نموذج استرشادى لإجابة امتحان نظري لمادة كيمياء الاجهزة والتحاليل الدقيقة
لطلاب الفرقة الرابعة- شعبة الكيمياء الحيوية- مقرر اجبارى
العام الجامعي ٢٠١٩/٢٠٢٠ الفصل الدراسي الاول

اجابة السؤال الاول:-

١- ماهو الاساس العلمى الذى بنى علية جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازى Gas liquid chromatography مع شرح مبسط لتركيب الجهاز . وكيفية تقدير عينة مجهولة (٥ درجات)

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.

ويعتبر جهاز (GLC) من الأجهزة الحديثة والوسائل التى لا غنى عنها فى تحليل المركبات وقد انتشر استعمال هذا الجهاز فى الآونة الأخيرة لعدة أسباب.

١- يستخدم فى فصل المركبات الصلبة والسائلة والغازية .

٢- يستخدم فى تحليل العديد من المركبات التى تتبع الأقسام المختلفة " أحماض دهنية – أحماض أمينية – سكرات ....الخ " . وذلك نظرا لوجود العديد من الأعمدة والـ Detectors وطرق الفصل .

٣- عادة تفصل مكونات العينة فصلا كاملا بواسطة الغاز الخامل أى لا يحدث أى تغير فى تركيبها وبالتالى يمكن جمع هذه المكونات لدراسة خواصها الطبيعية والكيميائية .

٤- قدرة هذه الأجهزة فى فصل مكونات العينات بدرجة عالية فمثلا توجد استحالة فى فصل الأحماض الدهنية $C_{18:2}$, $C_{18:3}$ وغيرها نظرا للاختلاف القليل فى درجة غليانهم ولكن يمكن فصلهم بسهولة بواسطة جهاز GLC .

٥ – أجهزة GLC تمتاز بالسهولة فى التشغيل ويتم تفسير النتائج بسرعة .

٦- يمتاز جهاز الـ GLC بسرعة إجراء التحليل والقدرة العالية على فصل المركبات المختلفة .

٧- يمتاز الجهاز بحساسية عالية جدا حيث مكن استكمال كميات قليلة جدا من المواد المراد تحليلها وفى نفس الوقت يمكن الحصول على نتائج دقيقة .

٨- كما يمكن ربط الجهاز بالحاسبات الإلكترونية Computers مما يوفر الفرصة لتحليل العديد من العينات أوتوماتيكيا . كما يمكن توصليه بأجهزة أخرى مثل Mass spectrometer .

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.

العوامل التى تؤثر على الفصل بواسطة GLC :

يعتمد فصل المركبات على اختلاف عدة عوامل :

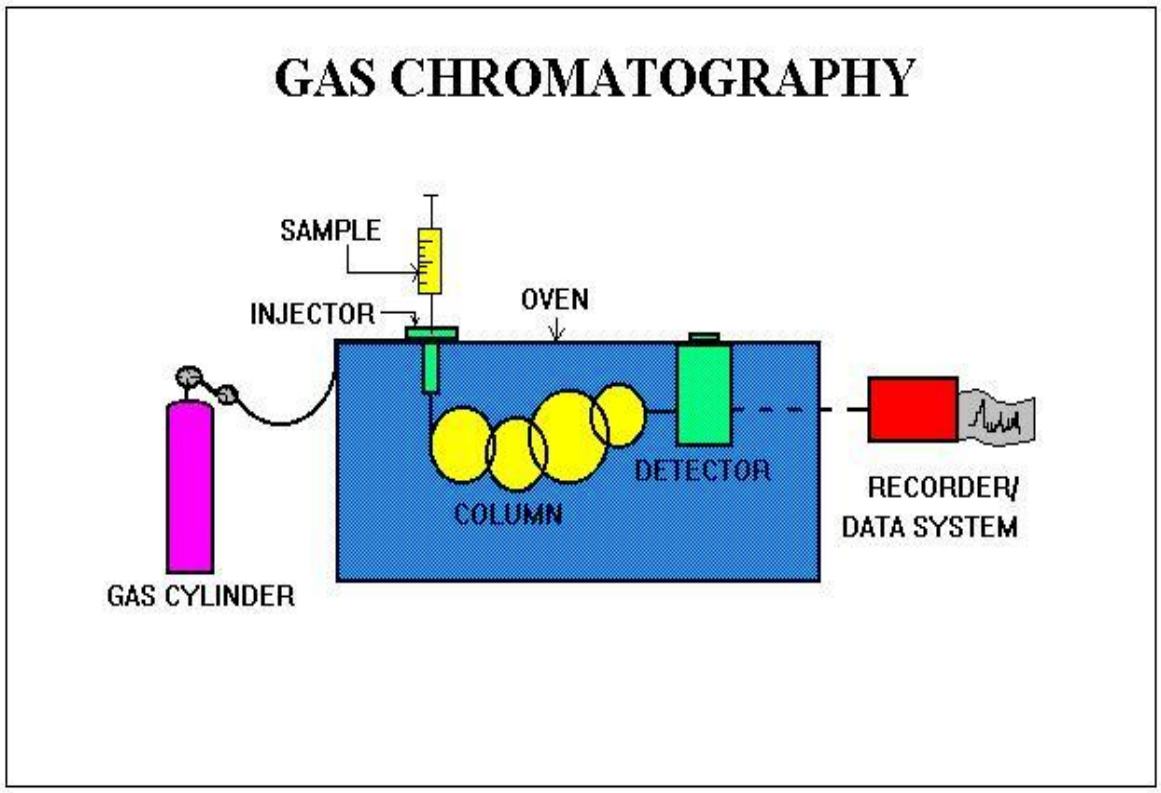
١- سرعة وضغط الغاز الخامل Velocity and pressure of the carrier

٢- معامل التوزيع بين الطورين السائل والغاز Partition coefficient

٣- معدل الانتشار بين الطور السائل والغازى .

٤- إنتقال المادة عند سطح الالتقاء Mass transfer at the interface

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 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.

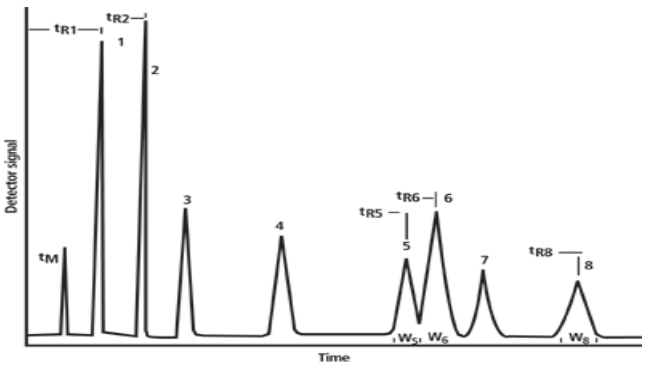
وتعتبر قيمة Rt قيمة ثابتة للمادة الواحدة فى ظروف فصل ثابتة . وبمقارنة قيمة Rt للمادة المجهولة unknown مع قيمة Rt لمركب معروف يستخدم كمرجع او مقياس reference or stander يمكن تحديد انواع المركبات المختلفة المكونة للعينة.

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 .

Manganese is often determined spectrophotometrically as the permanganate ion (MnO_4^-), whose aqueous solutions are a deep 10^{-4} M solution of ×purple color (λ_{max} = 525 nm). A 1.00 $KmnO_4$ 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

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

The weight percent of manganese in the unknown

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

٢ـ تكلم باختصار عن كل مما يأتى :-

RRT.-Capillary column – Rf value -Chromatogram

الاجابة

Chromatography

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.

تقدر RF

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

) الأعمدة الشعرية Capillary Column

أما أن تكون مستقيمة أو حلزونية ويلاحظ أن تغطيتها بطبقة رقيقة Thin film من الطور الثابت أسهل كثيرا عن تعبئة الأعمدة الحلزونية بالمواد الدعامية المغطاة بطبقة من الطور الثابت .

وتتم تغطية الأعمدة الشعرية بغمرها فى محلول يحتوى على الطور الثابت.

والاختلاف الرئيسى بين نظام العمود المعبأ والنظام الشعرى هو فى تصميم منطقة الحقن حيث يتطلب الأمر إلى حقن كمية قليلة جدا من العينة داخل العمود الشعرى وللوصول إلى هذا الغرض يتم بطريقتين وهما استعمال فاصل Splitting أو التخفيف بمذيب.

RRT.

هو عبارة عن مقارنة الوقت اللازم انقضاؤة من بدء حقن العينة حتى خروج المادة وظهور Peakللماة القياسية مع الوقت اللازم انقضاؤة من بدء حقن العينة حتى خروج المادة وظهور ال على الكروماتوجرام.Peak maximumعلى الكروماتوجرام للعينة المجهوله

أشرح طريقة فصل وتقدير المركبات باستعمال كلامن (التحليل الكروماتوجرافى الورقى، التحليل الكروماتوجرافى الطبقة الرقيقة مع ذكر مميزات كل طريقة)

٣- مـــــاهو الاســـــاس العلمـــــى الـــــذى بنـــــى عليـــــة جهـــــاز الاسبكتروفوتوميترSpectrophotometer مع شرح مبسط لتركيب الجهاز . (٥ درجات)

الاجابة

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.

وأســـــاس عمليـــــة القيـــــاس الضـــــوئي يحكمهـــــا قـــــانونين أحـــــداهما (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 α C ومن هذين القانونين معا أمكن استنتاج ما يعرف بقانون: Lambert and Peer's law

$A \alpha b C$

$A = \epsilon b C$

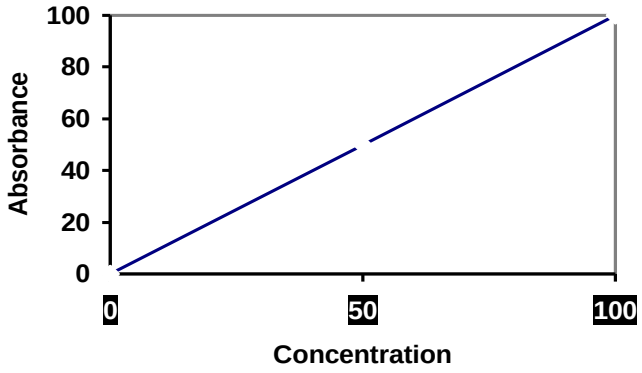
A = Absorbance

ϵ = Molar absorptivity

b = Cell length

C = Molar concentration

والرسم التالي يوضح العلاقة بين التركيز والضوء الممتص والنفاذية حيث يلاحظ أن العلاقة بين التركيز والامتصاص علاقة خط مستقيم كما تعرف أيضا بالكثافة الضوئية Optical density



$A = \text{Log } (1/T) = \text{Log } (P_0/P)$ $T = (P/P_0)$

Where: P = طاقة الضوء النافذ P_0 = طاقة الضوء الساقط

جهاز قياس الامتصاص الضوئي:-

تتكون أجهزة قياس الامتصاص الضوئي من مصدر إشعاع ضوئي يعطى طيف مستمر أو خطى والذي يمر خلال تجهيزات ضوئية معينة بحيث نحصل على الطول الموجى المطلوب أما أن يكون حزمة ضوئية ذات مدى واسع من الأطوال الموجية أو يقل هذا المدى ليكون أكثر تجانسا ثم يمرر هذا الضوء في العينة والتي تكون عادة سائلة وتوضع في خلايا تسمى Cuvettes ويمر الشعاع الساقط على العينة والتي تمتص جزء منه ويخرج شعاع محول Transmitted والذي يقاس

بإمراره خلال كشاف Detector ويكون عادة خلية ضوئية ثم إلى جهاز القياس الـ Recorder الذي يعطى القراءة مباشرة ومن هذه الأجهزة Colorimeter.

ويتكون الـ Colorimeter من الأجزاء التالية:

١- المصدر الضوئي: عادة ما يكون لمبة تنجستين.

٢- العدسات والمرايا: تستخدم المرايا العاكسة خلف المصدر الضوئي كما تستخدم لتجميع الضوء وتوجيهه إلى خلية القياس.

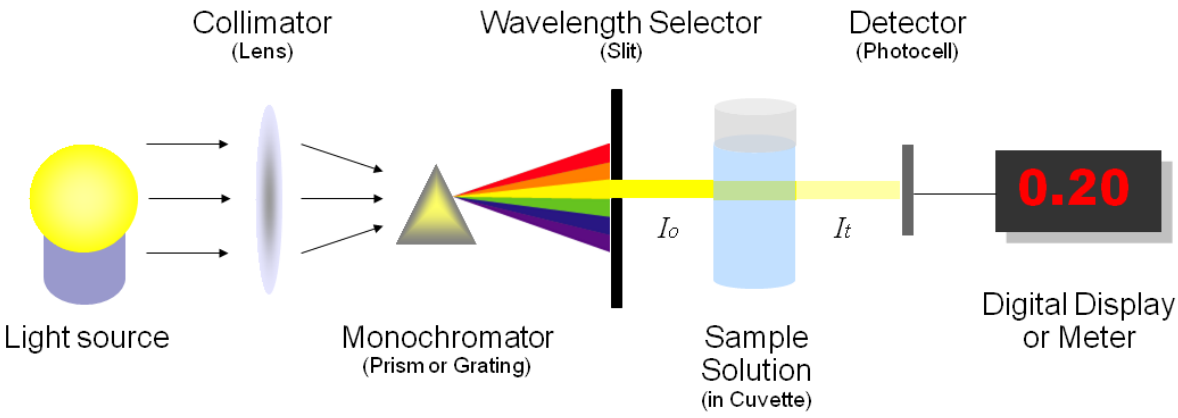
٣- المرشحات اللونية Color filter عندما لا يوجد بالجهاز إعداد خاص لتحديد الطول الموجى المراد القياس عنده وتستعمل المرشحات ويحدد لون المرشح تبعا للون المحلول المطلوب قياسه.

٤- الخلايا: تختار الخلايا المرتبطة مع بعضها بقوة نفاذية Transmission وتقارن عادة مع بعضها وهى مملؤة بالماء المقطر.

٥- الكشاف: يحتوى على خلايا ضوئية تحول الضوء الساقط عليها إلى تيار كهربائي وبالتالي يمكن قياسه.

٦- المكبر: وهو يحول التيار الكهربائي الناتج من الكشاف إلى مؤشرات يمكن تكبيرها.

٧- المسجل: يسجل الانحراف بالمؤشر والذي يتناسب مع كمية التيار التي تولف في الخلية الضوئية.



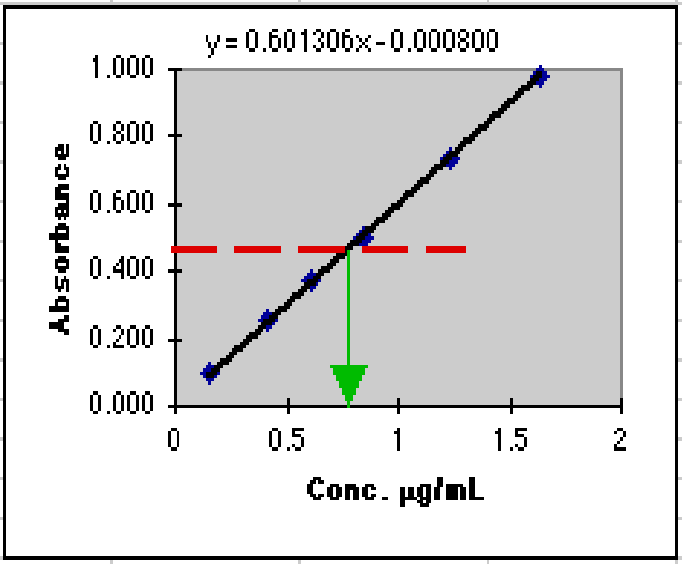
ويمكن تقدير التركيز للعينة المجهولة بطريقتين

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

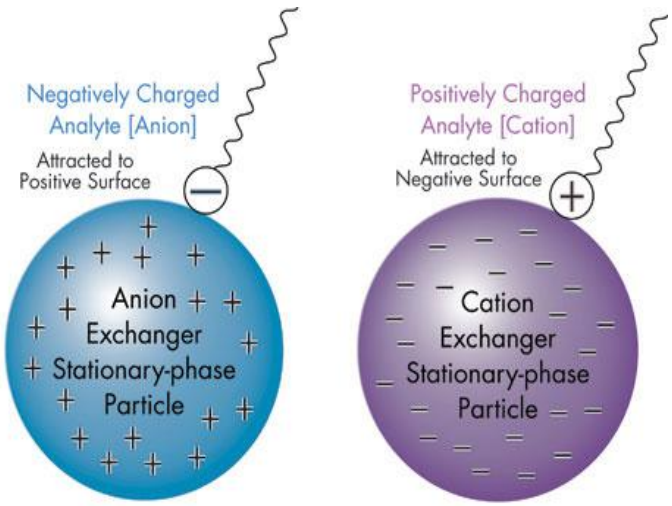
C_2 = concentration of unknown

السؤال الثاني:

(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:

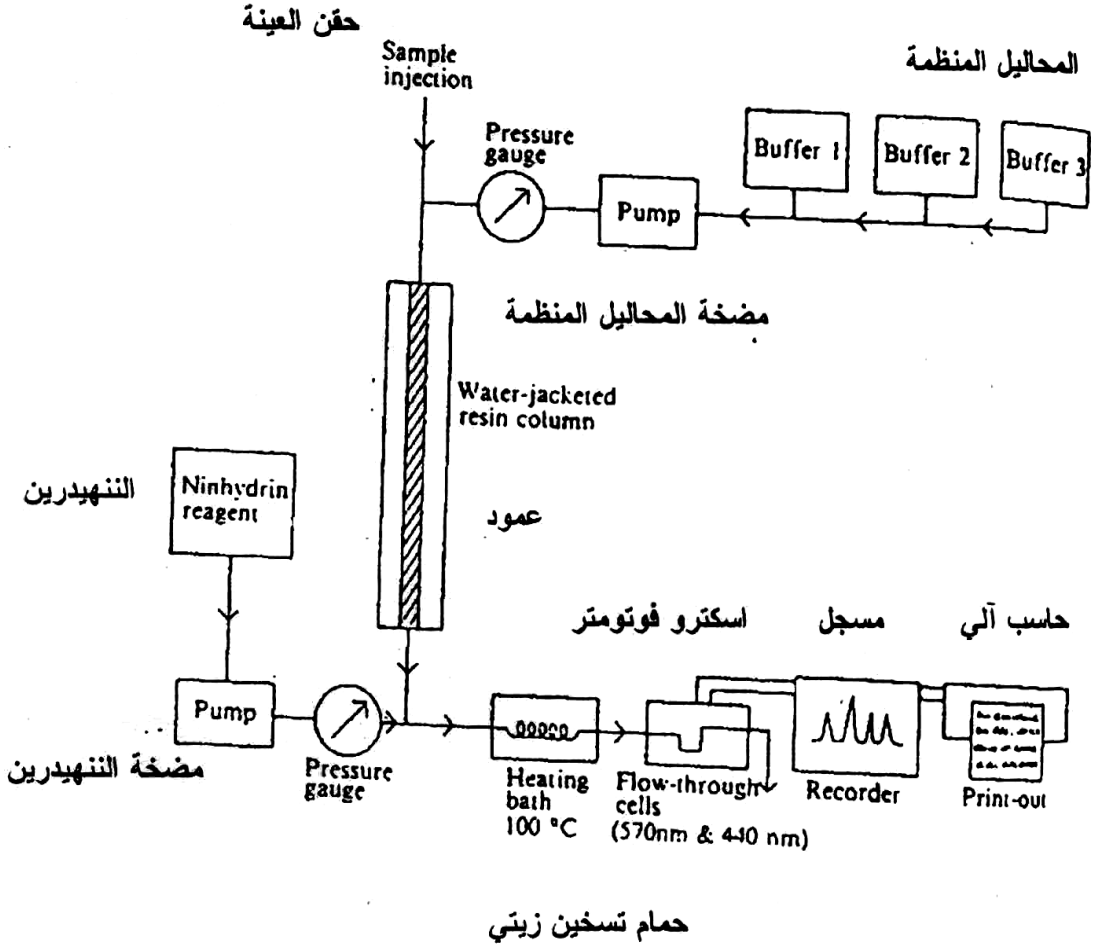


Gel filtrationماذا يعنى الفصل بـ

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- كيف يمكن تقدير الحماض الأمينيه بواسطة جهاز الـ Amino acid analyzerمبينا تركيب الجهاز وتجهيز العينة وميكانيكية الفصل وتفاعل النهيدرين مع الأحماض الأمينيه الخارجه من العمود وعيوب هذه الطريقة وكيفية التغلب عليها.

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 :

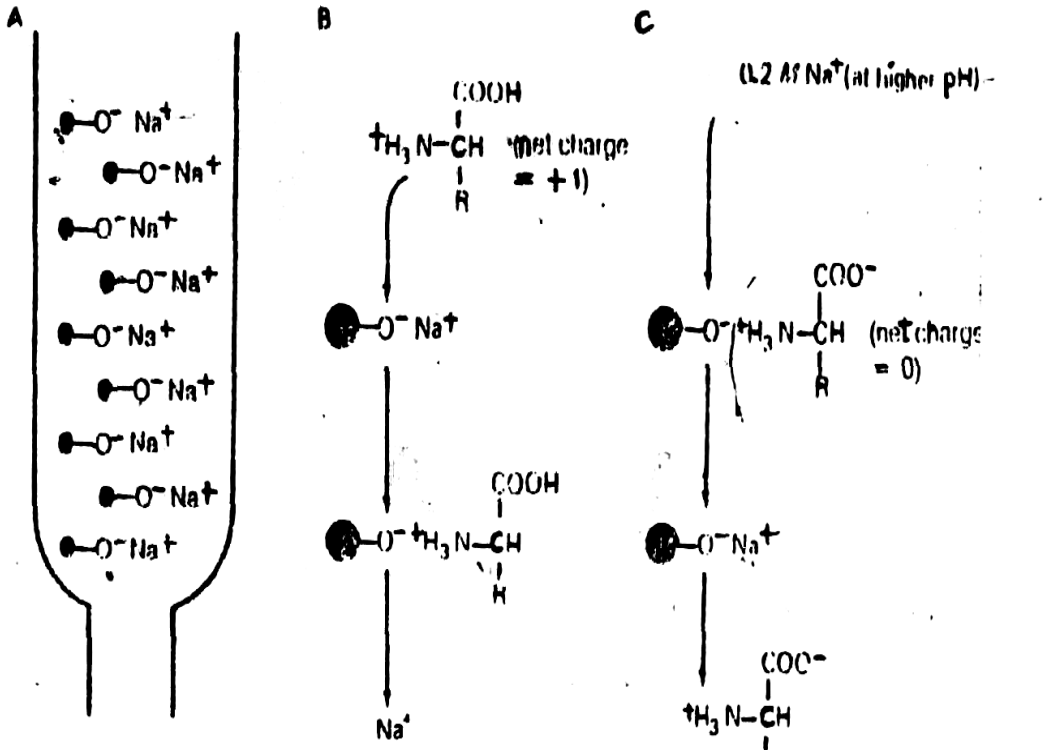
العمود الأول Short column: يستخدم في فصل الأحماض الأمينية القاعدية .

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

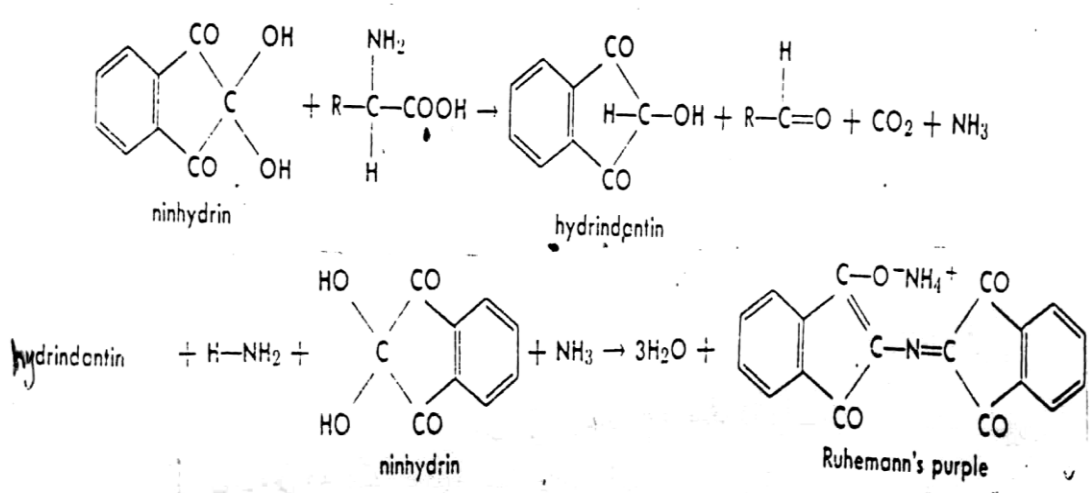
(B) تبادل الحامض الأميني مع أيون الصوديوم .

(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

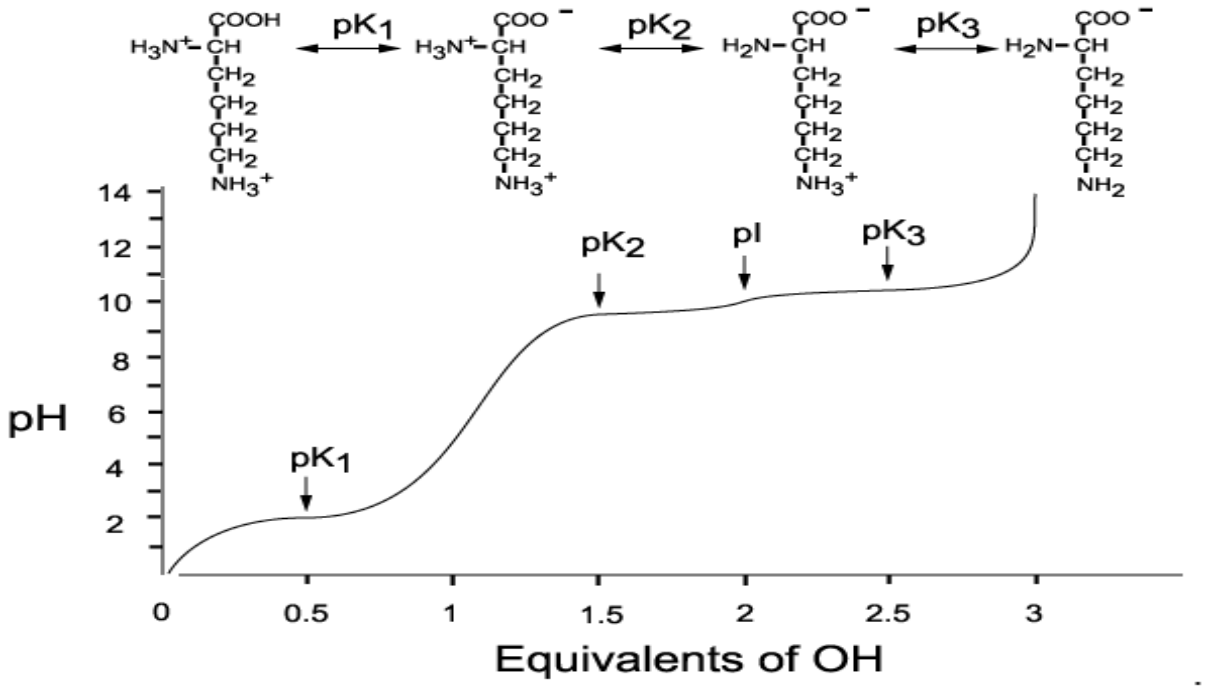
$PI = 1/2 (Pka_1 + Pka_2)$

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.

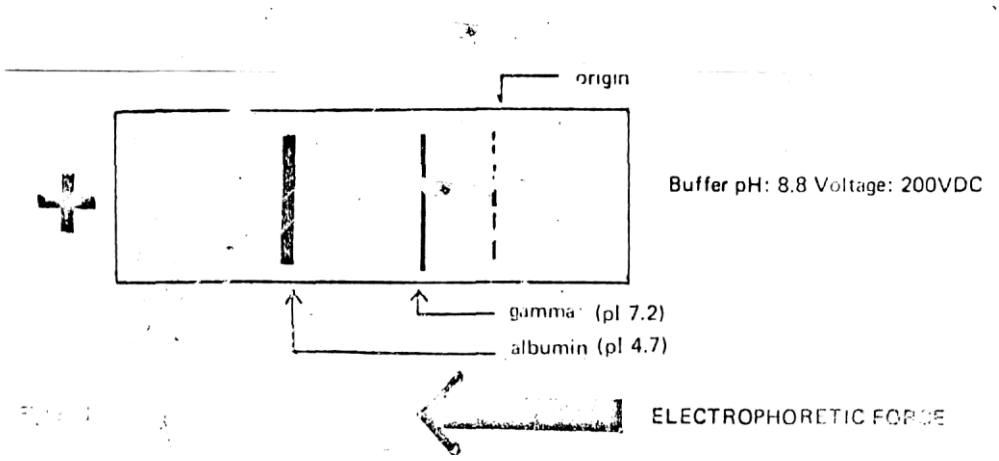
في حالة الأحماض الأمينية القاعدية مثل الليسين



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:

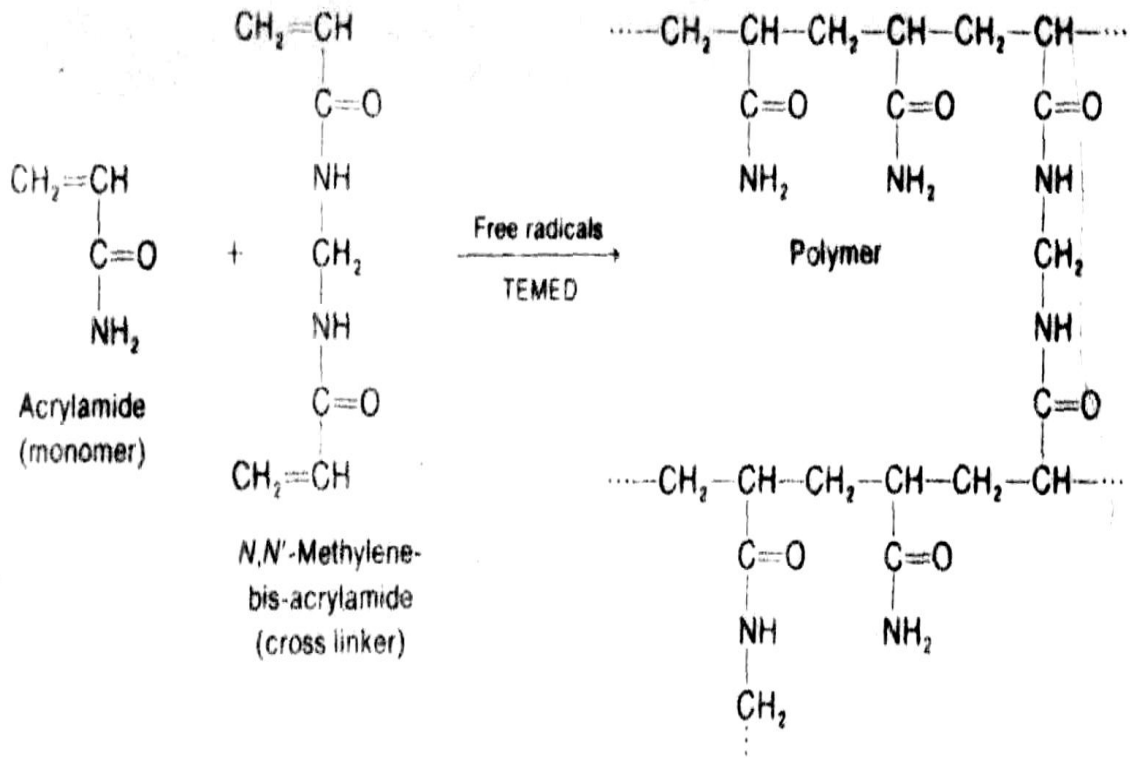
ب- الحجم Size

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