قسم الكيمياء الحيوية

نموذج استرشادى لإجابة امتحان نظري لمادة
كيمياء تحليلية وأجهزة
لطلاب الفرقة الرابعة - شعبة الكيمياء الحيوية
العام الجامعي ٢٠١٣ /٢٠١٤ الفصل الدراسي الثانى

إجابة السؤال الأول :-

١ - ماهو الاساس العلمى الذى بنى علية جهاز التحليل الكروماتوجافى السائل مع شرح مبسط لتركيب الجهاز والتقديرالكمى لعينة مجهولة.

يعتبر الـ HPLC أحد الطرق الأساسية لتحليل المواد العضوية وهو يمتاز مثل طرق التحليل الكروماتوجرافي الأخرى بالدقة والحساسية العالية كما أن مدى استخداماته لاتعتمد على تطاير العينة أو تأثرها بالحرارة كما هو الحال فى الـ GLC ويمتاز جهاز الـ HPLC بكفاءته العالية جداً على الفصل بالإضافة إلى استخدامه فى فصل العديد من المركبات الم ختلفة مثل الفينولات ، الفيتامينات والسكريات.

أساسيات جهاز الـ Principles of HPLC

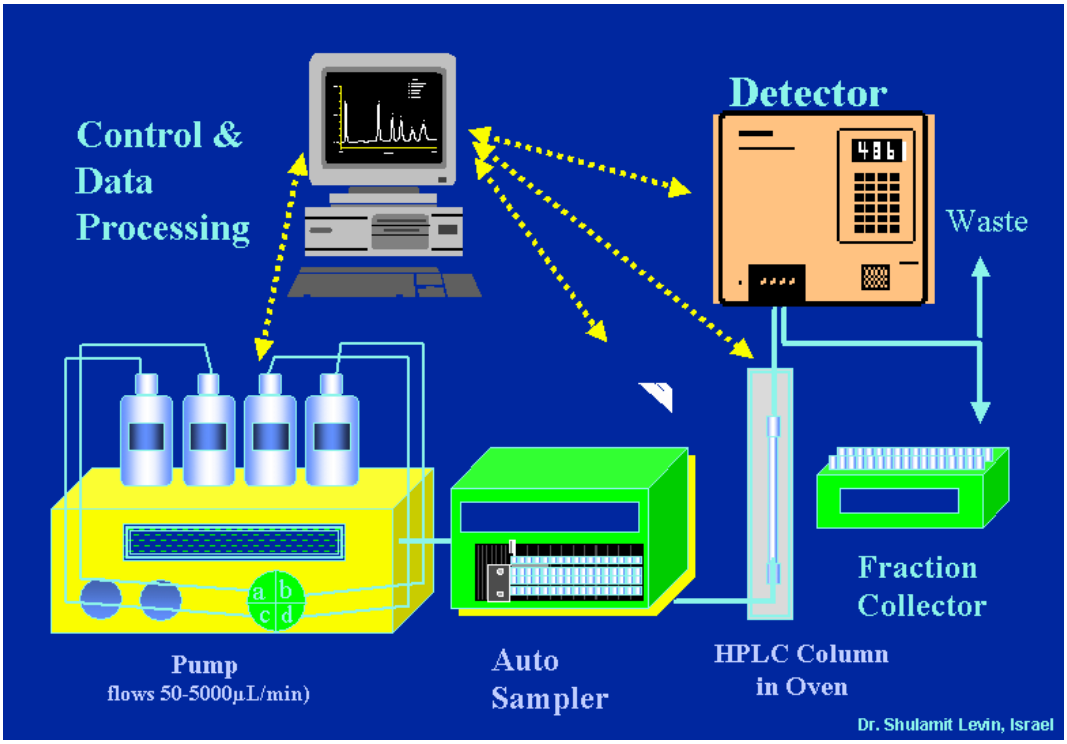
يقوم جهاز HPLC بفصل مكونات العينة ثم التعرف عليها وتقديرها كمياً. ويتم الفصل عن طريق توزيع العينة مابين طورين أحدهما الطور المتحرك (سائل) والآخر طور ثابت (سائل أو صلب) وعادة بكون الطور الثابت فى عمود طوله حوالي ٢٥ سم وقطره ٤ م م . وتعتمد كفاءة الفصل على مواصفات العمود وبصفة خاصة قطر جزيئات المادة المعبأة ويلاحظ أن خفض قطر الجزيئات يؤدي إلى تحسين أداء العمود بالإضافة إلى أنه يرفع الضغط بالتالي نحصل على معدل سريان مناسب للطو ر المتحرك خلال العمود ولهذا السبب فإن أجهزة HPLC الحديثة يطلق عليها أجهزة الضغط العالي الكروماتوجرافي السائل حيث تدفع المضخة الطور المتحرك داخل عمود الفصل والذي بدوره يفصل العينة لمكوناتها والتي تمر خلال الـ Detector حيث عندما يمر كل مكون من مكونات العينة خلال الـ Detector فإنه يحدث تغير فى الإشارات الكهربائية يتم تسجيلها على خريطة متحركة لتعطي كروماتوجرام .

ويمتاز الكروماتوجرام بالآتي :

١- المركب الذي يمر خلال العمود يكون تحت ظروف موحدة كما يكون ثابتاً ويسمى Retention time كما أن مقارنة الأرقام Retention مع المواد القياسية يعطي وسيلة للتحليل الوصفى .

٢- المساحة تحت الـ Peak فى الكروماتوجرام تتناسب طردياً مع تركيز المكون فى العينة وبالتالي فإن التحليل الكروماتوجرافي السائل يمكن استخدامه فى التقدير الكمي .

تركيب جهاز التحليل الكروماتوجرافي السائل



المضخة : Pump

الشروط الواجب مراعاتها فى نظام ضخ المذيبات

* الضغط العام لا يزيد عن ٦٠٠٠ رطل / بوصة .
* تعطي مقدرة على ضخ المذيب بمعدل صفر – ١٠ سم/دقيقة .
* الحجم الداخلى أقل مايمكن بحيث يظل معدل سريان المذيب ثابت سواء عند مقدمة المضخة أو عند بداية العمود .
* يجب أن تكون النبضات (معدل السريان / الضغط) أقل ما يمكن حيث أن ثبات معظم أنواع الـ Detectors يتناسب عكسياً مع النبيضات Pufsation
* ذات قوة ضغط عالي لتعطي سريان عالى للطور المتحرك خلال الأعمدة والضغط المطلوب يعتمد على لزوجة المذيب وحجم جزئيات المادة المعبأة بالإضافة على أبعاد العمود . ولمنع نبضات الضغط فإنه يستعمل مضخة ذات كباسين بحيث يكون أحدهما دائماً فى مرحلة الضغط والآخر فى مرحلة الملأ Refil.

الأعمدة Columns

الأعمدة الشائع استخدامها فى جهاز الـ HPLC يتراوح طولها بين ١٠- ٣٠ سم والقطر الداخلي يتراوح بين ٤ – ١٠ مم وقطر الحبيبات الشائع استخدامها يتراوح بين ٥-١٠ ميكروميتر . وعادة يكون العمود بطول ٢٥ سم وقطره ٤ مم وقطر الجزيئات ٥ ميكروميتر وفى أجهزة الـ HPLC الحديثة تستخدم أعمدة ذات أبعاد أصغر حيث يتراوح طول العمود بين ٣-٧.٥ سم وقطره ١-٤.٦ مم وقطر الحبيبات ٣-٥ ميكروميتر وتعتمد كفاءة الفصل على مواصفات العمود وبصفة خاصة على قطر المادة المعبأة وبغض النظر إذا كانت المادة المعبأة ذات حجوم واحدة فإنه يتطلب ضغط عالى نسبياً لتعطى معدل السريان المطلوب وهو ١-٢سم/دقيقة . فإذا كان عمود أبعاده ٢٥سم × ٤ مم ومعبأة بجزيئات قطرها ١٥ ميكروميتر فإنه يتطلب حوالي ٣٠ ض.ج للحصول على معدل سريان ١سم على الدقيقة من الهيكسان وإلى ضغط جوي قدره ٥٠ للحصول على معدل سريان مناسب للمذيبات والأكثر لزوجة مثل الماء .

وللحصول على معدل السريان المناسب لابد أن تكون حجم الحبيبات صغيرة يتراوح قطرها بين ٣-١٠ ميكروميتر . وهذا هو الشائع فى أجهزة التحليل الكروماتوجرافي الحديثة كذلك لابد من وجود ضغط عالي يصل إلى ١٠٠ ض.ج لذلك يعتبر HPLC أفضل طرق التحليل الكروماتوجرافي .

وعادة تستعمل أعمدة من الصلب Steel نظراً للضغط العالي للطور المتحرك ويجب أن تكون الجدار الداخلي للأنبوبة المكونة للعمود ناعمة Smooth ويجب أن تكون المسافة بين نهاية العمود والـ Detector أقل مايمكن لمنع استعراض الـ Peak .

ويتم التحليل بواسطة الـ HPLC فى درجة حرارة الغرفة ولكن في بعض التحليلات فإنه من المرغوب أن تكون درجة حرارة العمود مرتفعة ولذلك تستخدم أعمدة ساخنة حيث يتم الفصل عند درجة حرارة تتراوح بين ٦٠-٨٠ °م ويتم التسخين بأن يمرر ماء ساخن خلال Jacket حول العمود وأعمدة الـ HPLC غالية الثمن ولذلك يجب العناية بها لمنع تلف أدائها ويوضع قرص مسامي عند بداية العمود لمنع مرور أي مادة صلبة داخل العمود .

الكواشف Detectors

بعد مرور السائل خلال العمود يمر خلال الكاشف Detectors حيث يعطي خط Base line ثابت ويجب أن يستجيب لمكونات العينة حيث يعطي اشارات كهربائية تظهر على هيئة كروماتوجرام . ويجب أن تكون الاستجابة الكهربائية للكاشف تتناسب خطياً مع تركيز كل مكون فى العينة المراد تحليلها وهذا يؤدي إلى تقدير مكونات العينة كمياً . وعادة تكون استجابة

معظم الكواشف خطية حتى حد معين وعلى ذلك يجب التأكد من أن الكاشف يعمل حتى مدي تركيز معين .

التقدير الكمي **Quantitation analysis** :-

تختلف استجابة الكا شف في جهاز HPLC من مركب لأخر فمثلاً استجابة الكاشف U.V تعتمد على معامل الامتصاص لمكونات العينة واستجابة الكاشف ECD يعتمد على تآلف الكترونات العينة وأفضل طريقة للتقدير الكمي هي عمل Calibration لاستجابة الكاشف باستخدام مركب قياسي Reference يضاف إلى محلول العينة أي طريقة Internals standardization وهي تشمل الخطوات التالية :-

١- يجرى تحليل العينة للحصول على كروماتوجرام لمعرفة عدد ونوع مكوناتها .

٢- تختار مادة لاتوجد ضمن مكونات العينة ولها وقت ظهور يقع مابين Two peaks للعينة على الكروماتوجرام .

٣- تقدر استجابة الكاشف لكل مكون من مكونات العينة منسوباً إلى المادة القياسية الداخلية وذلك باجراء التحليل للعينة المحتوية على المادة القياسية ويجب معرفة تركيز كل مكون من مكونات العينة بالضبط **ونلاحظ أن** :-

مساحة الـ peak لاي مادة تتناسب طردياً مع تركيزه فى العينة

مساحة الـ peak = K تركيزه فى العينة حيث أن K معامل الاستجابة للكشف لمركب معين

وعلى ذلك بالنسبة للـ Peak للمكون A

K.concentration (A) = Peak area (A)

وبالنسبة للمادة القياسية Peak area (IS) = LIS concentration (IS

———

٢ - أشرح طريقة فصل وتقدير المركبات باستعمال كلامن (كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة ، التحليل الكروماتوجرافى الغازى، التحليل الكروماتوجراى بالاعمدة)

- التحليل الكروماتوجرافى ذو الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography

الأدوات التى تستخدم فى TLC ألواح زجاجية ، سليكاجيل – Spreader tray spreader ، plateholdor .

*** أنواع السليكا جيل :**

Silica gel H: – سليكا جيل ذو حبيبات دقيقة بدون كبريتات كالسيوم.

Silica gel G: – تحتوى على ١٣ % كبريتات كالسيوم.

Silica gel GF: – سليكاجيل مضاف إليها دليل فلورة.

Silica gel R: – تحتوى على ٥% كبريتات كالسيوم.

Silica gel D5:– سليكاجيل D-5 مضاف إليها دليل غير عضوى مقلور.

Silica gel DF-5:– سليكاجيل تحتوى على النشا كمادة لاصقة.

*** ملحوظة:**

تتحكم أقطار جزيئات المادة الإدمصاصية فى كفاءة الفصل فمثلا طبقات الجزيئات فى السليكاجيل ذات قطر يتراوح بين ١–٥ ميكرون يؤدى إلى فصل مناسب بينما الجزيئات الكبيرة تؤدى إلى تحرك المذيب بسرعة كبيرة وظهور بقع كبيرة جدا فى الحجم نتيجة للانتشار الجانبى العالى وقلة مقدرتها على الإدمصاص.

*** طريقة الفصل والتحليل :**

هذا النظام من التحليل الكروماتوج رافى تابع لتحليل الكروماتوجرافيا الادمصاص ويعتبر النظام الثابت Stationary phase عبارة عن مادة إدمصاص مثل ثاني أكسيد الألومونيوم أو السليكاجيل مخلوط بمادة لاصقة يتم فرد مادة الادمصاص على طبقة رقيقة على شريحة زجاجية مقاس ٢٠× ٢٥ سم.

أما النظام المتحرك mobile phase عبارة عن مذيب مناسب أو مخلوط من المذيبات المناسبة قبل استعمال الشرائح يتم وضعها فى فرن للتخلص من الرطوبة ولتنشيط مادة الادمصاص . ثم يتم وضع العينة المراد فصلها بواسطة أنبوبة شعرية دقيقة على هيئة بقع وعلى أحد أطراف الشريحة يوضع خط ويسمى بنقطة البداية على بعد ٢ سم وقبل انتهاء الشريحة بمسافة ٢ سم يوضع خط يسمى بخط النهاية.

تغمس الشرائح الزجاجية فى حوض يحتوى على المذيب أو مخلوط من المذيبات ويقفل الحوض جيدا وبعد سريان المذيب حتى خط النهاية تخرج الشرائح وتجفف

تحضير طبقات رقيقة ذات سمك واحد من السليكاجيل :

توجد عدة طرق لعمل الطبقات:

١) طريقة الصب ٢) طريقة الغمر

٣) طريقة الفرد ٤) طريقة الرش

التعرف أو الكشف على أماكن الفصل.

ترش الشرائح بجواهر كشافة لظهور مواضع المركبات المختلفة وبقياس المسافة التى سارها المذيب والمسافة التى سارها مكونات العينة يمكن حساب RF .

*** التقدير الكمى بعد الاستخلاص :**

نقشط كل منطقة Zone وتوضع فى أنبوبة زجاجية وتذاب فى مذيب مناسب وترشح للتخلص من مادة الادمصاص ثم يجرى عليها التقديرات الكمية الاتية .

التحليل الكروماتوجرافى الغازى
Gas Liquid chromatography (GLC)

هذا النوع من التحليل الكروماتوجرافى يستخدم أساسا فى تحليل المواد المتطايرة والمواد التى يمكن تحويلها إلى الحالة الغازية أو تحضير مشتقات منها كالاسترات التى يمكن تحويلها إلى الحالة الغازية فى درجات الحرارة العالية.

فكرة عمل جهاز GLC :

تعتمد فكرة ع مل هذه الأجهزة على تحرك مكونات العينة بين طورين أحدهما يسمى الطور المتحرك ويكون عبارة عن غاز خامل مثل الهيليوم أو الأرجون أو غازات أخرى مثل النيتروجين أو الأيدروجين أو خليط من هذه الغازات حيث يعمل الغاز الخامل على حمل جزيئات المركبات خلال عمود الكروماتوجرا فى ومن ثم يسمى Carrier Gas بينما الطور الثابت يكون عبارة عن سائل ممسوك على مادة حاملة تعمل كدعامة support موجودة فى أنبوبة طويلة وضيقة أو يكون فى صورة غشاء رقيق لأنبوبة قطرها صغير أو أنبوبة شعرية.

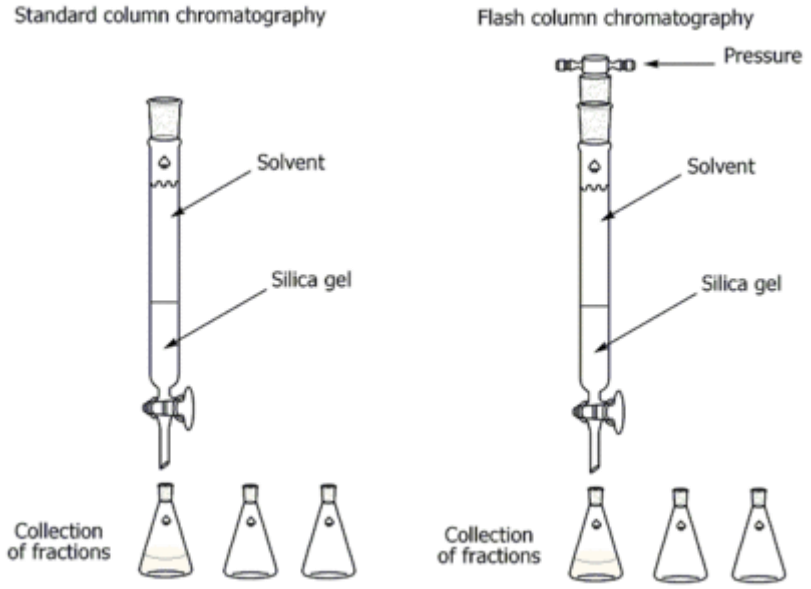
) كروماتوجرافى الأعمدة Cloumn Chromatography :-

فى هذا ا لنوع النظام الثابت عبارة عن مادة صلبة داخل عامود زجاجى لها القدرة على الامصاص ويقوم النظام المتحرك بحمل هذه المركبات وإمرارها على سطح الادمصاص وتتحرك وتتوزع هذه المركبات على طور سطح الادمصاص تبعا لقابليتها للادمصاص على سطح الادمصاص. والمركبات الأكثر مقدرة على الادمصاص أقلها تحركا.

والنظام الثابت عبارة عن مادة الادمصاص وهى قد تكون ألمونيوم – سليكا جيل – كربون – سيليلوز وغيرها.

وتعبأ مادة الادمصاص فى عامود زجاجى ويوضع أسفله وأعلاه طبقة من الصوف الزجاجى.

– كما موضح بالرسم :



ويتم الفصل فى العمود الكروماتوجرافى كما يلى :–

١– يتم التنظيف جيدا للعامود الكروماتوجرافى ويوضح أسفله طبقة من الصوف الزجاجى وتعبأ مادة الادمصاص ثم توضح طبقة أخرى من الصوف الزجاجى أعلى مادة الادمصاص.

٢– يذاب مخلوط المركبات المراد فصلها وتقديرها فى مذيب وينقل إلى العامود الكروما توجرافى بواسطة قمح فيحدث إدمصاص للمركبات المختلفة كل على حسب قدرته على الادمصاص وبالتالى تتحرك المركبات على مسافات مختلفة على هيئة مناطق Zones وتظهر المناطق بوضوح إذا كان المادة المراد فصلها لها لون مميز.

٣– إذا كان المطلوب هو الحصول على المركبات كل حدة فلأنة يتبع أحد الطريقتين.

أ) تقطع المناطق بعد إخراج محتويات العامود الكروماتوجرافى وتذوب كل منطقة وترشح للتخلص من مادة الادمصاص .

ب) يتم عمل غسيل وإزالة وذلك بإختيار مذيب مناسب يوضع أعلى العامود الزجاجى فيحدث سريان للمناطق المختلفة حيث تتحرك إلى أسفل العامو د خارجة منطقتة تلو

الأخرى وتستقبل فى دوراق مخروطية وفى هذه الحالة تخرج المواد ضعيفة الادمصاص أولا يليها المواد الأكثر إدمصاص.

---

٣ - تكلم باختصار عن كل مما يأتى:-

Chromatogrphy -Chromatogram - Rf value -RRt –Packed column –thermal conductivity detector – Hallow Cathodes lamps.

- تعريف التحليل الكروماتوجرافى :-Chromatogrphy

يمكن تعريف التحليل الكروماتوجرافى بأن هـ طريقة لتحليل وفصل المركبات المختلفة وتعتمد على حدوث ما يسمى بالـ Differental Migration أى إختلاف فى إنتقال وهجرة المركبات نتيجة مرور مذيب أو غاز على الوسط المحتوى على المواد المراد تحليلها.

- الأساس العلمى للطرق المستخدمة فى الفصل تعتمد على توزيع المركب ات المختلفة بين طورين أحدهما :-

- طور متحرك Mobile Phase

- طور ثابت Stationary Phase

Chromatogram :- يمكن التعرف على نوع المركبات المفصولة فى العينة وذلك عن طريق معرفى قيمية مايسمى بال Retention time (Rt) على شريط الترق الذى يسمى Chromatogram

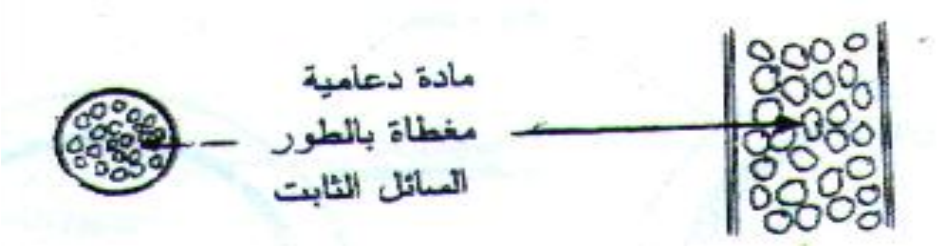
---

RF:- لكل مركب وذلك بقياس المسافة التى سارها المركب على المسافة التى سارها المذيب.

الأعمدة الحلزونية : Packed Column

وتستعمل فى هذه الأعمدة مادة حامل ة كدعامة support فى صورة حبيبات صغيرة الحجم بينهما فراغات تسمح بسريان الغاز خلالها بمعدل مناسب كما يمكنها أن تتغلف بطبقة رقيقة من السائل المستخدم كطور ثابت ومن المواد المستعملة الزجاج المجروش أو الرمل أو بعض الأتربة الطبيعية والسوائل التى تعمل كطور ثابت و تمسك فى صورة غشاء رقيق يجب أن

تكون غير متطايرة وثابتة حراريا مثل زيت البرافين أو الزيوت المعدنية أو الجلسرين وغير ذلك من السوائل حسب نوع المركبات المراد فصلها .



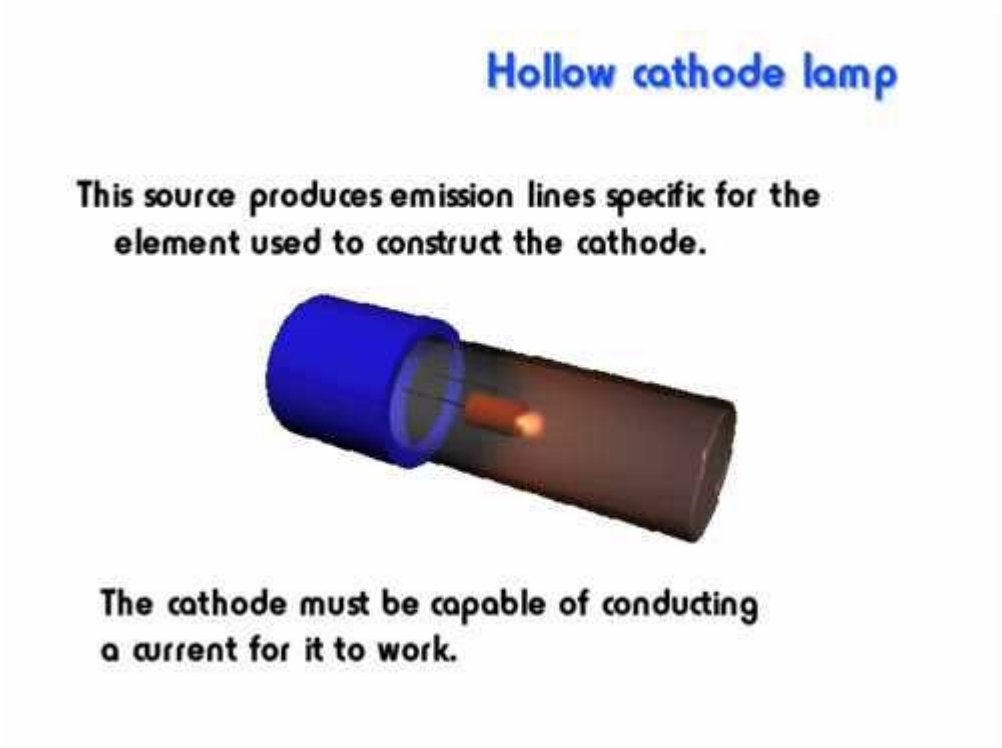
Thermal conductivity detectorجهاز الكشف القائم على التوصيل الحرارى

حيث يوجد بخلية التوصيل الحرارى سلك رفيع ترتفع درجة حرارته بتأثير تيار كهربى . وبمرور تيار ثابت من الغاز الخامل النقى فإن كمية الحرارة المفقودة من السلك تظل ثابتة وعندما يحمل تيار الغاز الخامل بعض المركبات المفصولة فإنه يحدث اختلاف فى درجة حرارة السلك يمكن تسجيله ومن الطبيعى فإن هذا الاختلاف يتوقف على كمية المركبات ونوعها وهو المطلوب الاستدلال عليه .

Hallow Cathodes lamps

ويستخدم لهذا الغرض لمبة الكاثود المفرغة Hallow cathode lamp radiation source ويستخدم لكل عنصر لمبة يكون فيها الكاثود مكوناً من العنصر المراد تقديره .

وتتكون لمبة الكاثود من أنبوبة اسطوانية يتكون جدارها من طبقة رقيقة من الزجاج وتحتوى أحد جانبيها على نافذة شفافة يوجد بداخل الأنبوبة الكاثود Cathode والذي يكون في شكل اسطواني ومصنوع من العنصر المراد إنتا ج الإثارة الخاصة به أما الآنود Anode فيكون في شكل سلك مواجه للكاثود . ويوجد بداخل الأنبوبة غاز خامل يتمثل في النيون Neon (Ne) أو الآرجون Argon (Ar) وذلك تحت ضغط منخفض .



إجابة السؤال الثاني :-

ماهو الاساس العلمى الذى بنى علية جهاز الامتصاص الذرى Atomic Absorbtion مع شرح مبسط لتركيب الجهاز .

يحدث الامتصاص الذرى بأن تمتص الذرات الموجودة في حالتها المنفردة الأشعة الضوئية عند طول موجي معين وتنتقل إلى الحالة المثارة وتزداد كمية الأشعة الممتصة عند هذا الطول الموجى بزيادة عدد ذرات العنصر الموجودة في مسار الأشعة والعلاقة بين كمية الأشعة الممتصة وتركيز العنصر المراد تقديره يمكن الحصول عليها باستعمال مادة قياسيه معروفة التركيز تحتوى على العنصر المراد تقديره .

* تركيب الجهاز : **Instrument structure**

يتركب الجهاز من الأجزاء الآتية :

١ -مصدر الأشعة **Radiation source**

٢ -وحدة تحويل العناصر إلى الصورة الذرية **Atomizer (Burner system)**

٣ -وحدة فصل الأطوال الموجية **Monochromator**

وحدة قياس طاقة الأشعة **Detector**

1- To prepare a standard soln. 15 ml of 0.0215 M soln. of KMnO4 was diluted to 500 ml. A series of standard was prepared by diluting from 1 to 10 ml of the main soln. at intervals of 1 ml in 25 ml of water. A steel sample having a mass of 0.5 g was dissolved in acid and after appropriate treatment the soln. was diluted to 100 ml. The resulting soln. had a color intermediate between the fourth and fifth standards.

Calculate the percentage of the Mn in the steel.

Con. of stock solution = 15x0.0215 = 500 xC

C = (15x0.0215)/500 = 0.000645 M

Con. of fourth standard = 4x0.000645 = 25xC

C = 0.0001032 M

Con. of fifth standard = 5x0.000645 = 25xC

C = 0.000129 M

Con. of steal solution = (0.0001032 + 0.000129)/2

= 0.0001161 M

Percentage of Mn of steel

= (0.0001161x100x55x100)/(1000x0.5) = 0.13%

السؤال الثالث :

العوامل التي تؤثر علي معدل تحرك جزيئات البروتين في المجال الكهربي :

Factors affecting migration

أ –**الشحنةCharge:** يزداد معدل التحرك بزيادة الشحنة النه ائية Net charge وهي تعتمد بصفة عامة علي درجة حموضة الوسطPH.

وفيما يلي تأثير تغير درجة حموضة الوسط علي الشحنة في البروتينات والأحماض الأمينية كبعض أمثلة:

NH_3^+ - R-COO^-

تعرف الـ PH التي يكون عندها صافي الشحنة الكهربائية net charge الجزئ البروتين أو الحمض الأميني يساوي صفر باسم نقطة الت عادل الكهربي Isoelectric point ومن هذه الدرجة من PH لا يتحرك الجزئ في المجال الكهربي ويعبر عن الـ PH والمقابلة لنقطة التعادل الكهربي PI (Isoelectric PH).

يمكن حساب قيمة الـ PH في المحلول بمعرفة معامل انقسام المجموعة المتأينة فمثلا في حالة الأحماض الأمينية الأحادية الأمين والكربوكسيل فإن Pka_1 هي معامل انقسام مجموعة Pka_2,CooH هي معامل انقسام مجموعة NH_2 وبحسب قيمة PI لما يلي

$PI= 1/2 (Pka_1+ Pka_2)$

مثال: Pka_1 للحامض الأميني جلسين = 2.3- Pka_2 =9.6

P1= ½ (2.3 +9.6)=6

أما في حالة الأحماض الأمينية ثنائية الكربوكسيل (جلوتاميك –اسبارتيك) تحتوي علي ثلاثة مجاميع قابلة للتأين وبالتالي يكون لها ثلاثة Pka وبكتابة حالات التأين المحتملة لحمض الاسبارتيك بدء من الوسط الحامضي الشديد ثم تزداد PH حتى تصل إلي القاعدي مرورا بحالة التعادل.

ب- الحجم Size

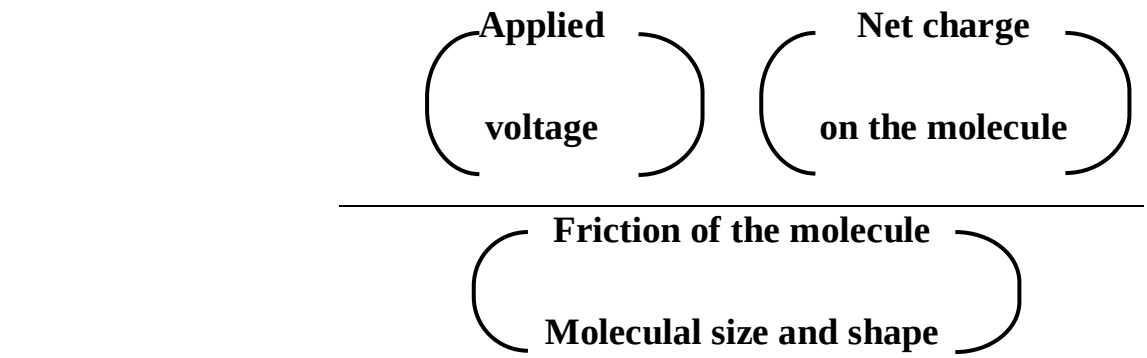
يقل معدل التحرك بالنسبة للمركبات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة نظرا لزيادة الاحتكاك وقوى التجارب الالكتروستاتيكي الناتجة من الوسط المحيط – فالجزيئات البلورية (ذات جزئ صغير) لا تتأثر نسبيا بالادمصاص علي الورق في حين أن الجزيئات الفردية (ذات وزن جزئي كبير) جزئيل علي الوزن وتترك trail tailing خلف كل شريط من المواد المفصولة الرئيسية.

جـ- الشكل Shape:

تظهر الجزئيات ذات الحجم المتساوي والتي تختلف في شكلها مثل البروتين الليفي والدائري اختلاف متباين في تحركها نظرا لاختلاف تأثير الاحتكاك وقوى التجاذب الالكتروستاتيكي.

ويمكن وضع العوامل التي تؤثر علي معدل التحرك في المعادلة التالية

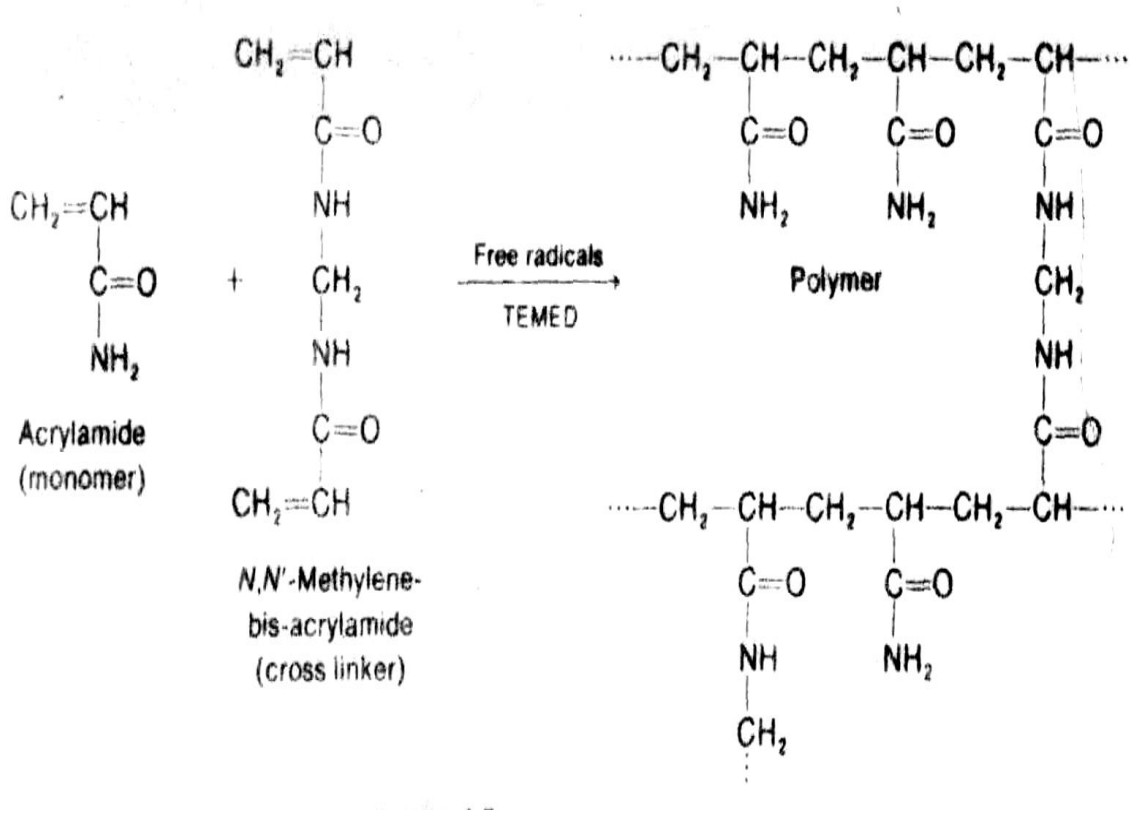
Mobility of molecule =



$$\frac{\left(\begin{array}{c}\textbf{Applied} \\ \textbf{voltage}\end{array}\right)\left(\begin{array}{c}\textbf{Net charge} \\ \textbf{on the molecule}\end{array}\right)}{\left(\begin{array}{c}\textbf{Friction of the molecule} \\ \textbf{Molecular size and shape}\end{array}\right)}$$

ثالثا:-

Formation of poly acrylamid gel



١ -خاصية Molecular sieving

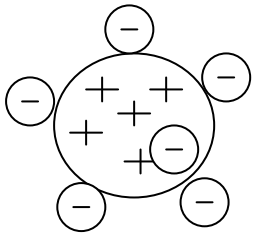
تعتبر هذه الصفة من مميزات Gel electrophoresis حيث تساعد خاصية Molecular sieving للوسط الدعامي النصف خشن semi rigid علي فصل المركبات ذات الوزن الجزئيئ الكبير مثل البروتينات والتي تختلف أيضا في الحجم والشكل ويتكون الجل من سلاسل متشابكة وموزعة توزيعا عشوائيا خلال الجيل معطية تركيب المنخل sieve-like structure وتختلف أقطار الجل بدرجة كبيرة بحيث يصبح هناك مجال الاختيار جل معين يناسب بعض التحليلات ولا يناسب البعض الأخر وأن الأساس هو مرور الجزيئات خلال الجل جيل الأجار أو النشا أو أكريل أميد العديد هو أن تحرك الجزيئات الكبيرة يزداد إعاقة بانخفاض حجم الثقوب نتيجة لزيادة الروابط العرضية في الجيل .

٣- **Ion Exchange Chromatography** حيث يعتمد فصل وتحليل المركبات علي إمكانية تبادلها مع الأيونات الموجودة علي سطح مواد خاصة تعرف بمواد التبادل الأيونى Ion exchanger وهي عبارة عن مادة غير ذائبة تحتوي علي بعض المجموعات التي تحمل شحنات ويحيط بها أيونات ذات شحنات مضادة وهذه الأيونا ت حرة الحركة بعكس المجموعات المشحونة التي تكون مرتبطة كيميائيا بجزئيات مادة التبادل الأيونى . ويمكن استبدال الأيونات

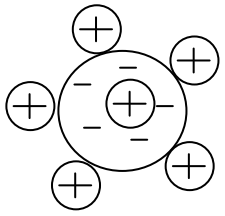
بأيونات أخري تحمل نفس الشحنة دون أن تتأثر المادة الأصلية تسمي matrix. فإذا كانت المادة matrix تحمل شحنات موجبة فإن الأيونات المحيطة بها تكون سالبة وبالتالي فإن المادة يمكن أن يتم عليها تبادل أيونات سالبة الشحنة ولذلك يطلق عليها اسم Anion exchanger والعكس إذا كانت المادة الأصلية matrix تحمل شحنات سالبة فإن الأيونات المحيطة بها تكون موجبة الشحنة وبالتالي يمكنها التبادل مع أيونات موجبة مع أيونات موجبة ولذلك تسمي Cation exchanger كما في الشكل:

***It is possible to have both positively and negatively charged exchangers.**

* Positively charged exchangers have negatively charged counter-Ions (anions) available for exchange and so are termed anion exchangers.
* Negatively charged exchangers have positively charged counter ions (cations) and are termed cation exchangers.*



Anion exchanger with exchangeable counter-ions



Cation exchanger with exchangeable counter-ions

$$\textbf{Relative mobility} = \frac{\textbf{Distance of protein}}{\textbf{length after distaining}} \times \frac{\textbf{Length before distaining}}{\textbf{Disatnce of day migration}}$$ ٤ -

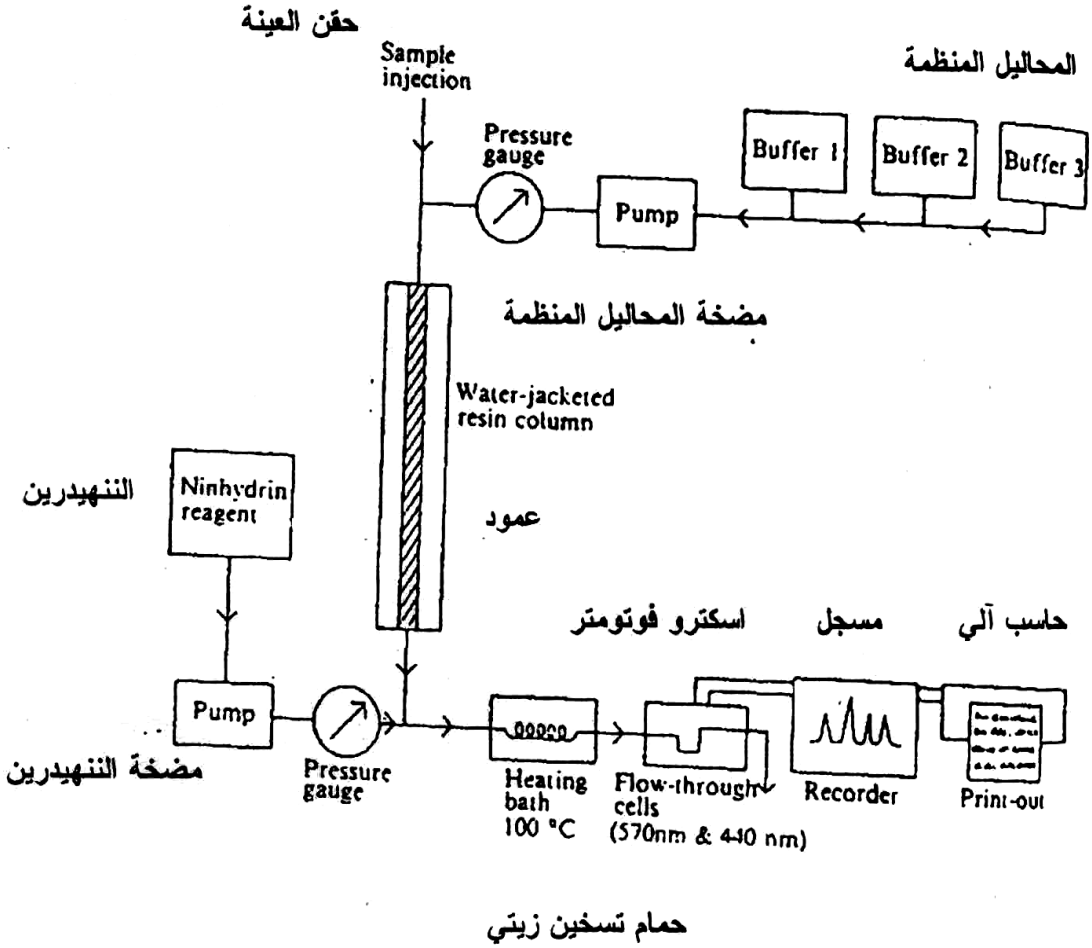
---

رابعا:- جهاز تحليل الأحماض الأمينية

Amino acid analyzer

تقدر الأحماض الأمينية وصفياً وكمياً باستخدام عمود يحتوى علي راتنج التبادل الأيوني ويمرر خلاله الطور المتحرك حاملاً معه الأحماض الأمينية المفصولة كل علي حدة ثم يتفاعل مع النهيدرين ويتكون معقد لونى . والجهاز يعتمد أساساً علي ضخ Pumped محاليل منظمة تختلف في درجة حموضتها أو قوتها الأيونية Ionic strength خلال عمود الراتنج Resin

column المزود بترموستات لضبط درجة حرارته . وقد حدث تطور فى الجهاز باستخدام راتنجات ذات نوعية عالية ونظام للحقن الآلى ، مع أنظمة للكشف ذات حساسية عالية . وهذا أدى إلي تقليل وقت التحليل من أيام إلي ساعات . الإضافة إلي تقديرها كمياً حتى وإن كان تركيز الأحماض الأمينية أقل من ١٠ $^{-9}$ مولر.



رسم تخطيطي لجهاز تحليل الأحماض الأمينية باستخدام النهيدرين للتقدير الكمي

الشكل التخطيطي السابق يبين أجزاء جهاز تحليل الأحماض الأمينية وهي:

١. محاليل منظمة ذات درجة حموضة مختلفة عادة يستخدم ثلاث محاليل منظمة ١ ، ٢ ، ٣ لها درجة حموضة ٣.٢٥ ، ٤.٢٥ ، ٥.٢٨ علي التوالى وتعمل كطور متحرك لإحلال الأحماض الأمينية .

٢. مضخة لدفع المحاليل المنظمة داخل العمود Buffer pump .

٣. وسيلة لحقن العينة Sample injection .

٤. عمود راتنج وبه وسيلة لضبط وثبات درجة حرارة الفصل Resin column.

٥. مضخة لدفع الجوهر الكشاف ننهيدرين Ninhydrin pump.

٦. حمام زيتي Reaction coil.

٧. خلية لتقدير الكثافة اللونية للمحلول Flow cell عند الطولين الموجين ٥٧٠ و ٤٤٠ نانوميتر.

٨. مسجل أو حاسب ألى Computer .

تقدير الأحماض الأمينية :

لتقدير الأحماض الأمينية المكونة للبروتينات لابد من إجراء عملية التحليل الحامضى للسلاسل الببتيدية وذلك بالتسخين علي درجة ١١٠°م في وجود حامض HCl بتركيز ٦ عيارى لمدة ٢٤ ساعة وبعد ذلك يتم التخلص من الحامض الزيادة والتجفيف ثم تذاب العينة في محلول منظم من الستارت pH = ٣ ثم تحقن العينة في جهاز تقدير الأحماض الأمينية Amino acid analyzer .

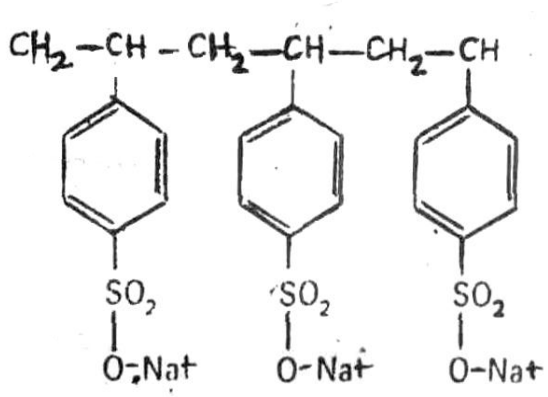
طريقة الفصل :

فصل الأحماض الأمينية يكون علي أساس التبادل الأيوني Ion exchange chromatography ويتكون الجهاز من عدد ٢ عمود :

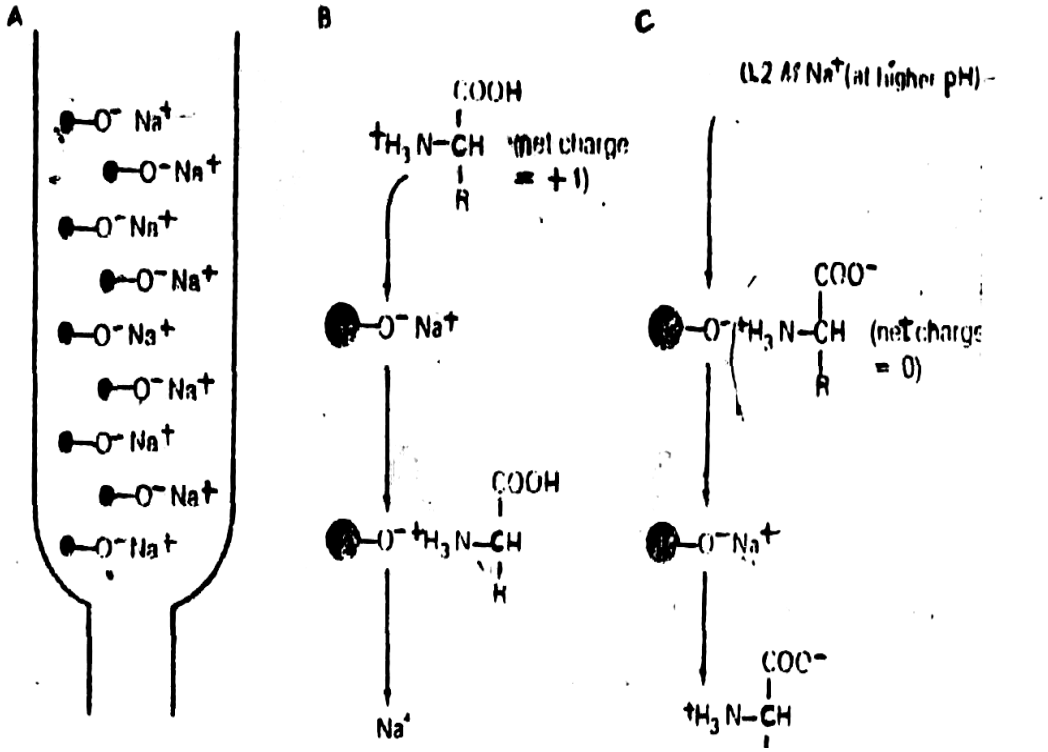
العمود الأول Short column: يستخدم في فصل الأحماض الأمينية القاعدية .

العمود الثاني Long column: يستخدم في فصل باقى الأحماض الأمينية .

كل من العمودين مملوء بمادة ذات شحنة سالبة عليها ايون الصوديوم تسمي (Sulfonated polystyrene resin Na^+ form) .



فعند إضافة المحلول الحامضى لمخلوط الأحماض الأمينية pH = ٣ للعمود المعبأ بالمادة فإن الأحماض الأمينية القاعدية ترتبط مع مادة العمود بقوة بينما الأحماض الأمينية الحامضية ترتبط برابطة ضعيفة بمادة العمود وباستعمال محاليل منظمة مختلفة في درجة الحموضة pH فإنه يمكن فصل Eluation كل نوع من الأحماض علي حدة . والشكل التالى يوضح ذلك :



(A) عمود مملوء بمادة تبادل كاتيوني Sulfonated polystyrene resin- Na^+ form

(B) تبادل الحامض الأميني مع أيون الصوديوم .

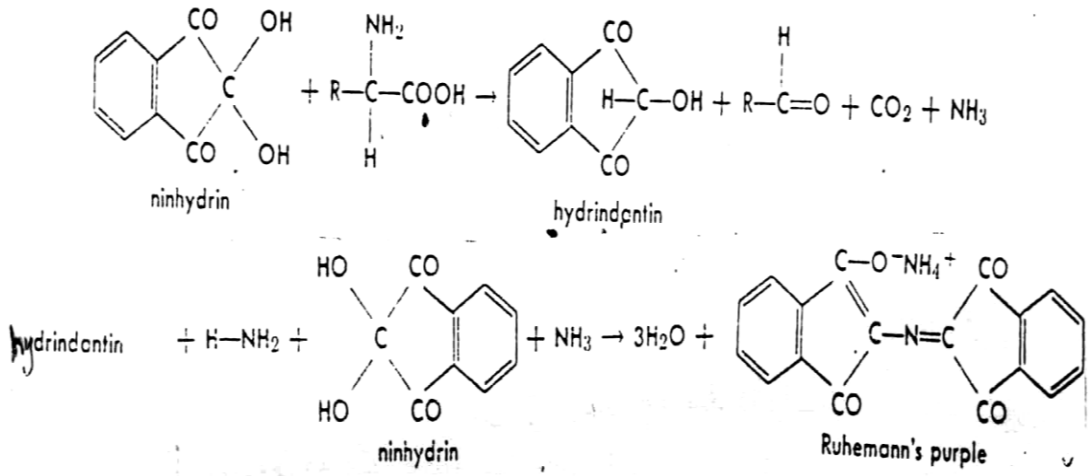
(C) إحلال Na^+ محل الحامض الأميني باستخدام محلول ذو pH عالى.

الحامض الأميني الذى يخرج من العمود بعد إجراء عملية Elution يتفاعل مع النهيدرين علي درجة ١٠٠°م ويعطى لون بنفسجي ويتم قياس تركيز اللون باستخدام جهاز

Colorimeter. كل الأحماض الأمينية الموجودة في صورة α-amino acids تعطي اللون البنفسجي بينما الحامض الأميني البرولين والحامض الأميني هيدروكسى برولين يعطي لون أصفر حيث أنه لا يوجد في صورة α-amino acids ومن عيوب التحليل الحامضى للبروتينات يعمل علي تحويل الجلوتامين إلي جلوتاميك والاسبراجين إلي إسبراتيك .

ويعمل أيضا علي أكسدة الأحم اض الأمينية الكبريتية والتربتوفان ولكى نقلل من عملية الأكسدة يتم أثناء عملية التحليل الحامضى إضافة مواد مانعة للأكسدة مثل المركبتوإيثانول أو الثيوجليكوليك أسد.

ومعادلة تفاعل النهيدرين تكون علي الصورة التالية:



يتكشف ناتج تفاعل النهيدرين مع الأمونيا مكونا مركب لونه أزرق أو بنفسجي ويتطلب هذا التفاعل وجود حامض أميني به مجموعة أمين منفردة في الموضع ألفا