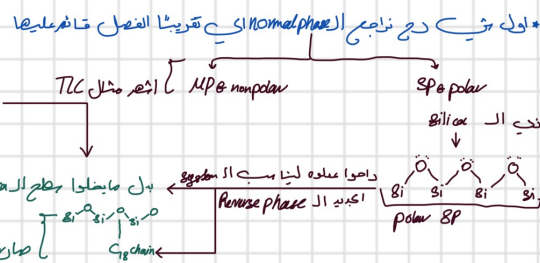
لجان الدفعات

PHARMACEUTICAL ANALYSIS

MORPHINE ACADEMY

By: Dana AlHroub

ليش أصلاً احتاجوا يطوروا الـNormal phase. قال إنه إذا بده يفصل مواد polar وnonpolar باستخدام column بالـHPLC، أحيانًا يحتاج وقت كبير جدًا جدًا حتى يفصلهم، خصوصًا إذا كان عنده mixture فيها مواد قريبة كثير من بعض بالـpolarity. هسا الـstationary phase الأصلية كانت silica polar. وقال إن هذا النظام ممكن يفصل polar عن nonpolar، لكن إذا عندك أكثر من مركب وخصوصًا مركبات polarity تبعتها قريبة كثير من بعض، عملية الفصل بتكون صعبة وبطيئة وغير مجزية. فلهيك قال: «شو طرحوا؟ الـsystem الجديد اللي اسمه Reverse phase.»



Reverse-phase column
Stationary phase = C18
nonpolar

Polar analyte
↓
يمشي مع mobile أسرع
↓
Elutes first

Low-polar analyte
↓
يمسك شوي
↓
Elutes second

Nonpolar analyte
↓
يمسك بقوة على C18
↓
Elutes last

لا nonpolar analyte

الـ low polar analyte

تمسك بالـC18 أكثر من المادة الـpolar، لكن أقل من المادة الـnonpolar.
إذن:
{Low polar = intermediate}

Polar analyte
↓
ما بحب C18 nonpolar
↓
يبقى أكثر مع mobile phase
↓
يخرج أسرع
{Polar = elutes first}

مثال: العينة عندي mixture فيها polar وفيها low polar وفيها nonpolar.

كيف بدي يصير؟ بدي sample mixture يعني فيها A=polar، B=low polar، C=non polar.

بدي الـcolumn فيه nonpolar stationary phase = C_{18}

طيب كيف نطلع الـNonpolar أسرع؟

هون الدكتور رجع لفكرة الـGradient اللي شرحها بالمحاضرة السابقة وقال تقريبًا: «شو بسوي؟ بدل ما مستخدم أنا methanol... بروح أزيد شوي acetonitrile وبشيله من الـcolumn.» يعني إذا المادة الـnonpolar علقت أكثر بالـC18، نقدر نغير تركيب الـmobile phase حتى نخليها تتحرك أسرع وتطلع.
وقال بمعنى الكلام: «الـpolar رح يبقى حابب الـmethanol ويخرج معه، الـlow polar راح يخرج أبطأ لأنه شوي راح يتأثر، بعدين المركب الثاني يخرج، والـnonpolar شو بسوي؟ بروح زي ما حكيت المرة الماضية بـgradient elution بضيف acetonitrile، acetonitrile راح ياخذ العينة من جوا الـcolumn ويخرجها مع الـmobile.»
يعني الدكتور ربط الـReverse phase مباشرة بالـGradient:
{Change mobile-phase composition}
حتى نقدر نطلع المركبات المحتجزة أكثر.

ليش *Reverse Phase* أحسن حسب شرح الدكتور؟

قال تقريبًا: «هيك قدرت أفك الثلاثة مع بعض: polar والـlow polar والـnonpolar، بينما بالـNormal phase ما بقدر أفك فقط polar عن nonpolar، القريبين جدًا بالـnonpolar رح يكون spot فوق بعض ومش رح يفصل.»
يعني الميزة اللي كان بده يوصلكم إلها:
{Reverse phase gives more flexibility}
خصوصًا إذا عندي mixture فيها مركبات متفاوتة أو قريبة جدًا بالـpolarity.
وقال تقريبًا: «هذا الـtechnique أعطاني modification، أعطاني flexibility بحيث أقدر أفك بعينة واحدة الـpolar عن الـnonpolar باستخدام الـReverse.»

هاي السلايدات معناها كل الدكتور رح نلخصها تلقائي لكن نزل على الـdetectors تحت

الدكتور هون قال إنه قبل ما يرجع يكمل موضوع الفصل، بده يروح للـdetectors. والفكرة اللي بدأ فيها إنه كل الحكي اللي أخذناه عن الـchromatography أساسه فصل المواد عن بعضها باستخدام mobile phase وstationary phase. مثل الـTLC: بتحط العينة، تتحرك المواد بسرعات مختلفة، وبالنهاية تنفصل. لكن التطوير اللي صار إنهم أخذوا نفس مبدأ الفصل وربطوه مباشرةً بـdetector، فبدل ما أفصل المواد وبعدين أروح أشوفها بطريقة ثانية، صار الجهاز يفصلها وبعدين يرسلها واحدة وراء الثانية مباشرة للـdetector حتى يشوفها ويقيسها. يعني عندي سواء HPLC أو GC: أولًا في mobile phase، بعدها sample تدخل، بعدها column فيها stationary phase، داخل الـcolumn تنفصل مكونات العينة، وبعد ما تنفصل تخرج واحدة وراء الثانية وتروح للـdetector.
وهون قال الدكتور إن الـchromatography تحولت من مجرد Tool مثل TLC إلى Instrument كامل، لأن صار عندي أجزاء كلها مشبوكة مع بعض: mobile phase → sample introduction → column → separation → detector

يعني عنا الـcolumn بتفصل و الـdetector بقيس المواد بعد فصلها
هاد الجزء العام جاء كان عنا HPLC أو الـGC

لكن الـdetectors المستخدمة في GC ممكن تختلف عن LC، وهو قال إنه رح يركز أكثر على LC detectors لأن شغلهم بالصيدلة أكثر على Liquid Chromatography، وعلّلها بأن كثير من الأدوية غير قابلة للتطاير، لذلك تطبيق GC عندهم أقل مقارنةً بالـLC.
أنواع الـDetectors اللي بدأ الدكتور يعددها
هون الدكتور أعطى overview سريع قبل ما يشرح كل واحد بالتفصيل. ذكر تقريبًا:
{UV/Absorbance detector}
{Fluorescence detector}
{Electrochemical detector}
{Mass detector}
{Refractive Index detector}
وبعدين صار يقارن بينهم من ناحية Sensitivity، يعني: شو أقل كمية من المادة بقدر الـdetector يشوفها؟
وهذا اللي قصده لما بدأ يحكي Nano وPico وFemto

بعدين حكى عن التطوير الكبير في HPLC

قال تقريبًا: «Reverse phase بشكل عام، وصار عليه تطوير. هسه في كثير chemicals، مش بس C18، بس نحن خلينا بالprinciple.»

يعني السلاسل مثل C18 وC8 أمثلة أساسية، لكن في stationary phases مطورة أكثر.

وبعدين قال إن الـReverse phase صار يعطي مرونة كبيرة جدًا، لدرجة إنه قال تقريبًا:

> «مرات 25 in one run مركب بخمس دقائق.»

وذكر إن الأجهزة المتطورة جدًا صار ممكن يدخل فيها عدة mobile phases ويلعب بنسبهم ويطلع عدد كبير من المركبات بسرعة.

وقال تقريبًا إن في أجهزة توصل بحدود **50,000 دينار** وتسمح باستخدام عدة mobile phases، بينما الجهاز اللي عندكم فيه **two mobile phases** وسعره تقريبًا **37,000** حسب كلامه.

يعني النقطة اللي كان بده يثبتها:

More flexible solvent control

⇒

Faster + more complex separations

وبعدها رجع للـGradient مرة ثانية

قال: «وكذلك التطوير اللي صار إنه Gradient، ما التزمت فقط بـIsocratic، يدخل أكثر من solvent، الدقيقة الأولى بنسبة كذا، الدقيقة الثانية بغير النسبة حتى أقدر مين يطلع ومين أخليه جوا.»

يعني:

Isocratic = composition ثابتة

أما:

Gradient = composition بتتغير مع الوقت

وقال إنه مثلًا إذا عنده mixture فيها polar وlow polar وnonpolar، يطلع أولًا الـpolar، وبعدين يغير polarity للـmobile phase حتى يطلع الـlow polar وبعده الـnonpolar.

يعني:

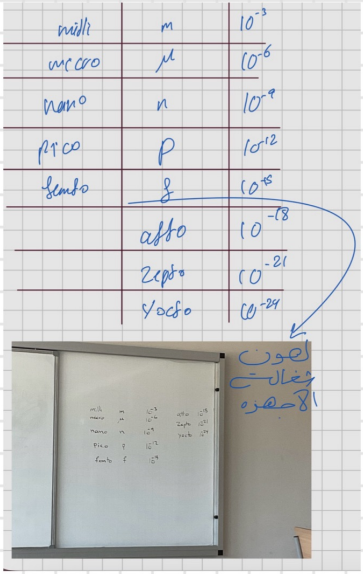
Plain text

```
Beginning of run
→ Mobile phase more suitable for polar analytes
→ Polar analyte exits

Later
→ Change mobile-phase composition
→ Low-polar exits

Later
→ Change composition again
→ Nonpolar exits
```

وبهذا يقدر يفصل عدة مركبات في نفس الـrun.



وقال إن هاي المصطلحات ممكن تستخدم سواء مع **weight** أو **volume**، يعني ممكن نشوف مثلًا:

ng = nanogram

أو:

μL = microliter

والفكرة مش كلمة gram أو liter؛ المهم الـprefix نفسه.

مين أكثر حساسية؟

حسب الأرقام اللي أعطاها الدكتور في الريكورد، كان بده يوصلكم للصورة العامة التالية:

Refractive Index حساسيته تقريبًا عند مستوى:

μg

بينما **UV/Absorbance** يوصل تقريبًا إلى:

ng

والـ**Fluorescence** أكثر حساسية من UV ووصل في شرحه لمستويات أقل، والـ**Mass** وصل فيه إلى:

fg

يعني أهم فكرة بالحفظ:

$μg > ng > pg > fg$

والتنبيه: لما الرقم/الوحدة تصغر، الجهاز صار **أكثر حساسية**؛ لأنه صار قادر يشوف كمية أصغر.

فالدكتور كان بده يوصلكم تقريبًا إلى:

أعلى حساسية من الأجهزة اللي كان يقارنها هنا = Mass detector

وعشان يوضح فرق الحساسية والسعر، أعطاكم مثال من الأجهزة الموجودة عندهم وقال تقريبًا إن جهاز UV اللي شغلته ممكن يكون سعره حوالي 6000–7000 دينار، بينما جهاز الـMass اللي عالى جدًا، وذكر مثلًا عن جهاز وصل سعره تقريبًا 334,000 دينار أردني، وكان قصده يبين لكم حجم الفرق بين الجهازين.

وبعدها قال إن كل هاي الأجهزة اللي بحكي عنها الآن هي detectors ممكن تكون مشبوكة بعد الـLiquid Chromatography

هسا رح نبلش بالـdetector في الـHPLC

UV Absorbance Detector 1

تقريبًا نفس جهاز الـUV-visible لكن

المادة بعد ما تطلع من الـcolumn ما بتصير انو وديها على cuvette وإنتِ تعبيها بإيدك، لا، في داخل الجهاز نفسه flow cell / cuvette يمر فيها الـmobile phase ومعه المركب الخارج من الـcolumn، وبسقط عليها الضوء والجهاز يقيس الـabsorbance. يعني الفرق عن جهاز الـUV العادي إنك هناك كنتِ تعبي الكيوفت بنفسك وتحطي sample، أما هون الـsample بيوصل أوتوماتيك من الـcolumn للـdetector. وذكر إن الكيوفت داخل الجهاز ما بتكون plastic، وإنما تكون مناسبة للـUV مثل

نفس العلاقات الأساسية اللي أخذناها قبل

$A = -\log T$ أولًا $A = \log \frac{P_0}{P}$ طالما الـdetector بقيس فروق الضوء قبل وبعد مروره بالعينة ومنه يطلع absorbance

شرط مهم جدًا: لازم المركب يمتص UV

الدكتور رجع هون لموضوع الـChromophore وقال إن الـUV detector مش Universal detector، يعني مش كل مركب أقدر أحلله فيه، لازم المركب يكون فيه شيء يمتص UV. وشرحها بالقاعدة اللي كان مستخدمها معكم سابقًا: المركبات اللي فيها conjugated systems / chromophore- هي اللي تنشاف بالـUV، وكان يكرر فكرة إنه لازم يكون عندك تقريبًا **at least two conjugated π-bonds** حتى يكون الامتصاص واضح ومفيد حسب شرح المحاضرة.

يعني عندك:

$$\text{Chromophore present} \Rightarrow \textit{UVdetectionpossible}$$

أما compound ما فيه chromophore مناسب أو saturated بالكامل، فممكن ما ينشاف بشكل مناسب بالـUV.

ولهذا قال الدكتور إن الـUV detector:

$$\text{Non} - \text{universal}$$

لأنه:

UV تمتص compounds مش كل

والـMobile Phase كمان لازم ما يخرب القياس

الدكتور شبّهها بموضوع solvent في NMR، وقال إن الـsolvent نفسه لازم ما يعمل interference مع القياس. في الـUV لازم تختاري mobile phase ما تعطي absorbance قوي عند الـwavelength اللي بدك تشتغلي عليها، لأنه إذا الـmobile phase نفسها امتصت الضوء بقوة رح تتداخل مع analyte.

الفكرة:

{Mobile phase absorbance should be minimal at analytical λ}

والجهاز أساسًا يعمل baseline/zero على الـmobile phase، وبعدها أي تغير يظهر لما يطلع analyte من الـcolumn.

الدكتور رجع شبّهها بطريقة الـtwo cuvettes اللي استخدمتوه قبل. شرح إنه عندك مرجع reference فيه mobile phase، ومسار ثاني فيه analyte + mobile phase،

يعني

$$\text{Signal of analyte} \approx \text{Sample signal} - \text{Mobile phase/background}$$

وبالتالي الـmobile phase تكون هي الـbaseline، ولما يطلع compound يظهر peak.

انواع الـUV Detectors

Fixed Wavelength

هذا أبسط نوع. الدكتور قال فكرته إنه الجهاز يشتغل على:

One wavelength only

يعني بتحدد wavelength معينة، غالبًا λ_{max} للمركب، والجهاز يراقب بس هاي الـwavelength.

مثلًا مركب A:

$$\lambda_{max} = 250\ nm$$

بتحكي للجهاز:

Measure at 250 nm

وخلص.

المشكلة اللي ركّز عليها الدكتور: لو عندك mixture فيها مركبين وكل واحد إله λ_{max} مختلف، هذا النوع ما يقدر يراقب كل wavelengths بنفس الوقت.

مثلًا:

$$A : \lambda_{max} = 250\ nm$$
$$B : \lambda_{max} = 310\ nm$$

إذا شغلتي الجهاز على 250:

بتشاف بشكل مناسب A

لكن B ممكن ما ينشاف بشكل مناسب أو تكون حساسيته أقل.

فحسب شرح الدكتور، إذا بدك تشتغلي على اثنين، تضطري تغيري wavelength أو تعيدي الـanalysis.

يعني:

Fixed wavelength = one selected λ

Variable Wavelength

يقدرين قال إن التطوير الثاني كان Variable detector، اللي يسمح لك تختاري أكثر من wavelength، وذكر بالمحاضرة إنه ممكن يتعامل مع عدد محدود، وقال تقريبًا **up to three wavelengths** في الجهاز اللي كان يشرحه.

يعني لو عندك ثلاثة compounds:

$$A : \lambda_{max} = 220$$
$$B : \lambda_{max} = 280$$
$$C : \lambda_{max} = 320$$

تقدر تخلي detector يراقب:

$$220,\ 280,\ 320\ nm$$

وبالتالي:

$$\text{Variable detector} = \text{several selected wavelengths}$$

لكن لسه عنده limitation:

عدد محدود من wavelengths

وعلى spectrum كامل.

Diode Array Detector (DAD)

هون الدكتور قال إن هذا النوع هو اللي كان موجود بالجهاز عندكم، وبدأ يوضح ليش يعتبر تطوير كبير. الـDAD ما براقب wavelength وحدة ولا بس 2–3 wavelengths، وإنما بستطيع يجمع **range** كامل من **wavelengths** تقريبًا في نفس الوقت.

ذكر range تقريبًا:

$$200 - 800\ nm$$

يعني بدل ما أقول له:

شوفلي 250 فقط

أو:

شوفلي 220 و280 و320

هو بستطيع يقرأ spectrum واسع كامل.

$$\text{DAD} = \text{many wavelengths simultaneously}$$

وهون المرونة بتكون أكبر كتير.

ليش اسمها Diode Array؟

لأنه عندك مجموعة كبيرة من الـphotodiodes، وكل diode تستقبل جزء wavelength مختلف من الضوء.

يعني بدل detector واحد يقرأ wavelength واحدة، صار عندك array من detectors.

تقريبًا:

```
Polychromatic light
200  250  300  350  400 ... 800 nm
 ↓    ↓    ↓    ↓    ↓       ↓
[D1] [D2] [D3] [D4] [D5] ... [Dn]
```

كل D_i يمثل detector صغير لحزمة معين من spectrum.

وبالتالي الجهاز يحصل على معلومات كثيرة جدًا دفعة واحدة.

ليش هذا مهم في الـMixtures؟

الدكتور قال إنه لو عندك mixture فيها عدد كبير من compounds، وكل compound إله λ_{max} مختلف، فالـDAD يقدر يراقبهم كلهم أثناء نفس الـrun، بشرط طبعًا إنهم ينفصلوا **chromatographically** بالـcolumn.

مثلًا:

$$A \rightarrow 220\ nm$$
$$B \rightarrow 250\ nm$$
$$C \rightarrow 300\ nm$$
$$D \rightarrow 350\ nm$$

الجهاز عنده wavelengths أصلًا، فيقدر يرجع يشوف كل compound عند الـwavelength الأنسب إله.

ولهذا الدكتور قال إنه ممكن يتعامل مع عشرات المركبات في نفس الـrun، بدل ما يكون محصور بمركب واحد أو ثلاث مركبات.

الفكرة المهمة:

Column separates compounds by retention time

والـDAD:

Measures their UV spectra at many wavelengths

يعني صار عندك معلومتين عن المركب:

Retention time

و:

UV spectrum / λ_{max}

هذا يساعد كتير في الـidentification.

نقطة مهمة: لو مركبين عندهم نفس λ_{max}

الدكتور طرح فكرة إنه ممكن مركبين يكونوا قريبين أو حتى عندهم نفس λ_{max}، هون الـwavelength لوحدها ما تكفي حتى أقول إنهم نفس المادة. لذلك أصلاً لازم الـcolumn يكون فصلهم عن بعض ويطلع كل واحد في retention time مختلف.

يعني:

λ_{max} alone doesn't necessarily identify compound

لكن لو عندك:

$t_R + UV\ spectrum$

بتكون عندك معلومات أقوى.

هل UV detector Destructive أم Non-destructive؟ ⭐

الدكتور شدد هون على نقطة مهمة وقال إن العينة بعد ما تمر بالـUV detector ممكن تخرج من الـdrain، وإذا بدك تجمعها تقدر تجمعها وتنزل solvent وتسترجع analyte.

يعني الضوء يقيسها لكنه ما لازم يدمرها كيميائيًا.

لذلك:

$\text{UV Detector} = \text{Non} - \text{destructive}$

وهذا معناه:

Sample can potentially be recovered

وقال بمعنى الكلام: «بقدر أروح أجمعه، وأطير الـsolvent، وأسترجع العينة.»

ادا ملخص الـ UV detector

UV Detector
Qualitative?
نعم، إلى حد ما، لأن الـwavelength/UV spectrum ممكن يساعد بالـidentification.
Quantitative?
نعم، لأن الـabsorbance تتناسب مع الـconcentration.
Universal?
لا، Non-universal، لأنه مش كل الـcompounds فيها chromophore مناسب.
Destructive?
لا Non-destructive، يعني العينة ما بتتدمر وبقدر أجمعها وأزيل الـsolvent وأسترجعها.
Sensitivity?
حسب كلام الدكتور تقريبًا {ng} يعني nanogram.

---

2. لا (RI) Refractive Index detector

الـrefractive index صفة فيزيائية للمادة. فكرته إنه لما أسقط ضوء على مادة، الضوء ينكسر بزاوية معينة، وكل مادة إلها زاوية انكسار مميزة إلها. أعطى مثال إنه المادة الأولى ممكن تكسر الضوء بزاوية 45، والثانية λ_{max}.

الدكتور شرح إنه بالبداية بمر الـmobile phase لحاله، وطبعًا الـmobile phase نفسه مادة وإله refractive index، فالجهاز يتعرف عليه ويعمل عليه Zero/Baseline. بعدين لما يطلع أول analyte من الـcolumn ويصير عندي mobile phase + analyte، تتغير زاوية الانكسار، فيتحسس الجهاز هذا التغير ويعطي signal/peak. لما تخلص المادة ويرجع يمر mobile phase لحاله، الإشارة ترجع للـbaseline.
بعدين لما تطلع المادة الثانية، يتغير الـrefractive index مرة ثانية ويطلع peak ثاني، وبعد ما تخلص يرجع للـbaseline، وهكذا مع باقي المركبات
والدكتور قال إنه بقدر نعمل calibration باستخدام standards، وبعدها من حجم/شدة الإشارة نستخدم الجهاز بالـquantitative analysis ونحسب concentration للعينة
هون أهم ميزة ذكرها الدكتور: الـRI ما بشترط وجود chromophore ولا fluorophore. بما إن المواد إلها خواص انكسارية، فحسب وصف الدكتور اعتبره:
{Universal detector}
وهذا كان السبب اللي خلاه يقول إن فكرته ممتازة ورخيصة مقارنةً بأجهزة مثل Mass.
لكن بعدها دخل مباشرةً على مشاكله، وهي الأهم عنا 3 مشاكل B C

Refractive Index Detector

Principle? يعتمد على اختلاف الـRefractive Index/انكسار الضوء بين الـmobile phase والعينة.
Universal? نعم، حسب تصنيف الدكتور Universal، لأنه لا يحتاج chromophore أو fluorophore.
Quantitative? نعم، ممكن نعمل calibration بالـstandards ونحسب concentration.
Gradient? لا، لأن تغيير تركيب الـmobile phase مشكلة؛ لذلك يفضل معه refractive index يغير الـIsocratic.
Temperature? يتأثر جدًا بالـtemperature، لذلك يحتاج Isothermal conditions.
Sensitivity? منخفضة نسبيًا، وحسب الدكتور تقريبًا /ng.
أهم عيوبه؟ Gradient limitation + Temperature sensitivity + Poor stability/reproducibility + Low sensitivity.

ملخص الـ RI

المشكلة الأولى: Gradient Elution ★★★

الدكتور قال إنه إذا كنت شغالة:

Isocratic

يعني تركيب الـmobile phase ثابت طول الـrun، ما عنده مشكلة كبيرة من هاي الناحية؛ لأن الجهاز صفّر على mobile phase ثابتة.

لكن لو عملتي:

Gradient

وصرت تغيري نسب الـsolvents أثناء الـrun، هون المشكلة.

ليش؟ لأن كل solvent إله refractive index خاص فيه. فإذا غيرتِ تركيب الـmobile phase، الـRI رح يتغير حتى لو ما طلع analyte.

يعني الجهاز ممكن يشوف:

Change in mobile phase

ويعطي signal، بينما إحنا بدنا:

Change due to analyte

فلهيك حسب كلام الدكتور:

RI detector is problematic with Gradient elution

ويكون أنسب مع:

Isocratic elution

المشكلة الثانية: Temperature ★★★

هاي الدكتور طول فيها كثير. قال إن الـrefractive index يتأثر بالـtemperature. يعني إذا نفس المادة كانت حرارتها مختلفة، زاوية الانكسار ممكن تتغير.

$$T \text{ changes} \rightarrow RI \text{ changes}$$

فمثلًا في أول run تكون الحرارة حوالي $25^\circ C$، ومع استمرار الجهاز والضوء والتشغيل ترتفع الحرارة، وبعدها ممكن تصير 30 أو أعلى. هون نفس المادة ممكن تعطي refractive index مختلف عن اللي أعطته أول مرة.

يعني:

```
Same compound
25°C → RI₁

Same compound
30°C → RI₂
```

وبالتالي الدكتور كان يقصد إنك لو أعدتِ نفس العينة عدة مرات، ممكن ما تحصلي على نفس النتيجة إذا الحرارة مش ثابتة تمامًا.

ولهذا ركز على:

Isothermal conditions

يعني لازم نحافظ على temperature ثابتة جدًا حتى يكون القياس ثابت.

وقال إنهم حاولوا يطوروا الجهاز والـcell حتى يحافظوا على isothermal conditions، لكن حسب شرح الدكتور ظل موضوع الـstability مشكلة.

المشكلة الثالثة: Low Sensitivity

الدكتور قال إن الـRI مقارنةً بالـdetectors الثانية:

Not sensitive

وكان حاط حساسيته تقريبًا عند:

μg

بينما UV يوصل تقريبًا إلى ng، والأجهزة الأكثر حساسية توصل pg وfg.

يعني:

RI sensitivity is relatively low

وهذا معناه إنه إذا عندك concentration قليل جدًا، ممكن ما يقدر يشوفه.

ليش قال الدكتور إنه تم الاستغناء عنه؟

حسب شرح الدكتور، تجمعت عنده المشاكل التالية: ما يناسب الـgradient بشكل جيد، حساس لتغير الـtemperature، الـstability/reproducibility مش ممتازة، والـsensitivity منخفضة. ولذلك قال إنه تم الاستغناء عنه إلى حد كبير في التطبيقات اللي كان يتكلم عنها.

الـ Fluorescence Detector (Fluorophore)

★ أول شيء لازم نعرفه هو الفرق بين الـChromophore والـFluorophore. حسب شرح الدكتور، الـChromophore يحتاج at least two conjugated π bonds بينما الـFluorophore يحتاج at least three π bonds conjugated، سواء كانوا في open chain أو ring. لذلك أي مركب فيه Fluorophore يحقق أصلًا شرط الـChromophore، لكن العكس مش صحيح؛ لأنه ممكن يكون عندي مركب فيه فقط two π bonds.

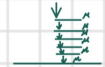
فعدد المركبات اللي فيها Fluorophore أقل من عدد المركبات اللي فيها Chromophore، ولذلك الـFluorescence detector: {Non-universal}*

not every Chromophore is a Fluorophore — يعني اهم قاعدة نعرفها ← Every Fluorophore is a Chromophore لكن

طيب شو فكرة الـFluorescence؟

هون الدكتور رجع لفكرة الـenergy levels. قال إنه بالـUV العادي، نسلط ضوء على المركب، فالـelectron يمتص energy وينتقل من الـground state إلى excited state وبعدين لما يرجع الـelectron، نحصل على الإشارة.

لكن الدكتور قال إن الفكرة بالـFluorescence إنه بعد excitation، الـelectron أثناء رجوعه ما يتعامل معها كأنه فقط انتقال واحد مباشر؛ شبّهها بأنه ينزل مثل الدرج عبر مستويات، وقال تقريبًا: «ما بيرجع مرة وحدة، كأنه نازل درج.



يوصل تقريبًا لـ Pg

ليش Fluorescence أكثر حساسية من UV؟ ← يوصل لـ ng

الدكتور شبّهها بطريقة بسيطة جدًا وقال بمعنى كلامه: بالـUV العادي الإشارة اللي أحصل عليها أقل، بينما بالـfluorescence أحصل على intensity أعلى، فحتى لو concentration العينة منخفض جدًا، تظل الإشارة واضحة وأقدر أشوفها.

يعني:{Higher signal/intensity}

وبالتالي:{Lower concentration can be detected}

فالميزة الأساسية:{Fluorescence is more sensitive than UV}

وقال بمعنى الكلام: لو المركب موجود بتركيز قليل جدًا، بالـUV ممكن تكون الإشارة صغيرة وصعب أشوفها، لكن بالـfluorescence تكون الإشارة أقوى، فبقدر أحلل تركيز أقل

إذن الـFluorescence يستطيع اكتشاف كمية أصغر:
{Fluorescence sensitivity > UV sensitivity}
وانتبهي للمصطلح: لما الدكتور يقول Limit of Detection أقل فهذا شيء أفضل، لأنه يعني الجهاز قادر يشوف كمية أقل من المادة.
{LOD ↓ ⟹ Sensitivity↑}

هل كل مركب أقدر أحلله بالـ*Fluorescence*؟
لا. وهون الدكتور رجع أكد:
{Non-universal}
لأنه حسب قاعدته لازم يكون عندي:
{Fluorophore}
أي حسب شرح المحاضرة:
{At least 3 conjugated π bonds}
ولهذا قال إن عدد المركبات اللي أقدر أحللها بالـFluorescence أقل من عدد المركبات اللي أقدر أحللها بالـUV

Fluorescence Detector ملخص
Principle?
يعتمد على fluorescence الصادرة من المركب بعد excitation ورجوع الـelectron من excited state.
Qualitative? نعم.
Quantitative? نعم.
Universal?
لا،{Non-universal}، لأنه مش كل المركبات فيها fluorophore.
شرط الـFluorophore حسب الدكتور؟
{At least 3 conjugated bonds}.
Destructive?
لا، {Non-destructive}، ويمكن استرجاع العينة حسب شرح الدكتور.
Sensitivity?
أعلى من UV، ووضعه الدكتور تقريبًا عند مستوى{pg}.
مقارنته مع UV؟
{UV أكثر حساسية من Fluorescence}
العلاقة بين Fluorophore وChromophore؟
{Every fluorophore is a chromophore, but not every chromophore is a fluorophore}.

(ELSD) Evaporative light scattering detector

HPLC Column
↓
Analyte + Mobile phase
↓
Nebulization / Heating
↓
Solvent evaporates → Exhaust
↓
Analyte particles remain
↓
Laser
↓
Light Scattering
↓
Detector

فكرته انه العينة بتكون طالعة من الـcolumn ومعها الـmobile phase، تدخل على الـdetector، وبعدين الجهاز يسخنها بحيث يتخلص من الـsolvent عن طريق evaporation ويطلعه من الـexhaust، وتبقى المادة المراد تحليلها. بعدها يُسلَّط عليها laser، والمادة تعمل scattering للضوء، والجهاز يتحسس الـscattered light. الدكتور قارنه بالـRefractive Index: هناك كنا نعتمد على زاوية الانكسار Refractive angle، أما هون نعتمد على Light scattering. وشرح إنه المواد المختلفة تعطي scattering مختلف، وبالتالي نقدر نكشف المركبات الخارجة من الـcolumn. وقال إن ميزة الجهاز الكبيرة إنه Universal حسب شرحه، لأنه مش محتاج Chromophore أو Fluorophore مثل UV وFluorescence. لكنه ذكر إنه واجه مشاكل بالـstability، وخصوصًا إنه لما يعيد نفس المادة ونفس التركيز أكثر من مرة ما كانت النتائج ثابتة بالشكل المطلوب، وربط الموضوع بضرورة ثبات الظروف والحرارة. وذكر

* اهم فكرة Remove solvent → laser → light scattering → Detection
* ليش يعتبر الجهاز Universal ؟
لأنه لا يعتمد على الـ Chromophore والـ Fluorophore وإنما يعتمد على الـ scattering بعد التخلص من الـ solvent
* هل هو Destructive ؟
نعم ما بنقدر نسترجع بعد العملية عكس الـ UV والـ Fluorescence

* شو بخصوص المشكلات اي واجهت؟

الـ Stability كان Poor Stability / reproducibility يعني لو أعاد نفس المادة بنفس التركيز عدة مرات، النتائج ما كانت ثابتة تمامًا. وذكر موضوع ثبات الحرارة والظروف أثناء القياس كجزء من المشكلة اللي كانوا يحاولوا يتعاملوا معها

ملخص Evaporative Light Scattering Detector (ELSD)

Principle?
إزالة/تبخير الـsolvent ثم تسليط laser وقياس الـlight scattering من المادة.
Universal?
نعم، {Universal} حسب تصنيف الدكتور.
Needs chromophore/fluorophore?
لا.
Destructive?
نعم،{Destructive}، والعينة لا تُسترجع حسب شرح الدكتور.
أهم مشكلة ذكرها الدكتور؟
يعني إعادة نفس العينة قد لا تعطي نتائج متطابقة ،{Stability/Reproducibility}.
مقارنته مع Mass؟ الدكتور قال إنه أثناء شغله ومقارنته كانت نتائج الـMass أفضل.

الـ Electrochemical Detector

عندي قطبين، واحد Anode وواحد Cathode، والعينة الخارجة من الـcolumn تمر بينهم. الفكرة حسب شرحه إن الـmobile phase بالبداية ما يعمل نقل للشحنة، فالجهاز يصفر عليه. لما يطلع compound قادر ينقل/يولد electrochemical signal بين القطبين، يبدأ الجهاز يتحسس انتقال الشحنة/electrons ويعطي peak. لما تخلص المادة ويرجع mobile phase لحاله، الإشارة تنزل للbaseline. بعدين تطلع المادة الثانية، يحصل signal مرة ثانية، وهكذا

ملخص Electrochemical Detector

Principle?
يعتمد على electrochemical/charge transfer signal عند مرور analyte بين electrodes.
بشكله الأساسي Universal?
لا،{Non-universal}، لأن مش كل المركبات تعطي electrochemical signal مناسب.
شو التطوير اللي ذكره الدكتور؟
عمل {Oxidation} للمركبات حتى تصبح قابلة للكشف electrochemically.
بعد الـOxidation شو المشكلة؟
تغيرت المادة الأصلية كيميائيًا.
Destructive?
نعم،{Destructive} حسب شرح الدكتور بعد عملية الـoxidation.
Qualitative/Quantitative?
الدكتور صنفه ضمن الأجهزة المستخدمة للتحليل النوعي والكمي.

(18) Mass spectrometry جهاز الـ

من أهم وأقوى الـdetectors، وإن العالم كله صار يشتغل عليه بشكل واسع. الفكرة الأساسية مختلفة عن UV وFluorescence وRI؛ هون إحنا بالنهاية بدنا نميّز المادة اعتمادًا على الـmass تبعها. كل مركب إله total molecular mass محددة حسب عدد وأنواع الذرات الموجودة فيه، مثل O=16، N=14، H=1، C=12، وهكذا. فالجهاز بده يحول المركب أولًا إلى ion حتى يقدر يتعامل معه، وبعدها يميزه/يقيسه حسب الـmass

أولًا: العينة من وين بتيجي؟

الدكتور كان يشرح الجهاز كـdetector بعد الـchromatography، يعني المادة أصلًا انفصلت بالـcolumn:

```
HPLC / GC Column
        ↓
Separated compound
        ↓
Mass Spectrometer
```

وقال إن المادة الخارجة تدخل الجهاز، وبحسب شرحه يتم تحويلها إلى **gas/vapor**، وبعدها تبدأ مرحلة الـionization.

Sample → Vapor/Gas → Ionization

اول شي لازم نعمل ionization

المركب عندي فيه covalent bonds، والـcovalent bond فيها electrons. الجهاز يسلط على المركب electron عالي الطاقة، والدكتور سماها: قصف بالإلكترونات / Bombardment

Electron bombardment ← high-energy e⁻s ← Molecule (M)

الـe الساقط بيقلع e من الـmolecule

$M + e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2e^-$

ليش صار عندي إلكترونين خارجين؟
واحد هو الـelectron اللي أصلاً أرسلناه على المادة، والثاني هو الـelectron اللي طلع من الـmolecule

مثال بسيط

H — H
σ bond
e⁻
↓
Electron bombardment
↓
إزالة electron من الرابطة
↓
$[H{-}H]^{+\bullet}$

الفكرة مش إنه لازم يكون H_2، هو بس استخدم رابطة بسيطة حتى يوضح كيف فقدان electron يعمل ionization.

ليش أصلًا لازم أحول المادة لـion؟ ⭐

لأن الدكتور بعدها بده يدخلها على جزء يعتمد على المجال المغناطيس ويميز الـions؛ إذا المادة بقيت neutral، ما رح تتفاعل مع المجال بنفس الطريقة المطلوبة.

يعني:

Ionization
Neutral molecule ——— $M^{+\bullet}$

وبعدين:

$M^{+\bullet}$ → Mass analysis

يعني الـmolecule فقد electron، ولأنه فقد شحنة سالبة أصبح: {Positively charged ion}
وهذا هو الـMolecular ion.

قصة الدكتور: «اشلح الجاكيت» 😂

هاي الطريقة اللي استخدمها الدكتور حتى يثبت الفكرة براسكم. قال تخيلوا عندي مجموعة طلاب، وكل طالب يمثل molecule. يدخل الطالب الأول، الجهاز بحكيله تقريبًا:

اشلح جاكيتك.

الـe جاكيت» هون يمثل:

Electron

إذا الطالب شلح الجاكيت:

فقد electron → صار ion

فالجهاز يقدر يتفاعل معه ويقيسه.

أما لو ما شلح الجاكيت، يعني:

ظل electron ما فقد → neutral

فحسب تشبيه الدكتور ما رح يدخل بعملية القياس المطلوبة بنفس الطريقة.

يعني احفظلي قصة الدكتور:

اشلح الجاكيت = Remove electron = Ionization

كيف احسب الـMolecular Mass؟

اذا عندي مركب C_3H_8 نعتمد على $H=1$ و $C=12$

44 propane الـmolecular mass اذًا الـ $3(12)+8(1) \leftarrow 36+8 \leftarrow 44$

ولما يفقد electron ويصير molecular ion: $M^{+\bullet}$
كتلة الـelectron صغيرة جدًا مقارنةً بالـmolecule، فحسب شرح الدكتور ما بنعتبرها مؤثرة بالحساب الأساسي، ولذلك يظهر الـmolecular ion تقريبًا عند: {m/z=44}

2) بعد الـIonization → Mass analysis

بعد ما صار عندي:

$M^{+\bullet}$

الدكتور قال إنه يدخل على الجزء اللي شبّهه بـ**الميزان/المغناطيس**. الفكرة اللي بده يوصلكم إلها إنه الجهاز بالنهاية يميز الـion بناءً على كتلته بالنسبة لشحنته.

يعني الفكرة الأساسية:

$$\frac{m}{z}$$

حيث:

- m = mass
- z = charge

وبالحالة البسيطة اللي الدكتور يشرحها، الـion شحنته غالبًا:

$z = +1$

فبالتالي:

$$\frac{m}{z} \approx m$$

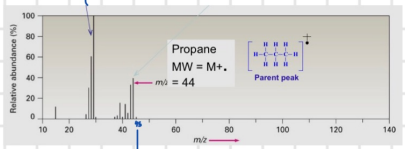
يعني الرقم اللي تشوفيه على الـspectrum يمثل تقريبًا mass للـion في هاي الحالة.

صيب الـ ion الأهم؟

الجزيء الأصلي بعد ما فقد ت فقط بدون ما عاصب إنه تكسر لأجزاء أصغر $M^{+\bullet}$ ويرضو اسمه parent ني بال Mass = 44

ف رح نتوقع الـ $M^{+\bullet} = 44$ وهاد معهم لأن بياخدي أعرف الـ Molecular mass of compound

شو هي الـ Base peak؟



لا تخلطي الـ Parent/Molecular ion مع الـ Base peak.

الـ Base peak هي:

{أعلى peak في الـ mass spectrum}

وتُعتبر شدتها:

{100%}

يعني ممكن الـ molecular ion يكون عند 44، لكن أعلى peak تكون fragment عند قيمة ثانية

إذن:

Molecular ion = represents intact molecular mass

بينما:

Base peak = most intense peak

ومش شرط:

Base peak = Molecular ion

الكود يمثل abundance or relative intensity

ليش أحيانًا أشوف Peak عند M+1؟

رجع لمعلومات الـNMR وقال: إحنا حكينا قبل إن الكربون مش كله ^{12}C

عندنا بشكل أساسي: ^{12}C

وموجود طبيعيًا كمية قليلة من: ^{13}C

والدكتور ذكّر بالنسبة اللي أخذتوها: $^{13}C = 1.1\%$

يعني أغلب molecules فيها ^{12}C لكن نسبة قليلة ^{13}C

3) بعد الـIonization ممكن يصير Fragmentation ★★★

هون الدكتور قال إن القصة ما بتوقف عند $M^{+\bullet}$. بعد الـionization الـmolecule ممكن يبدأ يتكسر إلى أجزاء أصغر.

يعني:

```
Molecule
   ↓
Ionization
   ↓
M+•
   ↓
Fragmentation
   ↓
Fragment 1
Fragment 2
Fragment 3
...
```

فلو الـion parent molecular عند:

$m/z = 44$

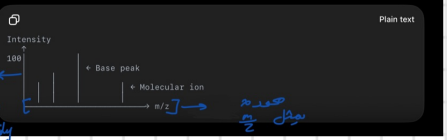
ممكن نشوف fragments عند أرقام أقل، مثل ما الدكتور كان يعطي أمثلة:

$44 \rightarrow 43 \rightarrow 42 \rightarrow \cdots$

وكل peak تمثل ion/fragment بكتلة معينة.

شو شكل الـMass Spectrum؟

بشكل عام:



يمثل عدد الـ ions

مثال Propane مرة ثانية

الـpropane:

C_3H_8

لو الثلاث كربونات كلهم ^{12}C:

$3(12) + 8 = 44$

إذن:

$M = 44$

لكن لو molecule ثانية من الـpropane فيها واحدة من الكربونات ^{13}C بدل ^{12}C:

$13 + 12 + 12 + 8 = 45$

إذن يظهر peak ثانية عند:

$M + 1 = 45$

تقريبًا:

```
Relative intensity
        ↑
        |  M = 44
        |  M+1 = 45
        |
        → m/z
      44 45
```

الـ $M+1$ صغيرة لأن abundance تبع ^{13}C قليل.

وهذا بالضبط اللي الدكتور كان يقصد فيه لما قال: ليش في peak كبيرة عند 44 وبجنبها peak صغيرة عند 45؟

$44 = M$

$45 = M + 1$

يعني السبب الـ ^{13}C

Determining the molecular formula

Natural abundances of Isotopes of some common elements

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

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

هيا بخصوص هاد الملايه

معنى M و M+1 و M+2 ⭐⭐⭐

الدكتور بده إياكم تفهموا المصطلح قبل حفظ الـisotopes:

إذا isotope أثقل من isotope الأساسي بوحدة واحدة:

$M+1$

مثلاً:

$^{12}C \rightarrow {}^{13}C$

الفرق:

$13 - 12 = 1$

إذن:

$M+1$

وكذلك:

$^{14}N \rightarrow {}^{15}N$

فرق واحد:

$M+1$

أما إذا الفرق وحدتين:

$^{35}Cl \rightarrow {}^{37}Cl$

الفرق:

$37 - 35 = 2$

إذن:

$M+2$

Isotopes

Hydrogen

^{1}H: الأساسي

وفرته الطبيعية: تقريبًا 99.9%

^{2}H: Deuterium

^{1}H هو الغالب جدًا.

Carbon

^{12}C: الأساسي

$^{12}C \rightarrow M$

$^{13}C \rightarrow M+1$

وفرة ^{13}C: تقريبًا 1.1%

لذلك $M+1$ تكون peak صغيرة.

Nitrogen

^{14}N: الأساسي

$^{14}N \rightarrow M$

$^{15}N \rightarrow M+1$

Oxygen

^{16}O: الأساسي

$^{16}O \rightarrow M$

$^{18}O \rightarrow M+2$

Fluorine

100% تقريبًا: ^{19}F

لذلك ما عنده isotope pattern قوي مثل Cl وBr.

Chlorine

$^{35}Cl \rightarrow M$

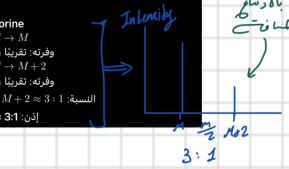
وفرته: تقريبًا 75%

$^{37}Cl \rightarrow M+2$

وفرته: تقريبًا 25%

النسبة: $M : M+2 \approx 3 : 1$

إذن: Cl = 3:1



بصير بالارتفاع مش المساحة

Bromine

$^{79}Br \rightarrow M$

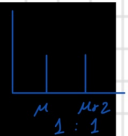
وفرته: تقريبًا 50%

$^{81}Br \rightarrow M+2$

وفرته: تقريبًا 50%

النسبة: $M : M+2 \approx 1 : 1$

إذن: Br = 1:1



بعني الـ Peak تقريبًا نص الـ ارتفاع

M+1

يعني isotope أثقل من الأساسي بوحدة واحدة.

مثال: $^{12}C \rightarrow {}^{13}C$

مثال: $^{14}N \rightarrow {}^{15}N$

M+2

يعني isotope أثقل من الأساسي بوحدتين.

مثال: $^{35}Cl \rightarrow {}^{37}Cl$

مثال: $^{79}Br \rightarrow {}^{81}Br$

إذا كان بالمركب أكثر من isotope

ممكن يظهر أكثر من combination وأكثر من isotope peak.

مثال: $^{35}Cl + {}^{79}Br$

أو: $^{37}Cl + {}^{79}Br$

أو: $^{35}Cl + {}^{81}Br$

كل combination إلها total mass مختلفة، ولذلك ممكن يظهر عندي عدة isotope peaks.
والدكتور قال إنه هون دخلنا بالـprobabilities، لكنه ما بده يعقد عليكم الفكرة زيادة؛ المهم تعرفوا من الـmass والـisotope pattern شو isotope اللي ممكن يكون موجود.

أهم مقارنة بالـIsotopes ⭐⭐⭐⭐⭐

$Cl \rightarrow M : M+2 = 3 : 1$

$Br \rightarrow M : M+2 = 1 : 1$

هاي من أهم الأشياء اللي الدكتور واضح إنه ممكن يسأل عنها.

Mass Detector

Principle?

تحويل المركب إلى ion ثم قياسه حسب m/z.

Ionization?

Electron bombardment → فقد electron → $M^{+\bullet}$.

Qualitative?

نعم.

Quantitative?

نعم.

Universal?

حسب تصنيف الدكتور: Universal.

Destructive?

نعم، بسبب ionization وfragmentation.

Sensitivity?

حسب الدكتور تقريبًا fg.

Molecular/Parent ion?

$M^{+\bullet}$

هو الجزيء بعد فقد electron.

يعطينا معلومات عن molecular mass.

Base peak?

أعلى peak في الـspectrum.

Relative intensity = 100%.

M+1?

زيادة وحدة واحدة.

أهم مثال: ^{13}C.

M+2?

زيادة وحدتين.

مهم جدًا مع Cl وBr.

أهم حفظ

Cl → $M : M+2 = 3 : 1$

Br → $M : M+2 = 1 : 1$

كيف ممكن يجي السؤال؟

ممكن يعطيك المركب ويسألك الـpeak من شو جاية.

أو يعطيك total mass ويطلب تحددي الـisotopes.

فكري خصوصًا بـ ^{13}C → $M+1$

فكري بـCl أو Br. → $M+2$

Cl → $3 : 1$

Br → $1 : 1$

*طبعًا ارجعوا على السلايدات خصوصًا اخر فكرة شوفوا الأمثلة

وخلصنا الحمد لله بالتوفيق