

مقرر محاضرات القسم الثاني لتقانات تحليل الأغذية ٢

١. د. أنور الحاج علي  
لطلاب السنة الرابعة تخصص علوم أغذية

# نظرية التحليل بالطيف

## Theory of Spectroscopy

### التحليل بالطيف:

هو فرع من العلوم التي تعني بدراسة التفاعل ما بين إشعاع الطيف الكهرمغناطيسي ( **Electromagnetic radiation** ) والمادة ، ومن أهم مظاهر هذا التفاعل ونتائجه امتصاص الطاقة أو انبعاثها من قبل المادة بكميات متفردة تدعى بالكونتا ( quanta ).

تحدث عملية الامتصاص والانبعاث خلال كل مدى الطيف الكهرمغناطيسي أي من منطقة أمواج الغاما إلى منطقة أمواج الراديو، فعندما يقاس تردد هذا الشعاع تجريبيا فإنه يعطي قيم تغير الطاقة، ومن هذه القيم يمكن الوصول إلى معرفة مستويات الطاقة للمادة ، لذا تكون الطرق التي تقيس تردد الإشعاع الممتص أو المنبعث تجريبيا مؤدية إلى معرفة مستويات الطاقة للمادة بعملية تحليل الطيفي .

ويكون تفاعل الإشعاع مع المادة الأساس لتقنيات كثيرة من الأجهزة الحديثة. ويتألف هذا الإشعاع من أمواج تتراوح أطوالها بين القصيرة جدا" والطويلة وإن الضوء المرئي بشكل جزءا" صغيرا" من هذا الطيف.

لفهما علينا معرفة أساس وخواص الإشعاعات:  
الإشعاعات :هي قوة في حقل فراغ لها خصائص التذبذب(التردد) والشدة ، وابتسط  
شيء لوصفها هو تملكها لخصائص الأمواج وخصائص الدقائق المتناهية في  
الصغر( الفوتونات) الحاملة لطاقة، فالإشعاع ذو خصائص طبيعية مزدوجة.

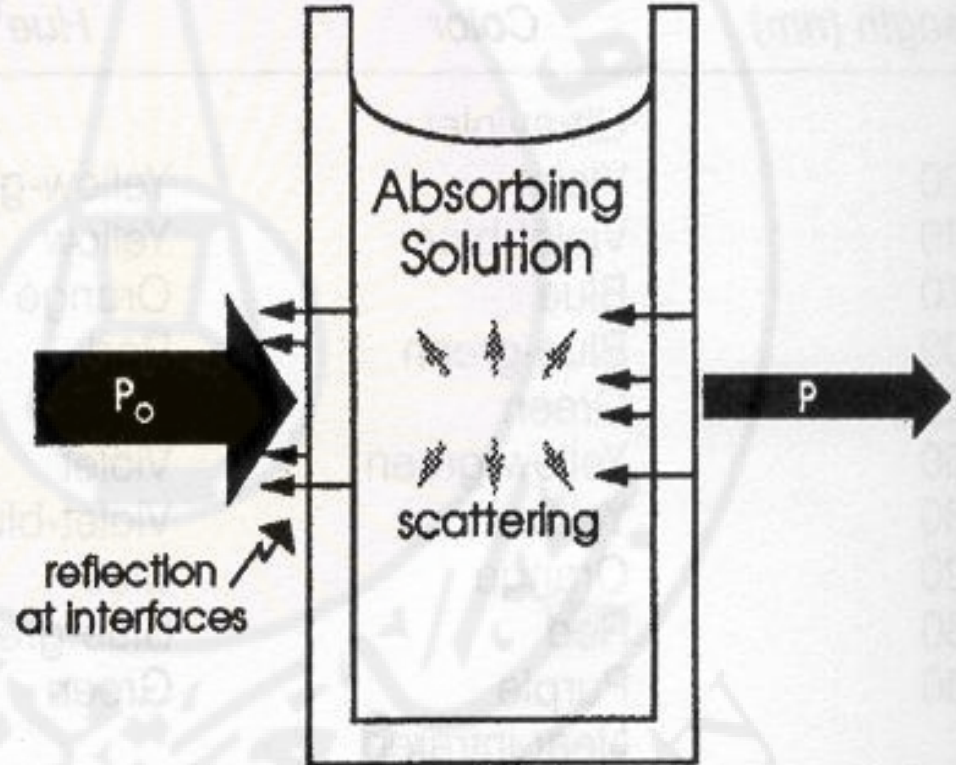


## خصائص الضوء

| طبيعة الضوء كموجة | طبيعة الضوء كمادة (فوتونات)  |
|-------------------|------------------------------|
| الانكسار          | التفاعل مع المادة أو الجزيئي |
| الارتداد          | الامتصاص                     |
| التبعثر           | الإصدار والانبعاث            |

ماذا يمكن ان يفعل الضوء

- الانكسار
- الارتداد او الانعكاس
- العبور أو النفوذ
- الامتصاص

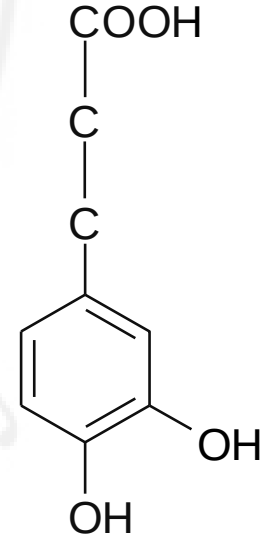
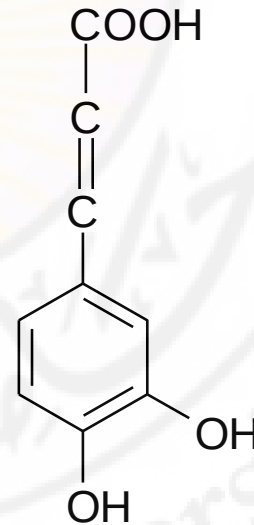
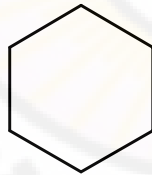
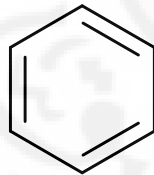
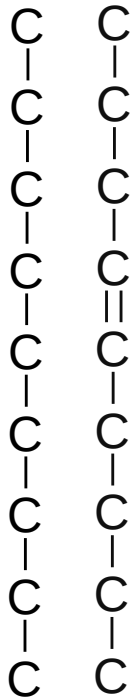


# ماذا يحدث في عملية الامتصاص

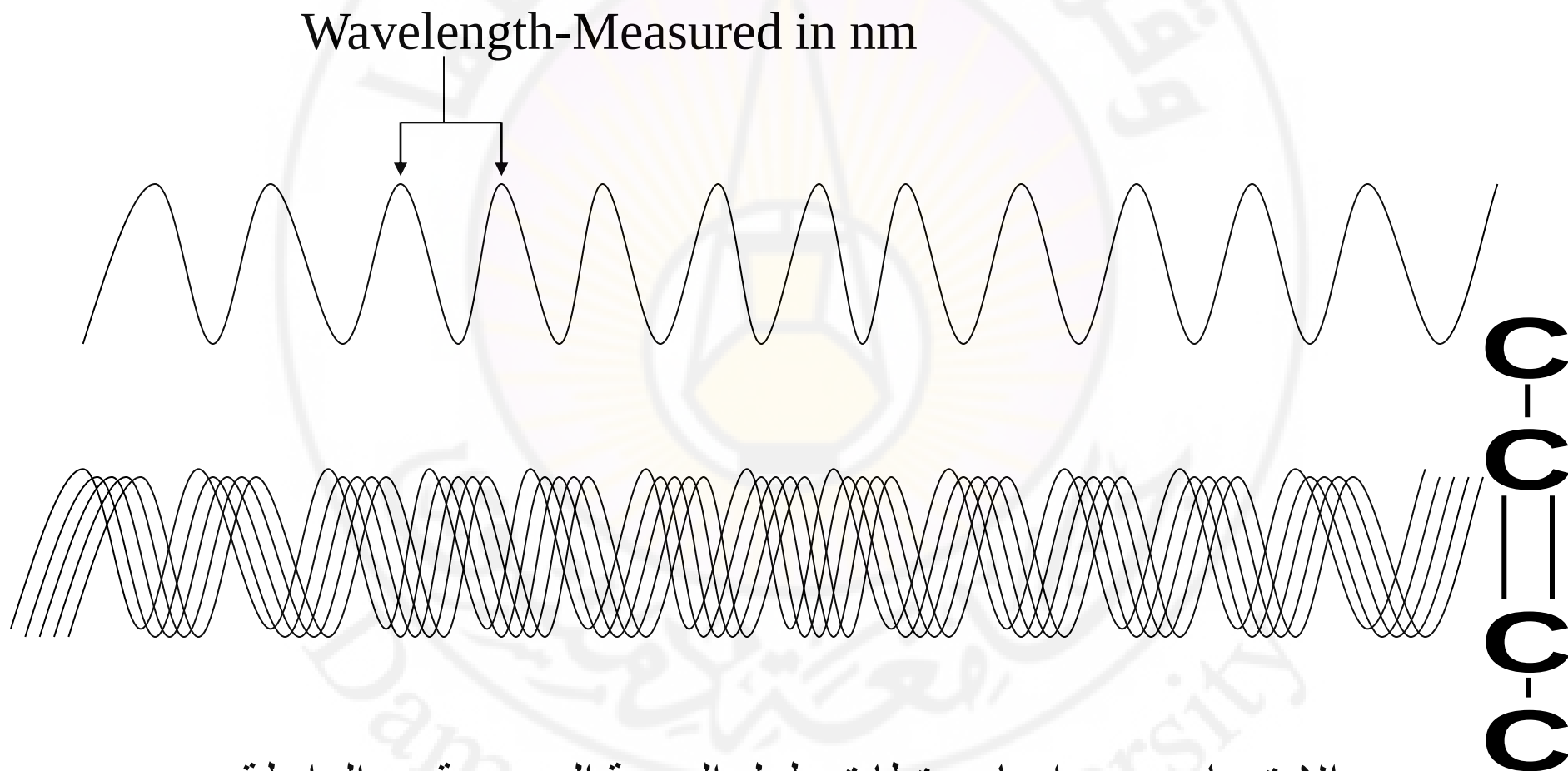
١. اهتزاز الرابطة المضاعفة ( UV/VIS spectroscopy ).

٢. انتقال الإلكترونات إلى مستوى طاقة أعلى

## Fluorescence spectroscopy



# Absorbance in it's Simplest Form

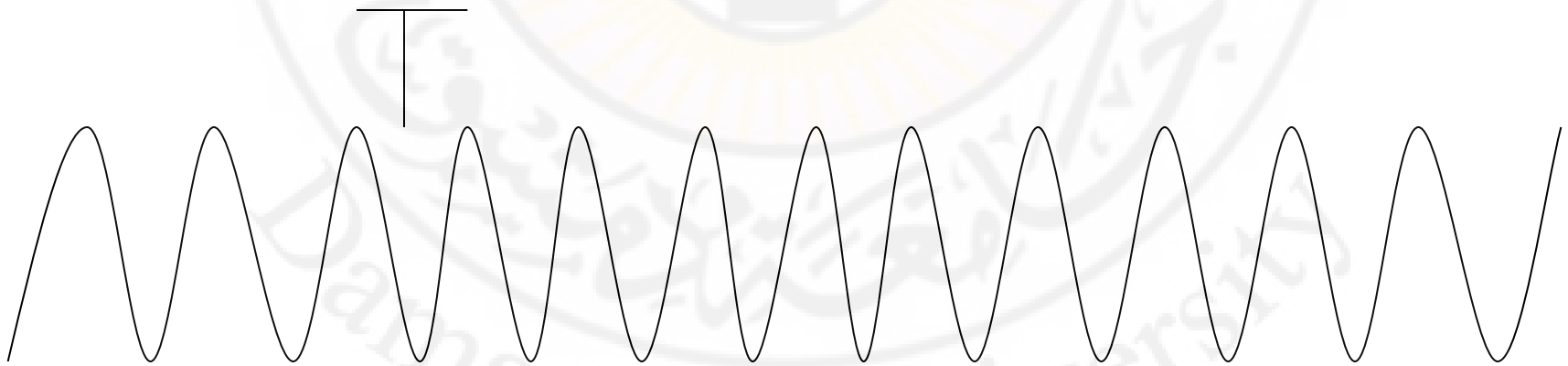


الامتصاص هو إيجاد و تطابق طول الموجة الصحيحة مع الرابطة  
المضاعفة للمركب المقاس

## تعريف طول الموجة

هو الزمن بين قمتين متتاليتين أو منخفضتين متتاليتين ويطلق عليها الدورة.  
أما التردد فهو عدد الدورات في الثانية ( $\nu$ )

**Wavelength-Measured in nm**



وتتعلق خصائص الضوء من حيث طول الموجة وطاقة الفوتونات بمعادلتين وهما :

المعادلة الأولى:

$$\lambda \times v = c$$

حيث تدل :

$\lambda$  - طول موجة الإشعاع بالسـم

$v$  - تردد الشعاع بالثانية

$c$  - ثابت سرعة الضوء ( $3 \times 10^{15}$  سم/ثانية).

والمعادلة الثانية هي:

$$h \nu = E$$

حيث تدل:

$E$  – طاقة الإشعاع او الفوتون

$h$  – ثابت بلانك ويساوي  $(6.62 \times 10^{-27})$

$\nu$  - تردد الشعاع بالثانية

• طول الموجة والتواتر والعدد الموجي وطاقة الإشعاع جميعها مترابطة.

# اطوال الموجات الطيفية الكهرومغناطيسية المستخدمة في تحليل الأغذية

## UV and Visible Light

| <u>Wavelength (nm)</u> | <u>Color</u> | For Food Analysis purposes                                                                                                 |
|------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • <380                 | UV-colorless | • UV light (~195-400 nm)                                                                                                   |
| • 380-420              | violet       | • Visible light (~400-800 nm)                                                                                              |
| • 420-440              | violet-blue  | • Near-infrared (>800 nm)                                                                                                  |
| • 440-470              | blue         | • Other parts of the electromagnetic spectra many be used with specific instruments, but these are the most commonly used. |
| • 470-500              | blue-green   |                                                                                                                            |
| • 500-520              | green        |                                                                                                                            |
| • 520-550              | yellow-green |                                                                                                                            |
| • 550-580              | yellow       |                                                                                                                            |
| • 580-620              | orange       |                                                                                                                            |
| • 620-680              | red          |                                                                                                                            |
| • 680-780              | purple       |                                                                                                                            |
| • >780                 | NIR          |                                                                                                                            |



# القياسات الطيفية

١. القياسات الطيفية فوق البنفسجي (Ultraviolet (195-400 nm) وتستخدم لجميع المركبات الغير ملونة مثل الأحماض العضوية والمركبات الفينولية الخ.....
- ٢ - القياسات الطيفية في المجال المرئي (Visible (400-800 nm) وتستخدم للمركبات الملونة مثل الكاروتينات، والأنتوسيانات وإضافة الكاشف المساعد في تلون المادة المكشوفة.
- ٣ - القياسات في مجال الأشعة تحت الحمراء (Infrared (>800 nm) ويستخدم لتمييز روابط الجزيئات وتشكلها (C-C)، (C=O)، (O-H)
- ٤ - قياسات الرنين المغناطيسي النووي NMR وتتضمن التأثير المتبادل بين الإشعاع الميكروي منخفض الطاقة وقوى الذرات

## تفاعلات الإشعاع مع المادة

- يحدث الامتصاص عندما تتطابق طاقة الفوتونات الساقطة على المادة مع تغيرات الطاقة في المادة أو الجزيء.
- المادة أو الجزيء يتكون من ذرات متصلة مع بعضها البعض بروابط كيميائية وفي لحظة معينة يمكن وصف موضع الجزيء الفراغي وفق إحداثيات  $x$  ،  $y$  ،  $z$  والعائدة لكل ذرة .
- الجزيء والمكون من  $n$  من الذرات له محاور إحداثية ثلاثية.
- تتغير هذه المحاور الإحداثية مع الزمن لأن الذرات في حالة حركة مستمرة في جميع درجات الحرارة
- تتحرك الذرات معاً في خط مستقيم وتحدث حركات دورانية وحركات اهتزازية  
إن تردد هذه الحركات يتطابق مع ترددات أجزاء من الأشعة الكهرومغناطيسية وهذا يؤدي إلى حدوث تفاعل بين المادة الكيميائية والأشعة.

## انواع طاقة الامتصاص

١. طاقة امتصاص دورانية (دوران حول محور الجزيء مثل C-H حيث تتحرك ذرات H حركة تدويرية حول ذرة C وذرة الأكسجين حول الرابطة المزدوجة في ذرة الكربون C=O وهكذا .
٢. طاقة امتصاص اهتزازية للجزيئات العضوية ( S=C=S )  
الاهتزازات الأساسية المحتملة هي:  
للجزيئات المستقيمة = ٣ ن - ٥  
للجزيئات الفرعية = ٣ ن - ٦ حيث تدل ن على الذرات في الجزيء
٣. طاقة امتصاص الكترونية وفيه يتم انتقال الإلكترون إلى مستوى طاقة أعلى

خلاصة تفاعل الإشعاع مع المادة:  
ويتضمن شرطين اثنين للامتصاص

١- الشرط الأول

ان يكون تردد الأشعة الساقطة نفس التردد التدويري أو التردد الاهتزازي أو التردد الكهربائي أو التردد النووي في الجزيء او المادة

٢- الشرط الثاني

يجب أن يملك الجزيء قطبية دائمة أو قطبية محدثة  
(طاقة امتصاص الكترونية)



## قانون بير Beers law

عندما يسقط شعاع وحيد اللون على عينة تحتوي أنواع كيميائية ماصة، تنخفض قوة الإشعاع كلما زاد امتصاص هذه الجزيئات للطاقة التي يحملها الإشعاع، لذا فإن الانخفاض في قوة الإشعاع يتناسب طردياً مع تركيز المواد الماصة ويحسب الامتصاص بأنه اللوغارتم العشري لمقلوب نفاذ الشعاع داخل المادة المقاسة.

$$(١) \quad A = \log 1/T = -\log T$$

$T = \%$  النفاذية

قانون بير يزداد الامتصاص بزيادة التركيز

$$(2) \quad A = abc$$

$A$  – تدل على الامتصاص

$a$  – الامتصاص النوعي

$b$  - تدل على طول الخلية

$c$  - التركيز بالمولارتي

## علاقة النفوذ بالامتصاصية بقانون بير

بحل المعادلتين نجد بأن

$$- \log T = abc$$

لتحقيق قانون بير يجب أن:

١. أن تكون الأشعة الساقطة وحيدة اللون
٢. أن تمتص الجزيئات الأشعة الساقطة
٣. يجب أن يحدث الامتصاص في حجم خلية الكوارتز المحدد طولها

## علاقة النفوذ بالامتصاصية

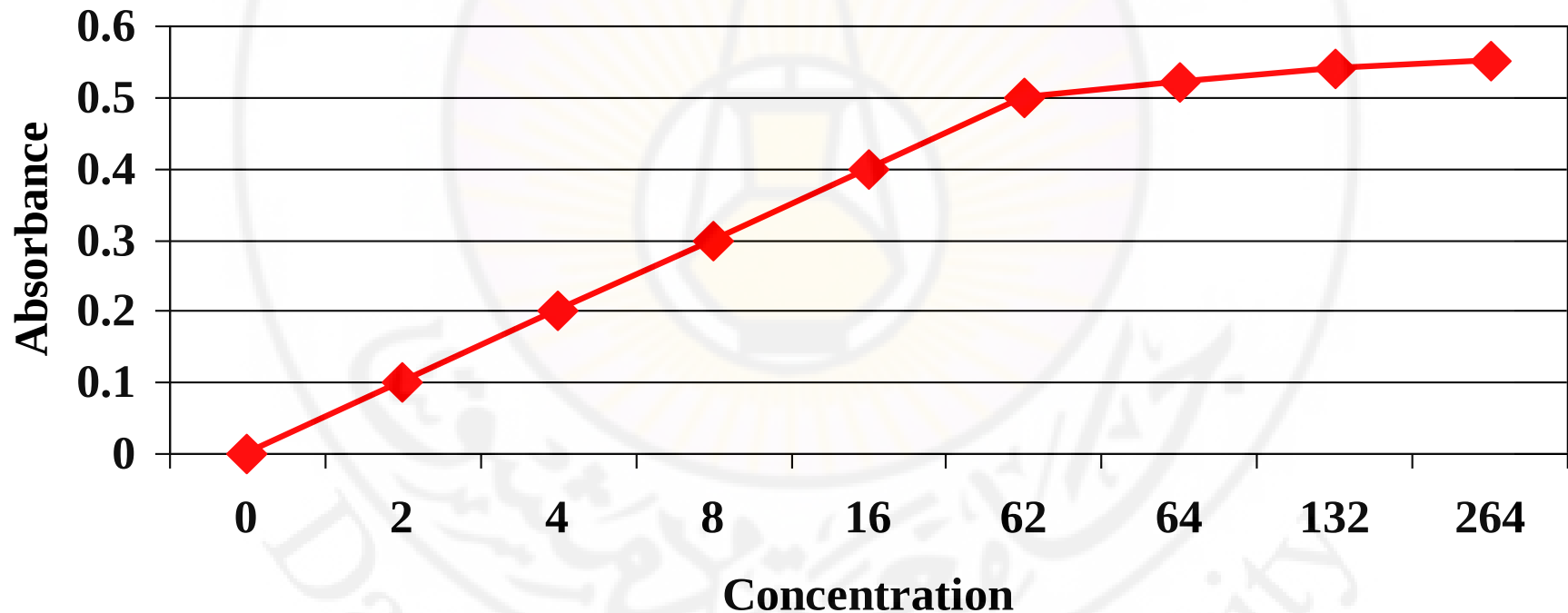
قيست عينة من محلول قياسي بنسبة نفوذ الشعاع ٥٠% على طول موجة ٦٥٠ نانوميتر فما هي قيمة الامتصاص بجهاز الطيف الضوئي أحادي الشعاع.  
نطبق القانون السابق

$$A = -\log T$$

$$A = -\log(0.500) = 0.301$$

Maximum Level of Beers Law  
Actual Cutoff is Dependent on the Given Assay

### Linear Cut-Off for Beer's Law in a Given Assay





# Quantifying an Unknown

Linear regression to obtain the SLOPE

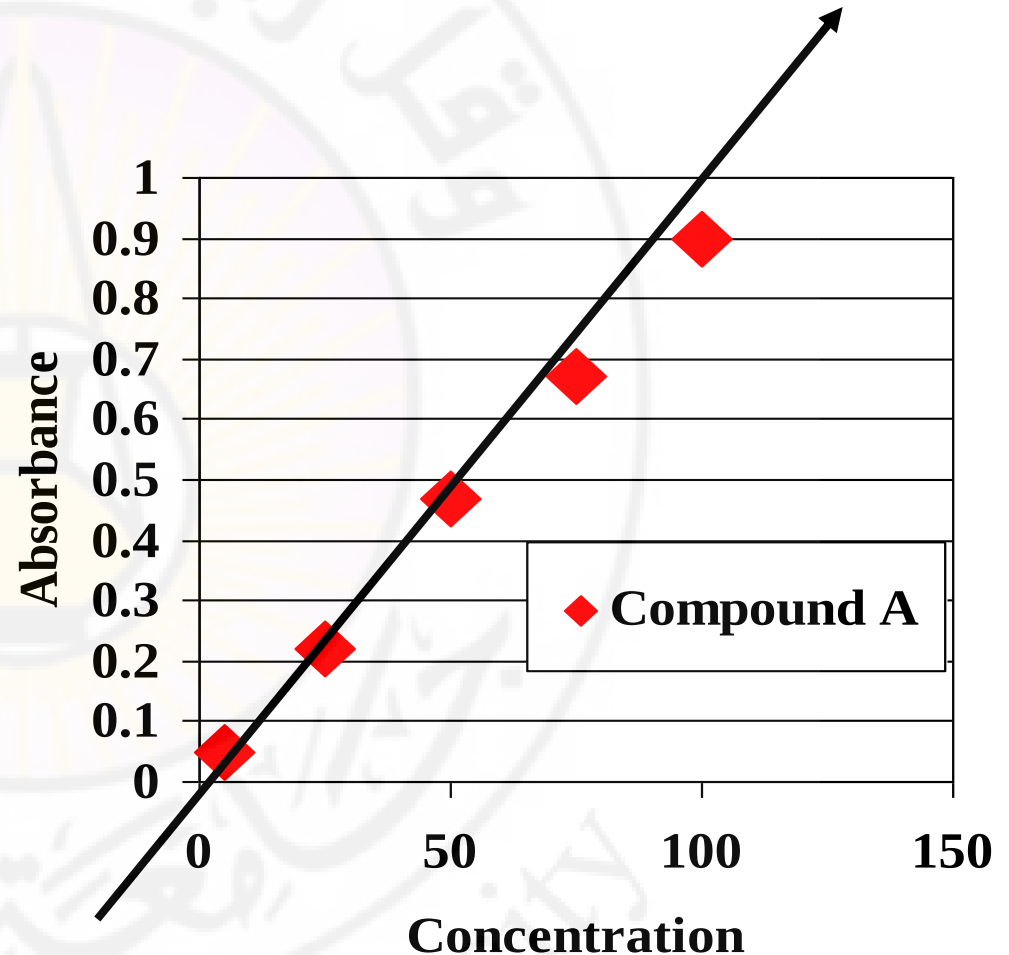
- Serial dilution of a standard
- Y-axis is dependent variable
- X-axis is independent variable
- Determine slope from Linear equation:

$$Y = mX + b$$

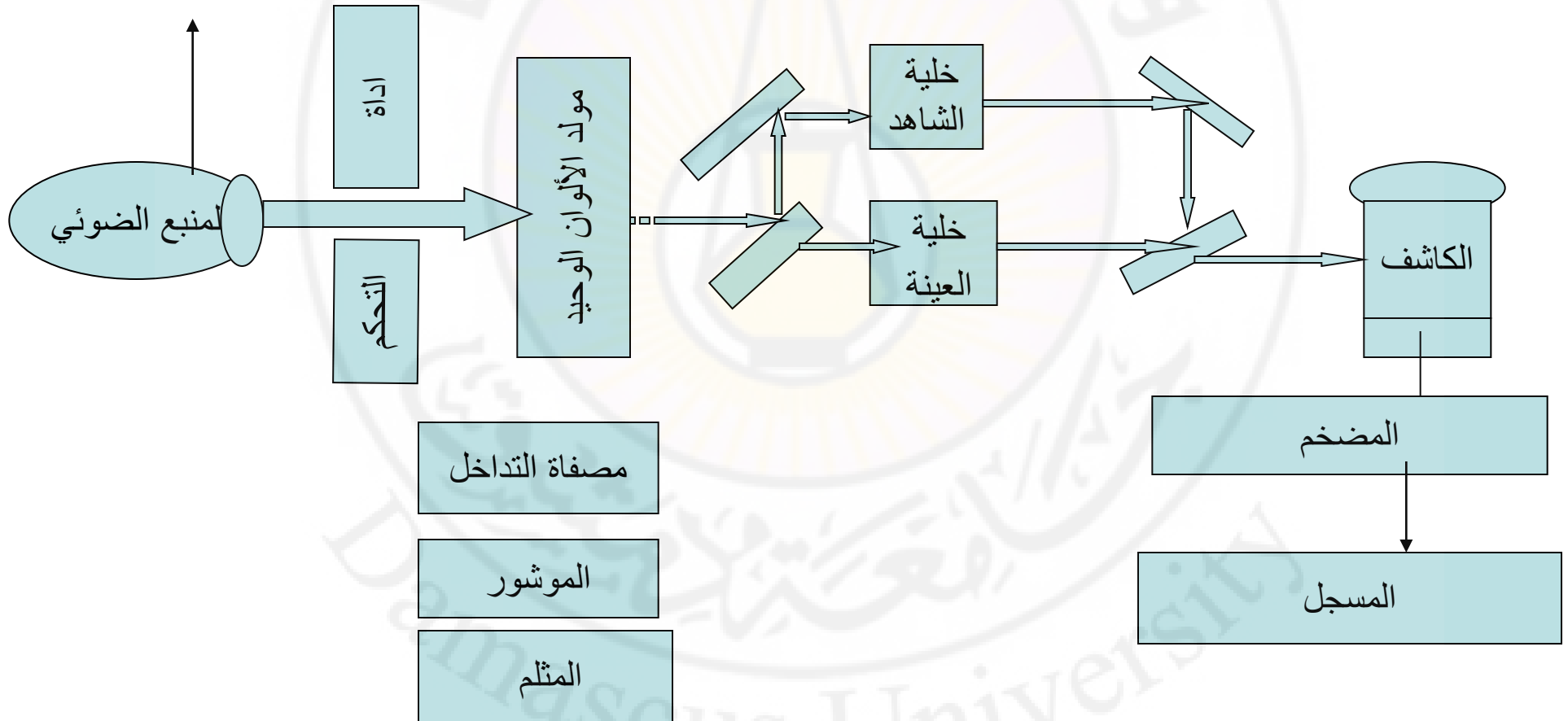
Y = the response (Abs.)

X = concentration

m = slope

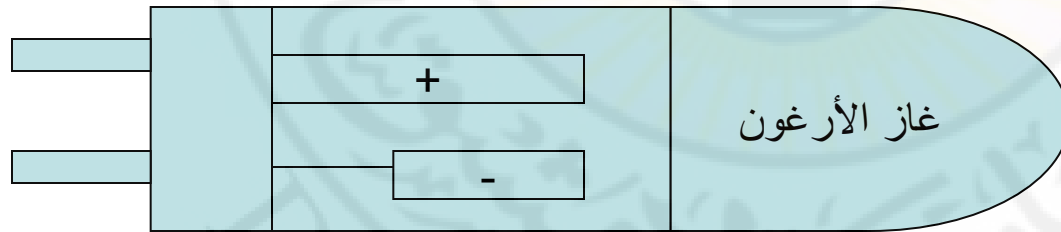


# المكونات الأساسية للمطياف المرئي والغير المرئي



# المصادر الضوئية

- مصباح سلك التفستين (+)(المنطقة المرئية)
- مصباح الهيدروجين المفرغ أو الديتريوم (الأشعة فوق البنفسجي)
- اسلاك ساخنة أو مصابيح ضوئية أو واد سيراميك متوهجة (تحت الحمراء)
- منابع ليزرية وحيدة اللون (الفلورة المتألقة)



## مولدات اللون الوحيد monochrome

### ١. الموشور

- الزجاجي والعدسات (في المجال المرئي )
- الكوارتز أو السيلكا المصهور ( منطقة فوق البنفسجي)
- المواشير المصنوعة من المعادن القلوية الترابية (الأشعة تحت الحمراء)

### ٢- المثلم أو شبكات الأنعراج

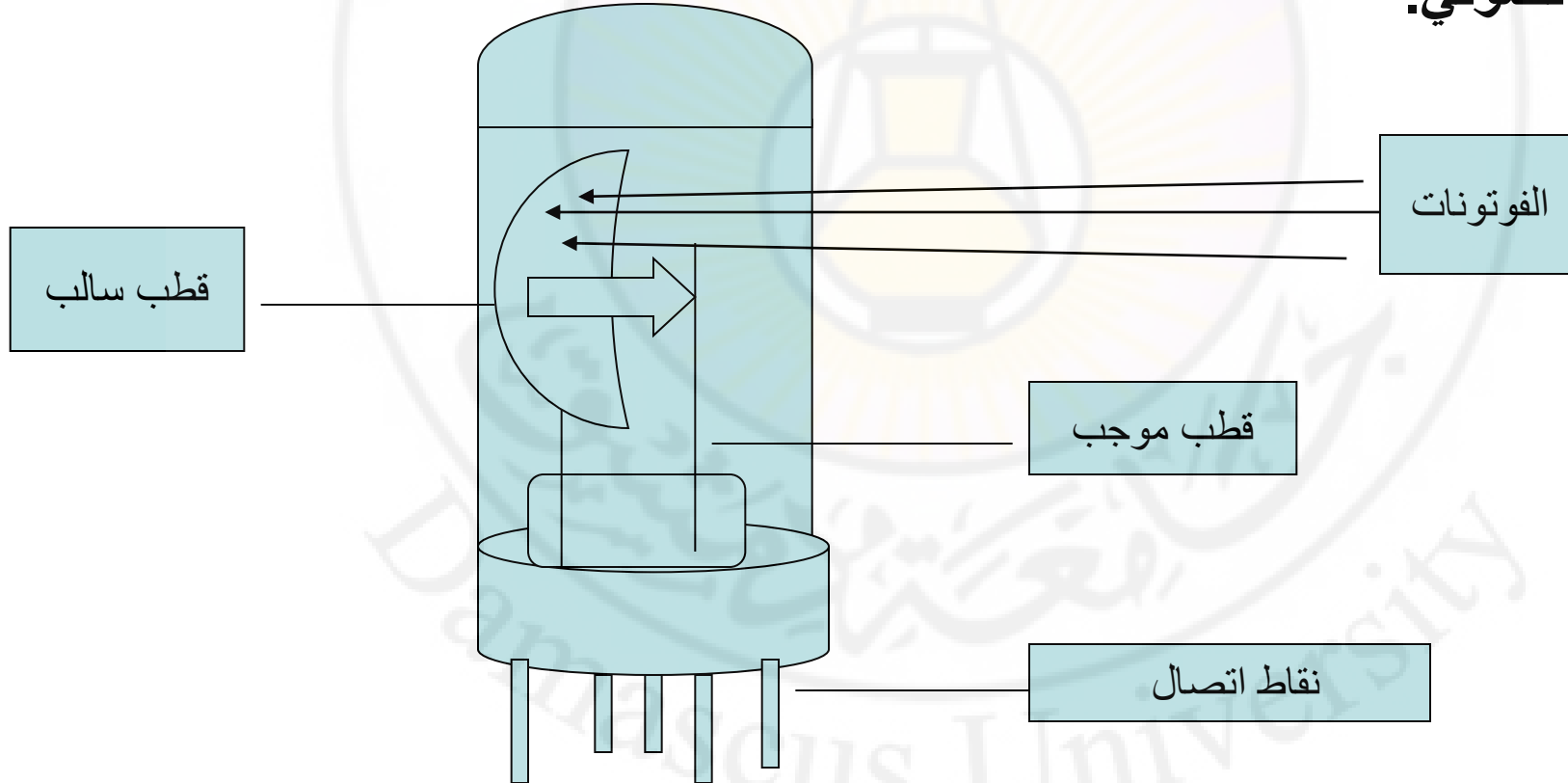
تتألف من عدد كبير من الخطوط المتوازي مسطرة على سطح شديد الصقل من حوالي ١٥٠٠٠ إلى ٣٠٠٠٠ أخدود في في الإنش الواحد، وتعمل كمراكز لتركيز الأشعة من أجل الحصول على أمواج ذات أطوال واحدة

### ٣- مصفاة التداخل

وظيفتها إمرار ضوء وحيد اللون وتكثيفه

## المكشاف أو الحاس Detector

الحاس اداة قادرة على حس الإشعاع النافذ من العينة وتحويل هذا الشعاع إلى إشارة كهربائية واهم الحاسات المستعملة في قياس الطيف المرئي والأشعة فوق البنفسجي هو الأنبوب الضوئي.

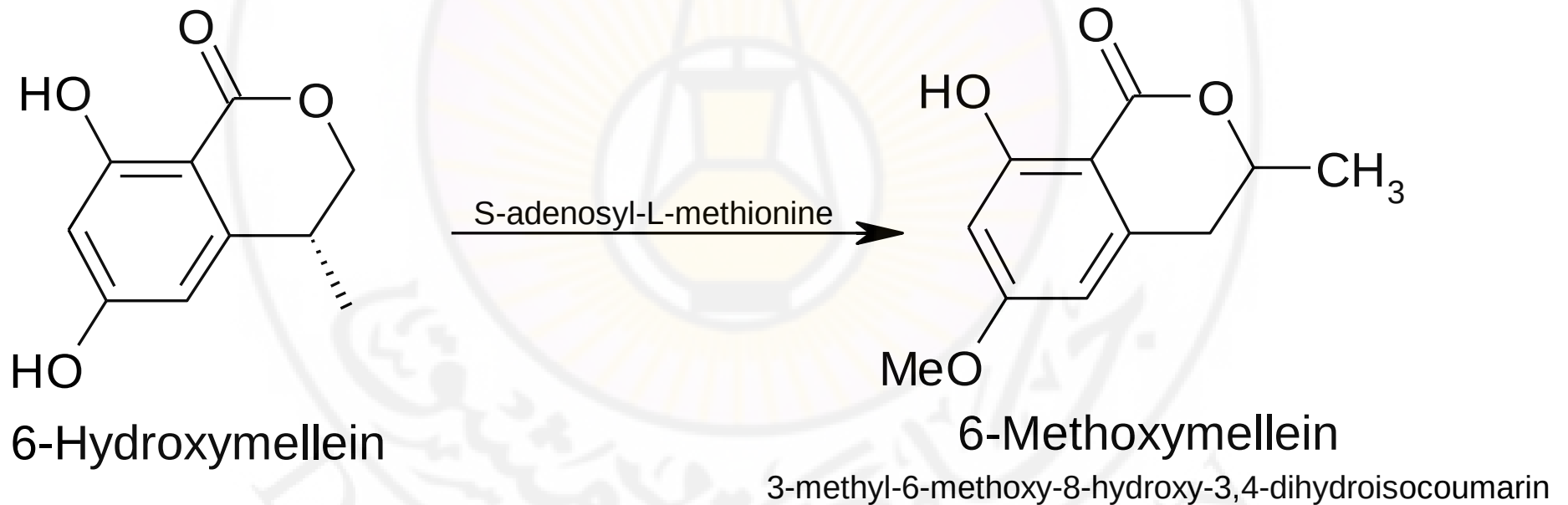


## انواع الأجهزة

- مقياس الطيف أحادي الحزمة وهو نوع تعليمي رخيص وشائع ويعطي نتائج ممتازة.
- مقياس الطيفي مضاعف الحزمة وهو أكثر تعقيداً من السابق ويسجل بصورة آلية الامتصاص كتابع لطول الموجة ويمتلك مسارين للضوء أحدهما للعينة والآخر لشاهد أو المرجع
- يلاحظ بأن طيوف امتصاص المرئي وفوق البنفسجي هي طيوف عريضة لأن كل مستوى طاقة مصحوباً بمستويات تذبذبية ودورانية سببه انتقالاً للإلكترونات بين عدد من مستويات الطاقة.

# Using Beer's Law in Research

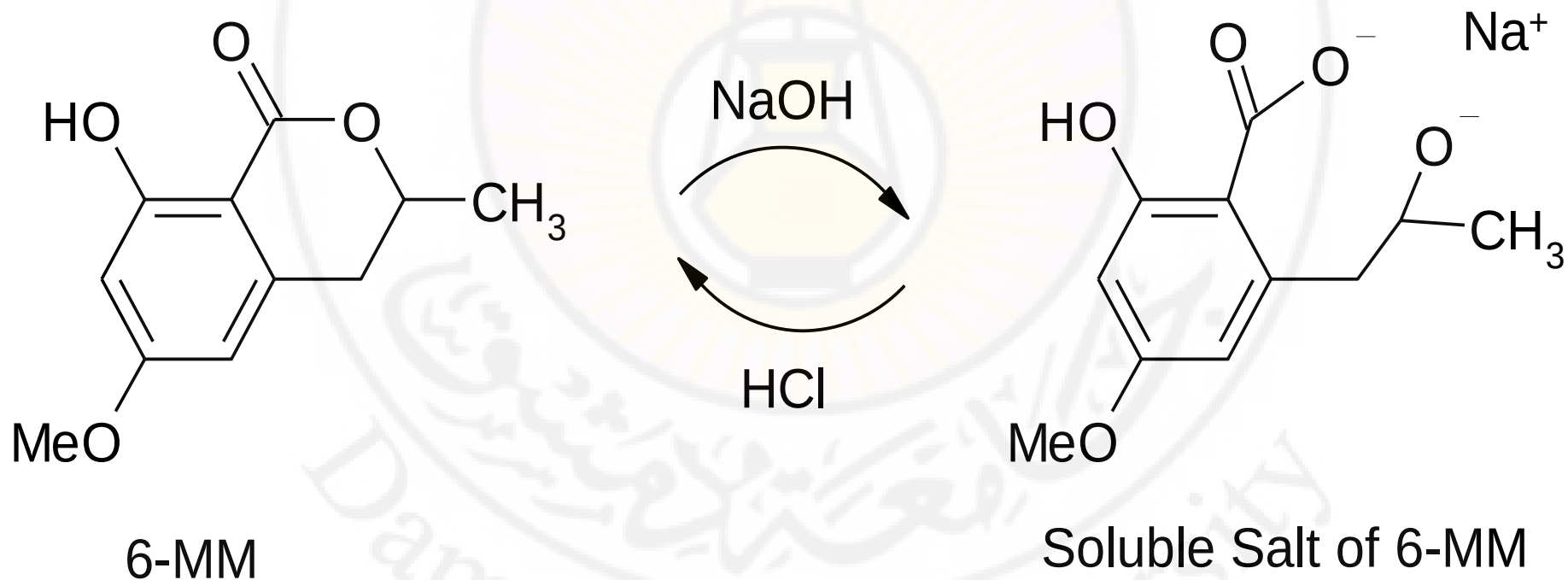
## Isocoumarin in Carrots



### The Hexane Dilemma

How to extract isocoumarin from carrots

# Using Beer's Law in Research





## استخلاص Isocoumarin في الجزر

Ground or Pureed Carrots

Alkali Saponification  
0.5 N NaOH

Filter

Acidify Aliquot  
2 N HCl

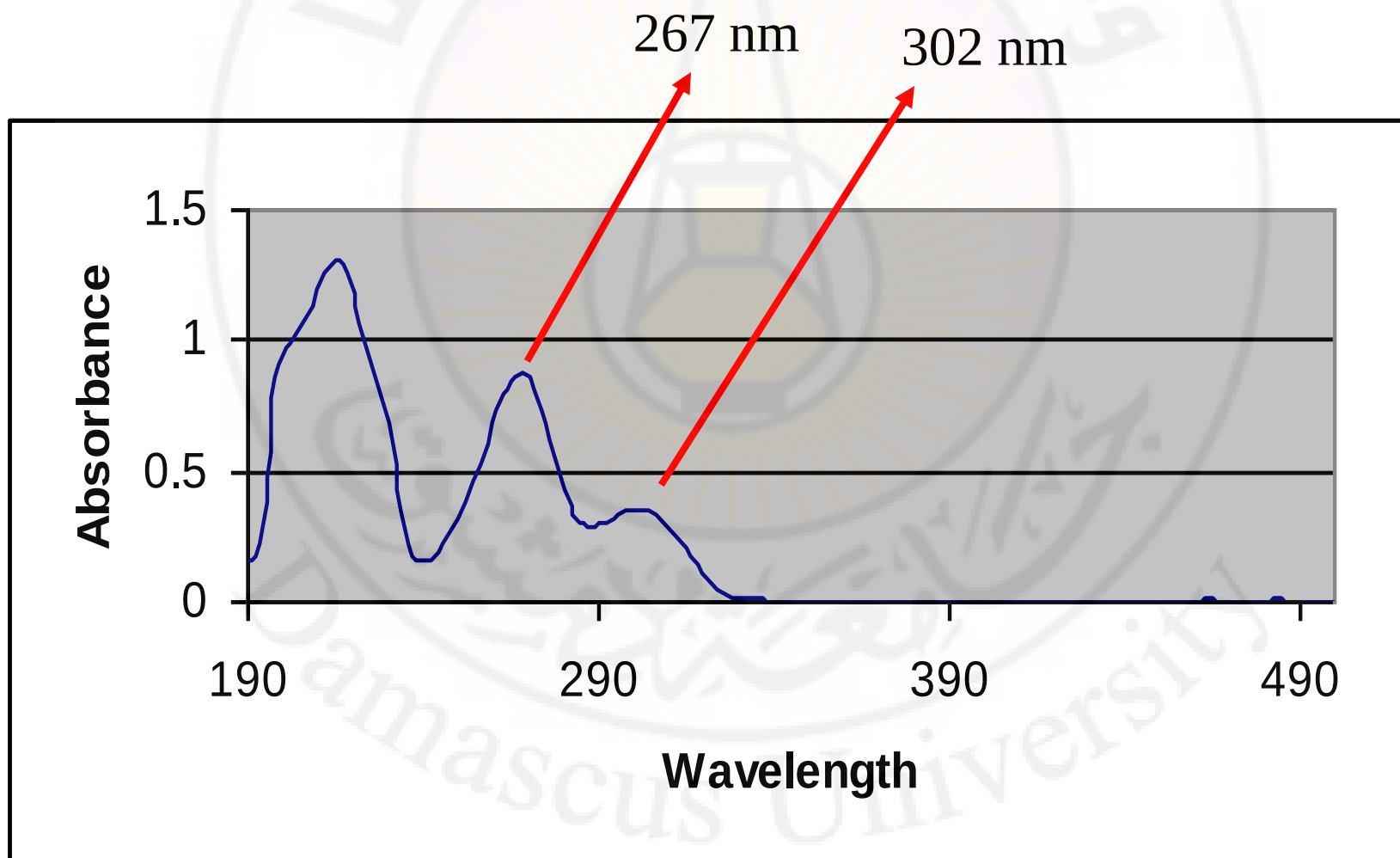
Hexane Extraction

75% Ethanol Extraction

Measure Absorbance  
238, 267 302 nm  
DL = 10 ppm

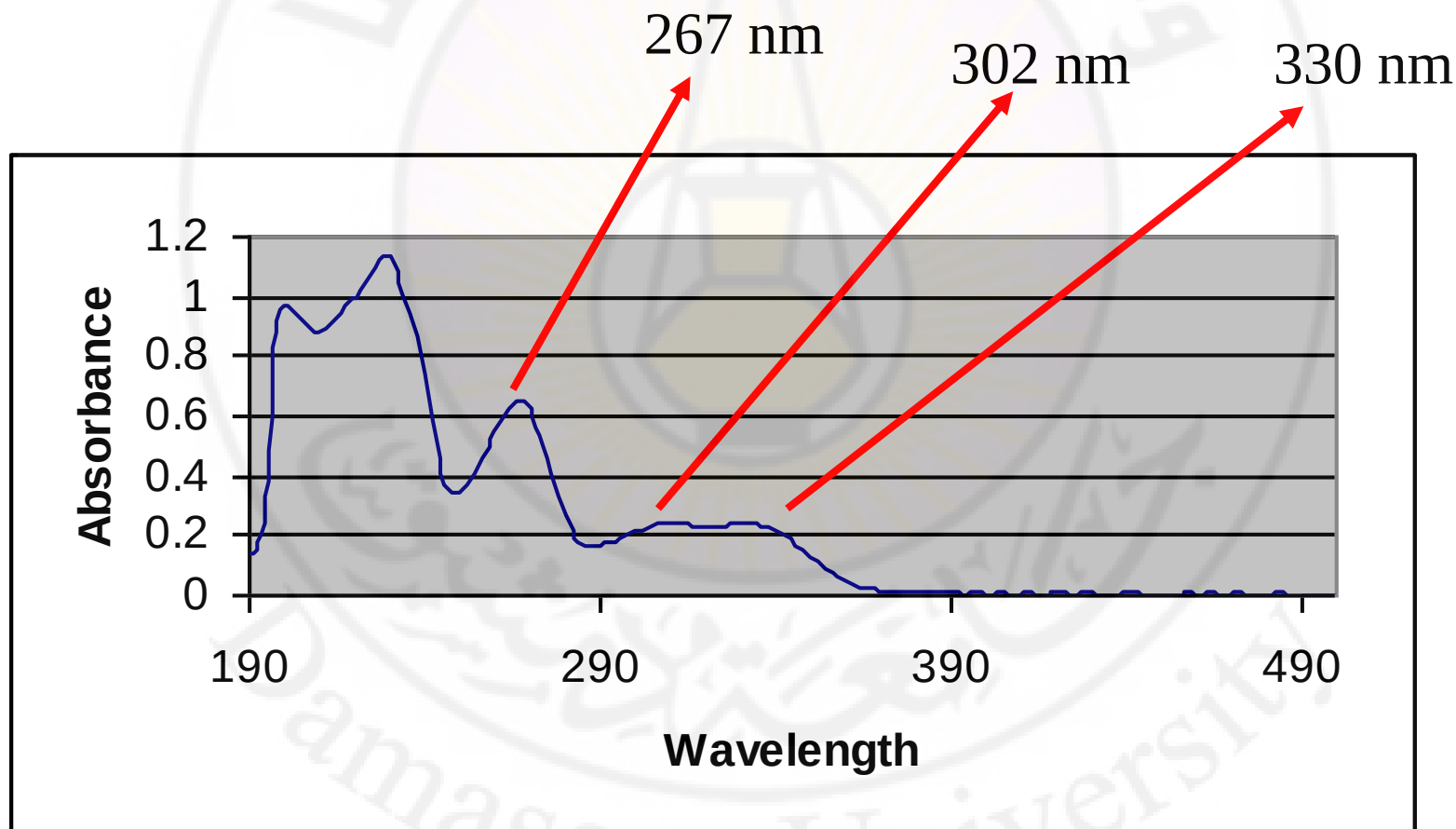
Measure Absorbance  
238, 262, 302 nm  
DL = 25 ppm

# Characteristic UV Spectra of Isocoumarin at pH < 4.0



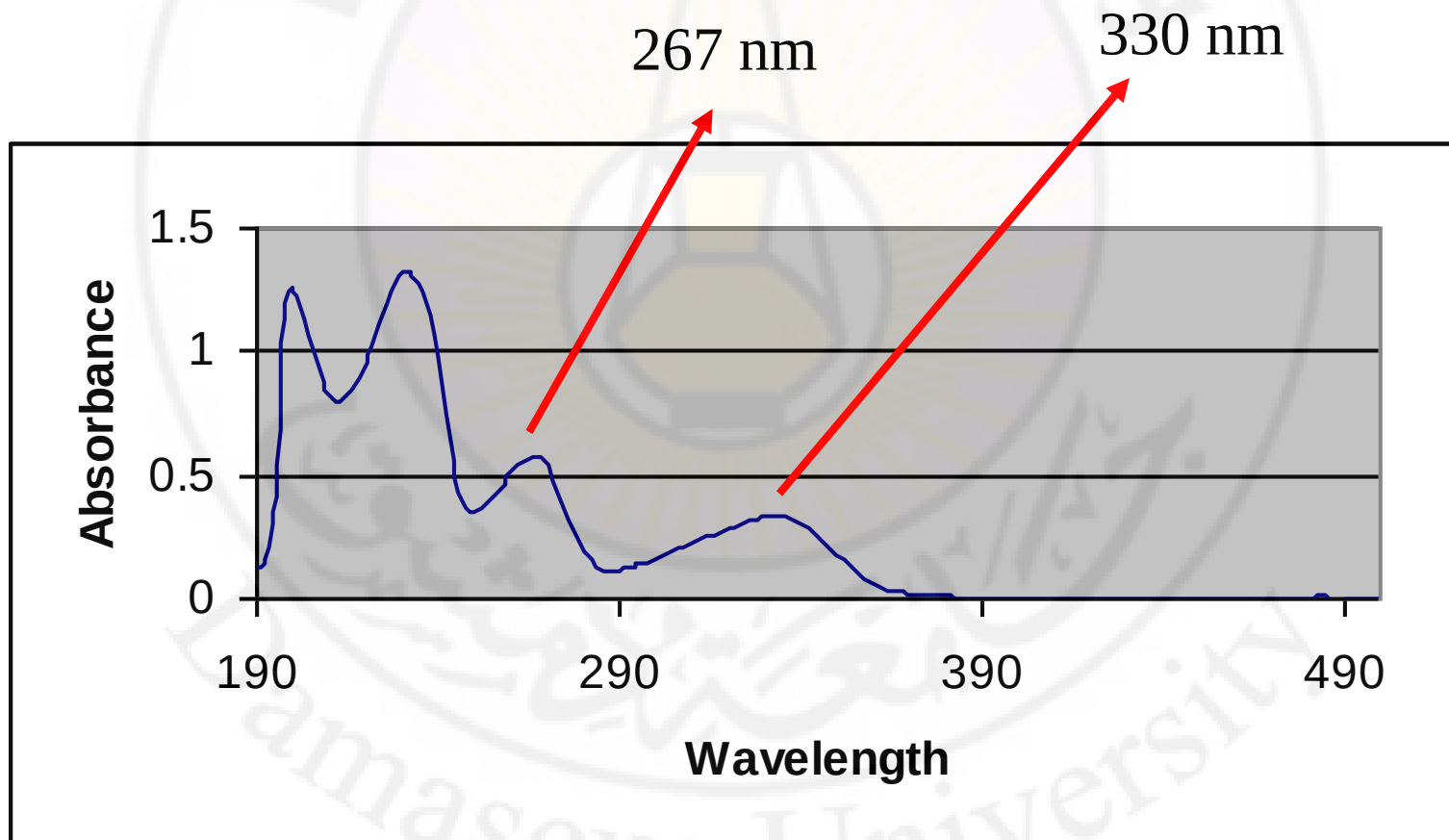
# Isocoumarin at pH 11.7

## Ring Not completely Open



# Isocoumarin at pH 12.3

## Minimum pH for Full Ring Opening

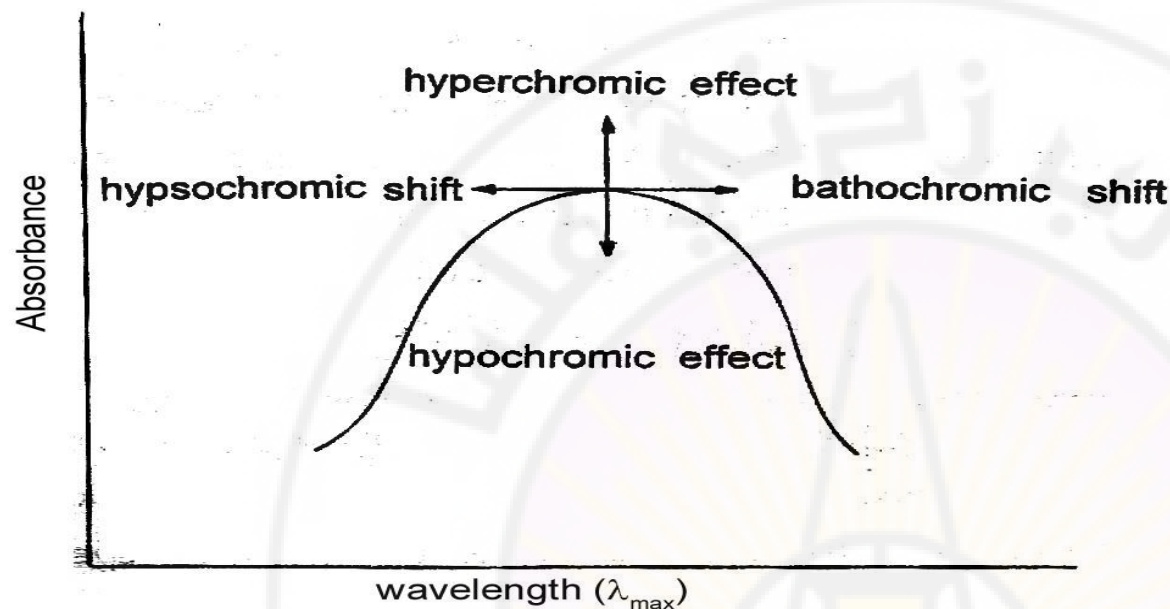


## التحليل بطيف الأشعة تحت الحمراء

مبدأه يعتمد على إحداث اهتزازات في ذرات الجزيء (المادة العضوية) بسبب امتصاص كمية من اشعاع الأشعة تحت الحمراء. والطيف الاهتزازي يبدي ترددات اهتزازية مطابقة فقط لروابط المختلفة في الجزيء ولكل جزيء عضوي بصمة خاصة.

انواع الاهتزازات:

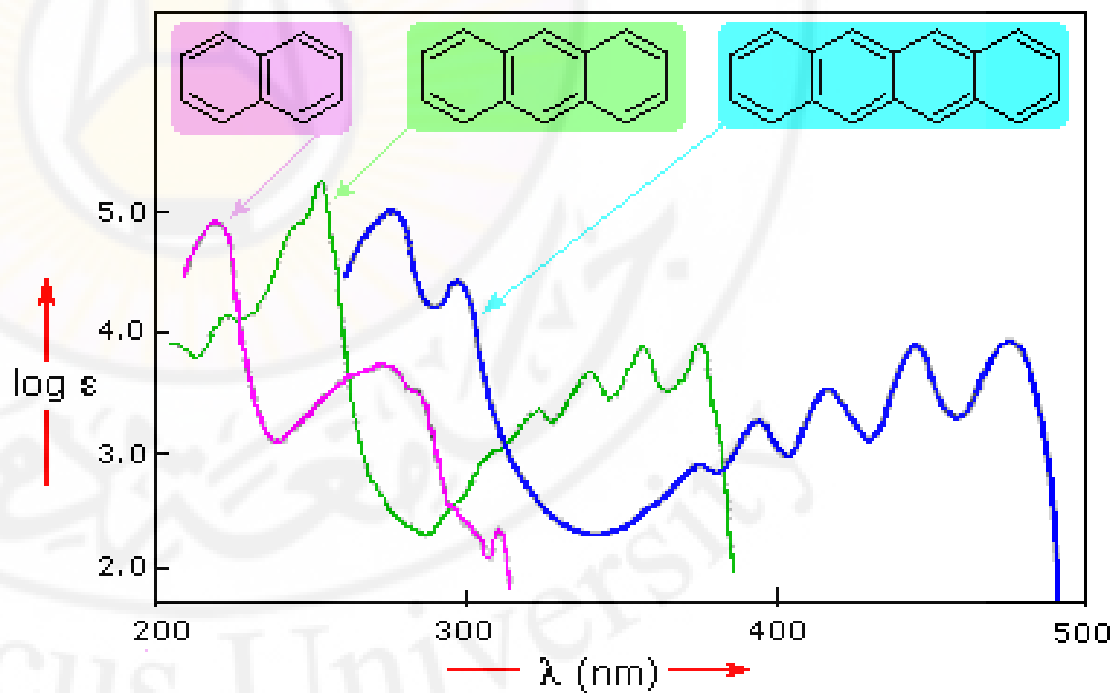
- مطي وفيه تقترب وتبتعد الذرات عن الأخرى  $H-C-H$
- منحنى ويتميز بتغير الزاوية بين الذرتين  $C-H$
- متأرجح ويحدث في الجزيء الحاوي ثلاث ذرات غير مستقيمة  $CH_3$
- التوائي ويحدث بالتواء الذرات حول الرابطة  $C-N$
- وقصي اقتراب وتباعد الذرات بحركة قسوية او بما يشبه حركة المقص
- $H-O-H$
- يحلل كافة المركبات الصلبة والسائلة والغازية



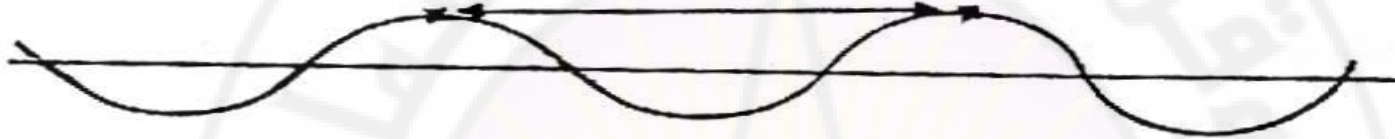
## Changes in Absorption spectrum

### Example 1): effect of conjugation on absorption spectrum

**Increase in conjugation, increases absorbance of light to higher  $\lambda$ , bathochromic shift with hyperchromic effect.**



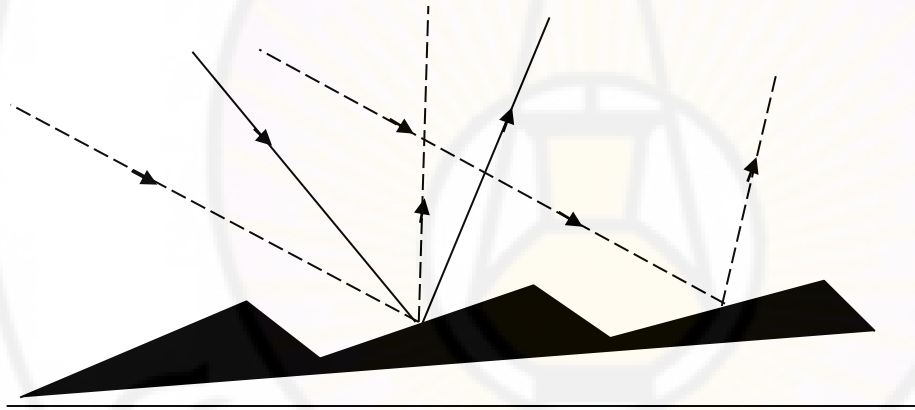
## Wavelength ( $\lambda$ )



- It is the linear distance measured along the line of propagation between crest of one wave to the next.
- Unit of Length
- Micron ( $\mu$ ) =  $1 \times 10^{-6}\text{m}$  =  $1 \times 10^{-4}\text{cm}$  =  $1 \times 10^{-3} \text{ mm}$ .
- Millimicron ( $\text{m}\mu$ ) = or nanometer (nm)
- =  $1 \times 10^{-9}\text{m}$  =  $1 \times 10^{-7} \text{ cm}$  =  $1 \times 10^{-6}\text{mm}$ .
- Angstrom ( $\text{\AA}$ ) =  $1 \times 10^{-10}\text{m}$  =  $1 \times 10^{-8}\text{cm}$  =  $1 \times 10^{-7} \text{ mm}$ .

### **C) Grating**

**Grating consists of a large number of parallel lines ruled very close to each other on a highly polished surface e.g aluminum or aluminized glass (600 line/mm).**



**Each ruled groove functions as a scattering center for light rays falling on its edge.**

**The grating disperses the light beam into almost single  $\lambda$ .**

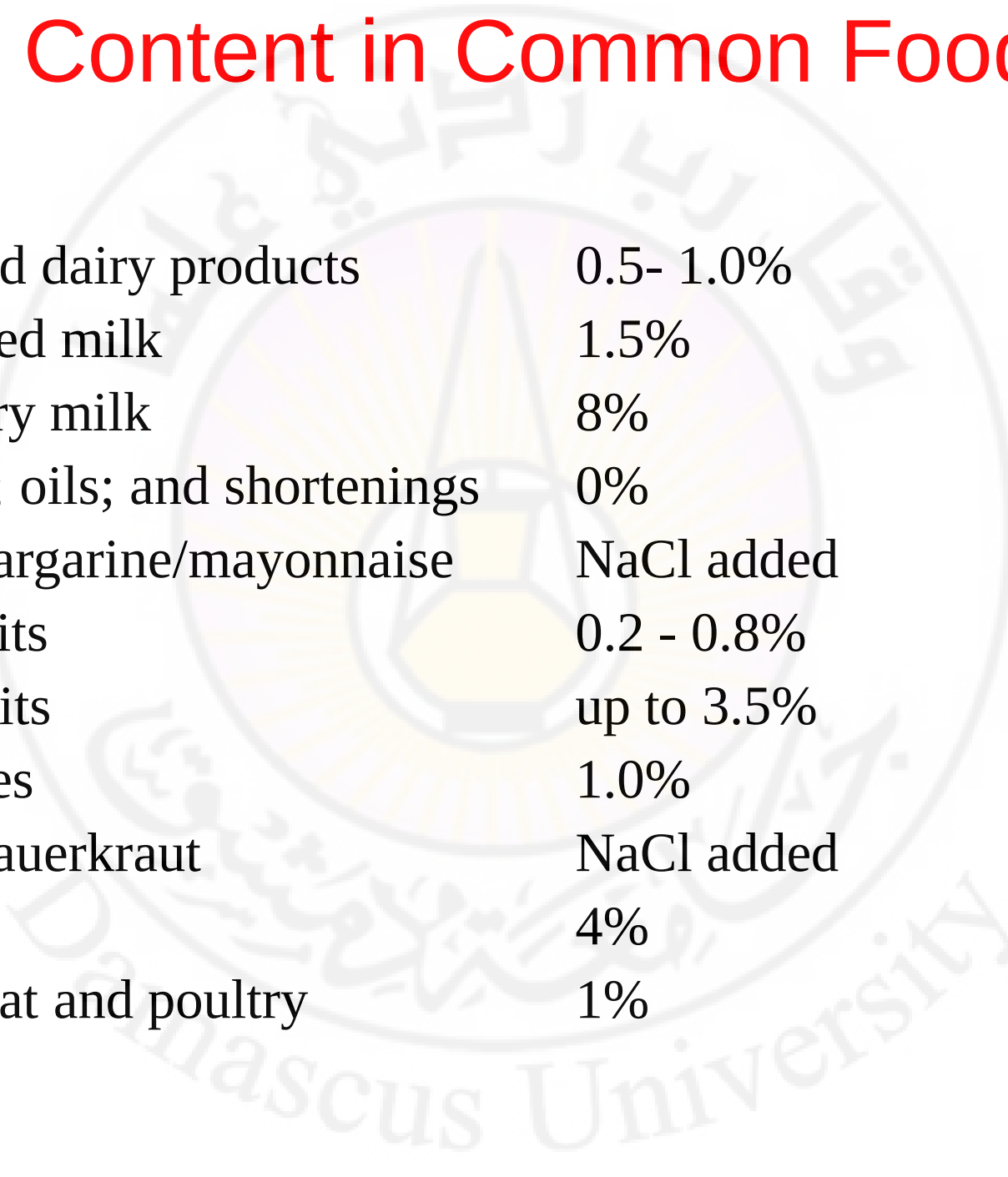


# مطياف الامتصاص الذري

## Atomic absorption spectrophotometer

- كيرشوف 1860 استنتج وجود بعض العناصر في محيط الشمس من خطوط امتصاص Frunhofer .
- Alan wlsch استعمل التقدير الكمي للعناصر في عام 1930 باستخدام الحرق بالهيب .
- حالياً تعتبر من اهم الطرق لتقدير العناصر الكبرى والصغرى والمواد السامة في مخابر التحليل الغذائي والكيميائي والصيدلي والبيولوجي .
- ماذا يقيس مطياف الامتصاص الذري يقيس مكونات الرماد ( Ashes )

# Ash Content in Common Foods



|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| •Most fluid dairy products        | 0.5- 1.0%  |
| •Evaporated milk                  | 1.5%       |
| •Nonfat dry milk                  | 8%         |
| •Pure fats; oils; and shortenings | 0%         |
| •Butter/margarine/mayonnaise      | NaCl added |
| •Fresh fruits                     | 0.2 - 0.8% |
| •Dried fruits                     | up to 3.5% |
| •Vegetables                       | 1.0%       |
| •Pickles/sauerkraut               | NaCl added |
| •Beans                            | 4%         |
| •Fresh meat and poultry           | 1%         |

# Ashes to Ashes.....



## ASH - WHO CARES??

- As a component of proximate analysis, it is a required component for nutritional labeling.
- Ash can be used to measure total mineral content in foods that are high minerals (ie. K in bananas) or to determine added salts.

# What is Really in the Ashes?

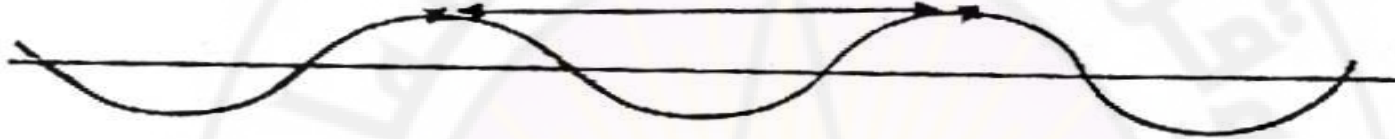
- **Calcium** (most all foods except sugar, starch or oil)
- **Phosphorus** (dairy, grains, nuts, meats, poultry products)
- **Iron** (enriched foods, grains, nuts; meats, eggs, legumes)
- **Sodium** (primarily from added salt)
- **Potassium** (dairy products, F&V, cereals, nuts, meats)
- **Magnesium** (nuts, cereals, legumes)
- **Manganese** (cereals, F&V, meats)
- **Copper** (sea foods, liver, cereals, vegetables)
- **Zinc** (sea foods)

These can be tested for individually by other methods

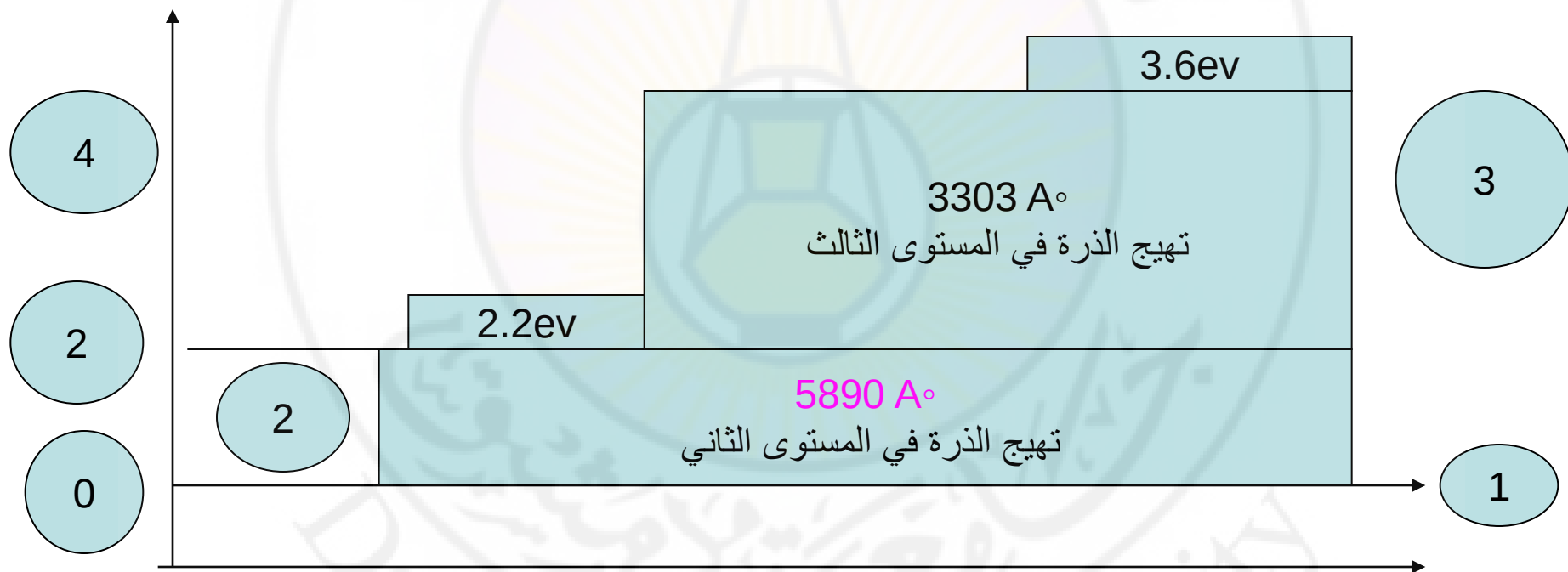
## مبدأ عمل المطياف الذري

- يعتمد على مبدأ ظاهرة امتصاص الذرات للضوء بأطوال موجة معينة ومحددة . حيث تبدي ذرات العناصر الطبيعية الموجودة في جدول تصنيف مندليف بأنها قادرة على امتصاص الضوء بطول موجة معينة ومحددة لكل ذرة.
- ذرة الصوديوم  $5890 \text{ \AA}$  ، والكالسيوم  $4227 \text{ \AA}$  و المنغنيز  $4033 \text{ \AA}$  .
- المصدر الضوئي هي لمبات العنصر نفسه المطلوب تحليله، لذلك يحتاج الجهاز إلى لمبات خاصة ترفق مع الجهاز حسب نوعية التحليل المطلوب.

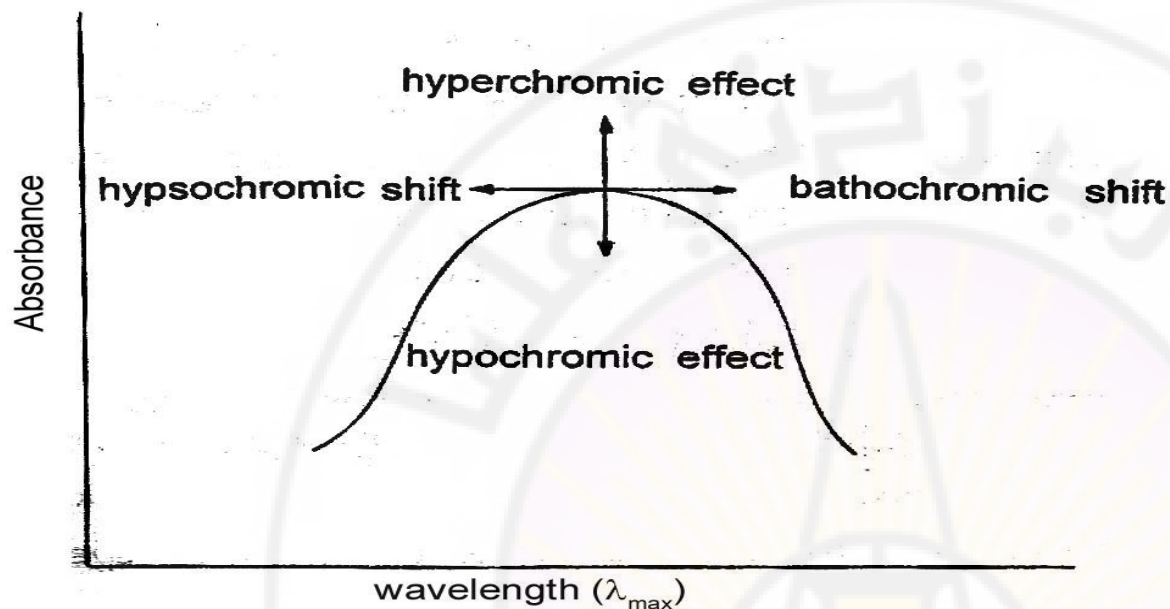
## Wavelength ( $\lambda$ )



- It is the linear distance measured along the line of propagation between crest of one wave to the next.
- Unit of Length
- Micron ( $\mu$ ) =  $1 \times 10^{-6}\text{m}$  =  $1 \times 10^{-4}\text{cm}$  =  $1 \times 10^{-3} \text{ mm}$ .
- Millimicron ( $\text{m}\mu$ ) = or nanometer (nm)
- =  $1 \times 10^{-9}\text{m}$  =  $1 \times 10^{-7} \text{ cm}$  =  $1 \times 10^{-6}\text{mm}$ .
- Angstrom ( $\text{\AA}$ ) =  $1 \times 10^{-10}\text{m}$  =  $1 \times 10^{-8}\text{cm}$  =  $1 \times 10^{-7} \text{ mm}$ .



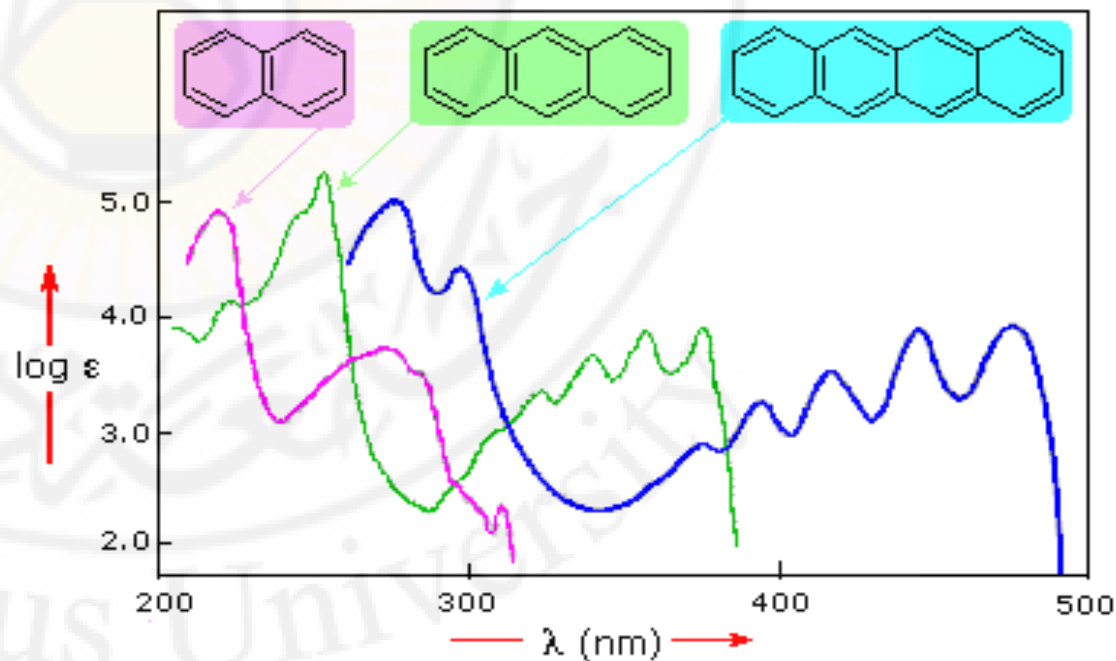
الشكل ( ١ ) يوضح مستويات طاقة ذرة الصوديوم



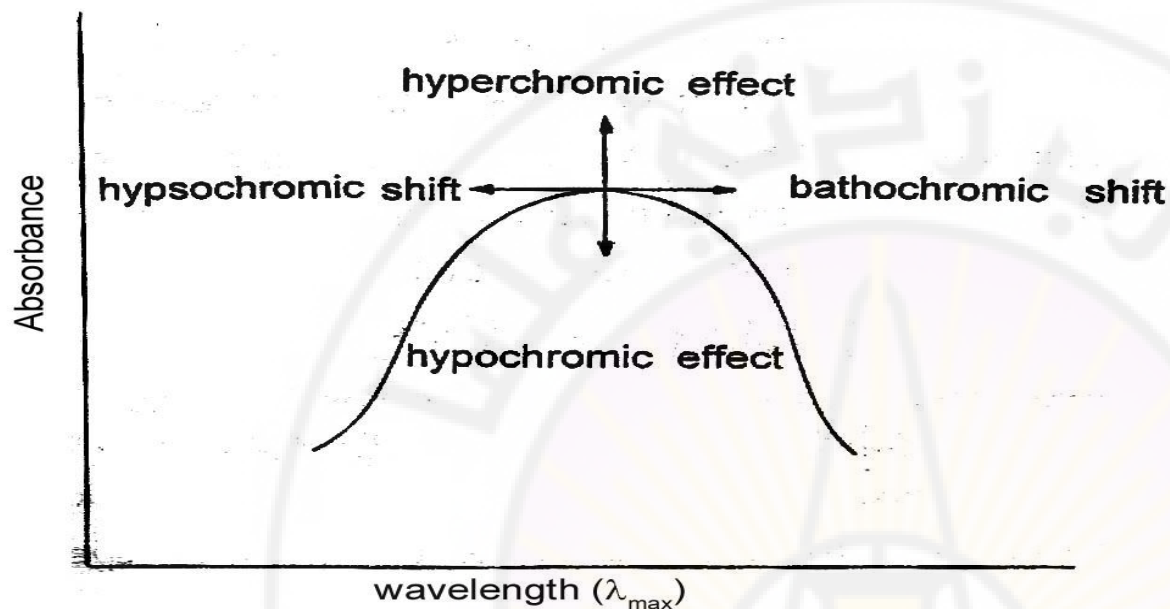
Changes in  
Absorption spectrum

**Example 1): effect of conjugation on absorption spectrum**

**Increase in conjugation, increases absorbance of light to higher  $\lambda$ , bathochromic shift with hyperchromic effect.**



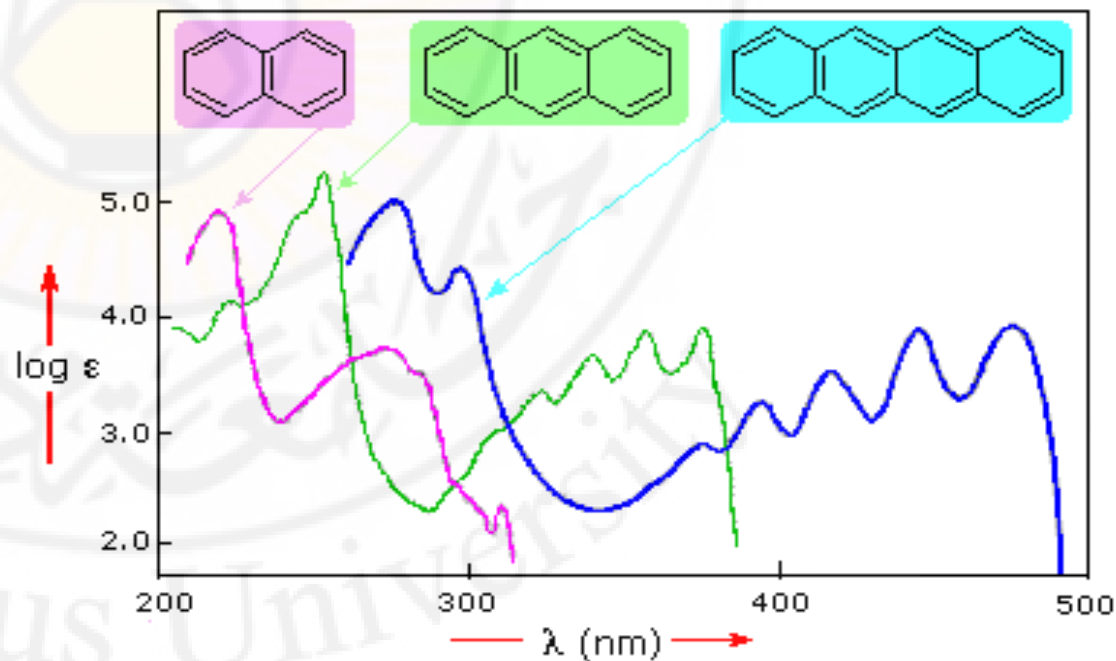


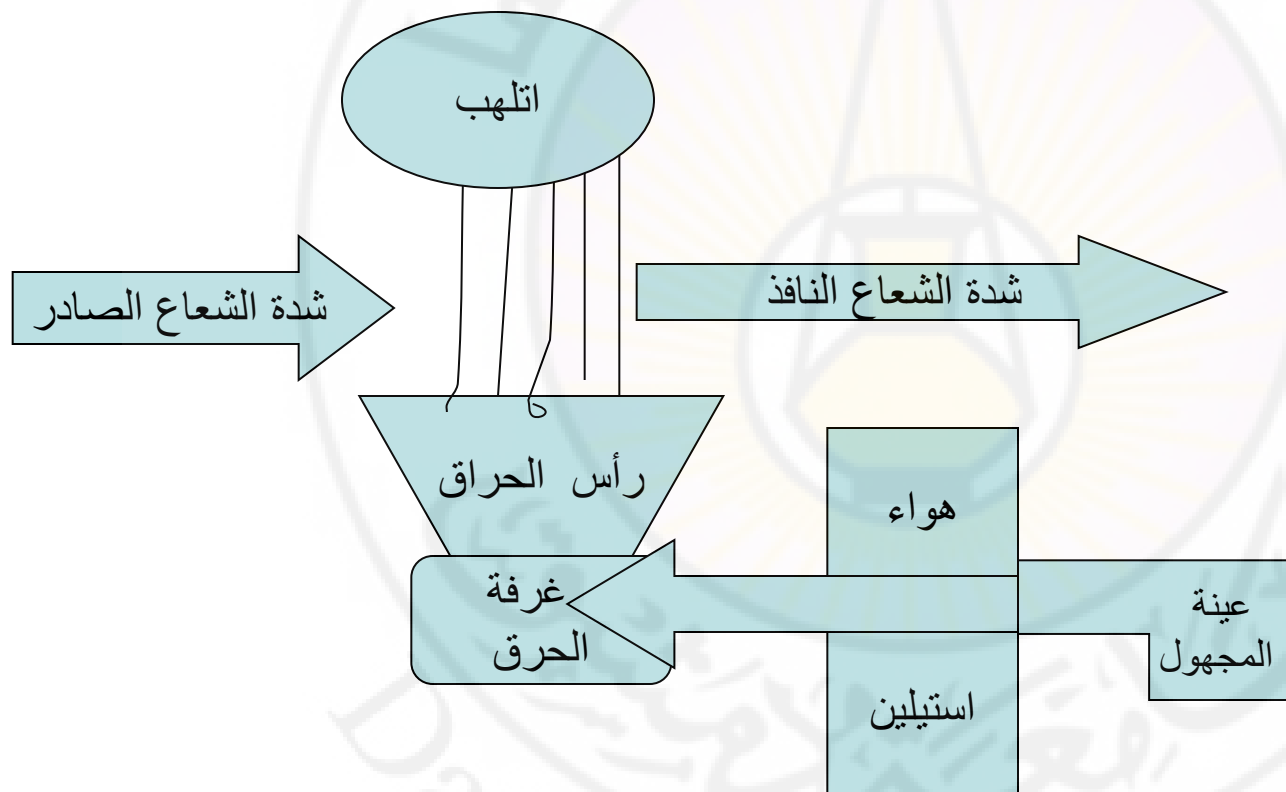


## Changes in Absorption spectrum

### Example 1): effect of conjugation on absorption spectrum

**Increase in conjugation, increases absorbance of light to higher  $\lambda$ , bathochromic shift with hyperchromic effect.**





مخطط التفكيك الحراري لعينة محلول كلور الكالسيوم بطول موجة ٤٢٢٧ انغستروم

# Chromatography

الكروماتوغرافيا

الدكتور أنور الحاج علي

علوم الأغذية سنة ٤ تخصص

جامعة دمشق

Damascus University

# تعريف الكروماتوغرافيا

- الكروماتوغرافيا كلمة مصاغة من كلمتين Chroma وتعني اللون و graph تعني التسجيل أو الرسم ، وتعني الكلمة بشقيها الرسم اللوني، لكن يفضل استعمالها بكلمة الكروماتوغرافيا .
- في الوقت الحاضر يفهم من الكروماتوغرافيا بأنها فصل مكونات عينة عن طريق توزيع هذه المكونات بين طورين أحدهما ساكن والآخر متحرك.
- يتم فصل مكونات العينة على **مبدأ الانتقال الفرقى** للمركبات الكيميائية في عمود ، ورقة سيلوزية، أو سطح زجاجي مغطي بطبشور كلسي .... الخ.

## تطور الكروماتوغرافيا

- يعتبر العالم Tswett وهو باحث نباتي من أصل بولوني أول من استعمل كلمة كروماتوغرافيا في فصل الصباغات النباتية في عام ١٩٠٦ في عمود زجاجي يحوي الطبخور الكلسي (اليخضور، الكاروتين، والزانتوفيل) .
- يعتبر العالمان Martin and synge من أمريكا أول من اسس كروماتوغرافيا التجزئة لفصل الأحماض الأمينية في الصوف باستعمال عمود سيلكا مرطب في ١٩٤١ .
- يعتبر العالم Hesse من المانيا أول من نشر تقنية الكروماتوغرافيا الغازية في فصل الأحماض الدهنية في عمود مملوء بالسيلكا جيل في ١٩٥٢ .
- يعتر العالم Campell من أمريكا أول من وضع تقنية الألفة الكروماتوغرافية لتنقية لبروتينات والأحماض النووية في عام ١٩٥١

# تسميات ومكونات الكروماتوغرافيا

- العمود الكروماتوغرافي ويمكن ان يكون زجاجي، ستتاليس ستيل، ورقة سيللوزية... إلخ
- الطور الثابت أو الساكن ( **Solid phase** ) ويمكن أن تكون مواد ماصة تحشى في عمود الكروماتوغرافيا ذات طبيعة قطبية أو غير قطبية.
- الطور المتحرك ( **mobile phase** ) ويمكن أن يكون مذيب عضوي واحد أو مذيبات مشتركة وقد تكون قطبية أو غير قطبية.
- التظهير وهي عملية جرف وارتحال المكونات المطلوب تحليلها إلى عصابات أو مناطق يطلق عليها اسم ( **zone** ) .

## أنواع الكروماتوغرافيا المهمة من حيث الاستعمال (٢)

- الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء وفيها تفصل العينات المستخلصة والسائلة في عمود ثابت يحتوي على حبيبات قطرها ٥ ميكرون لتوطيد التوازن بسرعة وانجاز سريع لعملية الفصل
- الرحلان الكهربائي وفيه يطبق تدرج كهربائي لفصل الجزيئات حسب شحنتها

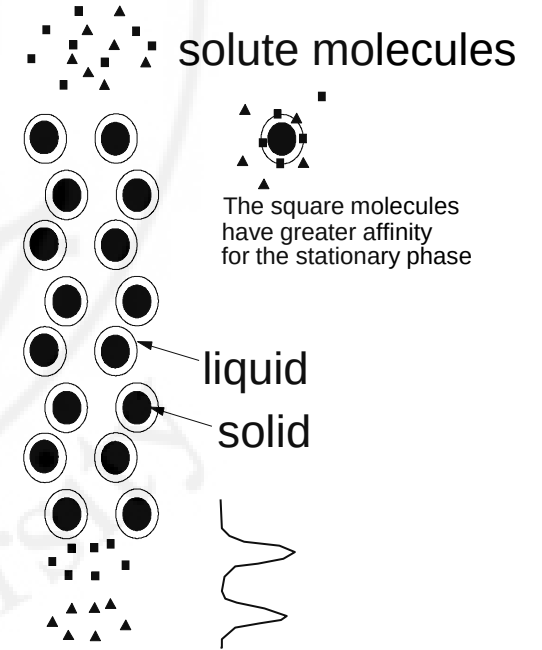
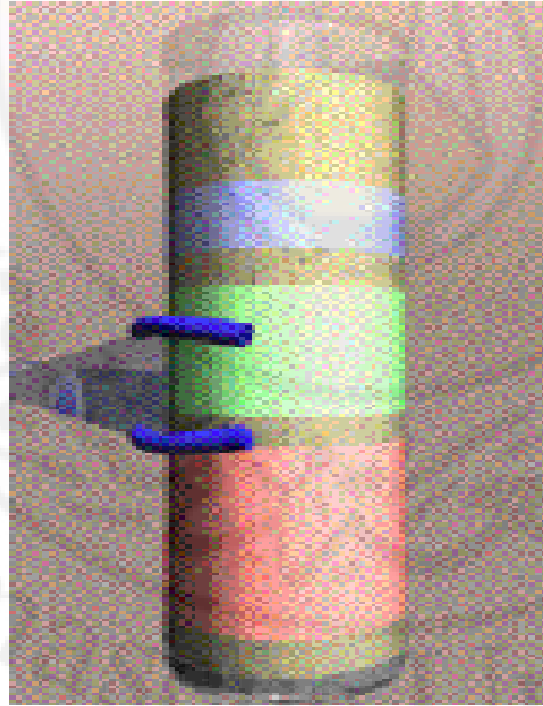
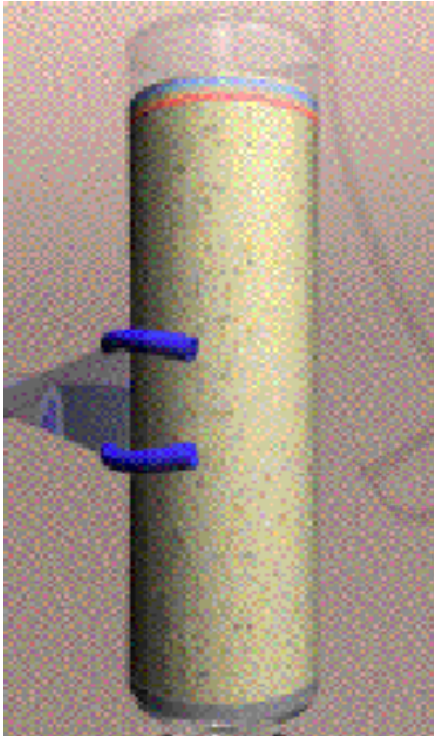
## أنواع الكروماتوغرافيا المهمة من حيث الاستعمال (٢)

- الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء وفيها تفصل العينات المستخلصة والسائلة في عمود ثابت يحتوي على حبيبات قطرها ٥ ميكرون لتوطيد التوازن بسرعة وانجاز سريع لعملية الفصل
- الرحلان الكهربائي وفيه يطبق تدرج كهربائي لفصل الجزيئات حسب شحنتها

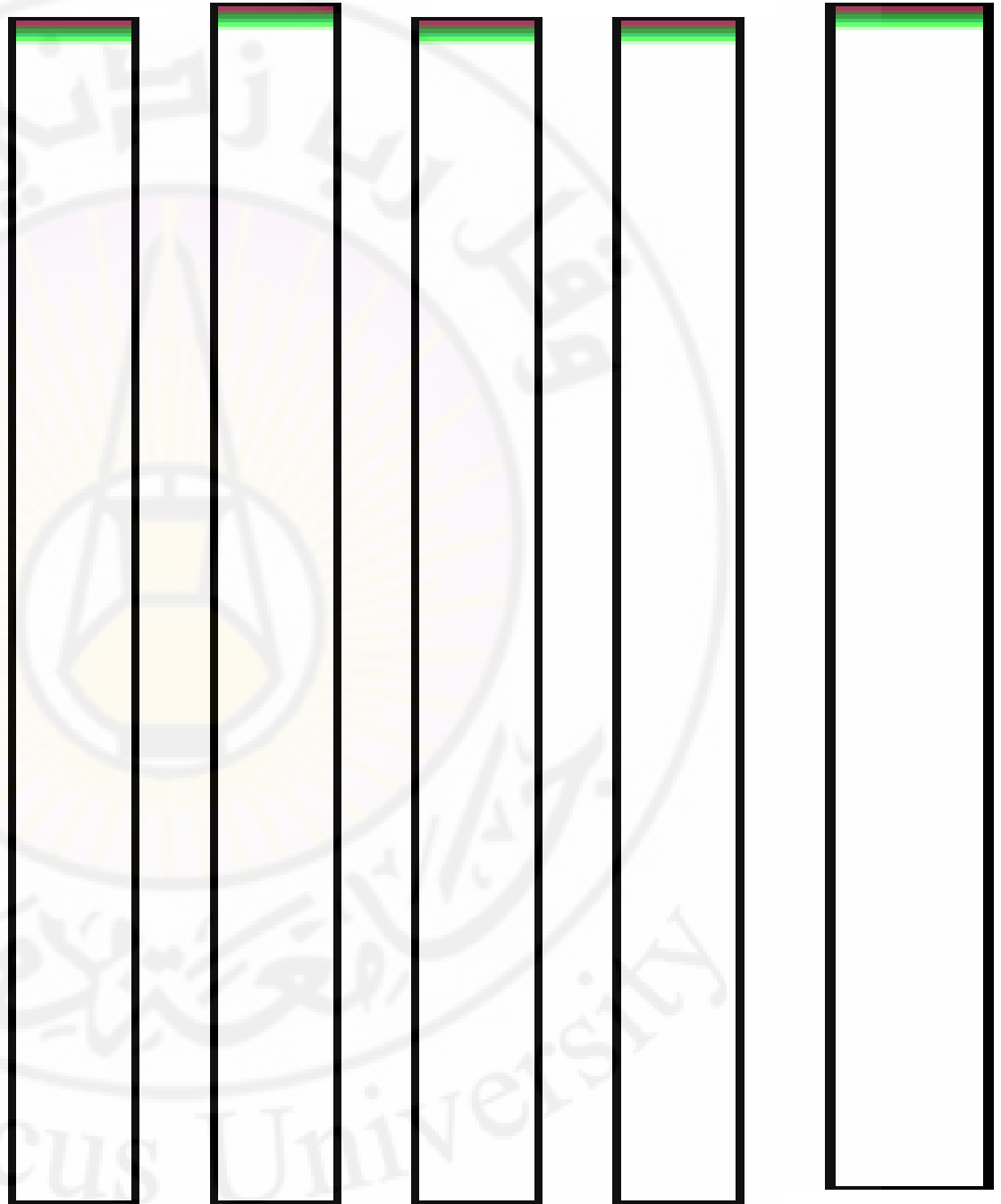
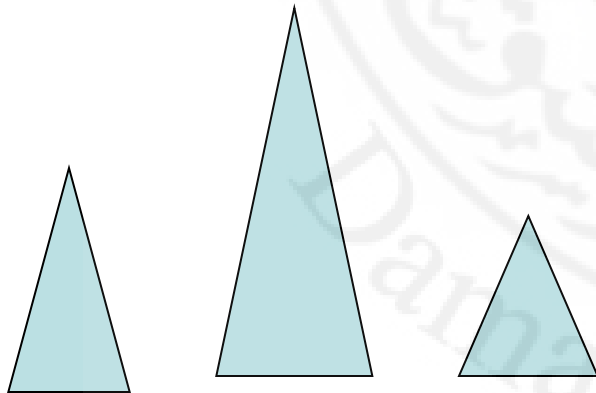
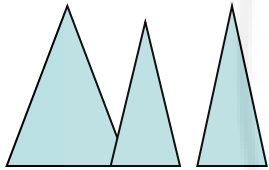
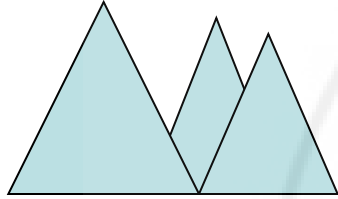


## مبادئ الكروماتوغرافيا

مهما اختلفت أنواعها فإنها تعتمد على إحداث توازن بين الطور الساكن والطور المتحرك. وأفضل شرح لفكرة التوازن بين الطورين هما الشكل التالي:



# Chromatography



## تحرك وتوزع المكونين ضمن العمود

- نحصل على الكروماتوغرام من قياس تركيز الجزئيات بدلالة زمن الطور المتحرك
- يمثل الشكل السابق توازن بين طورين أحدهما ثابت والآخر متحرك
- عند إضافة مزيج إلى الطور المتحرك تتوزع مكونات المزيج بين الطورين حتى يتم لفظهما في نهاية المطاف
- يحدث الفصل التام بين المكونات إذا كان توزعها متبايناً بصورة كافية
- يتوازن المذاب بين الطور المتحرك والطور الساكن

# مفهوم الارتحال الفرقي

يعتمد الارتحال الفرقي على سرعة انتقال جزيئات المادة المراد تحليلها وتماسكها لحبيبات الطور الثابت بحيث يمتص بعضها والبعض الآخر لا يمتص عند جرف المادة بطور متحرك أي انتقال بعض الجزيئات ووقوف بعضها بفعل مقاومة انتقائية تدعى الامتصاص الانتقائي .

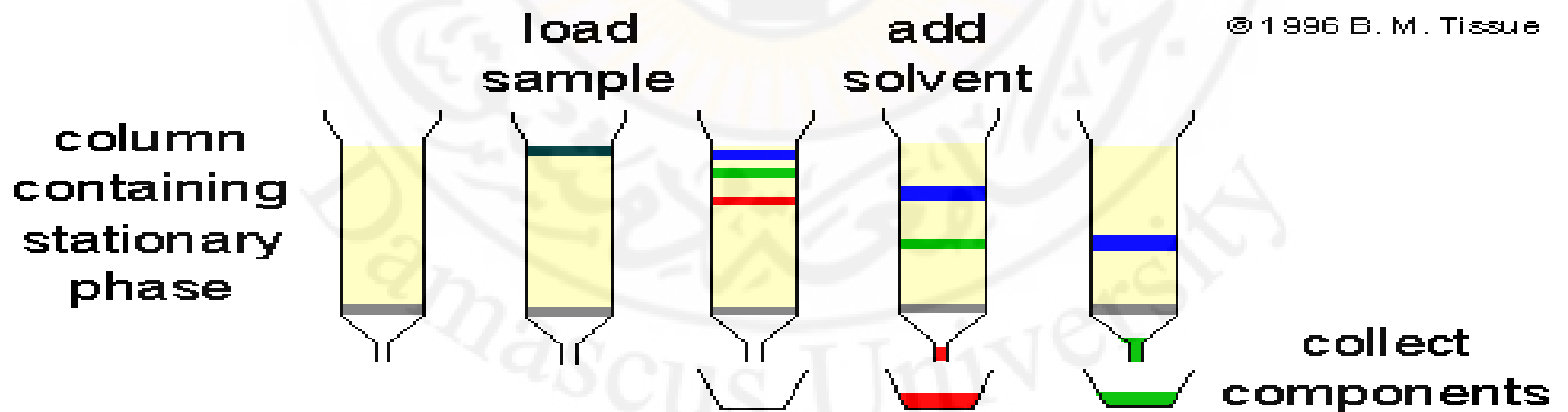
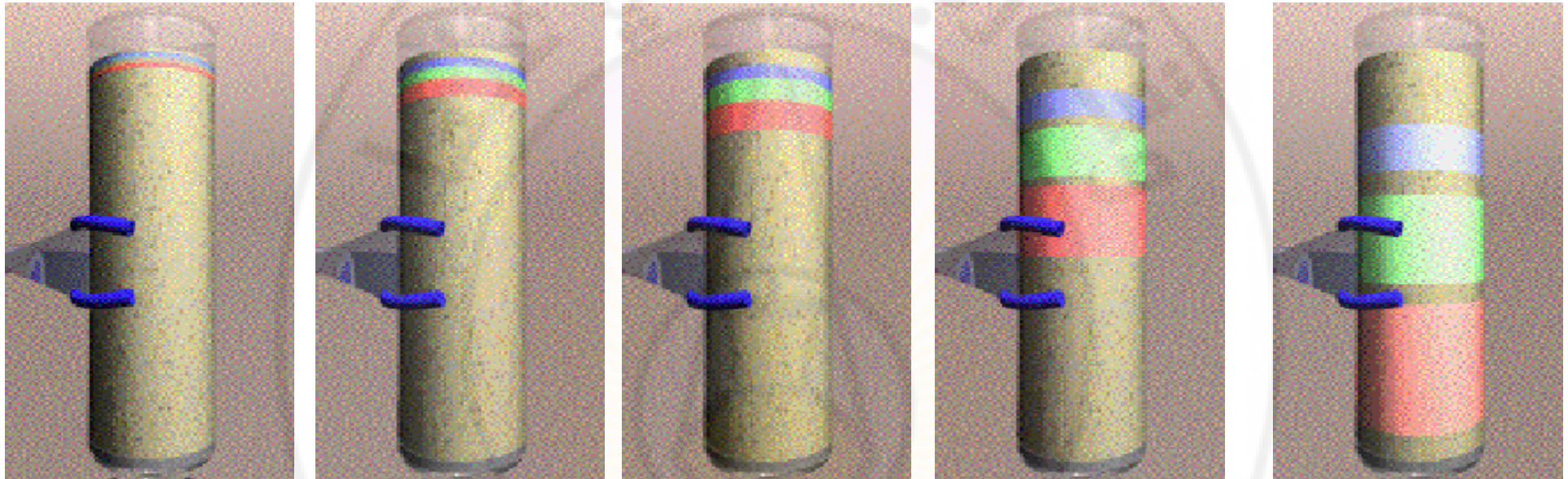
العوامل المؤثرة في الارتحال الفرقي :

١- الحرارة :زيادتها تؤدي إلى ارتحال سريع

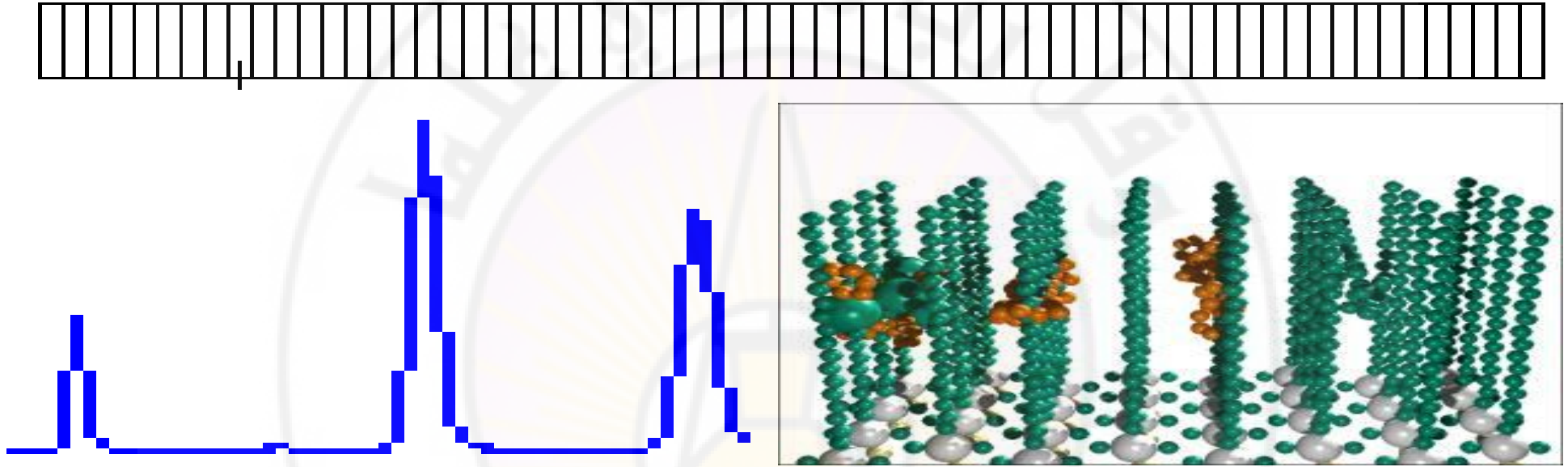
٢-الضغط العالي

٣- طبيعة الطور المتحرك : المذاب القطبي يمتص على الأطوار القطبية والعكس صحيح

# الآلية الارتحال



# نظرية الأطباق (١)

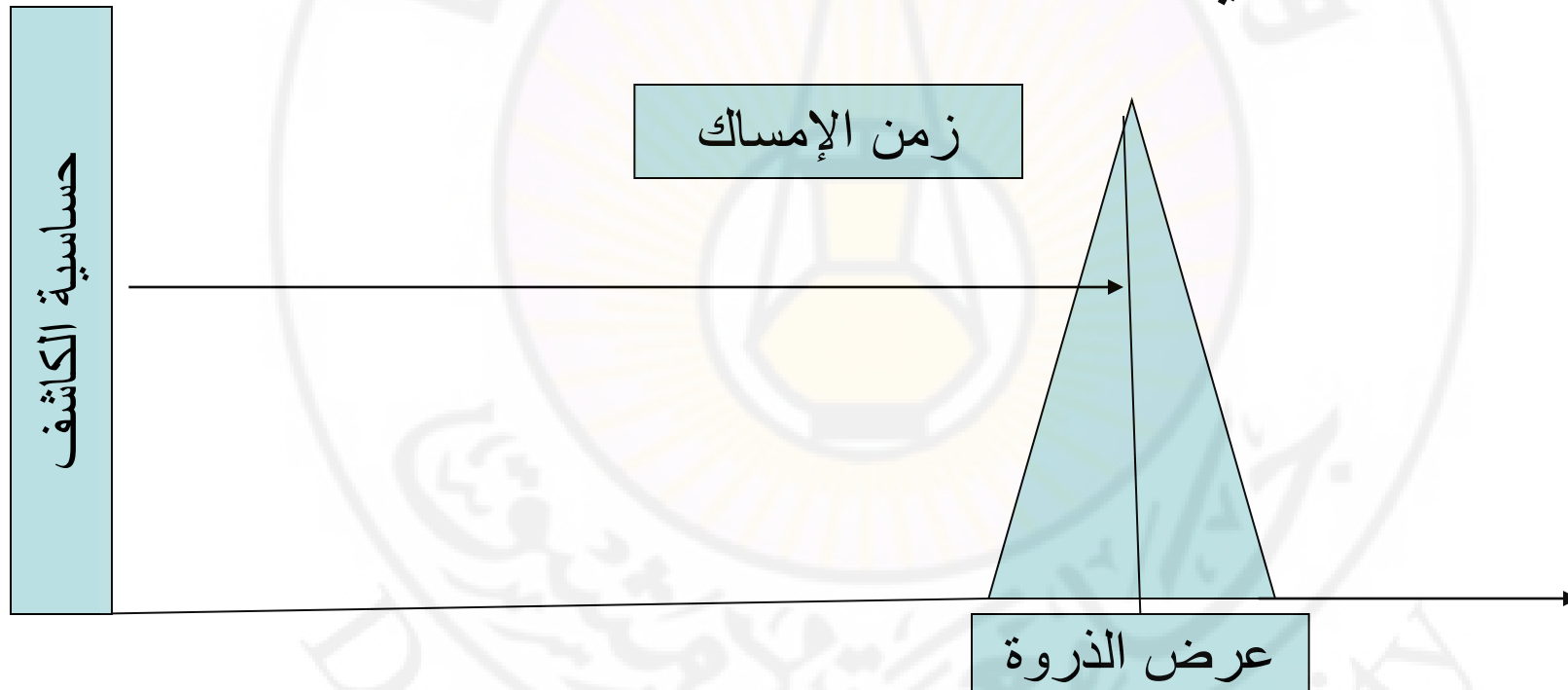


- و النظرية تعتمد على توازن المادة المذابة بين الطور الثابت والطور المتحرك في العمود بحيث يمثل كل توازن صفيحة أو طبق نظري واحد ويحسب من العلاقة التالية:  $N = L/H$  أو  $N = 16(tr/w)^2$
- $Tr$  وقت امساك العينة وهو الوقت اللازم لمكون ما من العينة ليجتاز عموداً طوله  $L$  .  $W$  عرض الذرة ،  $L$  – طول العمود،  $H$  – الارتفاع المكافئ للطبق النظري ( Height Equivalent to Theoretical Plate ) ( HETP )



# نظرية الأطباق (٢)

حساب الطبق النظري



# عوامل المؤثرة في تفريق مكونات المادة

- لتحسن التفريق
  ١. زيادة طول العمود
  ٢. زيادة كمية الطور الثابت
  ٣. رفع درجة الحرارة
- لتقليل عرض الذروة
  ١. استعمال حبيبات ناعمة
  ٢. تصغير قطر العمود
  ٣. تقليل سرعة الطور المتحرك
  ٤. تقليل حجم العينة



## تصنيف الكروماتوغرافيا استناداً إلى عملية التوازن التي تتعلق بنوع الطور الساكن

١. كروماتوغرافيا التجزئة (Partition)
٢. كروماتوغرافيا الامتزاز (Adsorption)
٣. كروماتوغرافيا التفريق الحجمي (Size exclusion)
٤. كروماتوغرافيا الآلفة (Affinity)
٥. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (Ion Exchange)

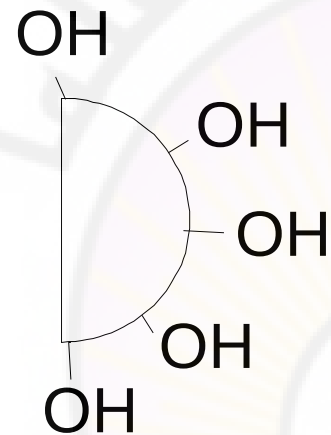
# ١- كروماتوغرافيا التجزئة (Partition)

تعتمد على فصل العينة بين طورين الطور الساكن سائل محمول على جسم صلب خامل والطور المتحرك إما سائل مثل (HPLC) او غاز مثل (GC)

وتمثل الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة نموذجاً فيها الطور الساكن طبقة الماء الممتز على صفيحة ورقية ونميز طريقتين للفصل :

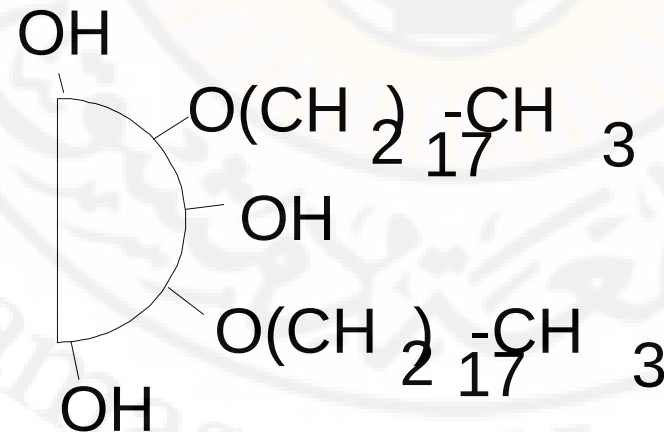
١. الطريقة العادية وفيها يكون الطور الثابت محشياً بمجاميع وظيفية ذات طبيعة قطبية والطور المتحرك عبارة عن مذيبات عضوية غير قطبية (الهكسان).
٢. الطريقة المعاكسة ويكون فيها الطور الثابت يحتوي على مجاميع وظيفية غير قطبية والطور المتحرك فيها يكون مذيبات عضوية ذات طبيعة قطبية (ميثانول)

## المجاميع الوظيفية في الطور الثابت



silica

قطبي



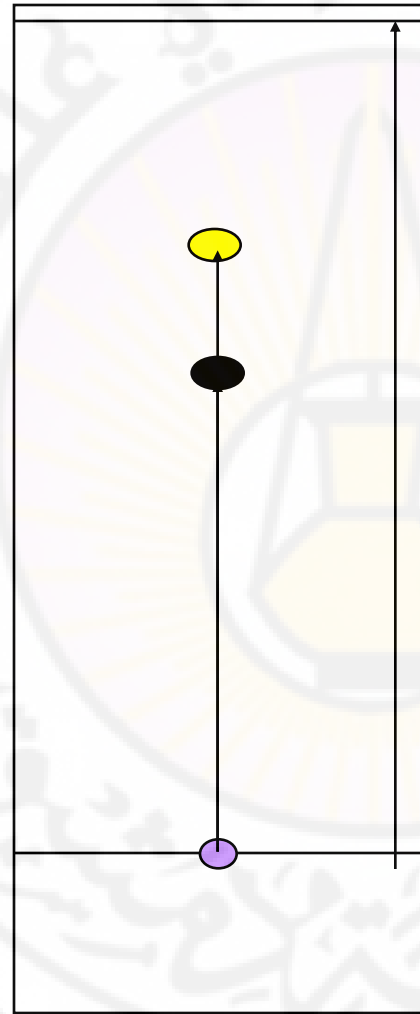
غير قطبي

ODS

## ٢-كروماتوغرافيا الامتزاز (Adsorption)

- وفيها يكون الطور الساكن جسم صلب تمتاز عليه مكونات العينة والطور المتحرك يكون سائلا ويحدث الفصل من خلال عملية محصلة الأمتزاز والانتزاز لمكونات العينة .
- وتمثل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة الورقية لفصل السكريات والأحماض الأمينية الحرة من أهمها.
- وتمثل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة الورقية الصفائية مثالا جيدا لذلك ( TLC ) لفصل مركبات سموم الأفلاتوكسينات والجليسريدات .

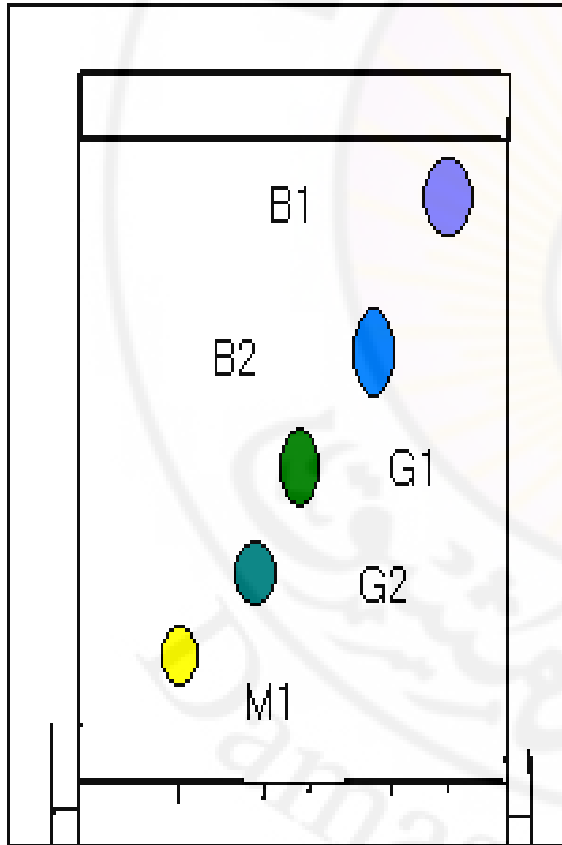
# كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة الورقية



$$R_f = \frac{\text{distance of spot}}{\text{distance of solvent}}$$

# تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة الصفائية (TLC)

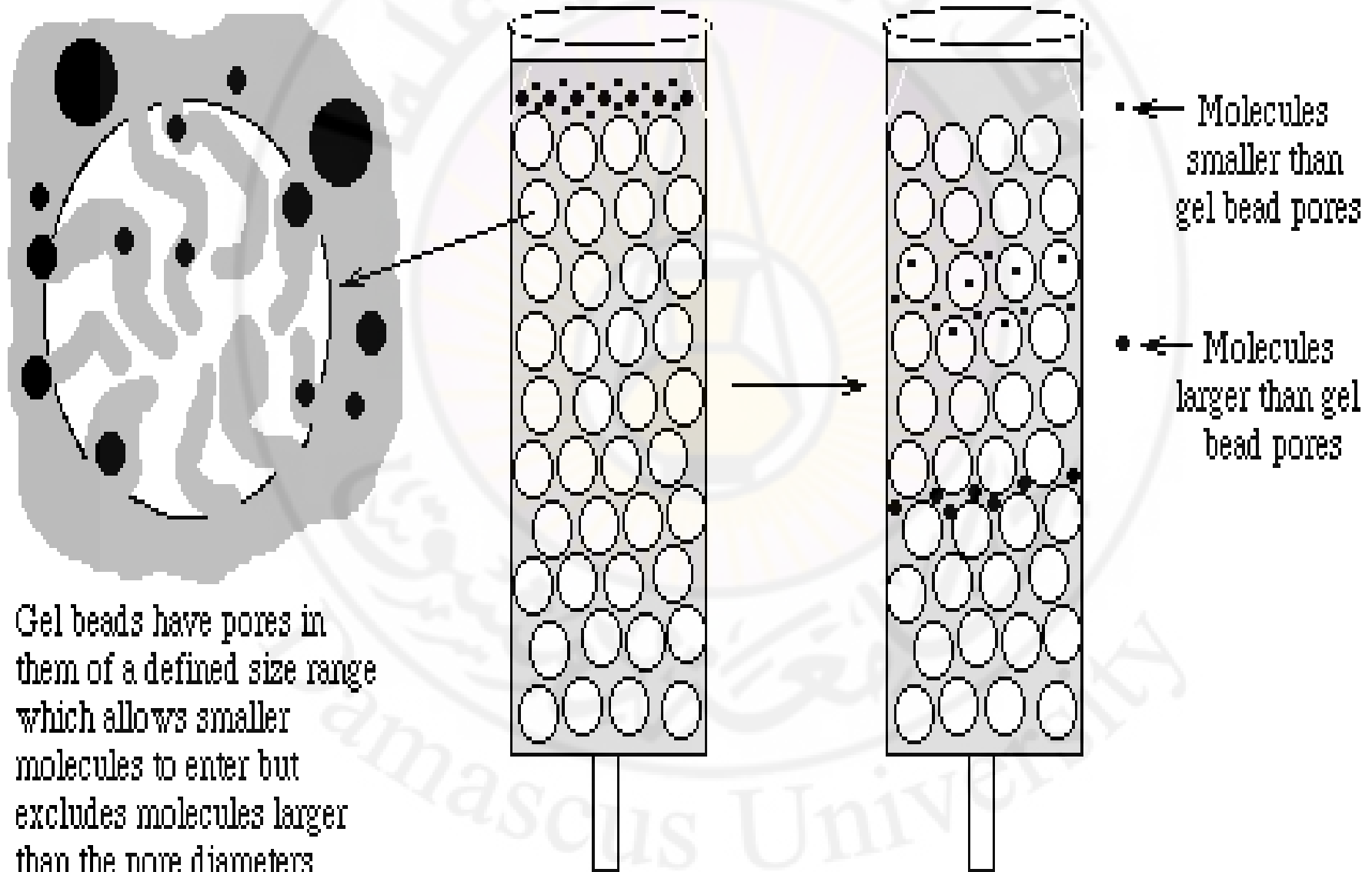
بعد التأكد من وجود السم B1 تم  
،تظهر صفائح ورقية جديدة لكل عينة  
بخليط مؤلف من الكلوروفورم  
والاسيتون بنسبة ٩-١ في حوض  
زجاجي ووضعت في مكان مظلم لمدة  
ساعة حتى وصول المحلول الصاعد في  
الصفحة الورقية إلى ارتفاع مناسب  
(١٨ سم)، ثم رفعت حتى الجفاف التام .  
تمت مقارنة الصفائح الورقية ونتائجها  
مع عينات قياسية تحتوي على  
B1 جزيء بالمليون من الافلاتوكسين  
٢٠-١٦-١٢-٨. بوساطة مقياس الكثافة  
الفلورية تحت أشعة فوق بنفسجية  
مقدارها ٢٦٥ nm



### ٣-كروماتوغرافيا التفريق الحجمي (Size exclusion)

- ويتم فصل الجزيئات على اساس حجمها أو على شكلها من خلال قدرتها على اختراق بنية منخلية المظهر (الطور الثابت) حيث يتم حجز الجزيئات الكبيرة ومرورا لجزيئات الصغيرة في مسام الطور الثابت المحدد من خلال جرفها بالطور المتحرك ولفظها من العمود .
- كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (Gel filtration)
- كروماتوغرافيا المناخل الجزيئية (Molecular Sieve)

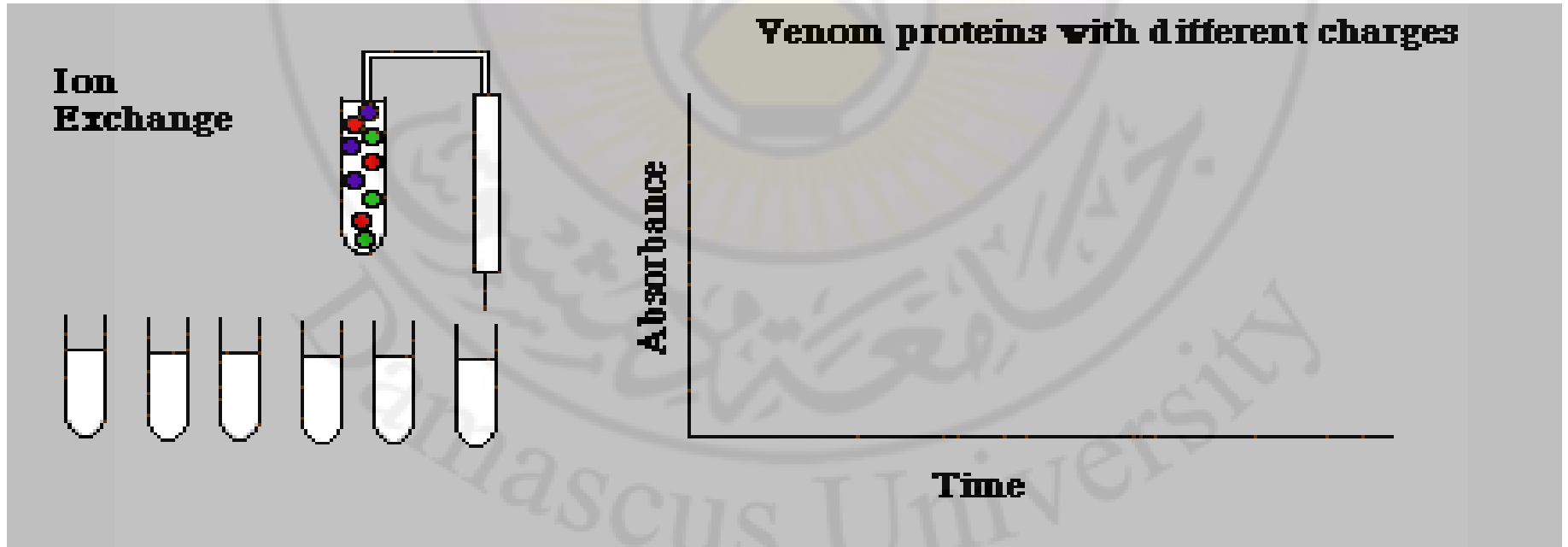
# Molecular *Sieve* Chromatography





## ٤-كروماتوغرافيا الألفة (Affinity)

- تقوم على اساس الألفة الكيميائية بين نوعين من الجزيئات
- ومثاله الأنزيم والكواينزيم، والأنزيم ومثبطه والسموم
- يرتبط أحدهما في الطور الساكن ويوضع الآخر في الطور المتحرك
- يؤدي الفصل إلى تحديد مكونات المزيج البيولوجي.



## ٥- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (Ion Exchange)

- الطور الساكن راتنج المبادل الأيوني مكون من خاملة حاوية على مجموعات أيونية مثل الكربوكسيل ، سلفوهيدريل ، أمونيوم .
- الطور المتحرك سائل يحوي الأيونات المراد فصلها حيث تتبادل مع المكونات الأيونية في الطور الساكن ويؤدي إلى فصلها عن مكونات العينة
- أعمدة خاصة بالشوارد الموجبة او أعمدة خاصة بالشوارد السالبة

## الكروماتوغرافيا الغازية (GC)

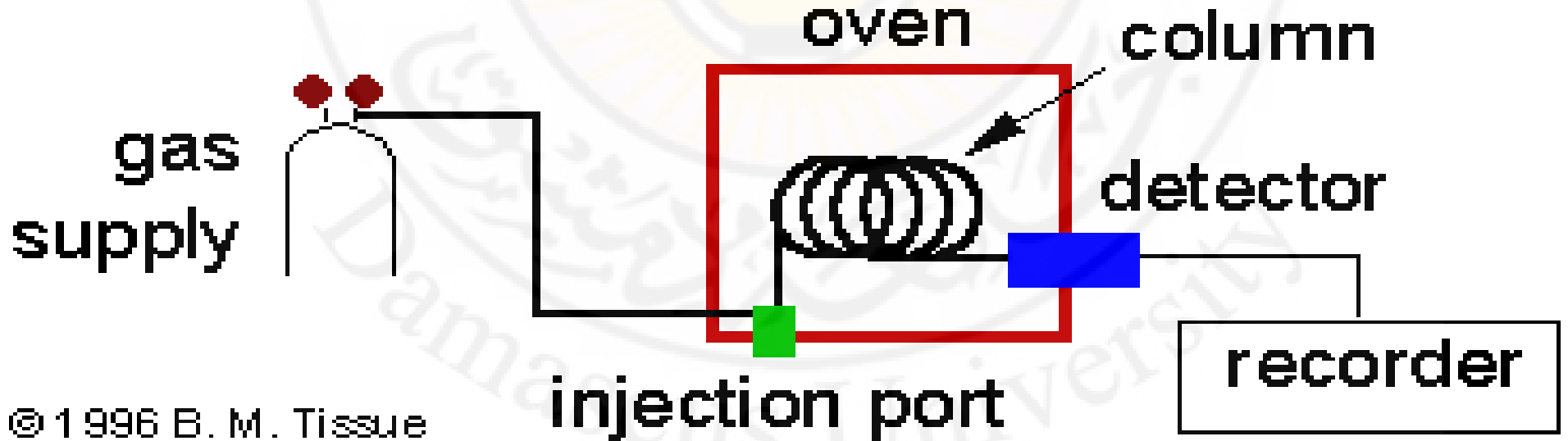
- المبدأ يعتمد على تحول المادة المراد تحليلها إلى غاز
- الجسم اللافظ هو غاز حامل وهو الطور المتحرك
- الطور الساكن اعمدة محشية من السيلكا قد تكون قطبية أو غير قطبية، وعملية الفصل تتم بمبدأ التجزئة ويمكن فصل مزائج معقدة اعتمادة على:



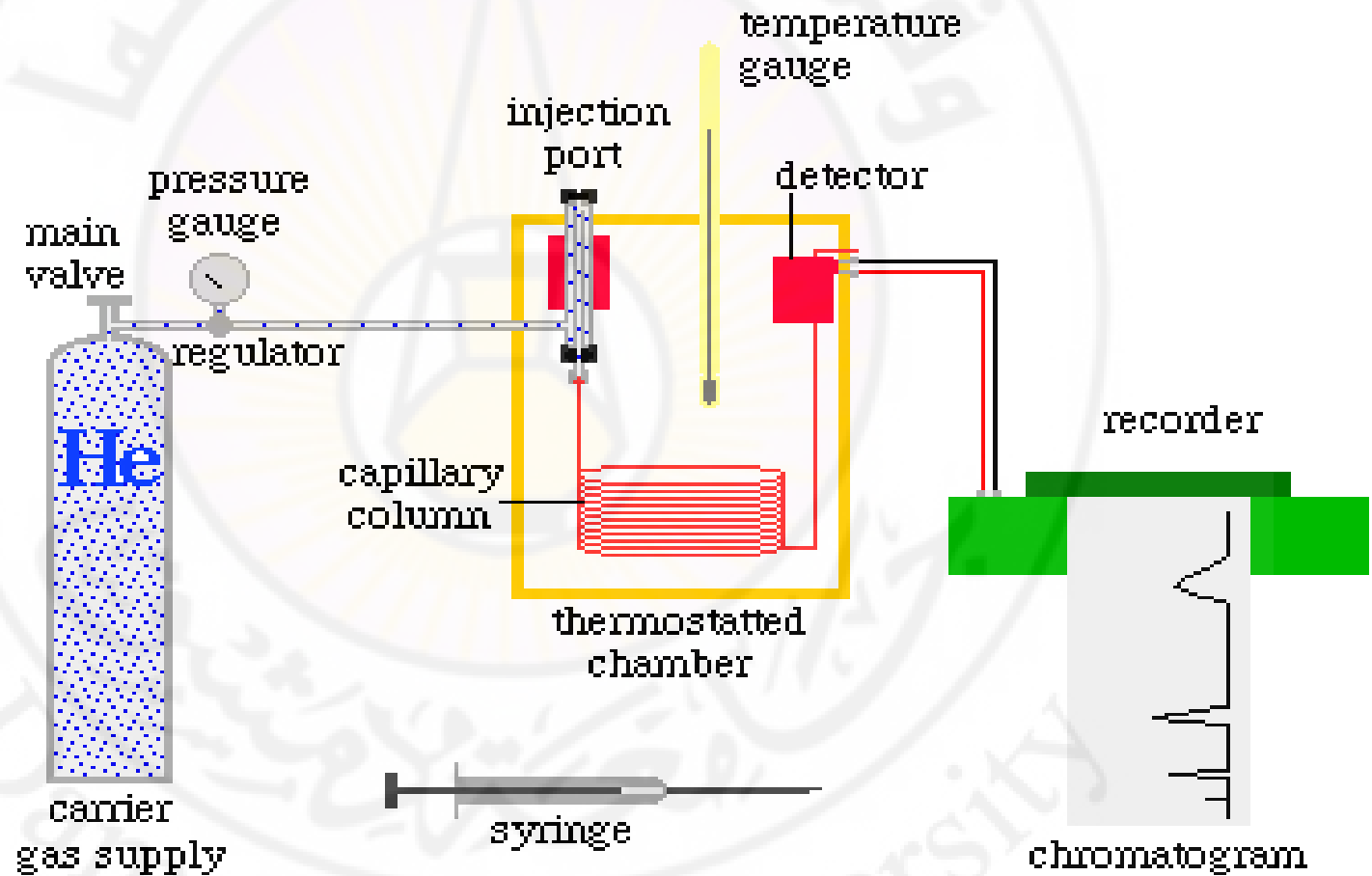
- ١- تطاير الجزيئات
- ٢- قطبية الجزيئات
- ٣- حجم الجزيئات
- ٤- شحنة الجزيئات

# مراحل وطريقة التحليل

- تحقن العينة المراد تحليلها في بؤرة الحقن المسخنة لدرجة عالية حيث تتبخر تَوّاً ومن ثم يسحبها الغاز الخامل إلى مدخل العمود حيث يمتص المذاب على طور الثابت ثم ينفصل محمولاً بالغاز الحامل، يحدث التفريق كلما سارت العينة نحو نهاية العمود ويرتحل كل مذاب حسب سرعة معينة مختلفة عن سرعة المواد الذائبة الأخرى وتتكون عصابات مطابقة لكل مذاب حتى يحين لفظها من نهاية العمود ثم يقوم الحاس أو الكاشف بتحسسها وتسجيا إشارتها



## مكونات أجهزة الكروماتوغرافيا الغازية



## مكونات أجهزة الكروماتوغرافيا الغازية

### • الأعمدة Column

١. أعمدة محشية (packed) مصنوعة من الستنليس ستيل وطولها من ١-٢م وقطرها من ٠,٣ إلى ٠,٦ سم وتستخدم للمركبات العضوية.
٢. أعمدة زجاجية تستخدم للمبيدات حصرياً.
٣. أعمدة شعرية دقيقة قطرهما من الداخل ٠,١ ملم وطولها حتى ٦٠م وتستخدم لكافة المركبات العضوية وتمتاز بدقة التحاليل بسبب تفريقها الجيد مقارنة مع الأعمدة المحشية.

# وحدة الغازات

- الغاز الخامل يجب أن يكون نقياً ٩٩,٩٩٩ % وهو الطور المتحرك لجرف مكونات المادة المراد تحليلها
  ١. غاز الأزوت  $N_2$
  ٢. غاز الهليوم
- وحدة الغازات النشطة (لتشغيل الكاشف أو الحاس)
  ١. غاز الهيدروجين وبنقاوة ٩٩,٩٩٩ %
  ٢. الهواء النقي

# الفرن ووحدة التحكم

- يحتوي الفرن على ما يلي:
  ١. العمود الشعري او الزجاجي
  ٢. مروحية داخلية لتوزيع الحرارة او تبريدها
  ٣. حجرة الحقن
  ٤. الكواشف المركبة (TCD ، ECD ، FID )
  ٥. لوحة تحكم بضغط الغازات والتدفق
  ٦. إمكانية التحكم بدرجات الحرارة



## تطبيقات الكروماتوغرافيا الغازية في الغذاء

- تحليل مركبات :  
pids, proteins, carbohydrates, preservatives, flavors, ,colorants, vitamins, steroids, drugs, . and pesticide residues
- تحليل الدهن والأحماض الدهنية بتحويلها إلى مشتقات مثيل استر ( FAM ).
- تحليل الأحماض الأمينية بأسترتها (N-propyl esters).
- تحليل السكريات إلى مشتقات طيارة بعملية **silylation**

# Interested in Drugs?

- Many GC applications for active components in drugs and possible contaminants, adulterants, or characteristic features which may indicate the source of the particular sample.
- Forensic analysis frequently uses GC to characterize drugs of abuse, in some cases the characteristic chromatographic fingerprint gives an indication of the source of manufacture.
- Analytical procedures for over **600 drugs, poisons and metabolites.**

# FAME (fatty acid methyl esters)

- GC methods determine fat, based on fatty acid content.
- A fat is extracted, saponified, and esterified to prepare the fatty acid methyl esters (FAMES).
- The fatty acid esters are separated and quantitated by the GC.
- This method is effective at determining the amount of saturated and unsaturated fatty acids in the sample.
- A GC/FAME-based test will determinate total saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fats in foods.

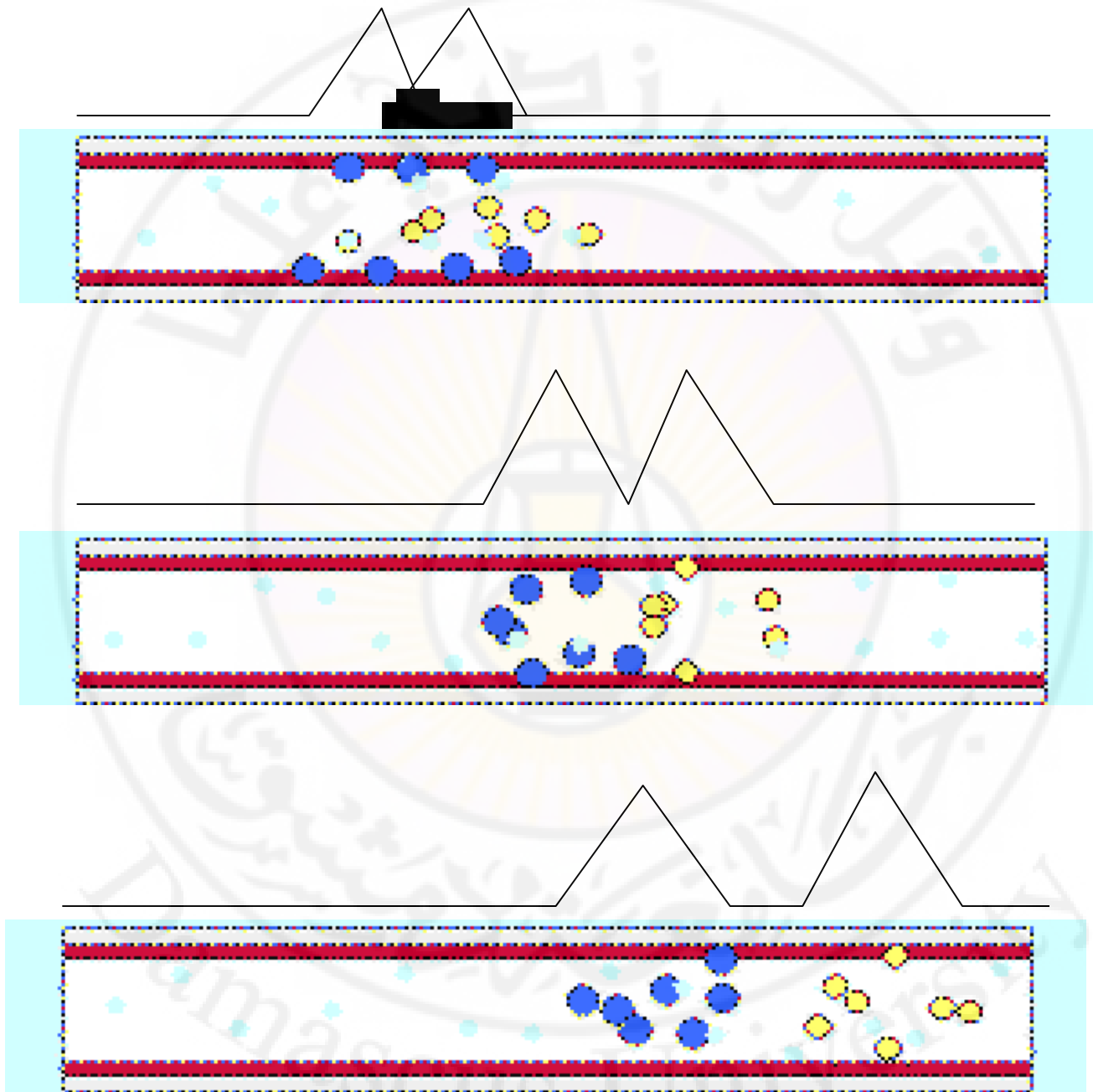
# Derivatization Steps

**Acetates**

Methyl ethers

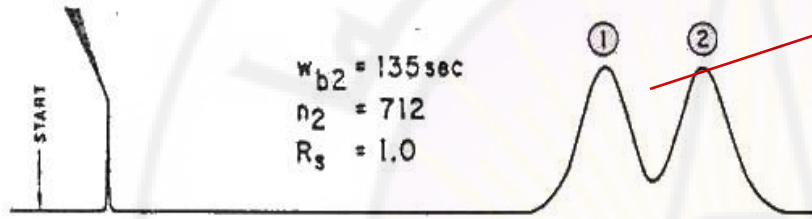
TMS ethers



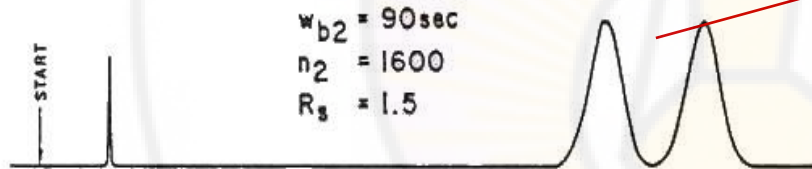


# CHROMATOGRAPHY - THE SEPARATION PROCESS

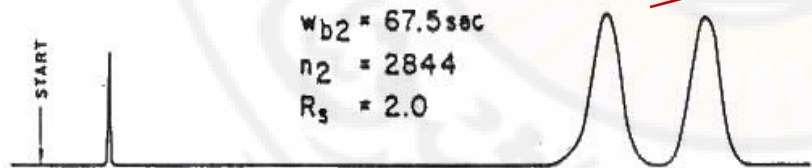
PEAK OF AN UNRETAINED SOLUTE



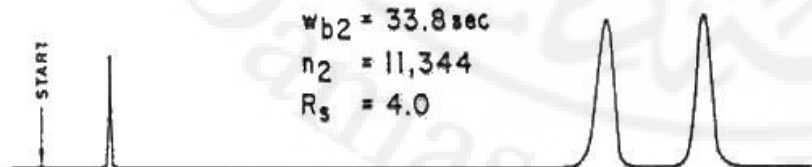
Separated but not resolved



Separated but almost resolved

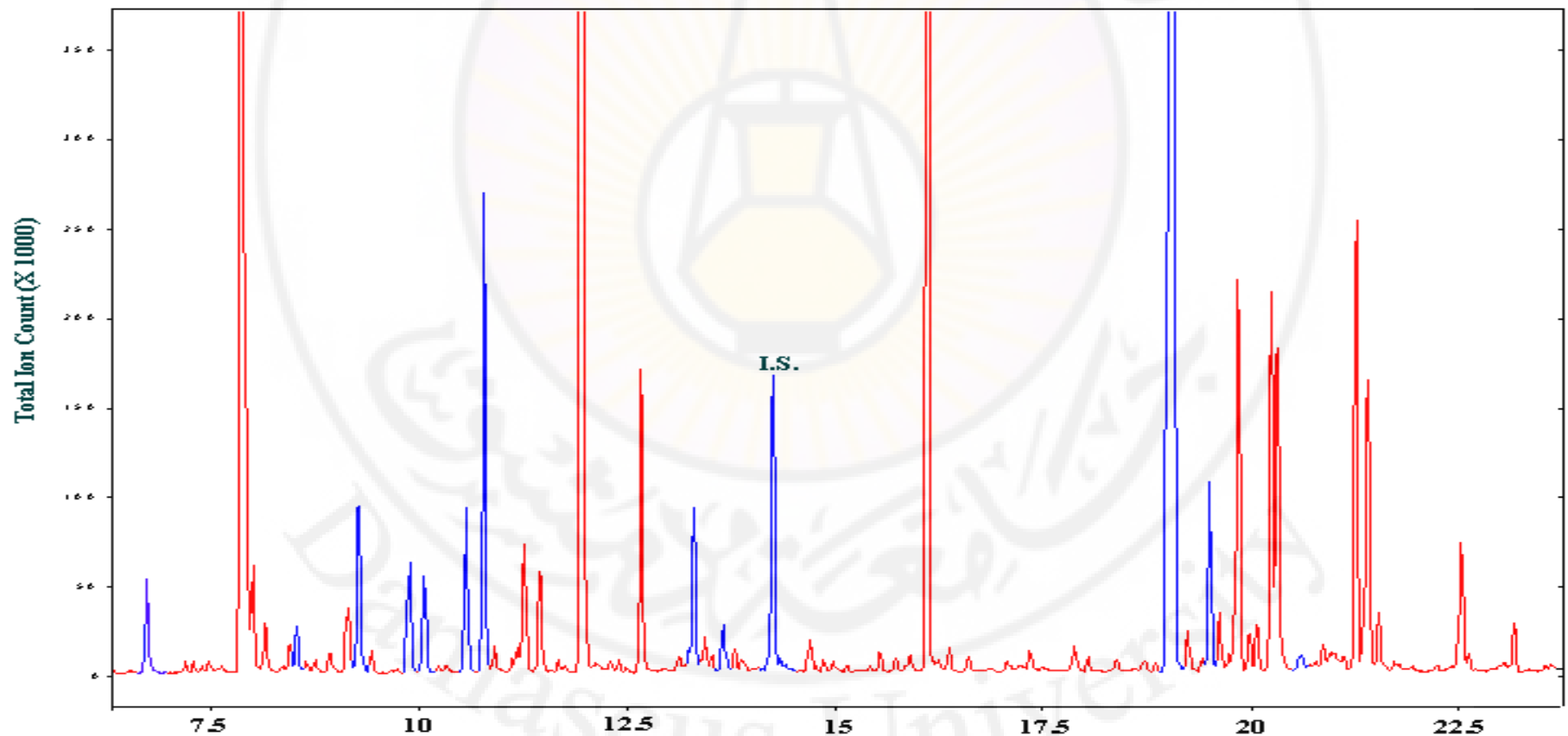


Separated and just resolved



Separated and completely resolved

# Typical Volatile Profile of Strained Carrots (Common Terpenoids Marked in Blue)



# الكواشف أو الحساسات المستخدمة

- تعريف الحاس : هو اداة تستطيع قياس تركيز مكونات العينة عن طريق اشارة كهربائية تتناسب مع تركيز المكون في العينة واهم صفات الحاس هي الحساسية والضوضاء والاستجابة الخطية





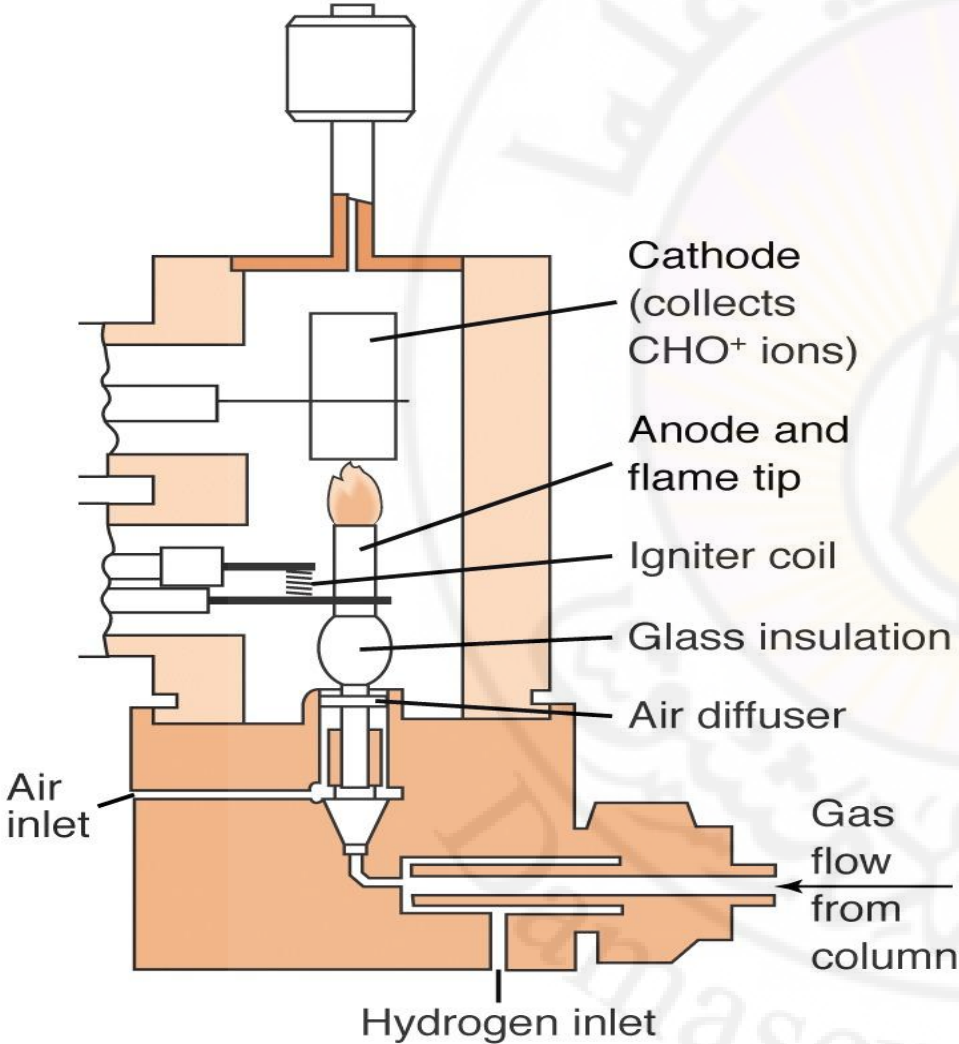
# ١- كاشف اللهب المتأين (FID)

## Flame ionization detector

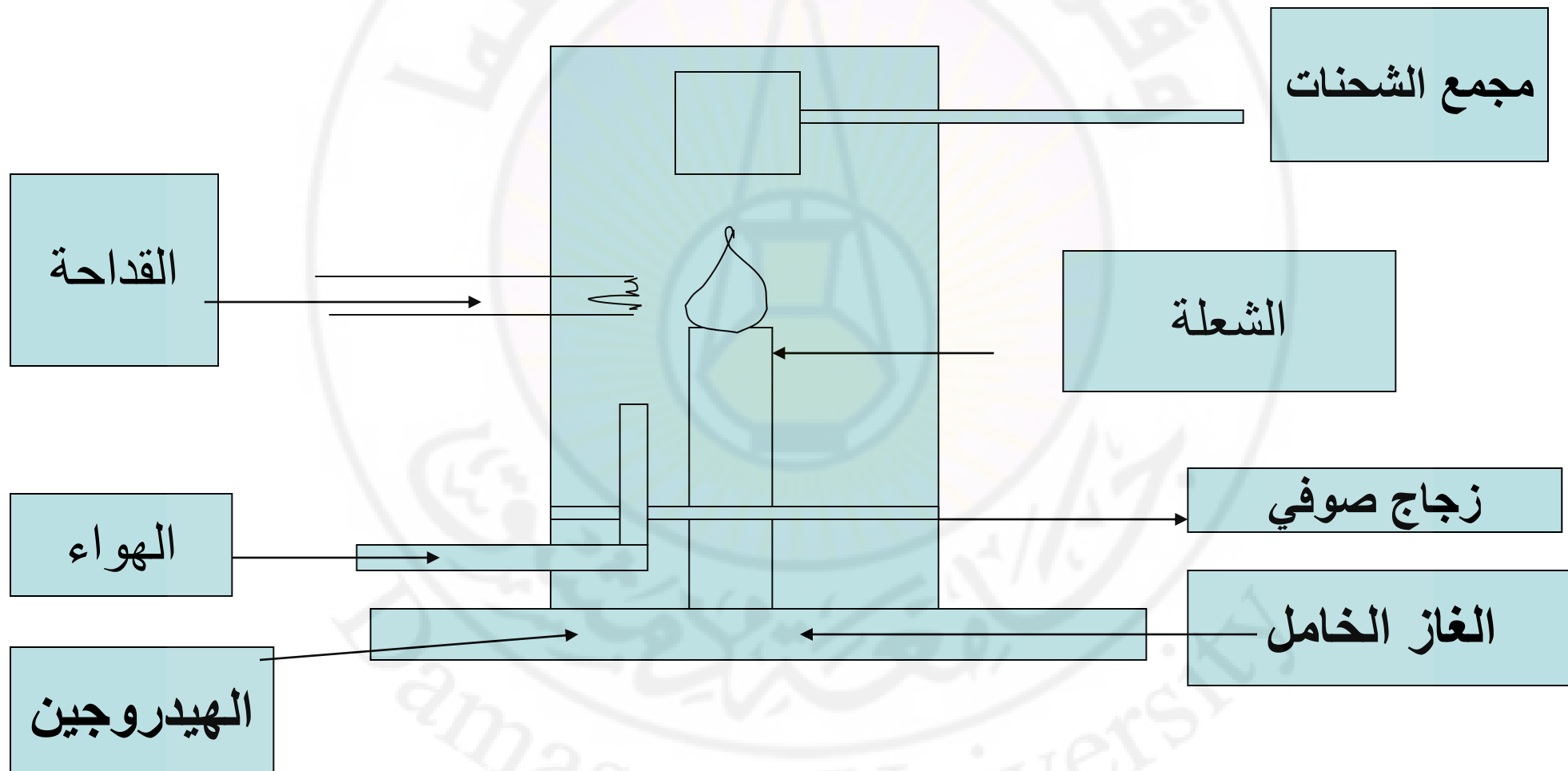
- مبدأ العمل : يعتمد على اساس ان التوصيل الكهربائي للغاز يتناسب طردياً مع تركيز الجسيمات المشحونة في الغاز ، فعندما ينساب الغاز الحامل تتشرد بعض الجزيئات العضوية في تيار الغاز إلى شحنات أيونية ( $\text{CH}_2^+$ ) فيؤدي ذلك إلى ظهور الجسيمات المشحونة (شوارد سالبة او موجبة + كهارب) في داخل حفرة الكاشف حيث يتم التقاط تلك الشحنات بواسطة مقياس كهربائي ترسل إلى مضخم الإشارة ومن ثم إلى المسجل.

# خصائص FID

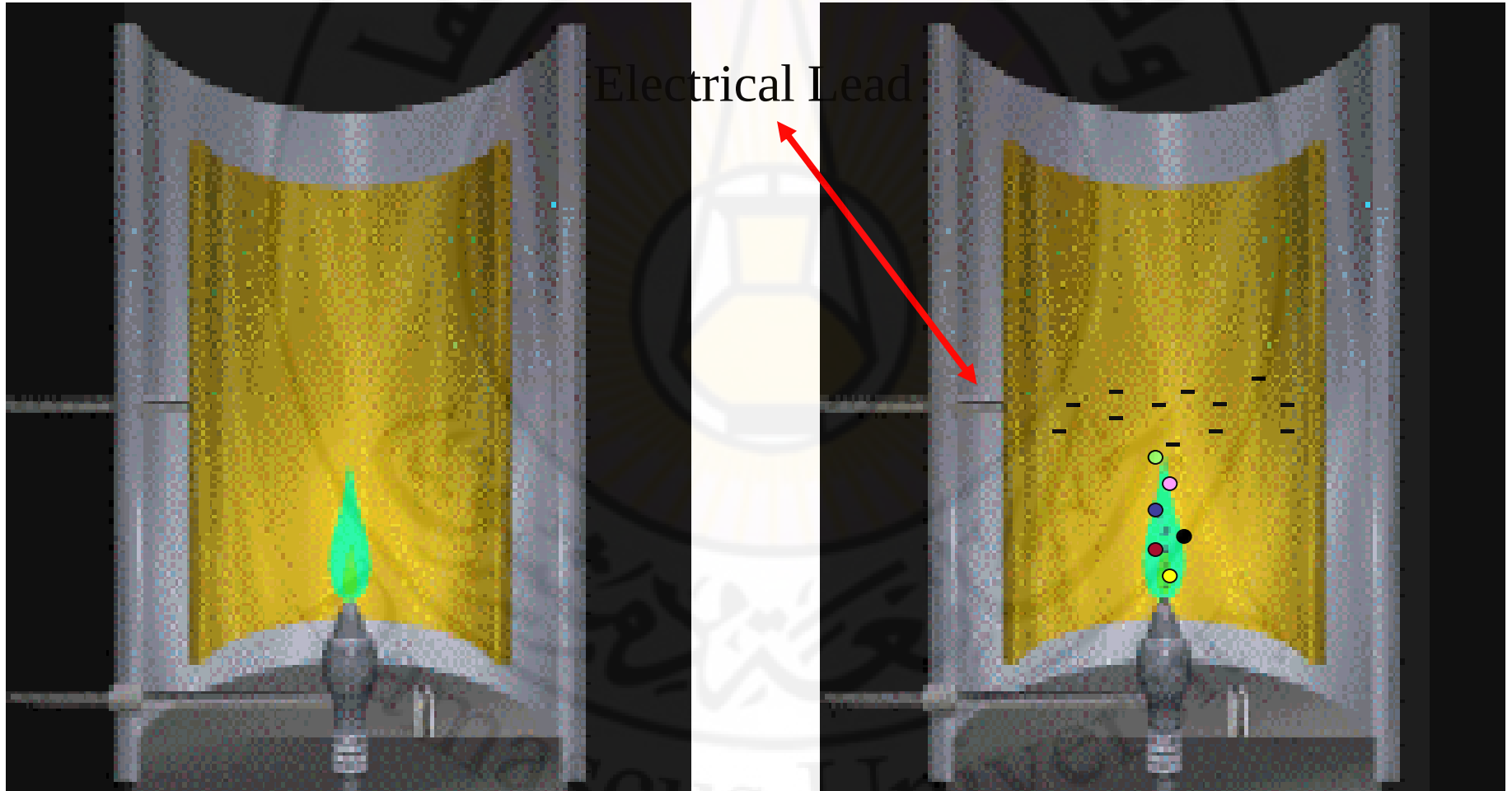
- كاشف عام من اجل المركبات العضوية
- حساسية عالية ( $10^{-13}$  g/s)
- استجابة خطية حتي ( $10^7$ ).
- صلب



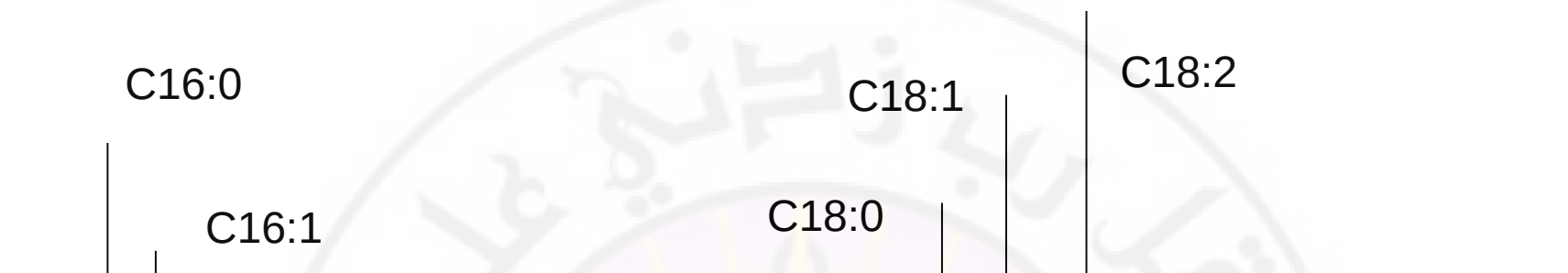
# FID



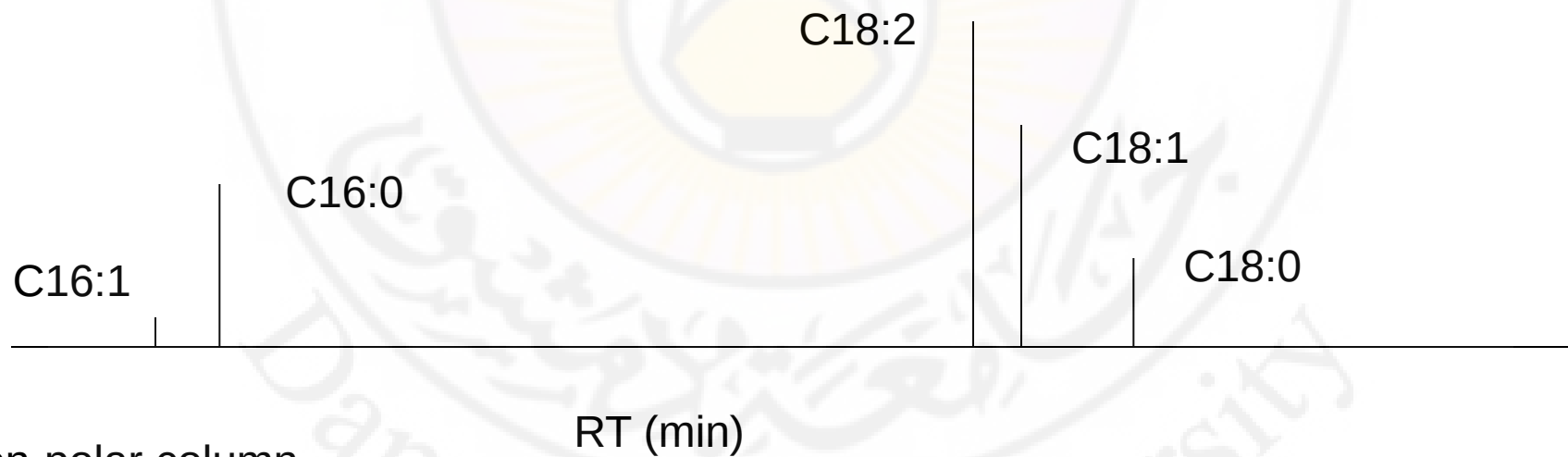
# Flame Ionization Detector (FID)



Polar column



Non-polar column



## ٢- كاشف قانص الكهارب (ECD) Electron capture detector

- يعتمد على نقص الإشارة الكهربائية بدلاً من قياس الزيادة في التيار الكهربائي فعند جريان الغاز الخامل عبر الحاس تعمل صفيحة رقيقة مشعة من النيكل  $^{63}$  على تشتت جزيئات الغاز الخامل وتولد كهارب بطيئة ترتحل إلى القطب الموجب وعندما تدخل العينة المحتوية على جزيئات قانصة للكهارب على الحاس تقلل من جريان التيار الذي يكون مقياساً لكمية جذب العينة للكهارب

# خصائص ECD

- مكشاف غاية في الحساسية للمركبات التي تحوي ذرات كهرسلبية متميزة مثل الهلوجينات المتواجدة في المبيدات
- مركبات الحاوية على مجموعات النيترو في مركباتها ولمركبات ذات الطبيعة العطرية المتكاثفة
- بعض المعادن
- الأثر المتبقي للمبيدات في المواد الغذائية

# مكشاف الناقلية الكهربائية (Thermal conductivity) TCD

- هو مكشاف السلك الساخن ويعمل عند اجرار غاز فوق سلك خيطي ساخن حيث تتغير درجة حرارته ومقاومته وفق الناقلية الحرارية للغاز.
- يوجد سيلكان خيطيان ، الأول يمر عليه الغاز الحامل النقي والثاني يمر عليه الفيض الملفوظ من العمود الحاوي على مكونات العينة .
- يكون السيلكان ذراعين متعاكسين لدارة جسر واطسون التي تقيس الاختلافات في المقاومة، ويتناسب هذا الاختلاف مع تركيز العينة

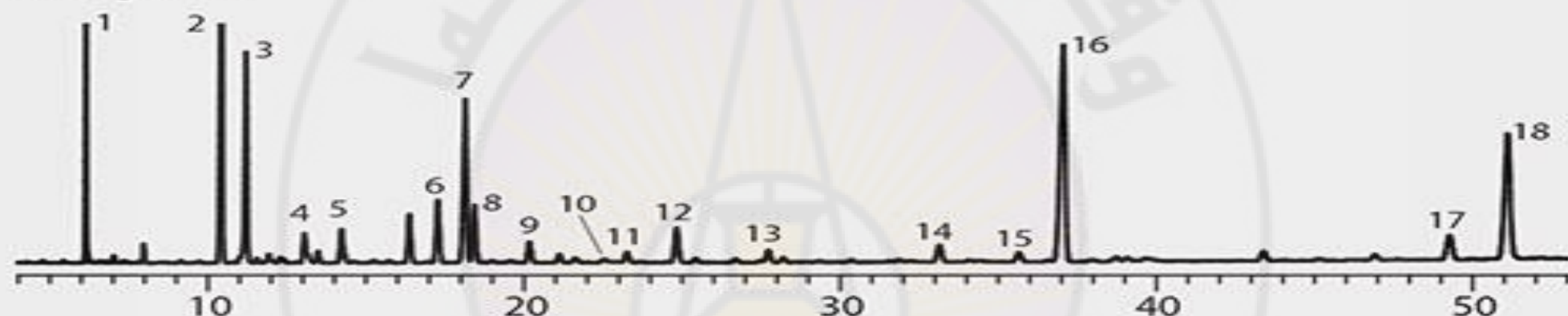


# استخدام TCD

- يستجيب هذا الحاس إلى جميع المركبات الطيارة والملوثة للهواء والماء
- حساسية حتى ١/١٠٠٠٠
- كشف غش المواد العضوية الكاز والبنزين والنفط

- |            |             |                   |                   |
|------------|-------------|-------------------|-------------------|
| 1. C14:0   | 6. C18:0    | 11. C18:3n3 (ALA) | 15. C20:4n3       |
| 2. C16:0   | 7. C18:1n9  | 12. C18:4n3       | 16. C20:5n3 (EPA) |
| 3. C16:1n7 | 8. C18:1n7  | 13. C20:1n9       | 17. C22:5n3       |
| 4. C16:2n4 | 9. C18:2n6  | 14. C20:3n3       | 18. C22:6n3 (DHA) |
| 5. C16:3n4 | 10. C18:3n4 |                   |                   |

### Omegawax



### SLB-IL60

