قسم الكيمياء الحيوية

نموذج استرشادى لإجابة امتحان نظري لمادة
كيمياء الاجهزة والتحاليل الدقيقة (مقرر أختيارى)
لطلاب الفرقة الثالثة شعبة وقاية النبات
العام الجامعي 2012 /2013 الفصل الدراسي الثانى

إجابة السؤال الأول :-

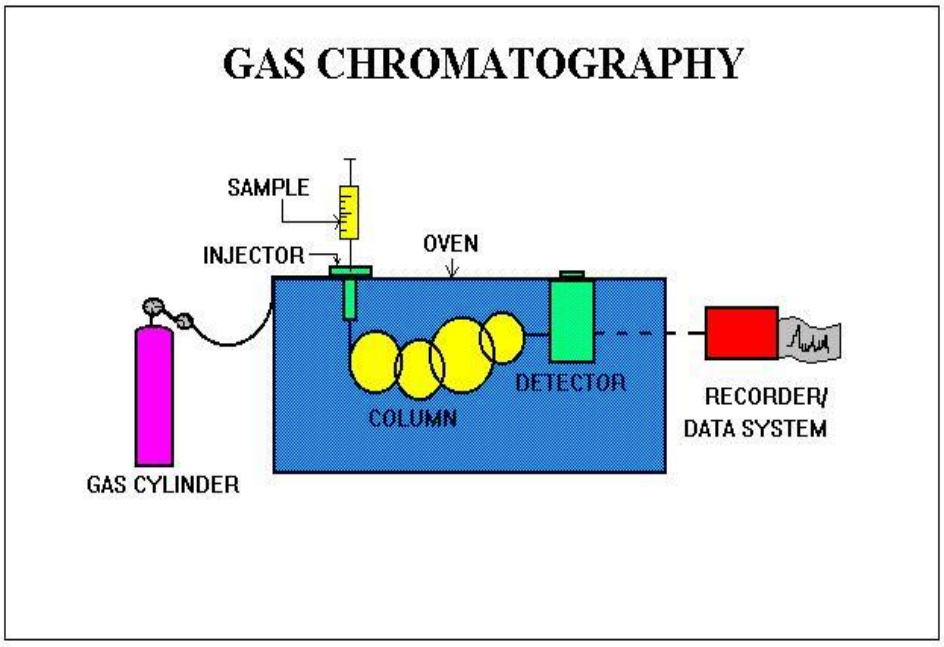
1- ماهو الاساس العلمى الذى بنى علية جهاز Gas liquid chromatography مع شرح مبسط لتركيب الجهاز والتقدير الكمى لعينة مجهولة .

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 عمل 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 الكروماتوجرافى 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.

مكونات جهاز GLC :



يتكون جهاز GLC من :

1- مصدر للغاز Gas stream

2- أعمدة الفصل Column detail

3- أجهزة الكشف والإظهار Detectors

4- الـ Recorder

التقدير الوصفى و الكمى للعينات المفصولة: Qualitative & Quantitative analysis

يمكن التعرف على نوع المركبات المفصولة فى العينة وذلك عن طريق معرفى قيمية مايسمى بال Retention time (Rt) على شريط الـقرق الذى يسمى Chromatogram والناتج من ال Recorder حيث يعبر ال Retention time (Rt) عن الوقت اللازم انقضاؤة من بدء حقن العينة حتى خروج المادة وظهور ال Peak maximum على الكروماتوجرام.

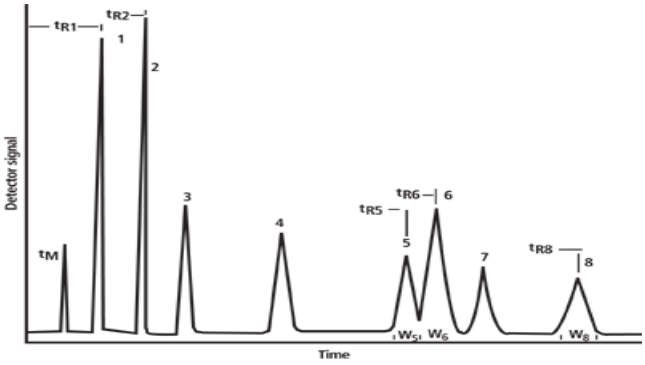
وتعتبر قيمة Rt قيمة ثابتة للمادة الواحدة فى ظروف فصل ثابتة . وبمقارنة قيمة Rt للمادة المجهولة unknown مع قيمة Rt لمركب معروف يستخدم كمرجع او مقياس reference or stander يمكن تحديد انواع المركبات المختلفة المكونة للعينة.

كما يمكن تقدير مكونات العينة كميا عن طريق عمل منحنى قياس يبين العلاقة بين التركيز وارتفاع ال Peak كذلك يمكن تقدير تركيز المادة المجهولة بمعرفة ارتفاع ال Peak ومقارنتة بالمنحنى القياسى Stander curve

وهناك طريقة اخرى تعتمد على قياس مساحة ال Peak عن طريق ضرب ارتفاع Peak فى نصف قاعدة ال Peak باعتبار ال Peak مثلث .

من أهم مميزات GLC هو قدرتة على التقدير الكمى . ويلاحظ أن مساحة كل Peak ما هى إلا تقدير كمية مكون موجود بالعينة وفى الحقيقة أن المساحة تحت الـ Peak تتناسب طرديا مع كمية المكون الموجود وتبعا لذلك فإن التحليل الكمى يدور حول الطرق المختلفة التى تقدر ما هية الـ Peak وتختلف طرق التقدير الكمى تبعا للنقاط التالية :-

* **أولا : أشكال الـ Peak** : هل هى متناسقة ، غير متناسقة ، مستعرضة ، خارج الكروماتوجرام ، غير مفصولة ، مفصولة جزئيا .



* **ثانيا : العينة Sample** : دقة الكمية المحقونة ، حدوث فصل كامل من داخل العمود ، وكشف كامل بواسطة الـ Detector لكل مكون من مكونات العينة.

* **ثالثا : الجهاز Instrument** : ثبات الـ Base line ، استجابة الكاشف ، ثبات الجهاز من ناحية معدل مرور الغازات ودرجات الحرارة .

2- 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 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

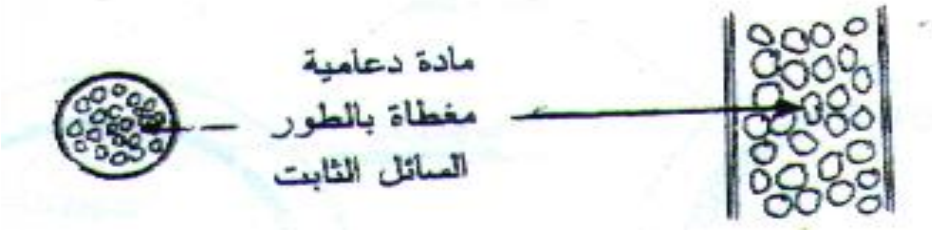
Chromatogram :– يمكن التعرف على نوع المركبات المفصولة فى العينة وذلك عن طريق معرفى قيمية مايسمى بال Retention time (Rt) على شريط الـترق الذى يسمى Chromatogram

---

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 .



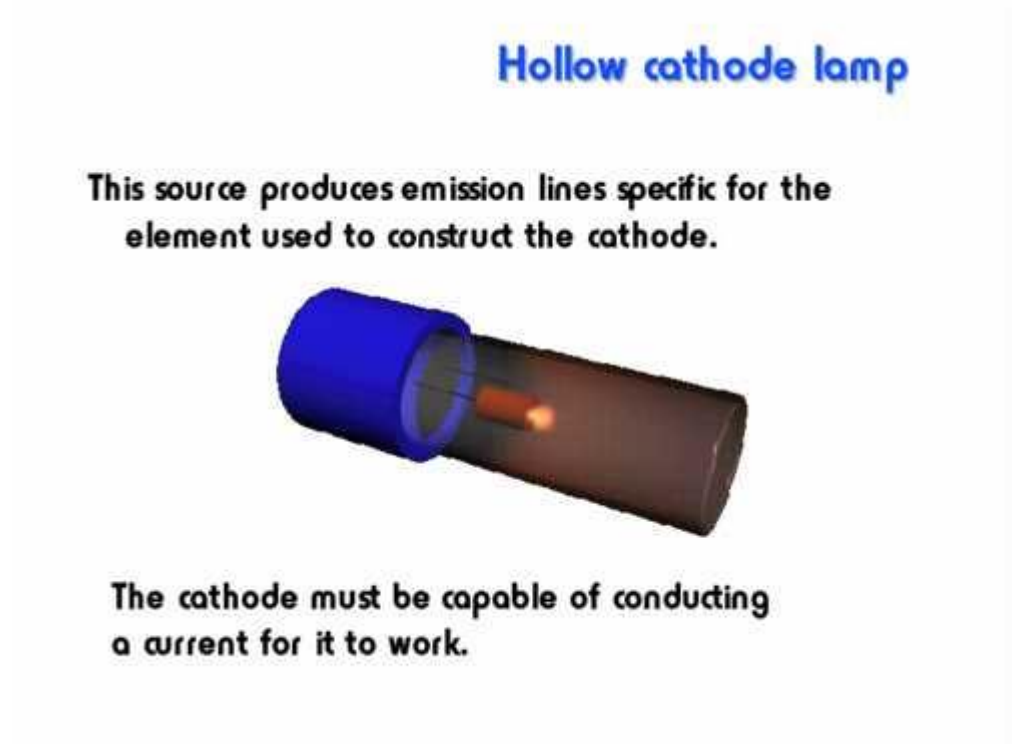
Thermal conductivity detectorجهاز الكشف القائم على التوصيل الحرارى

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 .



إجابة السؤال الثاني :-

أكمل العبارات التالية:-

1- **مصدر إثارة الذرات في جهاز الامتصاص الذرى هو.....لمبة الكاثود المفرغة.....**

2- **فى جهاز الامتصاص الذرى تظهر عدة تداخلات تحدث فى منطقة اللهب نتيجة** التداخلات من مادة الترابط، التداخل الكيميائي، التداخل الناتج من التأين،التداخل الطيفى...

3- **يستخدم جهاز ...HPLC.....في تقدير الفيتامينات الذائبة في الدهن بينما يستخدم جهاز .....Flame photometer..في تقدير عنصري الصوديوم البوتاسيوم ومصدر اللهب عبارة .....الهواء....،...والغاز الطبيعى او البيوتان..... بينما يستخدم جهاز..... atomic absorption..في تقدير الرصاص ومصدر اللهب عبارة عن ...الهواء.،.....الاستيلين.....**

4- **مصدر الأشعة الفوق بنفسيجية في الأجهزة هو لمبة .....الديوتريوم..... أو ...الايدروجين.....وهى تعطى شعاع له طول موجي ما بين .....180.....،.....350..... نانوميتر وتصلح لدراسة .....** تركيب الجزيئات في المركبات العضوية **خاصة المركبات التي بها** مراكز عدم التشبع

5- **مصدر هذه الأشعة تحت الحمراء ف الاجهزة هو لمبة ..الزئبق..... وهى تعطى أطوال موجية ما بين .....1.....،.....40..... ميكرون وتصلح لدراسة .....** المجاميع الفعالة بالجزيئات

2- ب- أحسب كمية السيلكا جيل اللازمة لتغطية سبعة ألواح زجاجية 250 × 250 مم وسمكها 0.25 مم وذلك لإجراء التحليل الكروماتوجرافى ذات الطبقة الرقيقة .

حجم المذيب = (0.25 ÷ 10)× 25 × 25 × 7 × 2.5 = 273

حيث أن النسبة ما بين الماء ومادة السليكاجيل فى العادة 2 : 1وأن يلزم الحصول على 273 سم2 فى المخلوط فيخلط 91 جم سليكا جيل مع 182 سم ماء ويلاحظ أن السليكا جيل المخلوط مكون من 81.9 جم سليكاجيل و 9.1 جم كبريتات كالسيوم و182 سم ماء.

ج- ضع علامة صح امام العبارات الصحيحة وعلامة خطا امام العبارات الخاطئة مع التعليل :-

1- **امتصاص الضوء فى اى عينة يتانسب مع الوزن المكافىء للمادة الممتصة ×**
2- **كمية الضوء الممتصة تعتمد على كثافة الضوء من المصدر الضوئي ولا تعتمد على طول المسار الضوئي داخل العينة ×**
3- **ينتج طيف الذرات نتيجة انتقال الالكترونات فى المدارات الجزئيية ×**
4- **الطاقة الناتجة من الاشعة الحمراء ضعف الطاقة الناتجة من الاشعة البنفسيجية ×**
5- **مصدر الاشعة فى جهاز الامتصاص الذرى عبارة عن لمبة يكون الكاثود اسطوانى الشكل من نفس العنصر المراد تقديرة و الانود عبارة عن سلك رفيع وتسمى لمبة الانود المفرغة ×**
6- **عند اجراء التحليل الكروماتوجرافى Descending system يكون سريان المذيب من اعلى الى اسفل √**

يتوقف اختيار الغاز الحامل فى جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازى على نوع الاعمدة ×

السؤال الثالث :

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.

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:

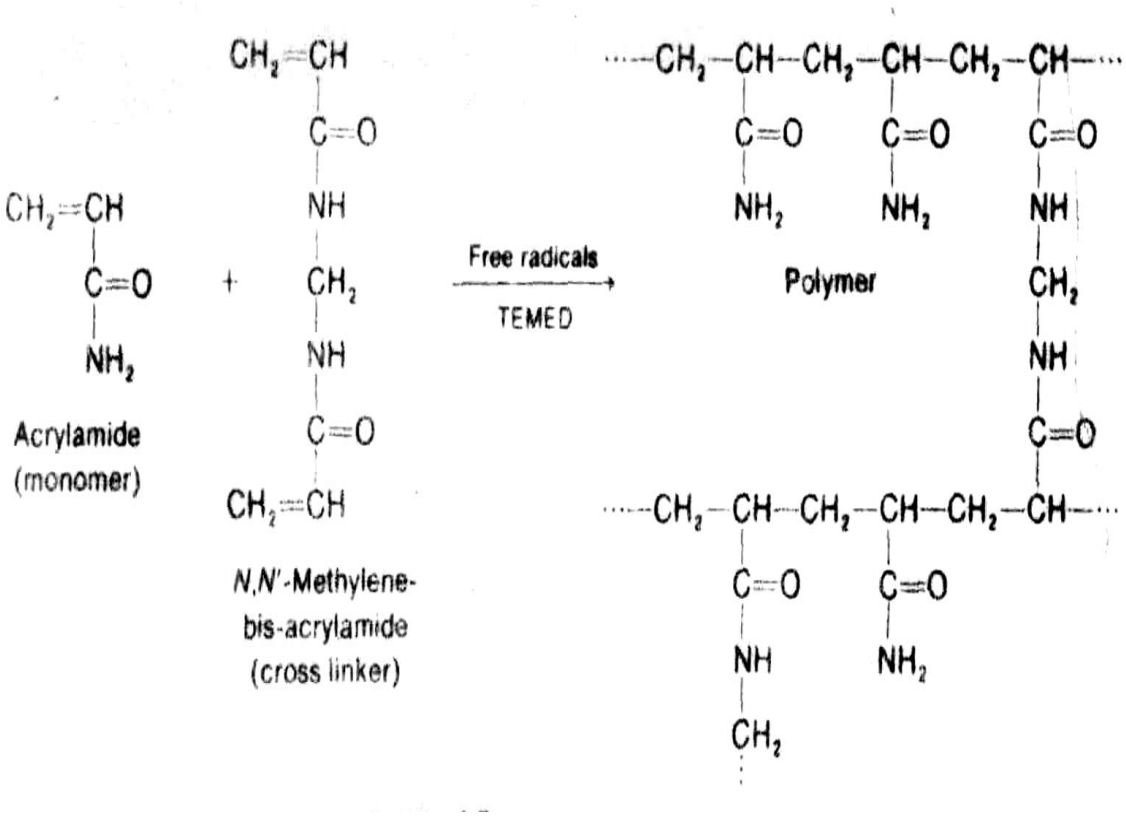
تظهر الجزئيات ذات الحجم المتساوي والتي تختلف في شكلها مثل البروتين الليفي والدائري اختلاف متباين في تحركها نظرا لاختلاف تأثير الاحتكاك وقوى التجاذب الالكتروستاتيكي.

ويمكن وضع العوامل التي تؤثر علي معدل التحرك في المعادلة التالية

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

ثالثا:-

Formation of poly acrylamid gel



1- خاصية Molecular sieving

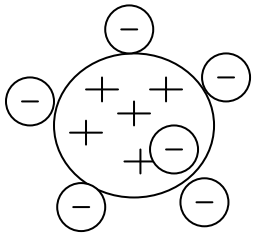
تعتبر هذه الصفة من مميزات Gel electrophoresis حيث تساعد خاصية Molecular sieving للوسط الدعامي النصف خشن semi rigid علي فصل المركبات ذات الوزن الجزئيئ الكبير مثل البروتينات والتي تختلف أيضا في الحجم والشكل ويتكون الجل من سلاسل متشابكة وموزعة توزيعا عشوائيا خلال الجيل معطية تركيب المنخل sieve-like structure 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.

3- **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 الأيونات حرة الحركة بعكس المجموعات المشحونة التي تكون مرتبطة كيميائيا بجزئيات مادة التبادل الأيونى. ويمكن استبدال الأيونات

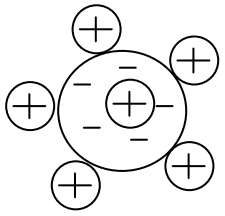
بأيونات أخري تحمل نفس الشحنة دون أن تتأثر المادة الأصلية تسمي matrix. فإذا كانت المادة matrix تحمل شحنات موجبة فإن الأيونات المحيطة بها تكون سالبة وبالتالي فإن المادة يمكن أن يتم عليها تبادل أيونات سالبة الشحنة ولذلك يطلق عليها اسم Anion exchanger والعكس إذا كانت المادة الأصلية matrix تحمل شحنات سالبة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

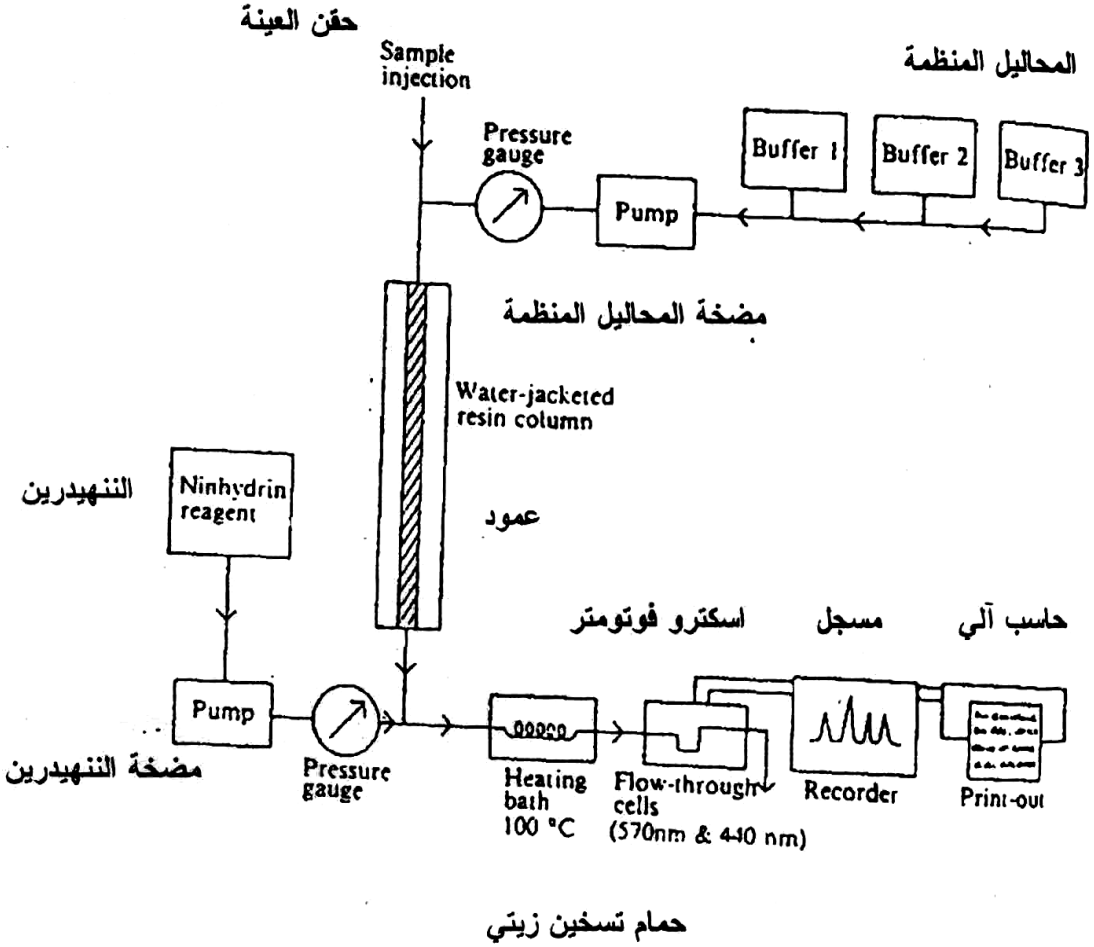
$$\textbf{Relative mobility} = \frac{\textbf{Distance of protein}}{\textbf{length after distaining}} \times \frac{\textbf{Length before distaining}}{\textbf{Disatnce of day migration}} \qquad -4$$

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 في 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 10^{-9} مولر.



رسم تخطيطي لجهاز تحليل الأحماض الأمينية باستخدام النهيدرين للتقدير الكمي

الشكل التخطيطي السابق يبين أجزاء جهاز تحليل الأحماض الأمينية وهي:

1. محاليل منظمة ذات درجة حموضة مختلفة عادة يستخدم ثلاث محاليل منظمة 1 ، 2 ، 3 لها درجة حموضة 3.25 ، 4.25 ، 5.28 علي التوالى وتعمل كطور متحرك لإحلال الأحماض الأمينية .
2. مضخة لدفع المحاليل المنظمة داخل العمود Buffer pump .
3. وسيلة لحقن العينة Sample injection .
4. عمود راتنج وبه وسيلة لضبط وثبات درجة حرارة الفصل Resin column.
5. مضخة لدفع الجوهر الكشاف ننهيدرين Ninhydrin pump.
6. حمام زيتي Reaction coil.
7. خلية لتقدير الكثافة اللونية للمحلول Flow cell عند الطولين الموجين 570 و 440 نانوميتر.
8. 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 110°م في وجود حامض HCl بتركيز 6 عيارى لمدة 24 ساعة وبعد ذلك يتم التخلص من الحامض الزيادة والتجفيف ثم تذاب العينة في محلول منظم من الستارت pH = 3 ثم تحقن العينة في جهاز تقدير الأحماض الأمينية Amino acid analyzer .

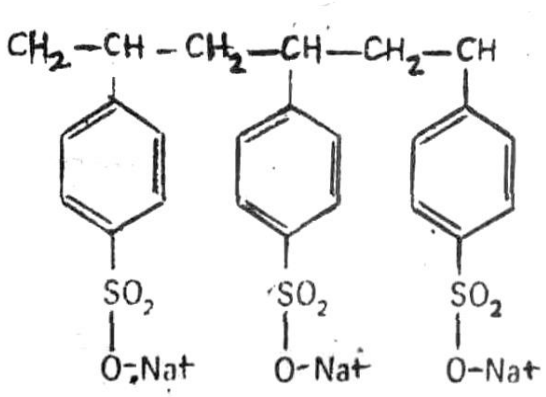
طريقة الفصل :

فصل الأحماض الأمينية يكون علي أساس التبادل الأيوني Ion exchange chromatography ويتكون الجهاز من عدد 2 عمود :

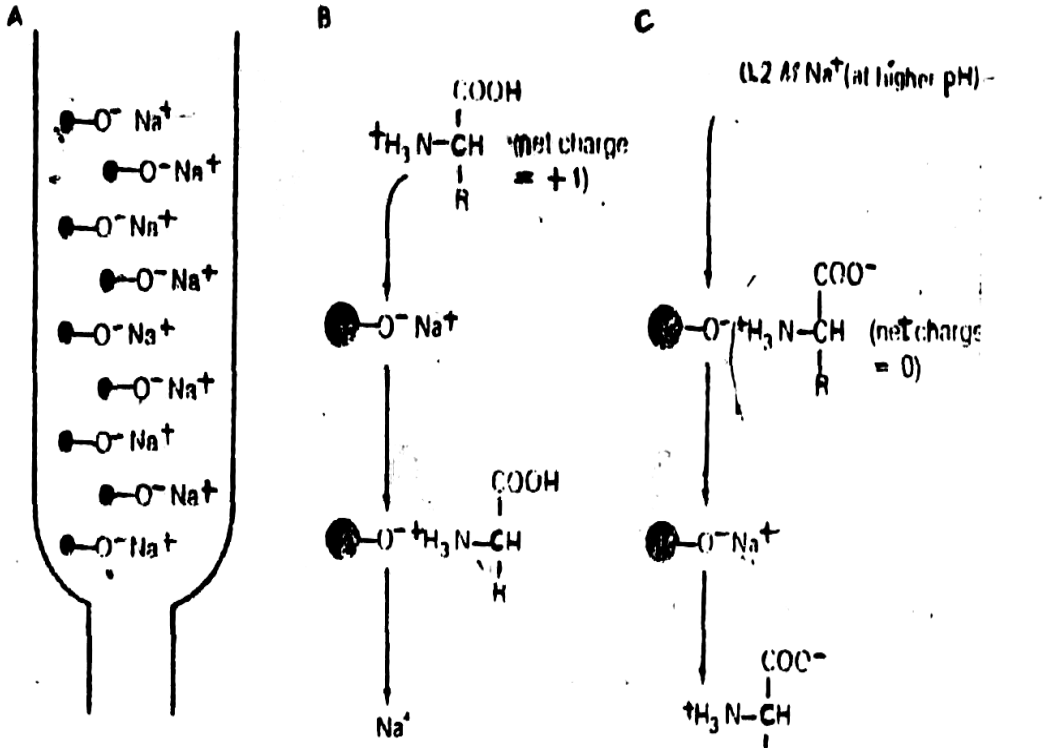
العمود الأول Short column: يستخدم في فصل الأحماض الأمينية القاعدية .

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 = 3 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 .

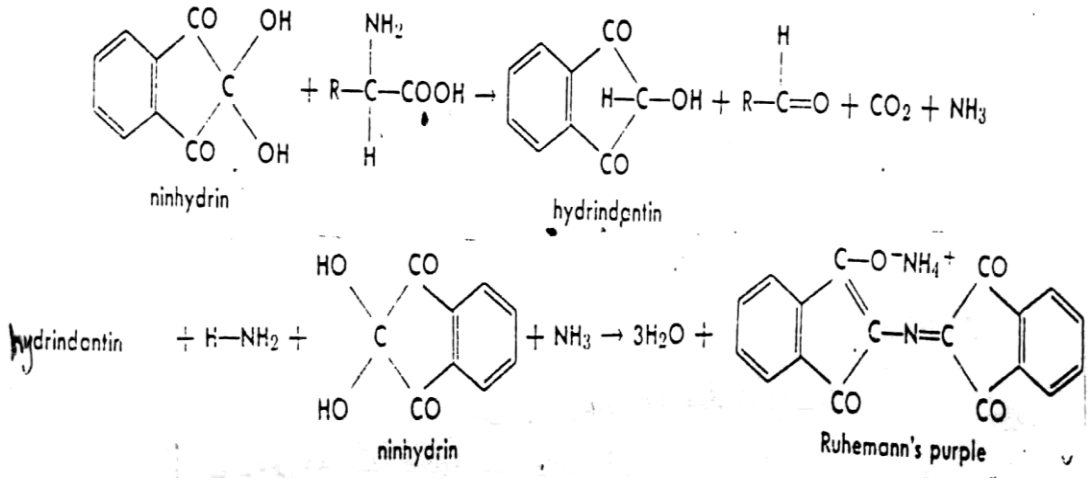
(C) إحلال Na^+ محل الحامض الأميني باستخدام محلول ذو pH عالى.

الحامض الأميني الذى يخرج من العمود بعد إجراء عملية Elution يتفاعل مع النهيدرين علي درجة 100°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