قسم الكيمياء الحيوية

نموذج استرشادى لإجابة امتحان نظري لمادة
كيمياء تحليلية والاجهزة
لطلاب الدراسات العليا– لائحة جديدة
العام الجامعي ٢٠١٩/٢٠٢٠ الفصل الدراسي الثانى

اجابة السؤال الاول:-

ماهو الاساس العلمى الذى بنى علية جهاز Spectrophotometer مع شرح مبسط لتركيب الجهاز والتقديرالكمى لعينة مجهولة . (١٠ درجات)

القياس في المنطقة المرئية من الضوء عن طريق الامتصاص

Measurement in visible region

بدأت فكرة القياسات اللونية واستعمالها لمقارنة تركيز محلولين بالعين المجرة منذ زمن بعيد ويعتمد القياس اللوني على مقارنة محلولين إحداهما معلوم التركيز والأخر مجهول التركيز وبالتالي لابد أن تكون المادة المراد قياسها ملونة أو إدخالها في تفاعلات حتى تعطى لون معين.

وأساس عملية القياس الضوئي يحكمها قانونين أحداهما (قانون لامبرت) Lambert's law والذي ينص على أن كمية الضوء الممتصة لا تعتمد على كثافة الضوء من المصدر الضوئي ولكن تعتمد على طول المسار الضوئي داخل العينة $A \alpha b$.

أما القانون الثاني (قانون بير) Peer's law والذي ينص على أن امتصاص الضوء في أي عينة يتناسب مع عدد الجزيئات الممتصة أو بمعنى آخر مع التركيز المولر للمادة الممتصة $A \alpha C$ ومن هذين القانونين معا أمكن استنتاج ما يعرف بقانون: Lambert and Peer's law

$$A \alpha b C$$

$$A = \epsilon b C$$

A = Absorbance

ϵ = Molar absorptivity

b = Cell length

C = Molar concentration

أجهزة التحليل الطيفي في المنطقة المرئية .

Spectrophotometery in the visible region

الأسبكتروفوتومتر Spectrophotometer

تتميز هذه الأجهزة من أجهزة الامتصاص الضوئي بما يلي:

١- يمكنها إنتاج طيف له طول موجي معين.

٢- يمكن ضبطها بحيث تعطى أطوال موجية مختلفة ويؤثر الطول الموجى المراد القياس عنده على اختيار نوعية مصدر الضوء ونوع وحدة طول الموجات وكذا الأجهزة الضوئية الأخرى فمثلا:

أ- المنطقة المرئية من الضوء ٤٠٠-٧٠٠ نانوميتر تستخدم فيها خلايا زجاجية عادية.

ب- منطقة الأشعة فوق البنفسجية U.V. القريبة والمنطقة المرئية والأشعة تحت الحمراء القريبة وطولها الموجى يتراوح ما بين ١٩٠-١٠٠٠ نانوميتر ويستخدم فيها خلايا من الكوارتز أو السليكا.

ج- منطقة الأشعة فوق البنفسجية U.V. ويمكن القياس فيها عند طول موجي أقل من ١٩٠ نانوميتر ويحتاج ذلك أن يعمل الجهاز تحت تفريغ عالي نسبيا.

التركيب العام لأجهزة التحليل الطيفي:

١- مصدر الضوء Light source:

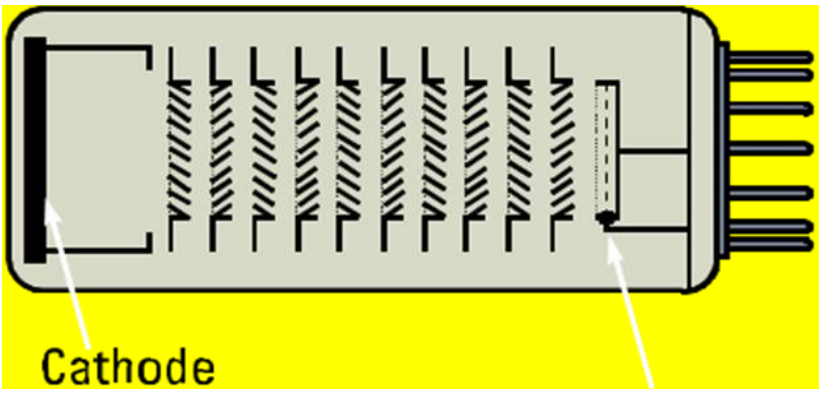
المصدر الضوئي المستخدم أما أن يكون لمبة هيدروجين وتكون منطقة الطيف المستمد فيها بين ١٨٠-٣٥٠ نانوميتر وتصلح للقياس في منطقة الأشعة فوق البنفسجية U.V. والوقت اللازم لتسخين هذه اللمبات قصير نسبيا أو أن يكون لمبة بخار الزئبق ولكنها تحتاج إلى وقت أطول للتسخين (١٥ دقيقة) أو لمبة التنجستين وهى تستخدم في القياس في المنطقة المرئية من الضوء.

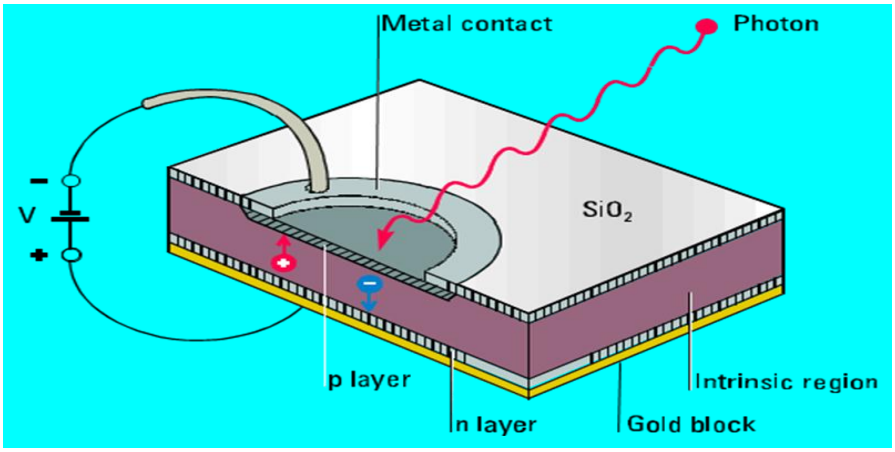
٢- موحد طول الموجات Monochromator:

وهو عبارة عن منشور Prism أو محزوز Crating ويتم ذلك أتوماتيكيا عند ضبط الطول الموجى ويلاحظ أن نوعية موحد الموجات تختلف من نوع إلى آخر والذي يتوقف عليه مدى دقة الجهاز.

٣- الكشاف Detector:

ويعتمد في عمله على أن سقوط الضوء يسبب تطاير الإلكترونات من الكاثود المغطى بطبقة من مادة يسهل تأثرها بالضوء مما يتسبب عنه توصيل تيار كهربائي.

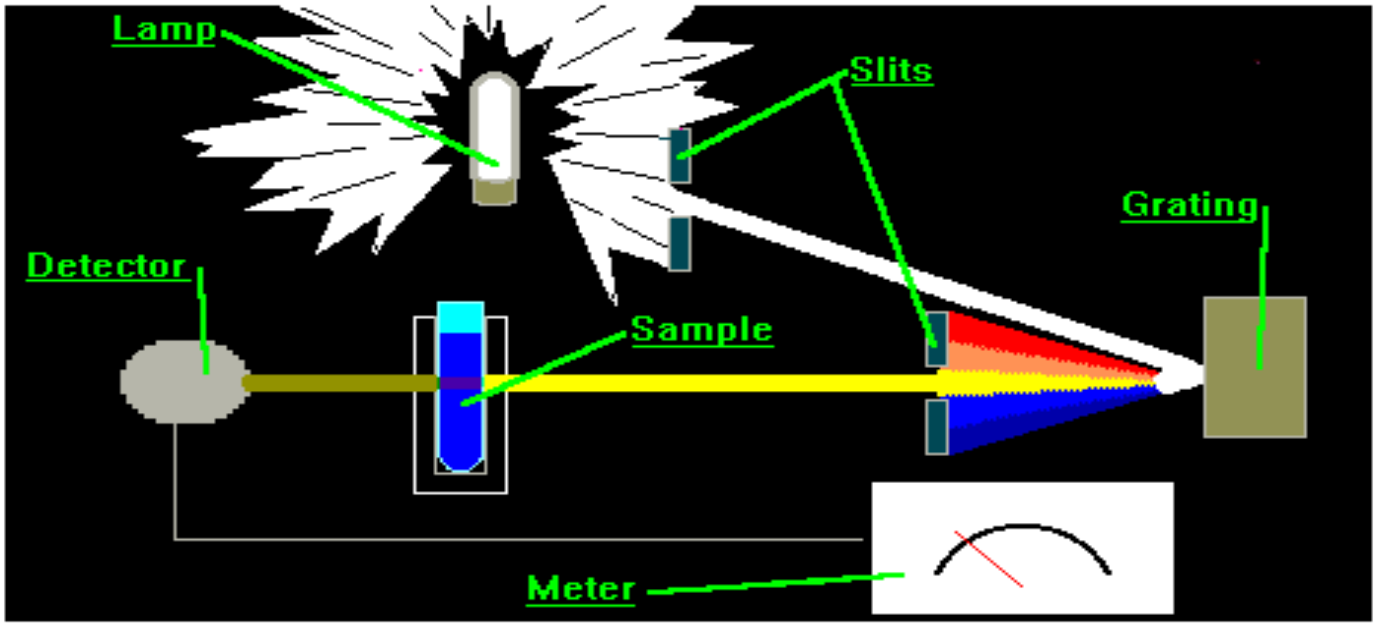




٤- المسجل الـ Recorder:

يتم القياس عن طريق دوائر معينة تمتاز بالحساسية العالية وسرعة التسجيل وثبات القراءات ومعظمها مبنى على أساس تحويل الطاقة الحرارية الناتجة من الضوء إلى طاقة كهربائية يمكن قياسها وقراءتها مباشرة على تدريج الجهاز.

Spectronic 20 optical diagram



خطوات القياس Step of analysis:

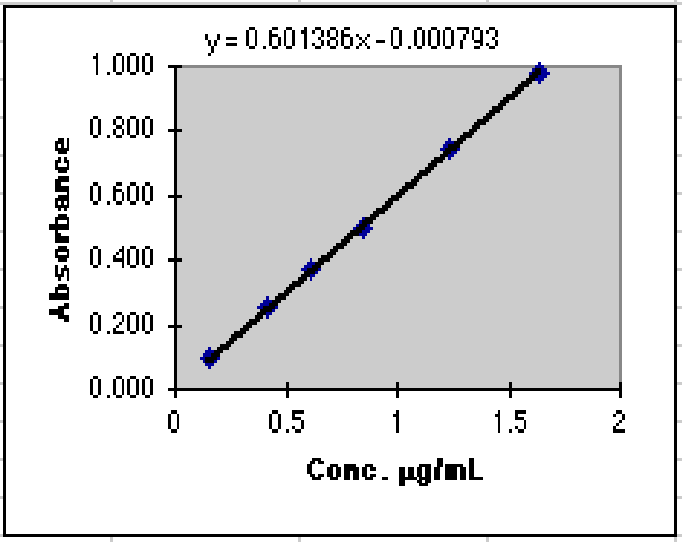
١- معرفة الطول الموجى Finding λ max:

ويتم معرفة أحسن طول موجي يتم عنده القياس بقراءة العينة عند أطوال موجبة مختلفة ومعرفة الامتصاص عند هذه الأطوال الموجية ثم ترسم علاقة بين الطول الموجى والامتصاص كما يلي:

- رسم المنحنى القياس Standard curve:

يرسم المنحنى القياسي باستعمال محاليل ذات تركيزات مناسبة وخلية قياس ذات سمك مناسب وترسم العلاقة بين التركيز والامتصاص.

Conc of Std µg/mL	Absorbance
0.154	0.094
0.422	0.251
0.615	0.370
0.843	0.504
1.233	0.740
1.632	0.982



Chromatography – Chromatogram- Rf value -Packed column - thermal conductivity detector – Hallow cathodes lamps.

- تعريف التحليل الكروماتوجرافى :-Chromatogrphy

يمكن تعريف التحليل الكروماتوجرافى بأنه 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 المركبات المختلفة بين طورين أحدهما :-

- طور متحرك Mobile Phase
- طور ثابت Stationary Phase

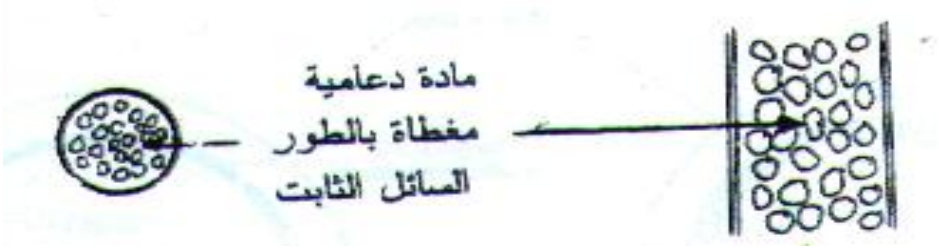
Chromatogram :- يمكن التعرف على نوع المركبات المفصولة فى العينة وذلك عن طريق معرفى قيمية مايسمى بال Retention time (Rt) على شريط الـقرق الذى يسمى Chromatogram

---

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

الأعمدة الحلزونية : Packed Column

وتستعمل فى هذه الأعمدة مادة حاملة 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 وتمسك 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

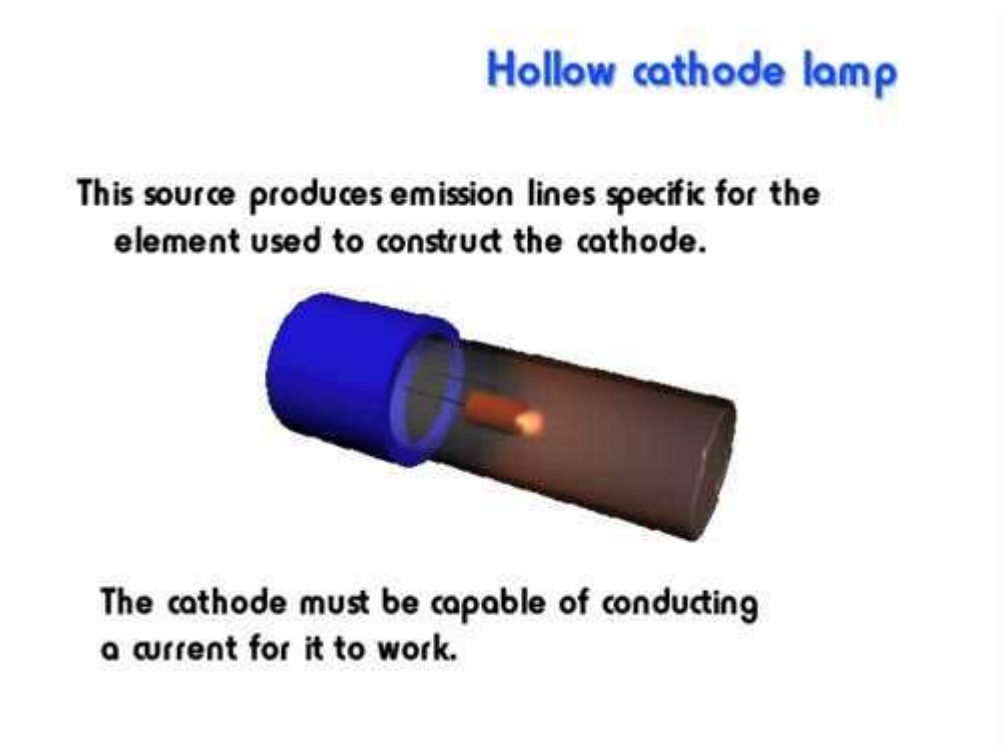
حيث يوجد بخلية التوصيل الحرارى سلك رفيع ترتفع درجة حرارته بتأثير تيار كهربى . وبمرور تيار ثابت من الغاز الخامل النقى فإن كمية الحرارة المفقودة من السلك تظل ثابتة وعندما يحمل تيار الغاز الخامل بعض المركبات المفصولة فإنه يحدث اختلاف فى درجة حرارة السلك يمكن تسجيله ومن الطبيعى فإن هذا الاختلاف يتوقف على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



Manganese is often determined spectrophotometrically as the permanganate ion (MnO_4^-), whose aqueous solutions are a deep purple color (λ max = 525 nm). A 1.00×10^{-4} M solution of $KmnO_4$ gives an absorbance of 0.585 when a 1.00 centimeter cell is used at 525 nm. A 0.500 gram sample of a manganese containing alloy is dissolved in acid, and all the manganese is converted to MnO_4^- by periodate oxidation. The sample is then diluted to 500 milliliters in a volumetric flask, and its absorbance, taken at 525 nanometers in a 1.00 centimeter cell, is found to be 0.400. Assume that the permanganate system follows Beer's law and calculate the weight percent of manganese in the unknown.

الاجابة

Concentration	Absorbance
$1x10^{-4}$ M	0.585

X 0.4

The concentration of $KMnO_4$ in 500 ml volumetric flask

$= (0.4x1x10^{-4})/0.585 = 0.68x10^{-4}$ M

The weight percent of manganese in the unknown

$= (0.68x10^{-4}x500x55x100)/ (1000x0.5) = 0.376\%$

.....

السؤال الثالث:

(٣٠ درجة)

أشرح النقاط التالية (اجب عن خمسة فقط):-

1- Factors affecting of migration electrophoresis.

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

Factors affecting migration

أ- **الشحنةCharge**: يزداد معدل التحرك بزيادة الشحنة النهائية 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 التعادل الكهربي Isoelectric point ومن هذه الدرجة منPH لا يتحرك الجزئ في المجال الكهربي ويعبر عن الـPH والمقابلة لنقطة التعادل الكهربي PI (Isoelectric PH).

يمكن حساب قيمة الـPH 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

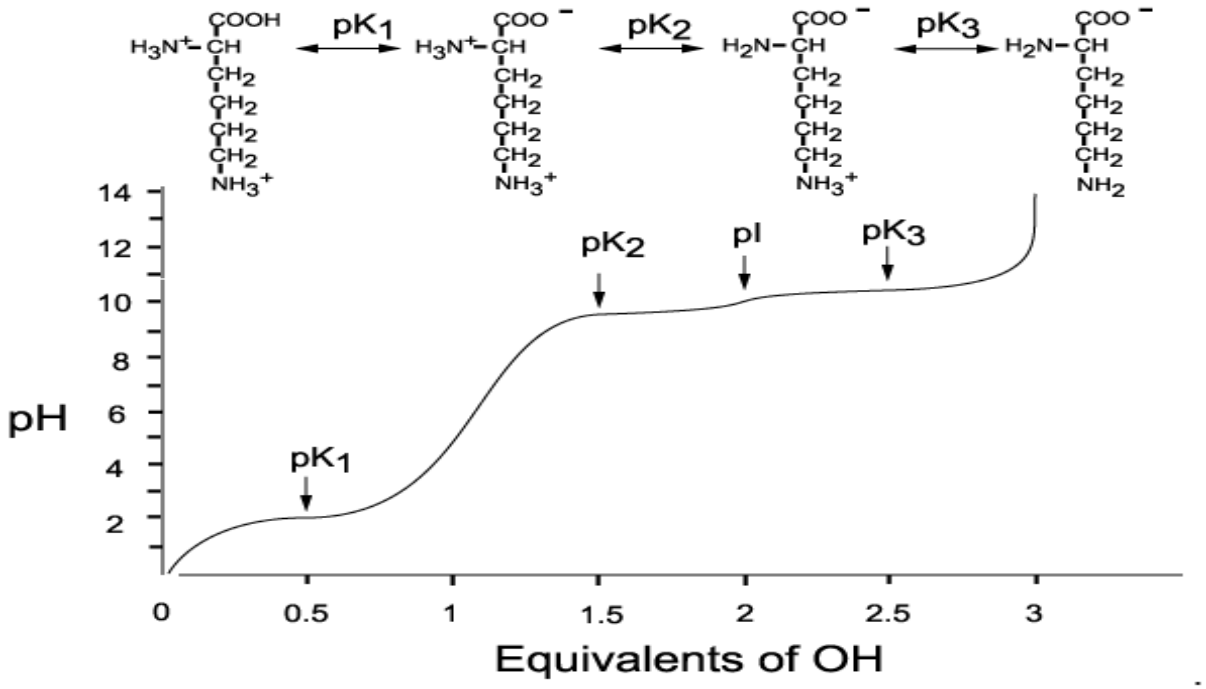
$PI= 1/2 (Pka_1+ Pka_2)$

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.

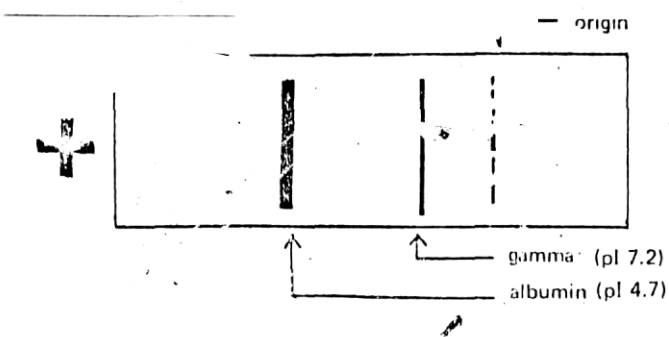
في حالة الأحماض الأمينية القاعدية مثل الليسين



يتضح أن نقطة التعادل الأيوني تقع ما بين Pka_3, Pka_2

$$P_1 = \frac{Pka_2 + Pka_R}{2} = \frac{9.0+10.5}{2} = 9.8$$

يتضح مما سبق كيفية حساب PI وأن قيم Pka، PH لمحاليل الأحماض الأمينية الحامضية والقاعدية عند نقطة التعادل الكهربي تكون دائما أقل أو أكثر من (7=PH) بالترتيب المحلول المنظم المستخدم عادة في فصل البروتينات الكهربائي يكون أعلي من 8=PH عند استخدام buffer درجة 8.8PH يكون الالبيومين P1 له 4.7 أعلي في الشحنة النهائية بخلافgamma PI أقل في الشحنة النهائية نجد أن الالبيومين وgamma يمكن فصلها عن بعضهم كما يتضح من الشكل التالي:



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) جزئيا علي الوزن وتترك trail tailing خلف كل شريط من المواد المفصولة الرئيسية.

جـ- الشكل Shape:

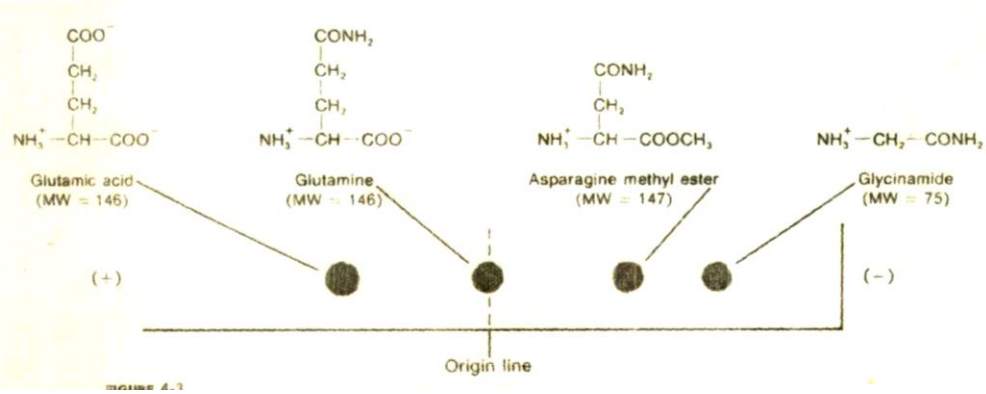
تظهر الجزئيات ذات الحجم المتساوي والتي تختلف في شكلها مثل البروتين الليفي والدائري اختلاف متباين في تحركها نظرا لاختلاف تأثير الاحتكاك وقوى التجاذب الالكتروستاتيكي.

ويمكن وضع العوامل التي تؤثر علي معدل التحرك في المعادلة التالية

$$\text{Mobility of molecule} = \frac{(\text{Applied voltage})(\text{Net charge on the molecule})}{\text{Friction of the molecule}\ (\text{Molecule size and shape})}$$

المعادلة السابقة توضح العوامل التي تؤثر علي تحرك الجزيئات في المجال الكهربي من هذه المعادلة يتضح أنه كلما زادت قوة التيار applied voltage وزادت أيضا الشحنة النهائية علي الجزئ net charge on the molecule كلما زاد معدل التحرك.

ومن المعادلة أيضا يتضح أنه كلما زاد حجم وشكل الجزئ قل معدل التحرك والمثال التالي يوضح ذلك:



ومن هذا المثال يتضح أن المركبات التي تتجه نحو القطب الموجب هي التي تحمل شحنة سالبة حيث أن Glutamic acid يحمل عدد٢ شحنة سالبة ووزنه الجزيئي ١٤٦ والمركب الثانيGlutamine متساوي معه في الوزن الجزئيي ١٤٦ ولكن أقل منه في الشحنة السالبة وبالتالي يتحركGlutamic acid أسرع منGlutamine علي أساس net charge on the molecule أما بالنسبة للمركبات Asparagine methyl ester وGlycinamide الشحنات الموجبة متساوية ولكن التحرك علي أساس الوزن الجزئي المركب الأقل في الوزن الجزئيي يتحرك أسرع من الأكبر في الوزن الجزئي (١٤٧). (٧٥).

الوسط الدعامي The supporting medium

علي الرغم من استعمال مواد خاملة نسبيا كوسط دعامي إلا أن تركيبها له عدة تأثيرات علي معدل تحرك المركب كما أن اختيار الوسط يعتمد علي نوع العينة المستخدمة كما يلي:

أ- الادمصاص Adsorption

هي عبارة عن حجز مكونات العينة بواسطة الوسط الدعامي كما في حالة الادمصاص الكروماتوجرافي وتسبب تداخل للبقع وبالتالي تقل كفاءة الفصل ، ويؤدي الادمصاص بصفة عامة إلي خفض معدل التحرك وتصل قوة الادمصاص إلي أكبر ما يمكن عند استعمال الورق كوسط دعامي ويمكن التخلص منها باستعمال خلات السليلوز.

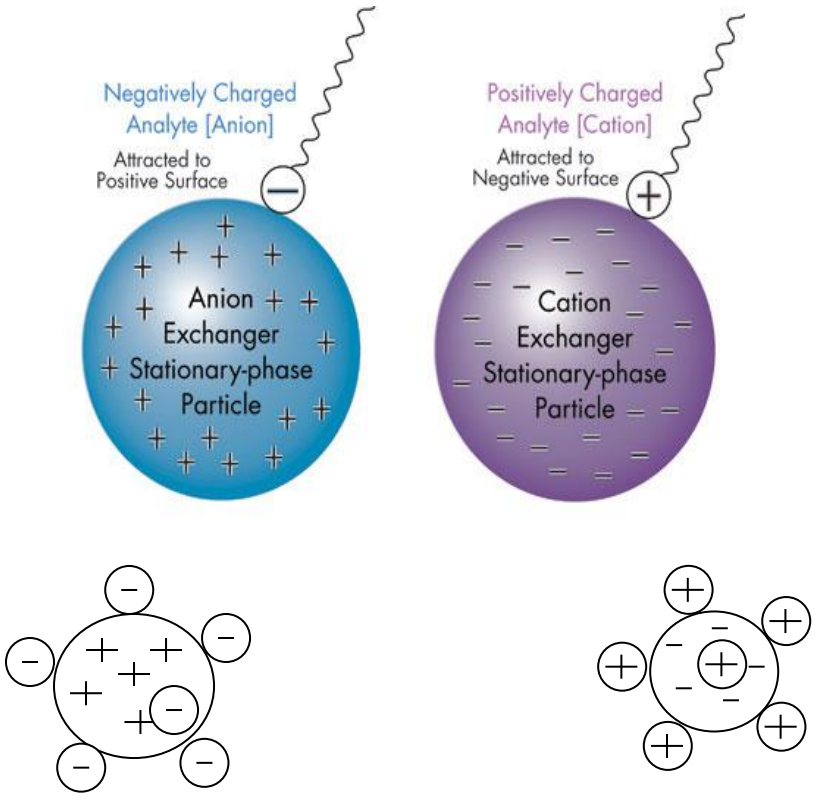
ب- خاصية Electro. Osmotic

تظهر هذه الخاصية من تأثير الشحنة التي تنتج من جزيئات المحلول المنظم وسطح المادة الدعامية حيث تتأين المجاميع الفعالة للوسط الدعامي وتكتسب جزيئات الماء بشحنة موجبة ويتكون أيون أكسونيم oxonium (H_3o^+) وحيث أن الماء يذيب مكونات العينة ويحمل شحنة موجبة فإنه يسرع من تحرك المواد التي تحمل شحن سالبة نحو الكاثود وتتحرك المواد المتعادلة قليلا من مكانها الأصلي بينما يقل تحرك المواد التي تحمل شحنة موجبة نحو الآنود .

ج- خاصية Molecular sieving

2- Ion exchange chromatography.

٣- 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 الأيونات 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 تسميCation exchanger كما في الشكل:



Anion exchanger with exchangeable counter-ions	Cation exchanger with exchangeable counter-ions

Charged groups:

4- Gel filtration.

٥- حيث يعتمد فصل المركبات المختلفة على اختلاف حجمها الجزئيى molecular size ممايسبب اختلافها فى النفاذية permeability بين حبيات مواد فى صورة جيل واشهرها مادة Sephadex فجزئيات المركبات الكبيرة الحجم لايمكنها النفاذ داخل فرغات الجيل لذلك فهى تمر اسرع مع المذيب بعكس الجزيئات الاخرى الصغيرة الحجم واذى يمكنها النفاذ فى الفرغات الموجودة بين حبيبات الجيل لذلك تخرج المركبات بالتتابع على حسب تناقص حجمها الجزئيى وتعرف ميكانيكية الفصل هذة بال Molecular exclusion.

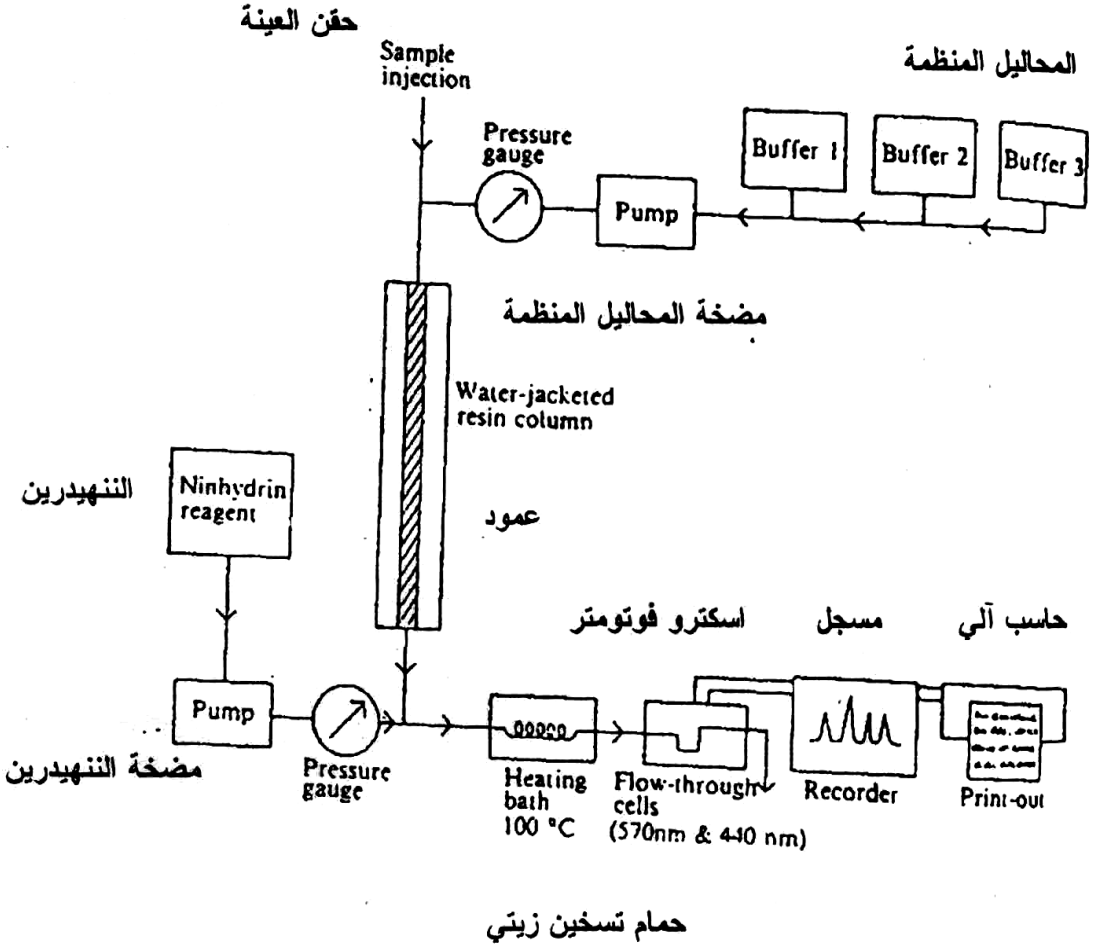
6- Determination of amino acids by using Amino Acid Analyzer.

الاجابة

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 $^{-٩}$ 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 .

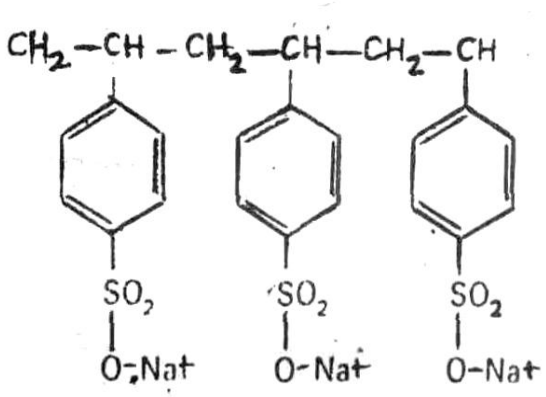
طريقة الفصل :

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

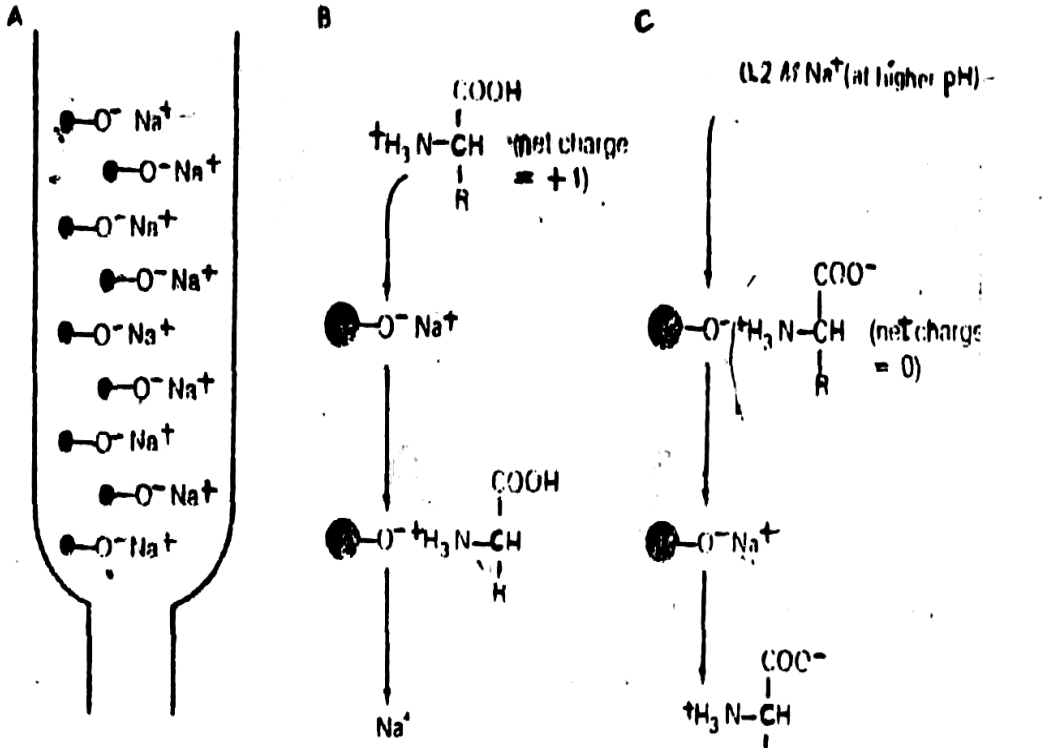
العمود الأول Short column: يستخدم في فصل الأحماض الأمينية القاعدية .

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 .

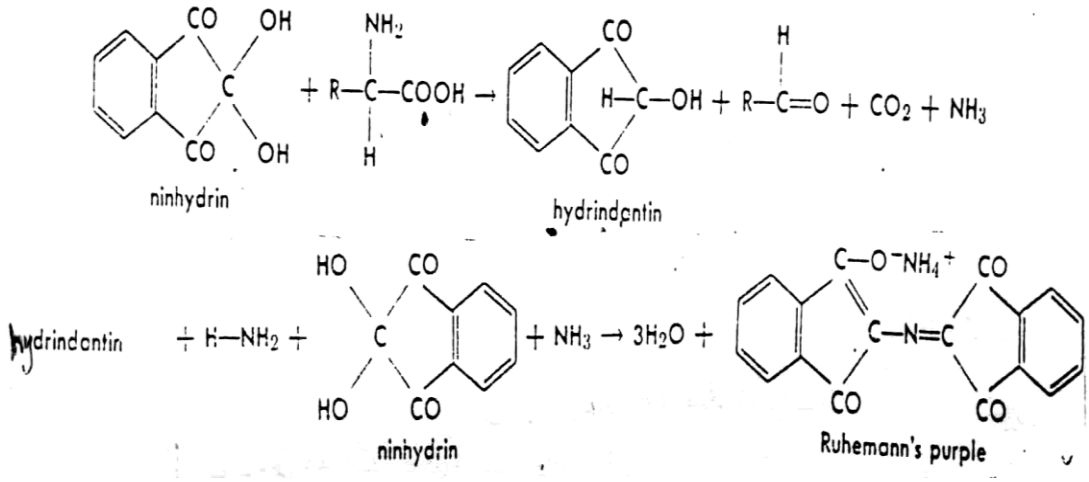
(C) إحلال Na^+ محل الحامض الأميني باستخدام محلول ذو pH عالى.

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 .

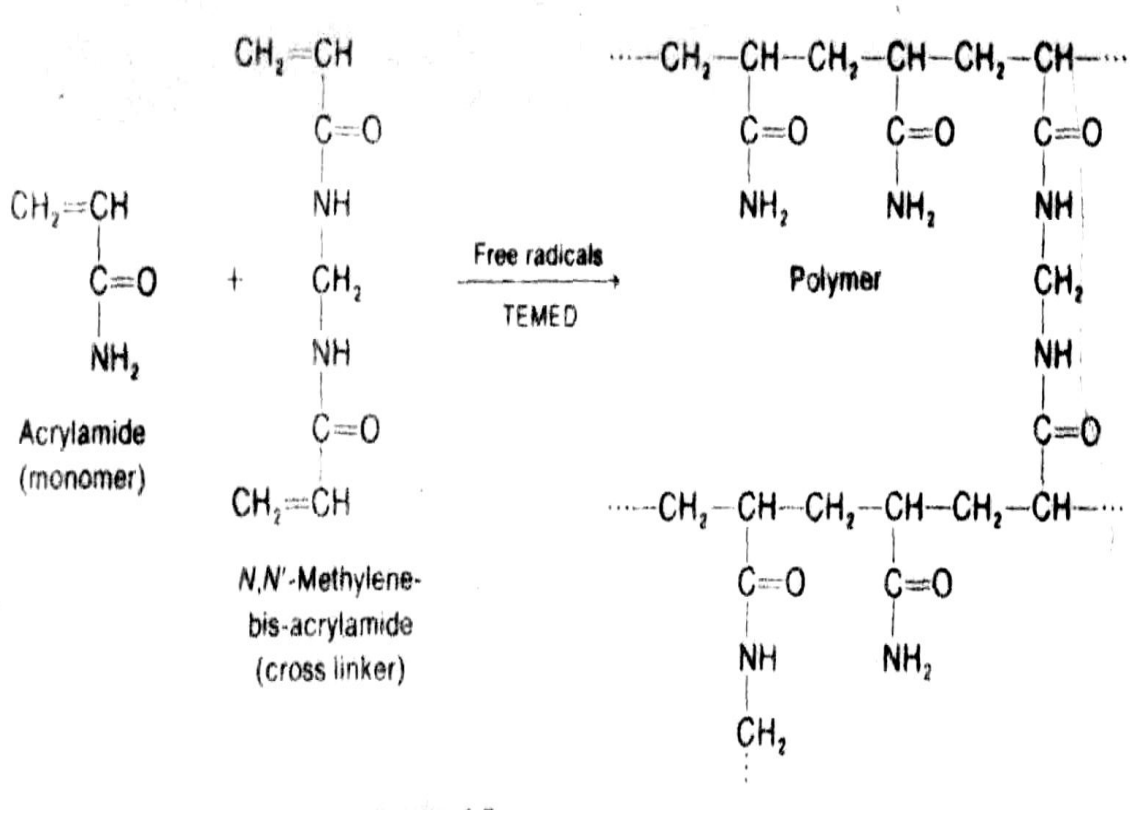
ويعمل أيضا علي أكسدة الأحماض الأمينية الكبريتية والتربتوفان ولكى نقلل من عملية الأكسدة يتم أثناء عملية التحليل الحامضى إضافة مواد مانعة للأكسدة مثل المركبتوإيثانول أو الثيوجليكوليك أسد.

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

7- Formation of polyacrylamide gel.



8- SDS polyacrylamide gel electrophoresis

يستخدم في تحليل ومعرفة عدد وحجم السلاسل البروتين polylepetide البروتين المحضر يعامل بزيادة من soluble thiol

Sodium dodecyl sulfate(SDS), (R= SH, e.g β-mercapto ethanol)

وجد أن روابط (s-s) تحول إلي R-SH وتنفرد السلاسل البيتيدية كل علي حده وتنفصل كل سلاسل بيتيدية متشابهة في band واحد