقيس الامتصاص للدوارق الثلاث في طول موجي 440 nm و 545 nm واستخدم 0.5 M من حمض الكبريتيك كمحلول خالي .

٦- نحسب معامل الامتصاص المولاري في الطول الموجي440 nm و 545 nm .

ب- تحديد معامل الامتصاص المولاري للدايكرومات:

١- ننقل الأحجام التالية: 25 ml , 15 , 10 من محلول الدايكرومات القياسي الى دوارق قياسية سعة 250 ml ثم نضف لكل دورق 100ml ماء مقطر.

٢- نضف لكل دورق 10 ml من حمض الكبريتيك المركز بحذر شديد وذلك باستخدام ماصة مدرج ثم نخلط جيدا ثم نكمل بالماء المقطر حتى العلامة.

٣- نقيس الامتصاص للدوارق الثلاث في طول موجي 440 nm و 545 nm واستخدم 0.5M من حمض الكبريتيك كمحلول خالي.

٤- نحسب معامل الامتصاص المولاري في الطول الموجي 440 nm و 545 nm.

ج- نمزج 5 ml لخليط مجهول التركيز من البرمنغنات والدايكرومات ثم نقيس الامتصاصية للخليط في الطول الموجي 440 nm و 545 nm.

٣- النتائج والمناقشة:

٣-١- النتائج لطريقة عمل فصل وتنقية وقياس خليط من محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم وبرمنغنات البوتاسيوم بواسطة كروماتوغرافيا العمود والتحليل الحجمي.

<u>نتائج المعايرة:</u>

٣-١-١ - حسابات برمنغنات البوتاسيوم:

المعايرة	الاولى	الثانية	الثالثة	متوسط الحجم	وزن برمنغنات البوتاسيوم المجهول
حجم محلول Fe^{2+} المستهلك ml	٢١	21.5	21.5	21.33	**0.77 gm** **من اصل وزن ٠.8 gm**

جدول رقم (1): يمثل نتائج المعايرة لمحلول البرمنغنات مع محلول الحديدوز القياسي وحساب وزنه.

يقدّر وزن KMnO4 في الحجم المعطى باستخدام المعادلة التالية و كما يأتي :

$$\text{Wt KMnO4 mg} = \text{eq.wt KMnO4} \times NFe^{2+} \times VFe^{2+} \times 10$$

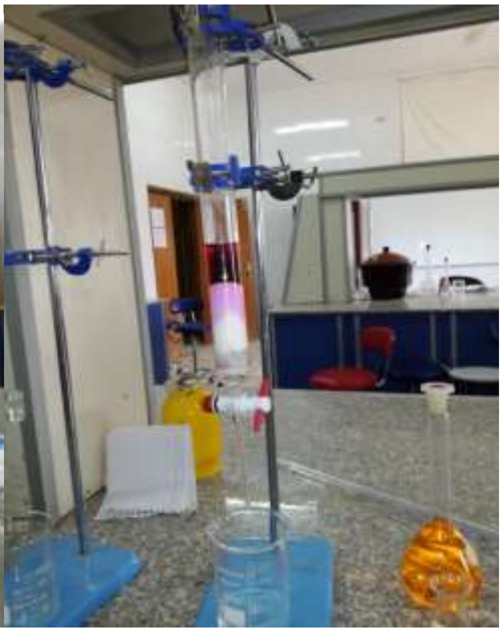
٣-١-٢ - حسابات دايكرومات البوتاسيوم:

المعايرة	الاولى	الثانية	الثالثة	متوسط الحجم	وزن برمنغنات البوتاسيوم المجهول
حجم محلول Fe^{2+} المستهلك ml	23.5	24	23.5	23.66	**1.16 gm** **من اصل وزن ١,٢٥gm**

جدول رقم (2): يمثل نتائج المعايرة لمحلول الدايكرومات مع محلول الحديدوز القياسي وحساب وزنه.

يقّدر وزن **K2Cr2O7** في الحجم المعطى كما يأتي : **[١٢،٤٠،٤١]**

$$\mathbf{Wt\ K_2Cr_2O_7\ mg = eq.\ wt\ K_2Cr_2O_7 \times N_{Fe2+} \times V_{Fe2+} \times 10}$$



الشكل رقم (11): يمثل صور فوتوغرافيا داخل المختبر والتي توضح مراحل فصل البرمنغنات والدايكرومات بأعمدة الفصل الكروماتوغرافي.

٣-٢- النتائج لطريقة قياس خليط من محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم وبرمنغنات البوتاسيوم بواسطة الطريقة الطيفية المرئية.

جدول رقم (٢): يمثل النتائج والحسابات لمادتي البرمنغنات والدايكرومات القياسية والمجهولة التركيز.

خطوات الطريقة	λ nm	V ml	C (M)	A	ε=A/C
أ- برمنغنات البوتاسيوم	440	10 15 25	0.0008 0.0012 0.0020	0.099 0.132 0.229	١٢٣,٧٥ ١١٠,٠٠ ١١٤,٥٠ Av. **ε=116.083**
	545	10 15 25	0.0008 0.0012 0.0020	0.451 0.769* 0.984*	563.75 640.83 492.00 Av. **ε=565.52**

ب- دايكرومـــــــــــات البوتاسيوم	440	10 15 25	0.00068 0.00102 0.00170	0.252 0.383 0.610	370.588 375.490 358.820 Av. ε=**368.3**
	545	10 15 25	0.00068 0.00102 0.00170	0.031* 0.048 0.091	45.588 47.058 53.529 Av. ε=**48.725**
ج- خليط من برمنغنات البوتاسيوم دايكرومات البوتاسيوم	440	10		0.209	
	545	10		0.944	
تركيز البرمنغنات المجهول	**0.083 M** **التركيز الحقيقي** **0.1M**		**تركيز الدايكرومات المجهول**		**0.0021M** **التركيز الحقيقي** **0.0025M**

ملاحظة: تم اعادة التجربة في الجدول اعلاه ثلاث مرات للحصول على نتائج دقيقة لتركيز المجهول.

حيث تم حساب تركيز كل من البرمنغنات والدايكرومات المجهولتين التركيز بتطبيق المعادلتين التاليتين والمشتقة من قانون بير – لامبيرت: [٣٩،٤٠،٤٢]

$$C\ KMnO4 = \frac{(\varepsilon Cr440XA545) - (\varepsilon Cr545\ X\ A440)}{(\varepsilon Cr440X\varepsilon Mn545) - (\varepsilon Mn440\ X\ \varepsilon Cr545\ )} \quad (1)$$

$$C\ K2Cr07 = \frac{(\varepsilon Mn545XA440) - (\varepsilon Mn440\ X\ A545)}{(\varepsilon Cr440X\varepsilon Mn545) - (\varepsilon Mn440\ X\ \varepsilon Cr545\ )} \quad (2)$$

٣-٣- مناقشة نتائج الطريقتين:

٣-٣-١- مناقشة نتائج الطريقة الأولى (فصل وتنقية خليط من برمنغنات البوتاسيوم وثنائي كرومات البوتاسيوم باستخدام تقنية كروماتوغرافيا العمود ومن ثم تقديرهما باستخدام التحليل الحجمي مع المحلول القياسي لكبريتات الحديدوز).

أولاً: تم فصل خليط من برمنغنات البوتاسيوم وثنائي كرومات البوتاسيوم باستخدام تقنية كروماتوغرافيا العمود وكانت هناك عدة معوقات اثناء العمل المختبري تم تجاوزها عن طريق اعادة التجربة في ظروف افضل و زيادة الخبرة العملية والعلمية لاجراءنا هذا البحث واهم تلك المعوقات:

١-تم استخدام مادة الطور الساكن وهو اوكسيد الالمنيوم (الالومينا) في عملية الفصل حيث تم سحب المادة من مخزن قسم الكيمياء، حيث لم تتم عملية الفصل لعدم نزول الطور المتحرك وهو المحلول لحامض النتريك، وتبين ان قطر بلورات(Mesh) هذه المادة قليل يصل الى ٢٠ مايكرون، وقد تم شراء هذه المادة

من السوق المحلية وكان قطر بلوراتها ٢٠٠ مايكرون وهي مخصصة كطور ساكن لتقنية كروماتوغرافيا العمود، وبذلك نجحت عملية الفصل والتنقية بكل سهولة ووضوح.

٢- توجد طريقتين لملء العمود بالطور الساكن طريقة العجينة وهي عملية مزج الطور المتحرك مع الطور الساكن وتكوين عجينة منهما وتوضع داخل العمود، والطريقة الثانية تعتمد على الاهتزازات اليدوية للطور السكان من قبل الباحث، وذلك من خلال النقر او هز عمود الفصل لتسهيل مرور الطور المتحرك خلال حبيبات الطور الساكن، وكانت الطريقة الاولى هي الافضل بعامل مهم وهو الزمن اللازم لانتهاء عملية فصل الخليط، حيث بلغ زمن الفصل لهذه الطريقة ٤٥ دقيقة فقط، اما الطريقة الثانية فقد استغرق وقت الفصل الى ساعتين ونصف، لذلك لم يتم ذكرها في فصل طرق العمل لأننا تجنبنا العمل بها.

٣- تم استخدام نوعين من الاعمدة الزجاجية لعميلة الفصل وهما عمود فصل خاص لهذا الغرض (تم شراءه من السوق المحلية)، والاخر سحاحة حجم ١٠٠ مل (من مخزن قسم الكيمياء)، حيث تم استخدام النوع الاول بنجاح رغم انه يأخذ كمية اكبر من الطور الساكن لكبر قطره اما السحاحة فكانت عملية الفصل بطيئة لصغر القطر وكذلك التدريج للسحاحة يمنع الرؤية الواضحة لعملية الفصل كما موضح في الشكل رقم (١١).

ثانياً: بعد عملية الفصل والتنقية لمحلولي البرمنغنات وثنائي الكرومات تم معايرتهما مع المحلول القياسي لكبريتات الحديدوز 0.1M ، حيث تمت المعايرة بمرحلتين الاولى قمنا بتحضير محاليل من المادتين معلومة التركيز لغرض تثبيت الظروف المثلى لعملية التحليل الحجمي، ومن ثم قمنا بأخذ نماذج مجهولة ومعايرتها لثلاث مرات للضبط والدقة ، وكانت النتائج جيدة وقد تم حساب النسبة المئوية للمادة المسترجعة لكلا المحلولين حيث كانت اكثر من ٩٥% بالنسبة للبرمنغنات واكثر من ٩٠% للدايكرومات، وكما مبين ذلك في الجدولين رقم (١،٢)، وكانت هذه النتائج متوافقة مع المصادر [١٢،٢٧،٢٨،٢٩] من حيث استخدام نفس الطور الثابت (الالومينا) في فصل وتنقية وتقدير المركبات.

٣-٢-٣- مناقشة نتائج الطريقة الثانية (تقدير خليط من برمنغنات البوتاسيوم وثنائي كرومات البوتاسيوم باستخدام الطريقة الطيفية المرئية).

تعتبر هذه الطريقة مباشرة لقياس هاتين المادتين باستخدام الطيف المرئي، حيث تشترك المادتين بطولين موجيين يمثلان الطول الموجي الاقصى لهما اي تمتص هاتين المادتين اعلى ما يمكن في هذين الطولين الموجيين وهما nm٥٤٥،٤٤٠ مع تفاوت قيم الامتصاص لهاتين المادتين في هذين الطولين الموجيين كما يظهر جلياً في جدول نتائج هذه الطريقة رقم (٢)، ولضبط هذه النتائج تم اجراء هذه التجربة لأكثر من ثلاث مرات وذلك لتثبيت الظروف المثلى قبل قياس الخليط المجهول وكانت النتائج جيدة وقيمة الاسترجاع عالية نسبياً حيث بلغت للمادتين اكثر من ٨٠%، وقد يعود السبب لعدم استقرار جهاز الطيف المرئي في اغلب الاحيان، والسبب الآخر قد تكون المادة غير نقية والسبب الاخير قد نكون نحن لدينا اخطاء في القياس والتحضيرات المختبرية، وتتصف هذه الطريقة بكثرة حساباتها المعتمدة بشكل رئيسي على قانون بير لامبيرت، حيث تم اشتقاق هذا القانون لجعله

مناسباً لحساب هاتين المادتين مع وجود بعض التعقيدات في كونهما يشتركان في طولين موجيين، وكانت النتائج المستحصلة بهذه الطريقة متوافقة مع المصادر [٧،٢،3٦,٣].

٣-٣-٣- المقارنة بين الطريقتين:

يمكن المقارنة بين الطريقتين من حيث النتائج والتكنيك لتلك الطريقتين، فقد كانت نتائج الطريقة الاولى افضل لسبب تم ذكره اعلاه هو ان الطريقة الاولى تقوم بتنقية المادتين عن طريق الفصل بواسطة تقنية كروماتوغرافيا العمود وبذلك يكون قياس تركيزهما ادق ونسبة الاسترجاع للمادة المجهولة افضل، وهذا ينطبق على كميات خليط النموذج التي تكون كبيرة نسبياً اما عند الكميات التي تكون قليلة نسبياً فتظهر الطريقة الطيفية افضل، بالإضافة لذلك فان الطريقة الطيفية ادق من الطريقة الحجمية في قياس النماذج خصوصاً في الكميات الصغيرة نسبياً كما اسلفنا الذكر، اما من ناحية التكنيك فان الطريقتين ينتميان الى نوعين مختلفين تماماً من طرق التحليل وهو التحليل الكروماتوغرافي مقترناً بالتحليل الحجمي في الطريقة الاولى، اما الثانية فتنتمي الى طرق التحليل الطيفي المرئي، وهذا هو احد اهدافنا المهمة لهذا البحث للتعلم والتدرب ومعرفة اكبر عدد ممكن من التقنيات في هذه المرحلة من الدراسة، من ناحية اخرى يمكن مقارنة الطريقة الأولى المبنية على الفصل بتقنية كروماتوغرافيا العمود مع تقنيات الكروماتوغرافيا الاخرى حيث تتميز هذه الطريقة بالمحافظة وبنسبة استرجاع وبنقاوة عالية للنموذج، اما بقية التقنيات الكروماتوغرافيا فلا يمكنها استعادة النموذج مثل كروماتوغرافيا (الورقية والطبقة الرقيقة والغاز والسائل والايونية ....الخ).[٧،٢،٣٢،٤]

المصادر

1- Mikhail Tswett Chlorophyll Dye Adsorption." (Physical-chemical studies of chlorophyll Adsorption.) vol. 24, pp. (316–326), (1906).

2- Ettre, L. S.; Sakodynskii, K. I. , "M. S. Tswett and the discovery of chromatography II: Completion of the development of chromatography (1903–1910)". Chromatographia. 35 (5-6): (329–338) (1993).

3- Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. "Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution". J. Org. Chem. 43 (14): 2923–2925, (1978).

4- IUPAC Nomenclature for Chromatography IUPAC recommendations 1993, Pure & Appl. Chem., Vol. 65, No. 4, pp.819–872, 1993.

5- Reich, E.; Schibli A., High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants ,New York: Thieme. (2007).

6- Pavia, Donald L., Gary M. Lampman, George S. Kritz, Introduction to Organic Laboratory Techniques (4th Ed.), (2006).

7- Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R. Crouch, Fundamentals of Analytical Chemistry, 9th Ed., (2014).

8- Bailon, Pascal; (et al), An Overview of Affinity Chromatography, Humana Press, p. (161 – 169), (2000).

9- Ninfa Alexander J., David P. Ballou, and Marilee Benore. Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology. Hoboken, NJ: John Wiley, (2010).

10- Müller, Tobias K.h., and Matthias Franzreb. "Suitability of Commercial Hydrophobic Interaction Sorbents for Temperature-controlled Protein Liquid Chromatography under Low Salt Conditions." Journal of Chromatography A 1260 p. 88-96, (2012).

11- Ren Jun, Peng Yao, and Lingyun Jia., "Salt-independent Hydrophobic Displacement Chromatography for Antibody Purification Using Cyclodextrin as Supermolecular Displacer." Journal of Chromatography A 1369, p. 98-104. (2014).

12- Davies (et al), Isolation of Three Components from Spearmint Oil: An Exercise in Column and Thin-Layer Chromatography, p. 78-85, (2007).

13- Elke Hahn: Applied Thin-Layer Chromatography. Best Practice and Avoidance of Mistakes. Wiley-VCH, Weinheim u. a., p 618-625 (2000).

14- Pavia, Donald L., (et al), Introduction to Organic Laboratory Techniques (4th Ed.). Thomson Brooks/Cole. pp. 797–817, (2006).

15- Grob Robert L. and Barry Eugene F., Modern Practice of Gas Chromatography (4th Ed.). John Wiley & Sons., p451-467, (2004).

16- Siddiqui M. Raza; (et al), "Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review". Arabian Journal of Chemistry, p. 67-72, (2013).

17- Gerber, F.; (et al), "Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3μm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice". Journal of Chromatography A. 1036 (2): 127–133, (2004).

18- Laurence M. Harwood, and Christopher J. Moody, Experimental organic chemistry: Principles and Practice. p. 180–185, (1989).

19- Fair, J. D.; and Kormos, C. M., J. Chromatography. A, 1211(1-2), p. 49-54, (2008).

20- Harrison et al. Bio separations Science and Engineering, Oxford University Press. New York, (2003).

21- Fatiadi, A. "The Classical Permanganate Ion: Still a Novel Oxidant in Organic Chemistry". Synthesis. (2): p. 85–97. (1987).

22- Kovacs KA, Grof P, Burai L, and Riedel M. "Revising the Mechanism of the Permanganate/Oxalate Reaction". J. Phys. Chem. A. 108 (50): p. 11026- 11031, (2004).

23- "Potassium Permanganate MSDS". Sigma-Aldrich. Retrieved 20/3/2017.

24- Gerd Anger, (et al), "Chromium Compounds" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, (2005).

25- "Potassium dichromate MSDS". Sigma-Aldrich. Retrieved 20/3/2017.

26- Zug KA, (et al), Patch-test results of the North American Contact Dermatitis Group. 20(3):p.149-60, (2009).

27- Ninfa, Alexander J.; Ballou, David P.; Benore, Marilee; Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology (2nd ed.). Wiley. p. 133-135, (2009).

28- Baur, Daniel; (et al) "Comparison of batch and continuous multi-column protein A capture processes by optimal design". Biotechnology Journal. John Wiley & Sons, Inc. 11 (7):p. 920–931, (2016).

29- Uhlén M. "Affinity as a tool in life science.". Biotechniques. 44 (5):p. 649–654, (2008).

30- Malmstadt, H. V., Enke, C. G., and Crouch, S.R. Microcomputers and Electronic Instrumentation: Making the Right Connection, American Chemical Society, Washington, DC,; pp7-13, 28-34, (1994) .

31- Smith, D. R. Anal. Chem., 72, , 503A, p. 662-668, (2000).

32- Christian, G. D. Analytical Chemistry, 6th Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, p. 90-94, (2004).

33- Vitha, M. F., Carr, P. W., and Mabbott, G. A., Analytical Chemistry, 82, p. 901-906, (2005).

34- Auroux, P. A., Iossifidis, D., Reyes, D. R., Manz, A. Anal. Chem., 74, p. 2637-2652, (2002).

35- Klinger, J. “Influence of Pretreatment on matter spectra” Chemistry Material, 17, p. 2755-2768, (2005).

36- Chemistry 215 Analytical Chemistry Laboratory Manual. P.11-16. Izmir Institute of Technology, Turkey, (2009).

٣٧- كتاب (الكيمياء التحليلية التحليل الحجمي والوزني) للمؤلف الزامل ابراهيم زامل لعام ١٩٩٨.

38- Harry W. Lewis and Christopher J. Moody, Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice , Wiley Black well, p.173-181, (1989).

39- British national formulary : BNF 70 (7^{th} ed.). British Medical Association. p. 1052-1054, (2015).

40- General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, internal standard, ISO/IEC 17025, 2^{nd} Ed., (2005).

41- http://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/protein-chromatography/affinity-chromatography. Retrieved 1/3/2017.

42- A.I. Vogel, (et al), Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry (8th Ed.), (2007).