قسم الكيمياء الحيوية

نموذج استرشادى لإجابة امتحان نظري لمادة
كيمياء الاجهزة والتحاليل الدقيقة
لطلاب الفرقة الثالثة - شعبة وقاية النبات (مقرر اختياري)
العام الجامعي ٢٠١٤ /٢٠١٥ الفصل الدراسي الاول

السؤال الأول:- (١٥ درجة)

ماهو الاساس العلمى الذى بنى علية جهاز Spectrophotometer مع شرح مبسط لخطوات تقدير عينة مجهولة.

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

$$A \alpha b C$$

$$A = \in b C$$

A = Absorbance

$\in$ = Molar absorptivity

b = Cell length

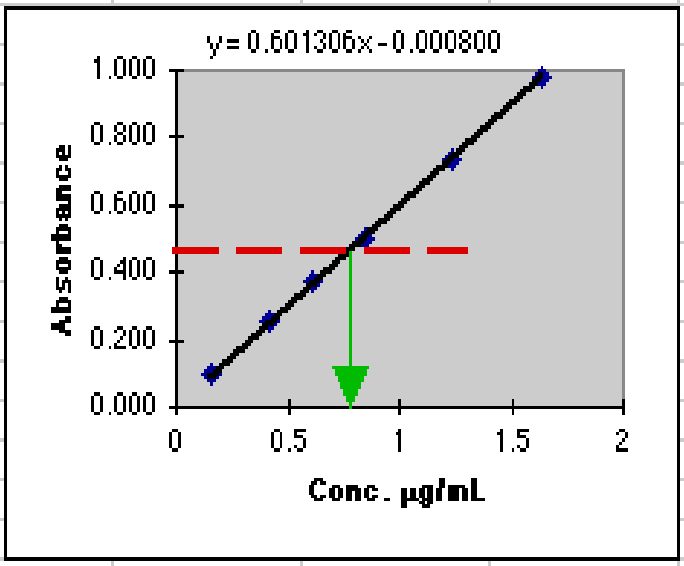
C = Molar concentration

- ويمكن تقدير التركيز للعينة المجهولة بطريقتين

Finding the concentration of unknown

أ - قراءة الامتصاص للعينة المجهولة ثم توقع القراءة على محور الامتصاص ويرسم خط مستقيم موازى لمحور التركيز ليقابل Standard curve عند نقطة معينة يسقط منها خط مستقيم يقابل محور التركيز في نقطة هي تركيز العينة المجهولة.

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
unk	0.455



ب - من معرفة وحساب معامل الامتصاص A من عينة نقية عند طول موجي معين في مذيب معين ثم قراءة امتصاص العينة المجهولة ومعرفة قيمة A لها وبالتالي يمكن حساب تركيز العينة المجهولة من القانون:

$$A_1/A_2 = C_1/C_2$$

A_1 = absorbance of standard

A_2 = absorbance of unknown

C_1 = concentration of standard

C_2 = concentration of unknown

١ ـ تكلم باختصار عن كل مما يأتى :- **(٨ درجات)**

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

- تعريف التحليل الكروماتوجرافى :-Chromatogrphy

يمكن تعريف التحليل الكروماتوجرافى بأنه طريقة لتحليل وفصل ا لمركبات 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

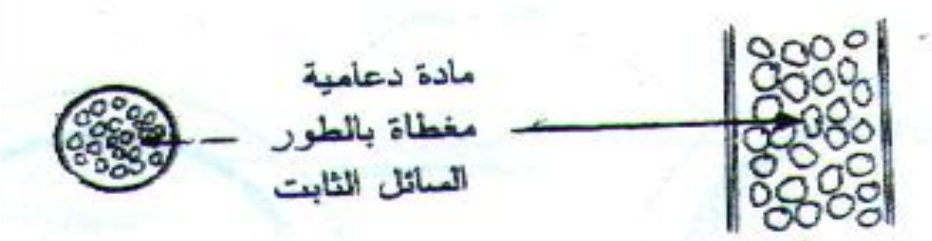
Chromatogram :- يمكن التعرف على نوع المركبات المفصولة فى العينة وذلك عن طريق معرفى قيمية مايسمى بال Retention time (Rt) على شريط الترق الذى يسمى Chromatogram

---

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

الأعمدة الحلزونية : Packed Column

وتستعمل فى هذه الأعمدة مادة 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 رقي ق 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 يتو قف 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 أ ما 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 .

السؤال الثانى:- (١٥ درجة)

١ ـ ماهو الاساس العلمى الذى بنى علية جهاز Gas liquid chromatography مع شرح مبسط لتركيب الجهاز والتقديرالكمى لعينة مجهولة .

(١٠ درجات)

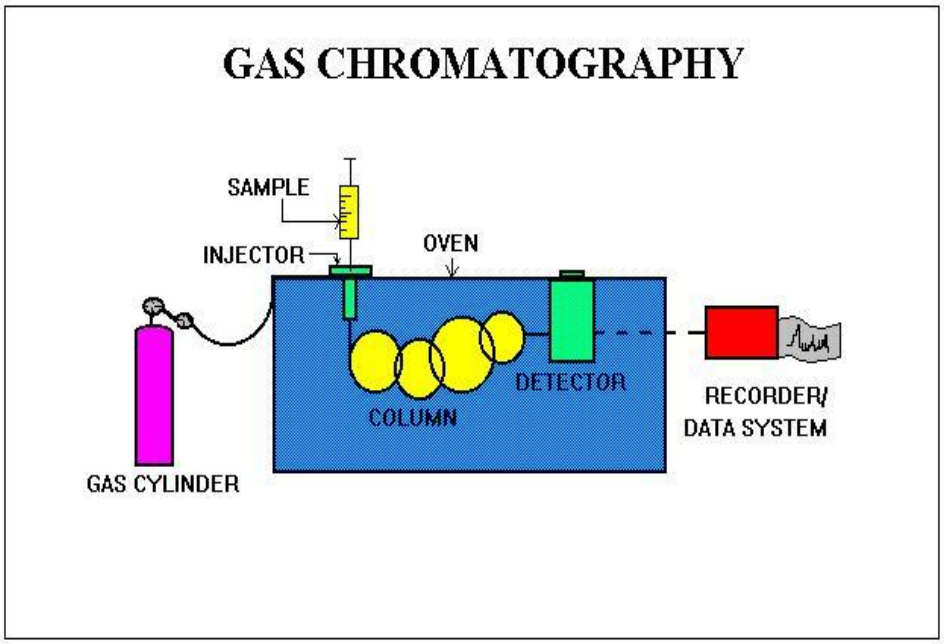
٢ ـ ماهو الاساس العلمى الذى بنى علية جهاز Gas liquid chromatography مع شرح مبسط لتركيب الجهاز والتقديرالكمى لعينة مجهولة.

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 :

١- مصدر للغاز Gas stream

٢- أعمدة الفصل Column detail

٣- أجهزة الكشف والإظهار Detectors

٤- الـ Recorder

التقدير الوصفى و الكمى للعينات المفصولة: Qualitative & Quantitative analysis

يمكن التعرف على نوع المركبات المفصولة فى العينة وذلك عن طريق معرفى قيمة مايسمى بال Retention time (Rt) على شريط الترق 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.

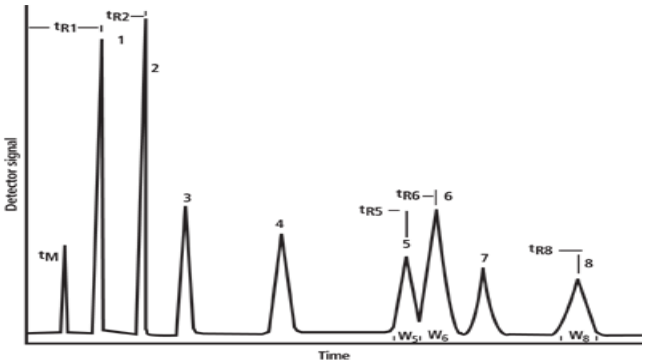
وتعتبر قيمة Rt قيمة ثابتة للمادة الواحدة فى ظروف فصل ثابتة . وبمقارنة قيمة Rt للمادة المجهولة unknown مع قيمة Rt لمركب معروف يستخدم كمرجع او مقياس reference or stander يمكن تحديد انواع المركبات المختلفة المكونة للعينة.

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 الت ى 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 داخ ل 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 .

---

١ - - أحسب كمية السيلكا جيل اللازمة لتغطية خمسة ألواح زجاجية ٢٠٠ × ٢٠٠ مم وسمكها ٠,٢٠ مم وذلك لإجراء التحليل الكروماتوجرافى ذات الطبقة الرقيقة .

(٥ درجات)

حجم المذيب = (٠.٢٠ ÷ ١٠)× ٢٠ × ٢٠ × ٥ × ٢.٥ = ١٠٠

حيث أن النسبة ما بين الماء ومادة السليكاجيل فى العادة ٢ : ١وأن يلزم الحصول على ١٠٠ سم٢ فى المخلوط فيخلط ٢٥ جم سليكا جيل مع ٧٥ سم ماء.

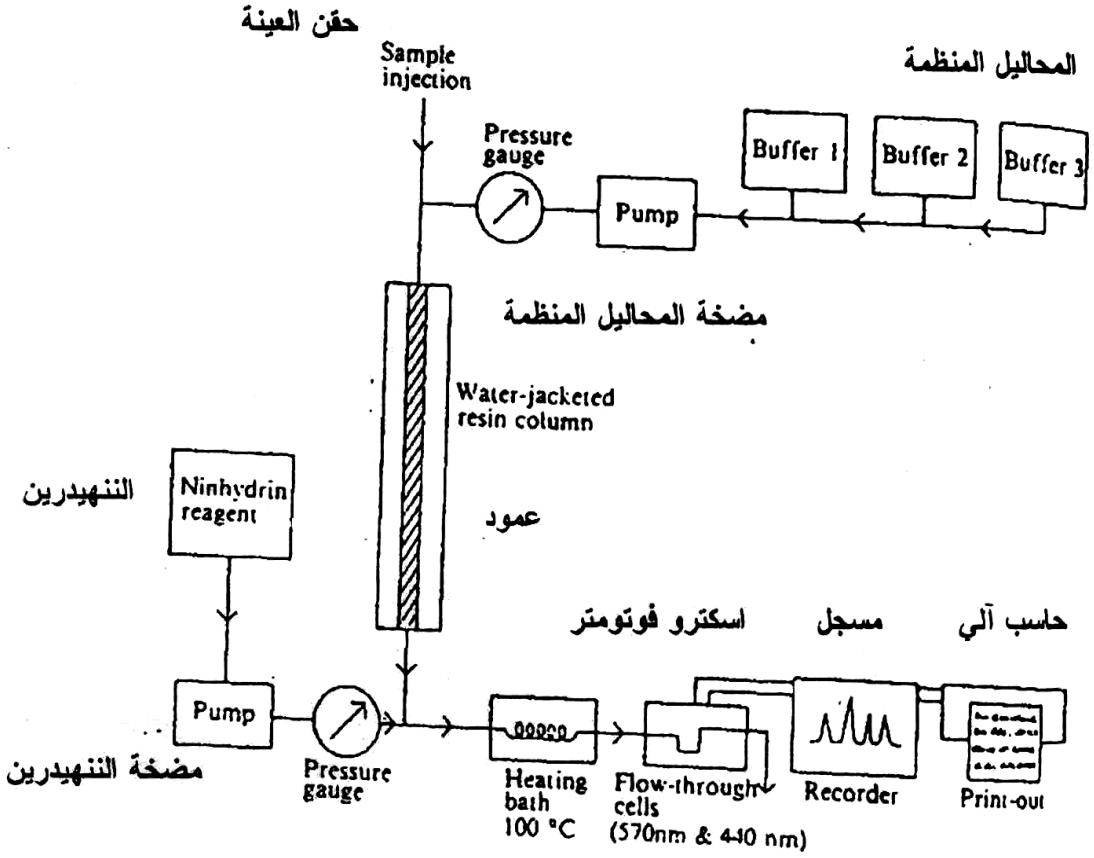
السؤال الثالث: **(٣٠ درجة)**

أ - عينة نباتيه كيف يمكن تقدير الأحماض الأمينيه بها بواسطة جهاز Amino acid analyzer مبينا تجهيز العينه – ميكانيكية الفصل وعيوب هذه الطريقة وكيف يمكن التغلب عليها.

:- 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 $^{-٩}$ 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 اللو نية 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 .

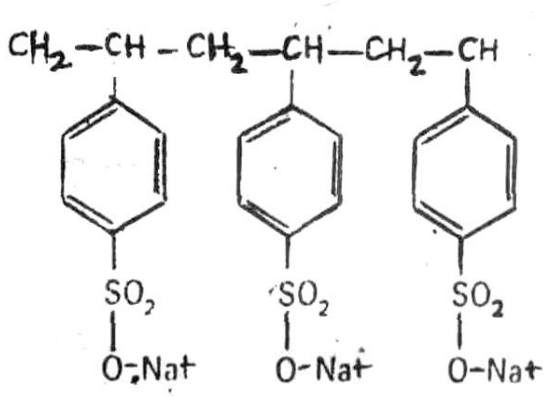
طريقة الفصل :

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

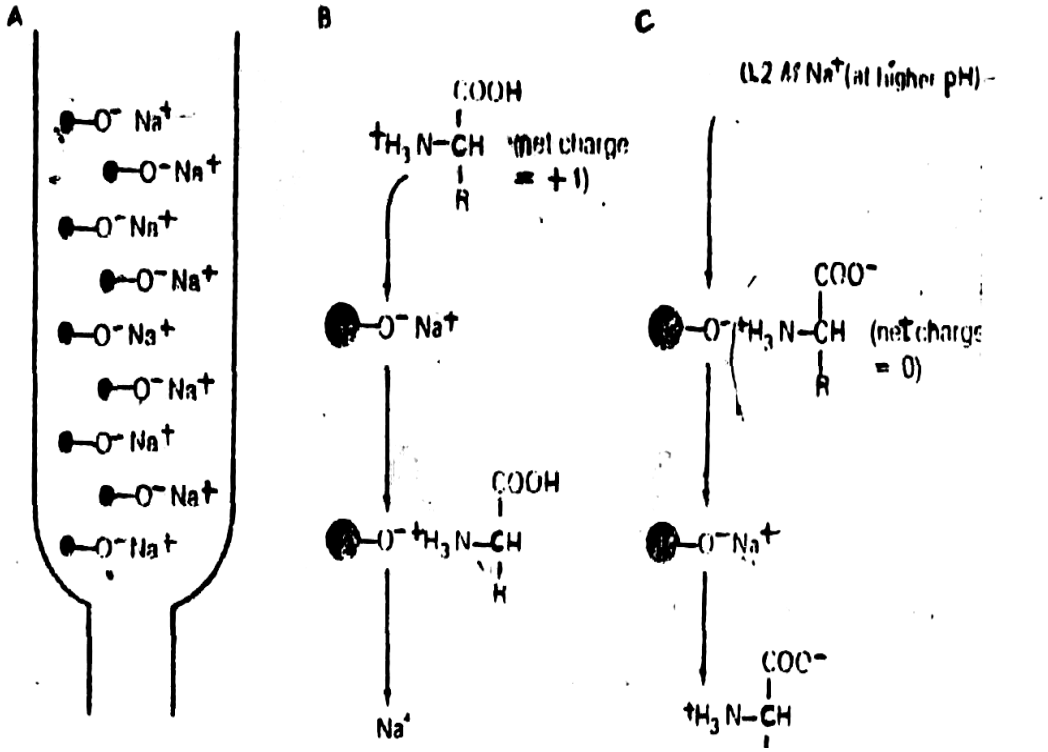
العمود الأول Short column: يستخدم في فصل الأحماض الأمينية القاعدية .

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

كل من العمودين مملوء بمادة ذات شحنة سالبة عليها ايون الصود يوم 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 ضعيف ة 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 .

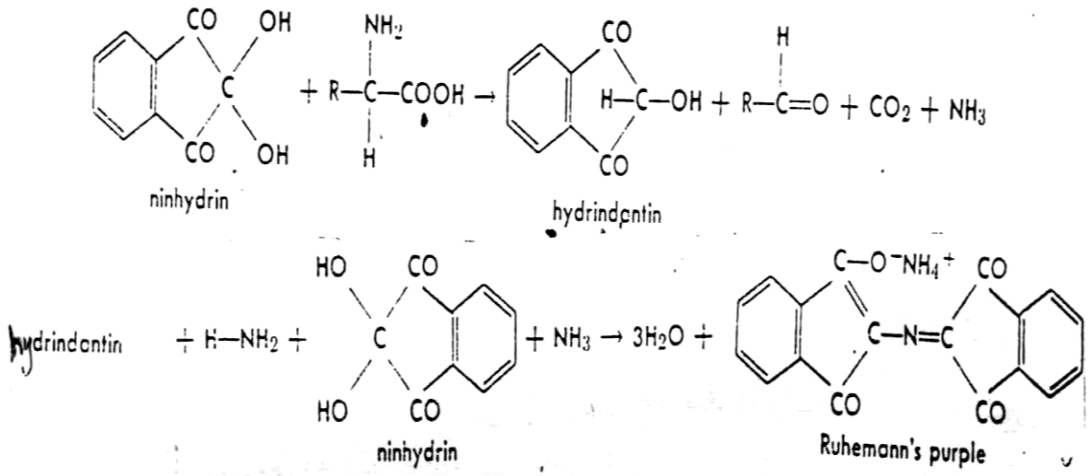
(C) إحلال Na^+ محل الحامض الأميني باستخدام محلول ذو pH عالى.

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

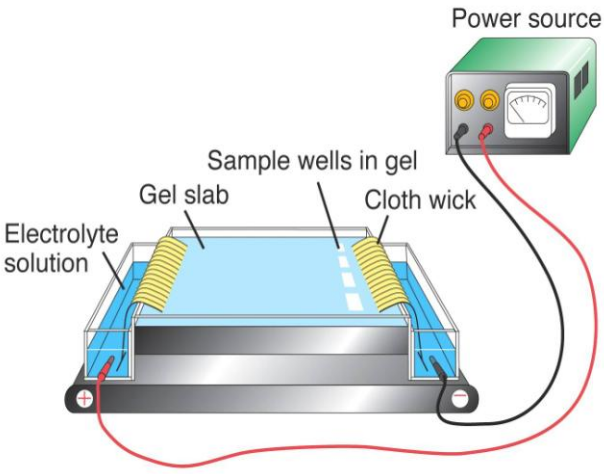
ب -عينة بذور حمص تم استخلاص البروتين منها والمطلوب فصلها على جهاز Electrophoresis موضحا مواصفات الجهاز – العوامل التى تؤثر على الفصل وكيف يمكن تقدير الوزن الجزيئى بـ SDS-PAGE.

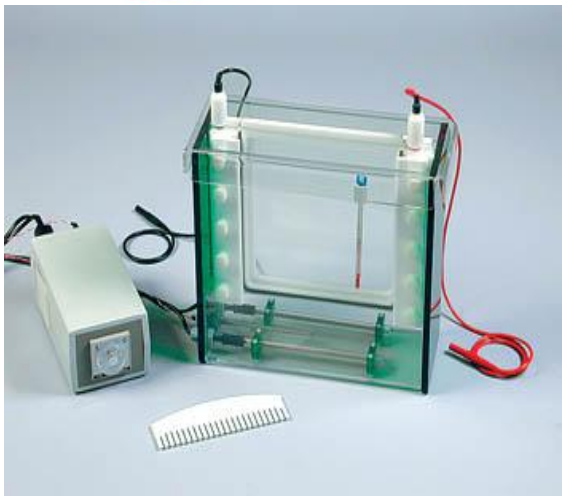
يتكون جهاز الفصل الكهربي بالالكتروفورسيس من جزئين رئيسيين هما :

١ –مصدر التيار.

٢ – وحدة الفصل :تحتوي هذه الوحدة علي الكترودات مصنوعة من الصلب الغير قابل للصدأ– مستودع المحلول المنظم– وسط دعامي Support–غطاء شفاف كما بالشكل . حيث يوضع

الوسط الدعامي المشبع بالمحلول المنظم والمحمل بالعينة في داخل مستودع المحلول المنظم ثم يمرر التيار الكهربائي.





<u>العوامل التي تؤثر علي معدل تحرك جزيئات البروتين في المجال الكهربي:</u>

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 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 بالادم صاص 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 ف ي تحركها نظرا لاختلاف تأثير الاحتكاك وقوى التجاذب الالكتروستاتيكي.

ويمكن وضع العوامل التي تؤثر علي معدل التحرك في المعادلة التالية

Mobility of molecule =

(Applied voltage) (Net charge on the molecule)

(Friction of the molecule: Molecular size and shape)

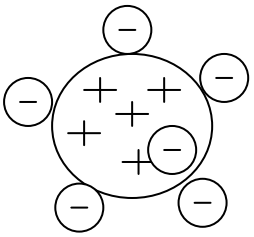
ج- ماذا يعنى : Cation exchange chromatography – gel filtration

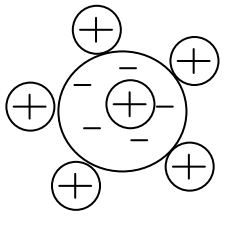
٣- **Ion Exchange Chromatography** حيث يعتمد فصل وتحليل المركبات علي إمكانية تبادلها مع الأيونات الموجودة علي سطح مواد خاصة تعرف بمواد التبادل الأيونى Ion exchanger وهي عبارة عن مادة غير ذائبة تحتوي علي بعض المجموعات التي تحمل شحنات ويحيط بها أيونات ذات شحنات مضادة وهذه الأيونات حرة الحركة بعكس المج موعات 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 ال مادة 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**

٤ -

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

أ - ماذا يعنى الفصل بـ Gel filtration.

حيث يعتمد فصل المركبات المختلفة على اختلاف حجمها الجزئيى molecular size مما يسبب 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.