قسم الكيمياء الحيوية

نموذج استرشادى لإجابة امتحان نظري لمادة كيمياء الاجهزة والتحاليل الدقيقة
لطلاب الفرقة الرابعة- برنامج علوم الاغذية– مقرر أختيارى
العام الجامعي ٢٠١٩/٢٠٢٠ الفصل الدراسي الاول

أجب عن جميع الأسئلة التالية :-

السؤال الأول:- (٣٠ درجة)

١- ماهو الاساس العلمى الذى بنى علية جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائل High performance liquid chromatography مع شرح مبسط لتركيب مكونات أجزاء الجهاز . وكيفية تقدير عينة مجهول (٦ درجات)

الاجابة

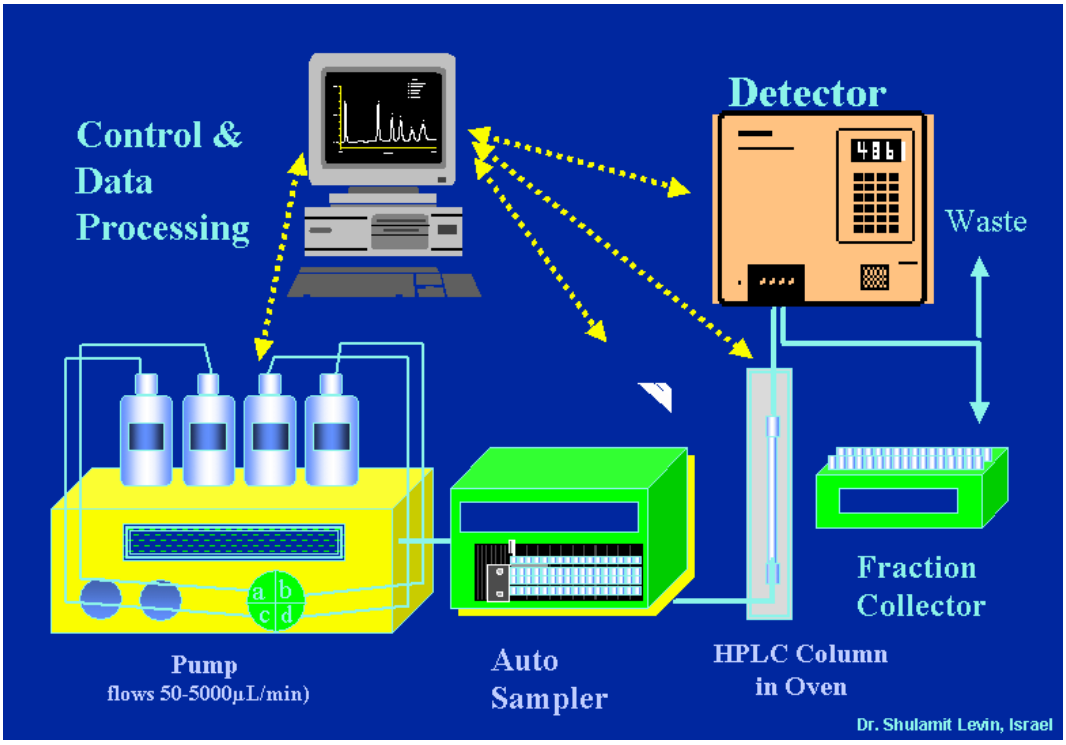
يعتبر الـ HPLC أحد الطرق الأساسية لتحليل المواد العضوية وهو يمتاز مثل طرق التحليل الكروماتوجرافي الأخرى بالدقة والحساسية العالية كما أن مدى استخداماته لاتعتمد على تطاير العينة أو تأثرها بالحرارة كما هو الحال فى الـ GLC ويمتاز جهاز الـ HPLC بكفاءته العالية جداً على الفصل بالإضافة إلى استخدامه فى فصل العديد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

تركيب جهاز التحليل الكروماتوجرافي السائل



المضخة : Pump

الشروط الواجب مراعاتها فى نظام ضخ المذيبات

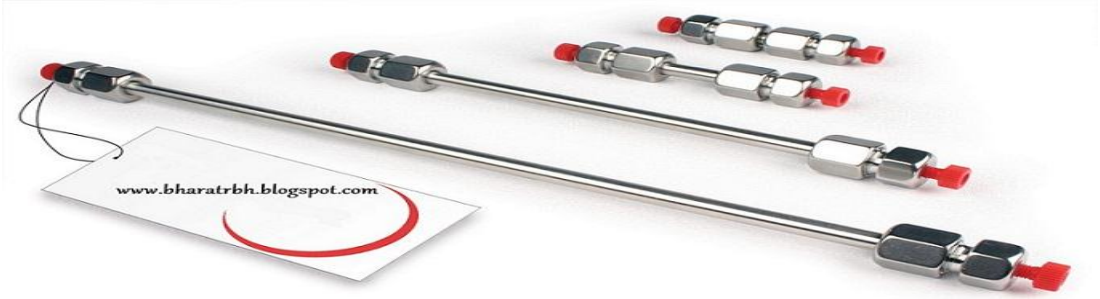
* الضغط العام لا يزيد عن ٦٠٠٠ رطل / بوصة .
* تعطي مقدرة على ضخ المذيب بمعدل صفر – ١٠ سم/دقيقة .
* الحجم الداخلى أقل مايمكن بحيث يظل معدل سريان المذيب ثابت سواء عند مقدمة المضخة أو عند بداية العمود .
* يجب أن تكون النبضات (معدل السريان / الضغط) أقل ما يمكن حيث أن ثبات معظم أنواع الـ Detectors يتناسب عكسياً 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

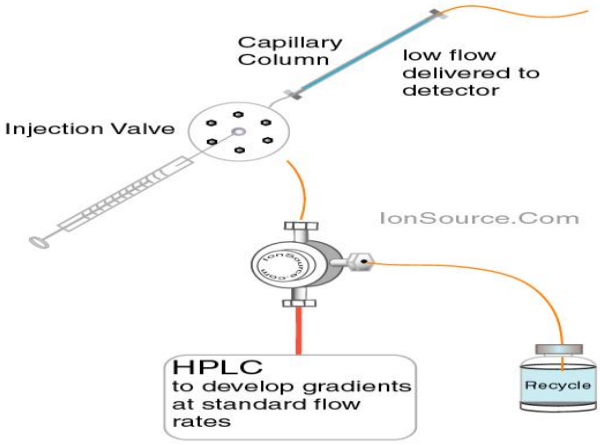
الأعمدة الشائع استخدامها فى جهاز الـ HPLC يتراوح طولها بين ١٠- ٣٠ سم والقطر الداخلي يتراوح بين ٤ – ١٠ مم وقطر الحبيبات الشائع استخدامها يتراوح بين ٥-١٠ ميكروميتر . وعادة يكون العمود بطول ٢٥ سم وقطره ٤ مم وقطر الجزيئات ٥ ميكروميتر وفى أجهزة الـ HPLC الحديثة تستخدم أعمدة ذات أبعاد أصغر حيث يتراوح طول العمود 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 .

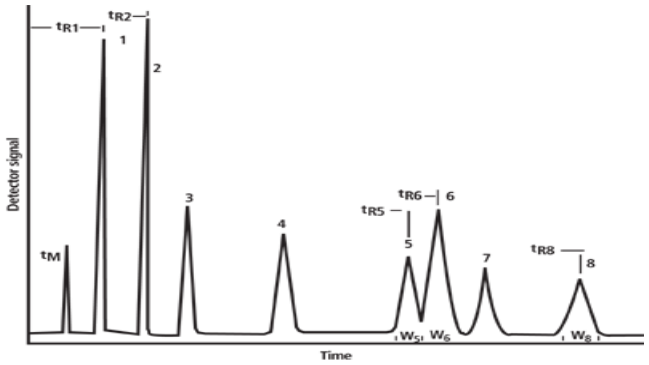
التقدير الوصفى و الكمى للعينات المفصولة: Qualitative & Quantitative analysis

يمكن التعرف على نوع المركبات المفصولة فى العينة وذلك عن طريق معرفى قيمية مايسمى بال (Rt) Retention time على شريط الـتٌرق الذى يسمى Chromatogram والناتج من ال Recorder حيث يعبر ال (Rt) Retention time 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 .

٢- ماهو الاساس العلمى الذى بنى علية جهاز الامتصاص الذرى Atomic Absorption لتقدير العناصر مع شرح مبسط لتركيب مكونات أجزاء الجهاز.

(٦ درجات)

الاجابة

ماهو الاساس العلمى الذى بنى علية جهاز الامتصاص الذرى Atomic Absorption 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**

٤- وحدة قياس طاقة الأشعة **Detector**

Atomic Absorption Spectrophotometer

أولاً : مصدر الأشعة :

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 .

٣- تكلم باختصار عن كل مما يأتى :-

Chromatogram –Rf value – Chromatography -Packed column –RT. (٥ درجات)

الاجابة

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 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.

تقدر RF

لكل مركب وذلك بقياس المسافة التى سارها المركب على المسافة التى سارها المذيب.

Chromatography

تعريف التحليل الكروماتوجرافى :-

يمكن تعريف التحليل الكروماتوجرافى بأنه طريقة لتحليل وفصل المركبات المختلفة وتعتمد على حدوث ما يسمى بالـ Differential 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**

ويتم توزيع المواد وحدوث الاتزان بين هذين الطورين نتيجة لاختلاف قابلية المواد للتوزيع والارتباط بكل من الطور الثابت والمتحرك.

Packed column

أ) 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

RT

Retention time يعبر عن الوقت اللازم انقضاؤة من بدء حقن العينة حتى خروج المادة

وظهور ال Peak maximum على الكروماتوجرام.

٤- أحسب كمية السيلكا جيل اللازمة لتغطية عشرة ألواح زجاجية ٢٥٠ × ٢٥٠ مم وسمكها ٠.٢٠ مم وذلك لإجراء التحليل الكروماتوجرافى ذات الطبقة الرقيقة . (٥ درجات)

* حجم المذيب الذى يستخدم فى عمل Slurry = ٢.٥ × عدد الألواح × سمك اللوح (سم) × بعد اللوح (سم).
* النسبة بين الماء والسليكاجيل = ٢ : ١
* السليكاجيل تحتوى على كبريتات كالسيوم بنسبة ١٠% من وزنها.

حجم المذيب الذى يستخدم فى عمل Slurry = ٢.٥ × ١٠ × ٠.٠٢٠ (سم) × ٢٥×٢٥ (سم). =

٥- أشرح طريقة فصل وتقدير المركبات باستعمال كلامن (التحليل الكروماتوجرافى بالاعمدة، التحليل الكروماتوجرافى الطبقة الرقيقة مع ذكر مميزاتها) (٨ درجات)

الاجابة

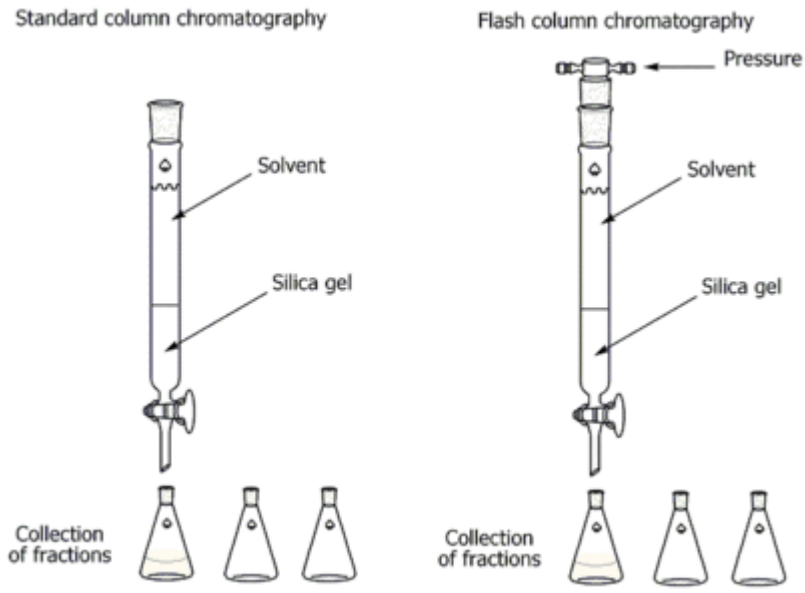
كروماتوجرافى الأعمدة Column Chromatography :-

فى هذا النوع 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.

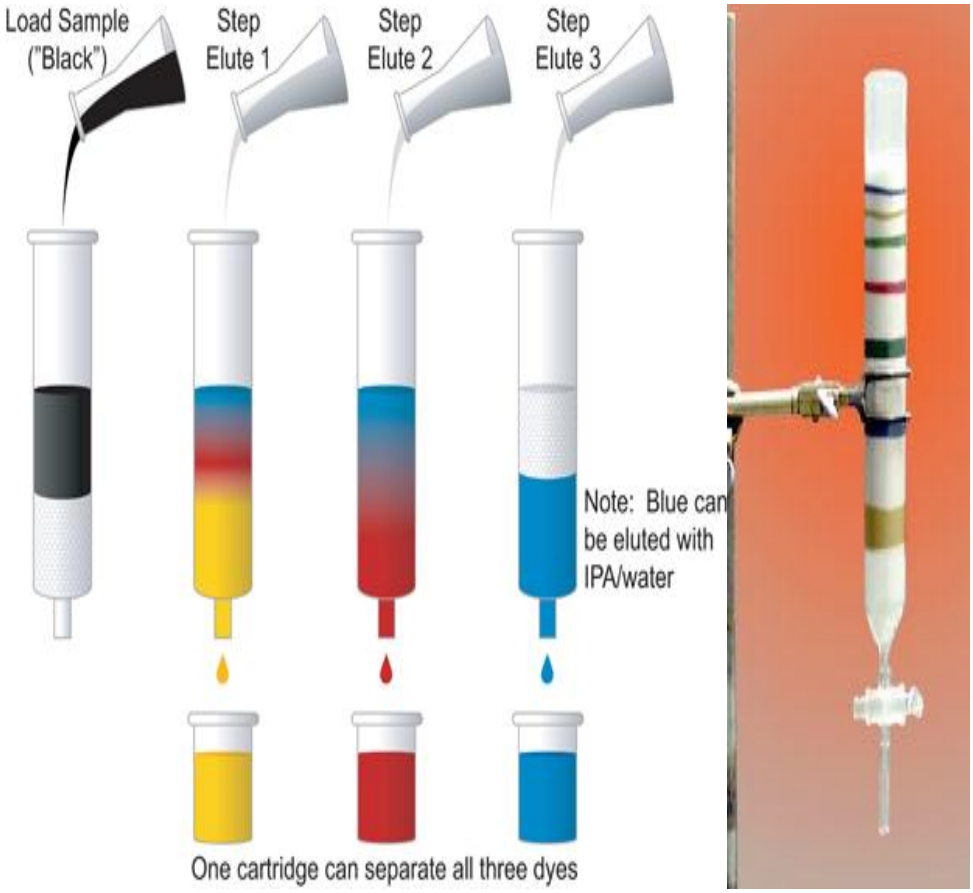
٢- يذاب مخلوط المركبات المراد فصلها وتقديرها فى مذيب وينقل إلى العامود الكروماتوجرافى بواسطة قمح فيحدث إدمصاص للمركبات المختلفة كل على حسب قدرته على الادمصاص وبالتالى تتحرك المركبات على مسافات مختلفة على هيئة مناطق Zones وتظهر المناطق بوضوح إذا كان المادة المراد فصلها لها لون مميز.

٣- إذا كان المطلوب هو الحصول على المركبات كل حدة فأنة 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 العامود خارجة منطقتة تلو الأخرى وتستقبل فى دوراق مخروطية وفى هذه الحالة تخرج المواد ضعيفة الادمصاص أولا يليها المواد الأكثر إدمصاص.

- كما موضح بالرسم :



- 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 الكروماتوجرافى 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

مميزات TLC عن Paper Chromatography

١) الوقت الذى يأخذة الفصل بواسطة TLC قصير جدا حيث لا يحتاج أكثر من نصف ساعة وبسيطة فى حين أن الوقت الذى يأخذة Paper طويل يتراوح من ١٦ – ٢٤ ساعة .

٢) تكون البقع مندمجة Compact والفصل ممتاز .

٣) تستعمل مواد ادمصاصية كثيرة منها مواد عضوية مثل السيليلوز أو السيليلوز المحور أو غير عضوية مثل السليكاجيل أو الالومنيا . فى حيث أن Paper يكون يعتمد فقط على الطبقة الرقيقة من السيليوز.

٤) تستعمل كميات قليلة من المواد المراد تحليلها كما إنها تستخلص كل مكونات العينة .

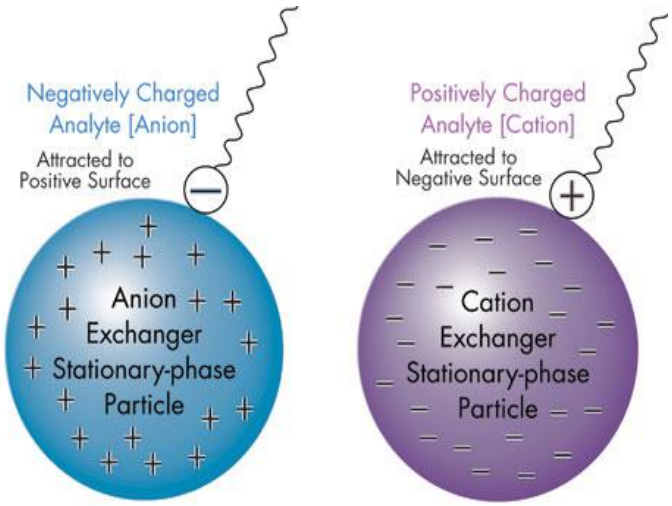
٥) تستعمل مواد لتعيين موضع المركبات المفصولة مثل حمض الكبريتيك وترش على السيلكاجيل أو الومنيوم دون أن تتأثر على العكس من التحليل الكروماتوجرافى الورقى .

السؤال الثانى:

(٣٠ درجة)

أ- أذكر أنواع Ion exchange chromatography مع ذكر مثال.

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:

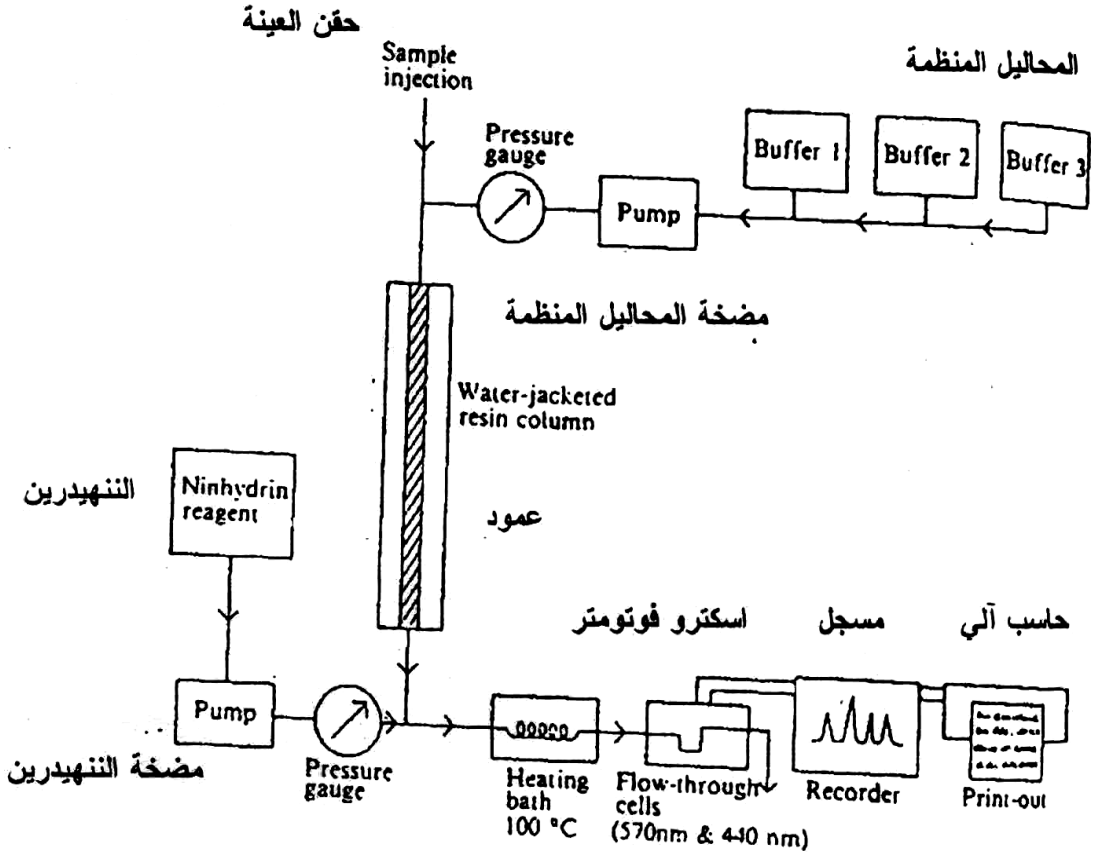


Gel filtrationماذا يعنى الفصل بـ

حيث يعتمد فصل المركبات المختلفة على اختلاف حجمها الجزئيى molecular size ممايسبب اختلافها فى النفاذية permeability بين حبيبات 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 exolusion.

ج ج- عينة بذور فول صويا كيف يمكن تقدير الأحماض الأمينيه بها موضحا ميكانيكية الفصل – تجهيز العينة- تركيب الجهاز – عيوب التحليل الحامضى وكيف يمكن تفاديها- تفاعل النهيدرين مع الاحماض الامينية الخارجة من العمود.

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 :

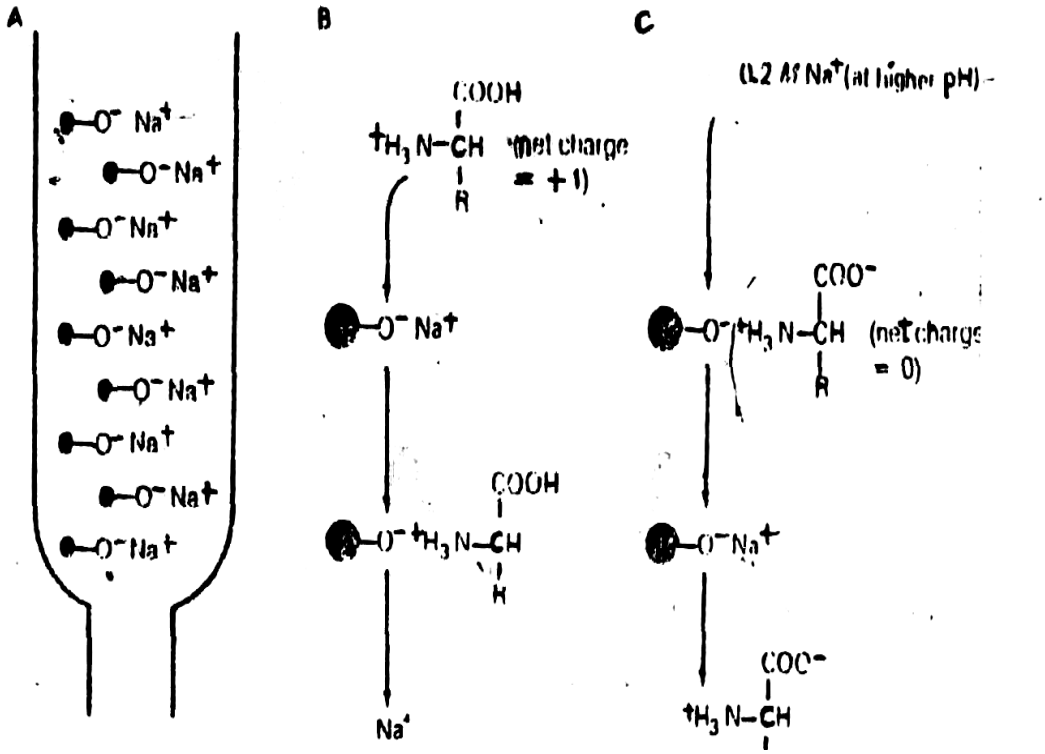
العمود الأول Short column: يستخدم في فصل الأحماض الأمينية القاعدية .

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

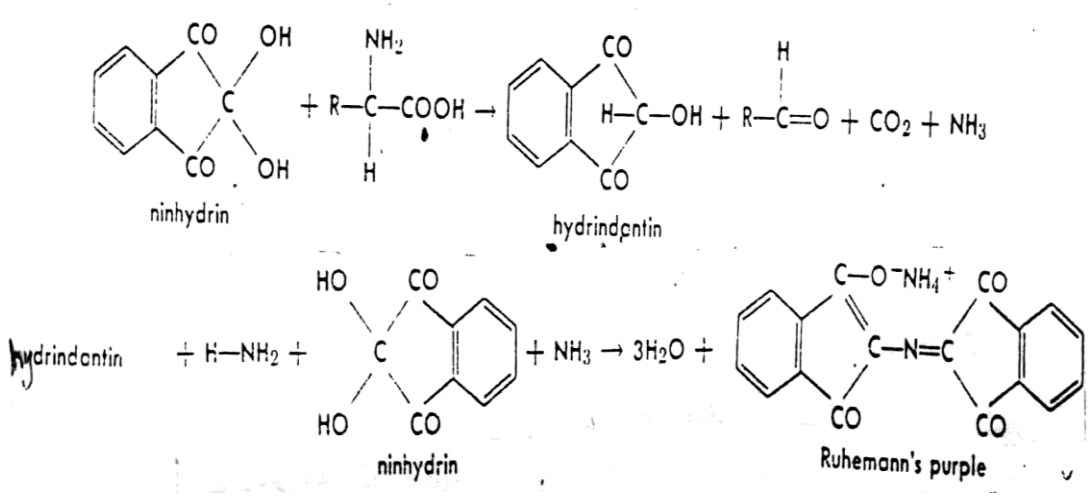
(B) تبادل الحامض الأميني مع أيون الصوديوم .

(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:



يتكثف ناتج تفاعل النهيدرين مع الأمونيا مكونا مركب لونه أزرق أو بنفسجي ويتطلب هذا التفاعل وجود حامض أميني به مجموعة أمين منفردة في الموضع ألفا من مجموعة كربوكسيل منفردة حتى يكون التفاعل كميا .

ملخص لطريقة الفصل :

١. يحقن خليط قياسى من الأحماض الأمينية وبعد انتهاء التحليل يظهر تقرير يبين عدد الأحماض الأمينية القياسية R_t لكل حمض أميني ومساحات الـ peaks المقابلة للأحماض الأمينية .

٢. يزود الحاسب الآلى بالـ R_t لكل حامض أميني قياسى وتركيزه .

٣. يحسب آليا معامل الاستجابة Response factor

بقسمة التركيز ÷ المساحة لكل حامض أميني Amount/area = RF

تحقن العينة – يقوم الحاسب الآلى أوتوماتيكيا بكتابة تقرير يبين فيه اسم الحمض الأميني (من المعلومات السابق تغذيته بها) ، الـ R_t ، التركيز بالـ nM حيث تضرب المساحة في معامل الاستجابة لكل حمض أميني .

٤. يحول تركيز الحمض الأميني من nM إلي ng بالضرب في الوزن الجزيئى للحمض الأميني .

٥. يحسب تركيز الحمض الأميني علي أساس % mg أو أى نوع أخر للدلالة علي التركيز. يجب الأخذ في الاعتبار أى تخفيف أجرى أثناء التحليل .

د- ما هى الأنواع المختلفة للفصل الكهربى وماذا يقصد بكل من مع الشرح:

- **SDS-PAGE.**

- يستخدم في تحليل ومعرفة عدد وحجم السلاسل البروتين polylepetide البروتين المحضر يعامل بزيادة من soluble thiol
- Sodium dodecyl sulfate(SDS), (R= SH, e.g Bmercaptoethanol)
- وجد أن روابط (s-s) تحول إلي R-SH وتنفرد السلاسل البيتيدية كل علي حده وتنفصل كل سلاسل بيتيدية متشابهة في band واحد ويمكن تقدير التحرك من المعادلة السابقة

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

- **Factor affecting migration of protein.**

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 (Isoelectric PH) PI.

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

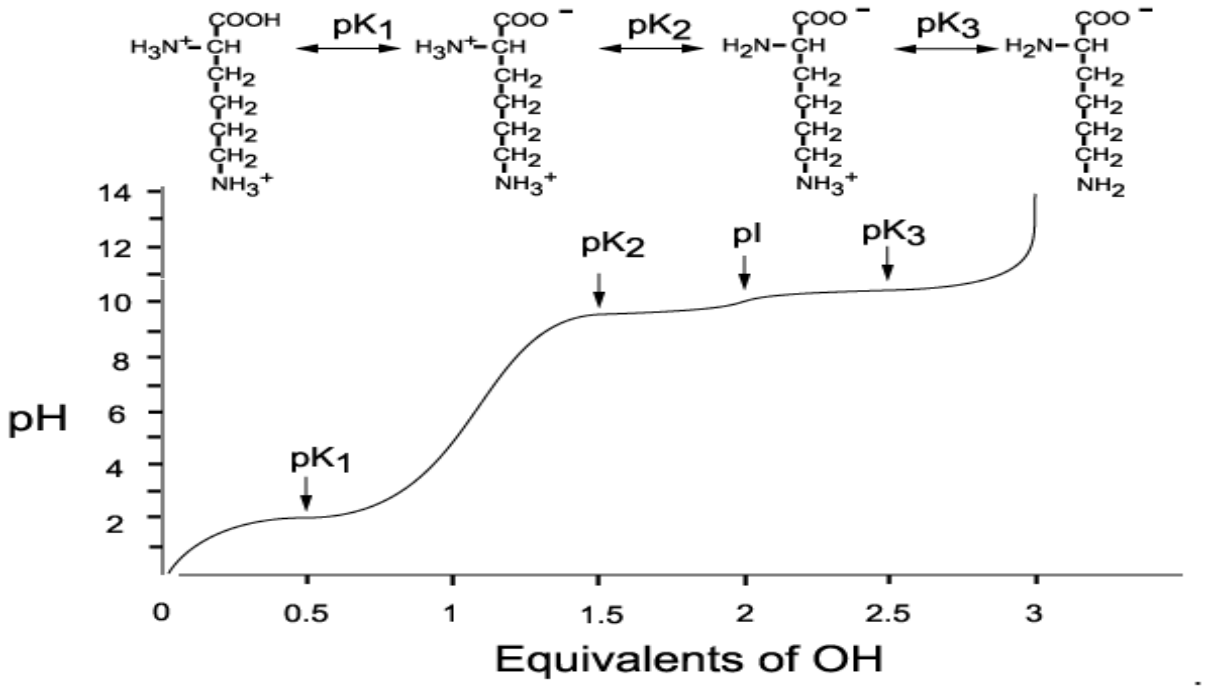
$PI = 1/2 (Pka_1 + Pka_2)$

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.

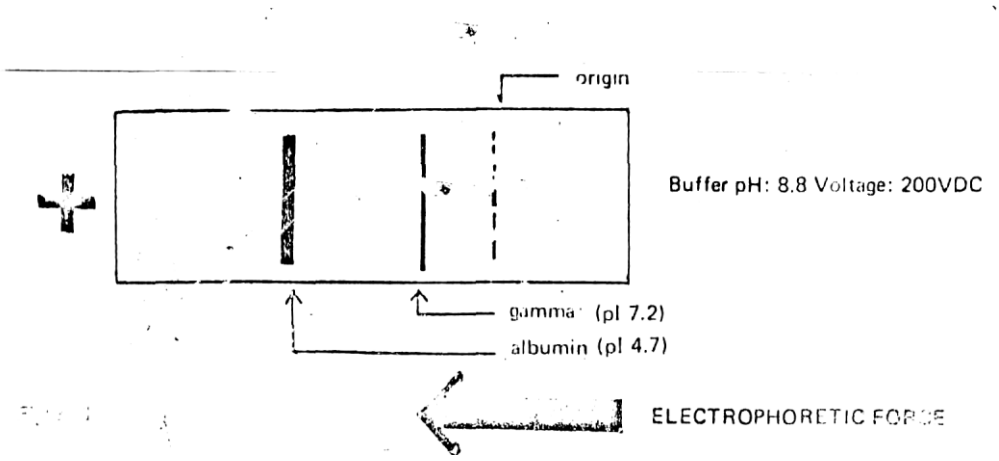
في حالة الأحماض الأمينية القاعدية مثل الليسين



يتضح أن نقطة التعادل الأيوني تقع ما بين Pka_3,Pka_2

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

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



بخلافPI gamma أقل في الشحنة النهائية نجد أن الالبيومين وgamma يمكن فصلها عن بعضهم كما يتضح من الشكل التالي:

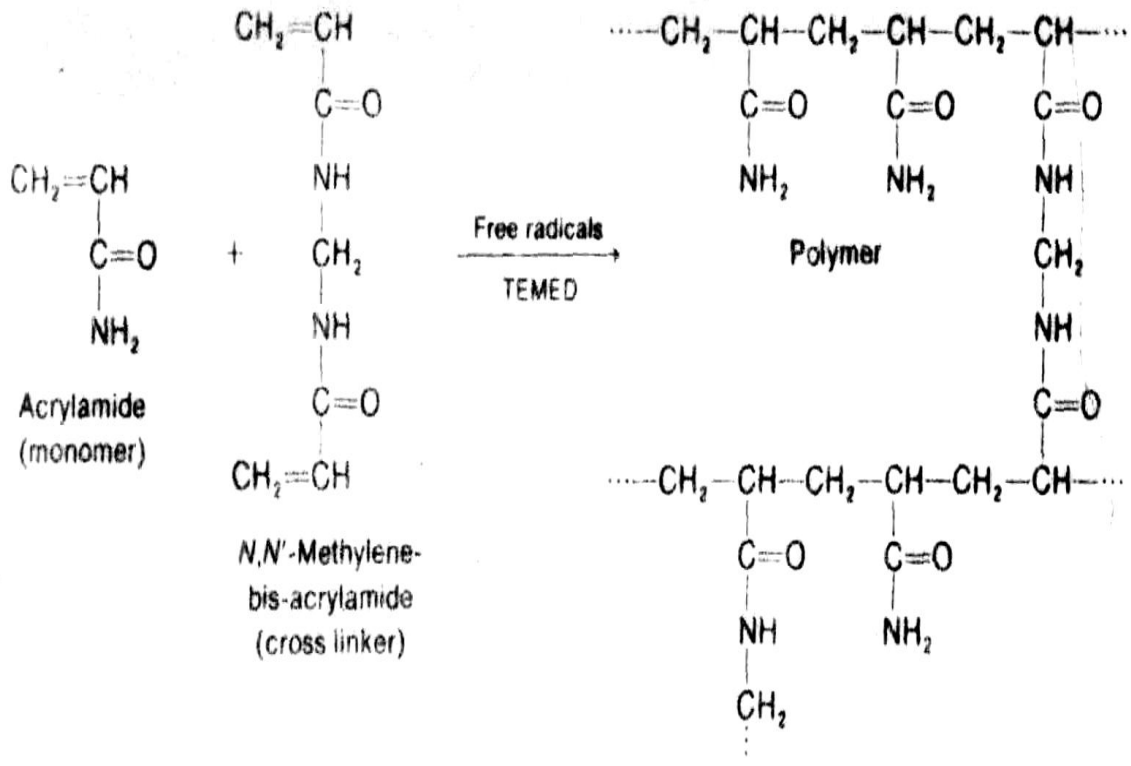
ب- الحجم Size

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.

- **Formation of polyacrylamide gels.**


Acrylamide
(monomer)
N,N'-Methylene-
bis-acrylamide
(cross linker)
Free radicals
TEMED
Polymer