نموذج استرشادى لإجابة امتحان نظري لمادة كيمياء تحليلية وأجهزة
لطلاب الفرقة الرابعة شعبة الكيمياء الحيوية
العام الجامعي 2013/2012 الفصل الدراسي االثانى

إجابة السؤال الأول :-

1- أشرح طريقة فصل وتقدير المركبات باستعمال كلامن (كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة ، التحليل الكروماتوجرافى بالاعمدة)

ج- 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 13 % كبريتات كالسيوم.

Silica gel GF: – سليكاجيل مضاف إليها دليل فلورة.

Silica gel R: – تحتوى على 5% 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 1–5 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 20× 25 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 2 سم وقبل انتهاء الشريحة بمسافة 2 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:

1) طريقة الصب 2) طريقة الغمر

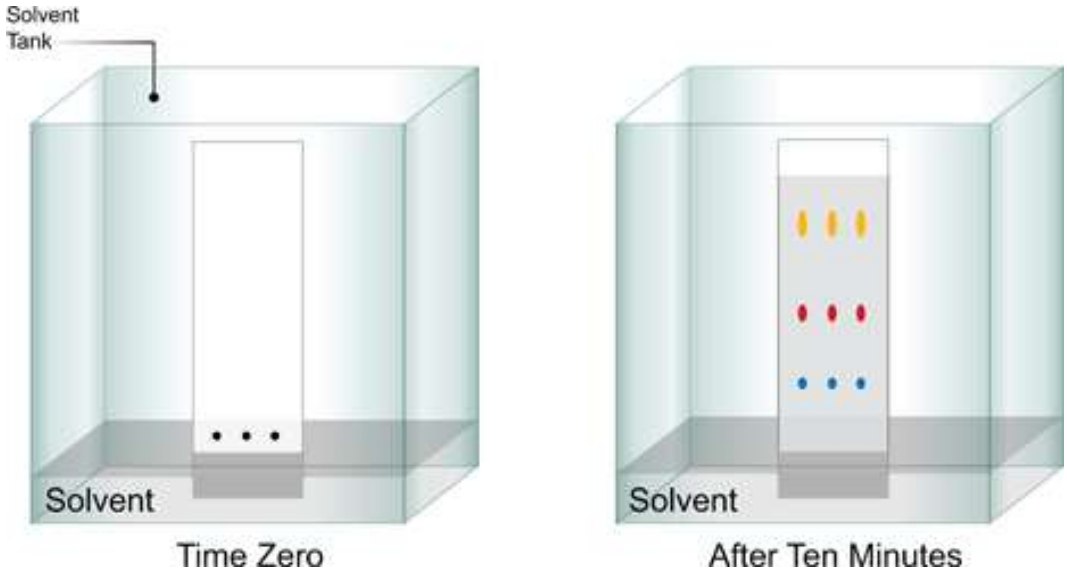
3) طريقة الفرد 4) طريقة الرش

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 الاتية .



* استخدام الأشعة الفوق بنفسجية UV

* استخدام جواهر كشافة وقياس الكثافة الضوئية بإستخدام Spectrophotometer .

*** التقدير الكمى على الورق أو اللوح :**

توجد عدة طرق وهى

1)المقارنة البصرية

2) التقدير بواسطة حساب مساحة البقع

3) تقدير النفاذية للبقع الملونة أو المكربنة أو التى تمتص الأشعة الفوق البنفسجية.

*** مميزات TLC عن Paper Chromatography**

1) 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 16 – 24 ساعة .

2) تكون البقع مندمجة Compact والفصل ممتاز .

3) 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.

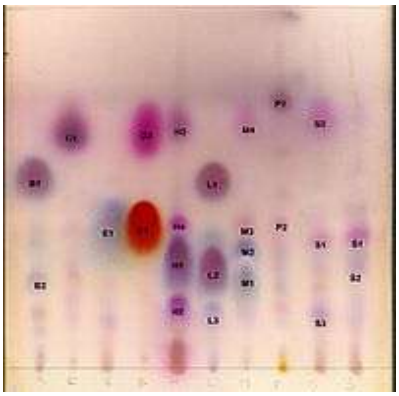
4) تستعمل كميات قليلة من المواد المراد تحليلها كما إنها تستخلص كل مكونات العينة .

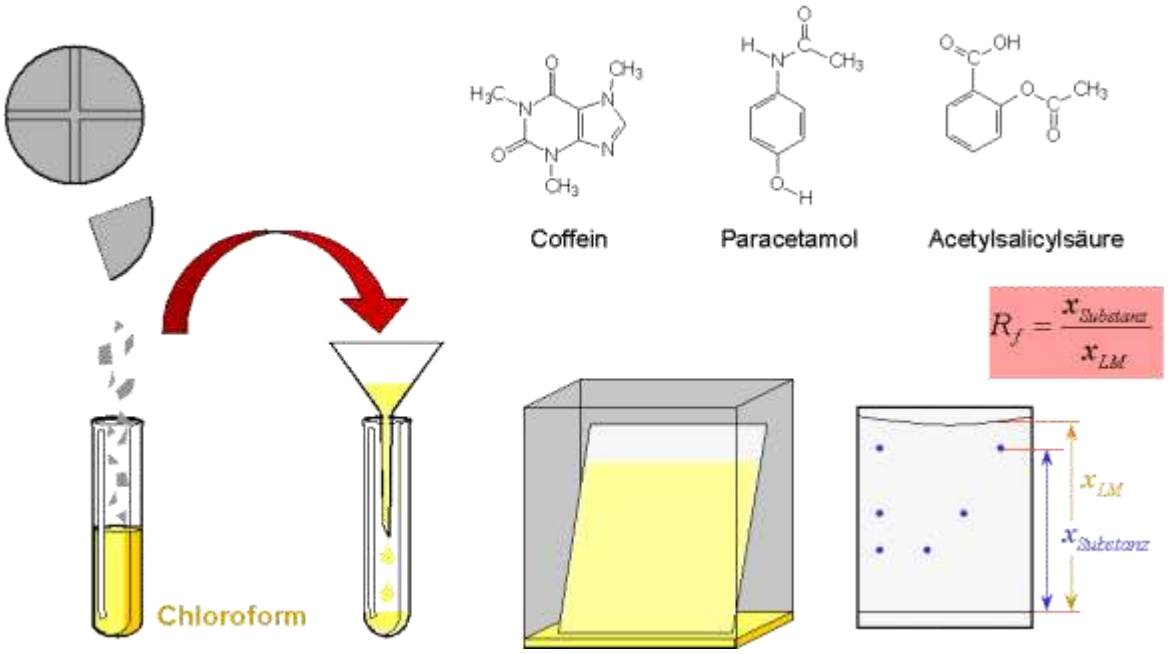
5) تستعمل مواد لتعيين موضع المركبات المفصولة مثل حمض الكبريتيك وترش على السيلكاجيل أو الومنيوم دون أن تتأثر على العكس من التحليل الكروماتوجرافى الورقى .

* حجم المذيب الذى يستخدم فى عمل Slurry = 2.5 × عدد الألواح × سمك اللوح (سم) × بعد اللوح (سم).

* النسبة بين الماء والسليكاجيل = 2 : 1

* السليكاجيل تحتوى على كبريتات كالسيوم بنسبة 10% من وزنها.





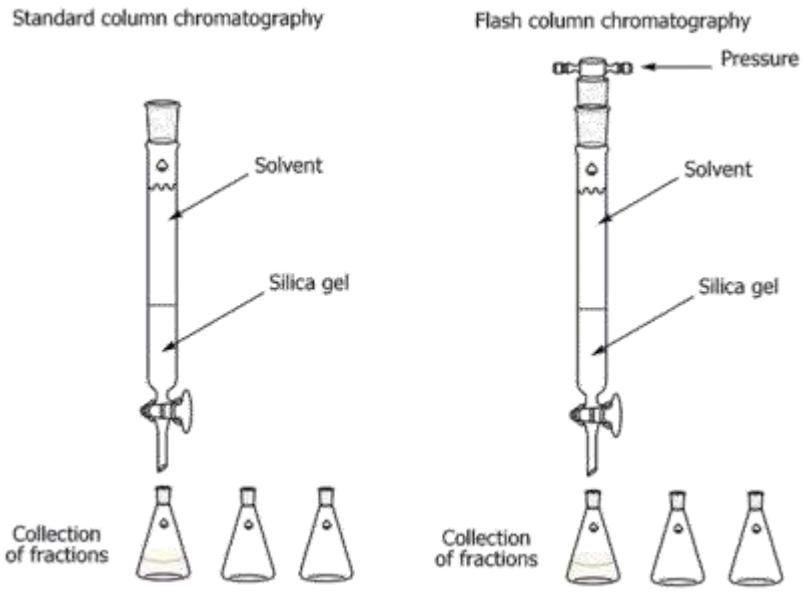
ثانيا) كروماتوجرافى الأعمدة Cloumn Chromatography :-

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 :-

1- يتم التنظيف جيدا للعامود الكروماتوجرافى ويوضح أسفله طبقة من الصوف الزجاجى وتعبأ مادة الادمصاص ثم توضح طبقة أخرى من الصوف الزجاجى أعلى مادة الادمصاص.

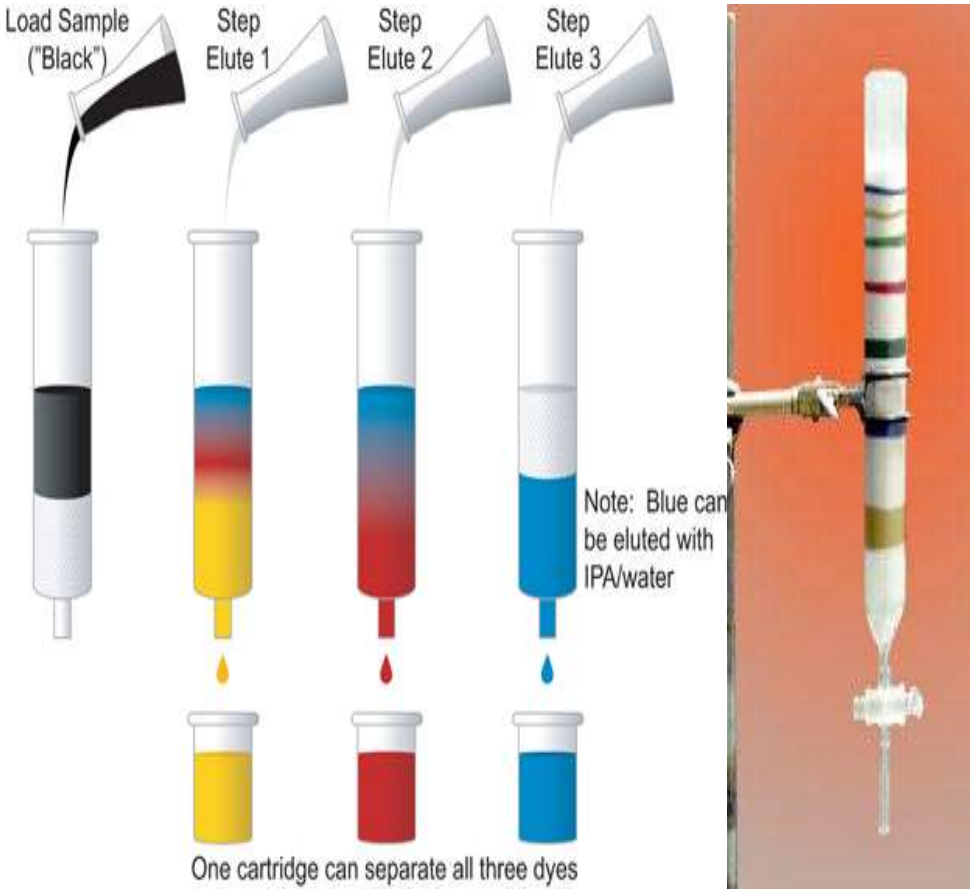
2- يذاب مخلوط المركبات المراد فصلها وتقديرها فى مذيب وينقل إلى العامود الكروماتوجرافى بواسطة قمح فيحدث إدمصاص للمركبات المختلفة كل على حسب قدرته على الادمصاص وبالتالى تتحرك المركبات على مسافات مختلفة على هيئة مناطق Zones وتظهر المناطق بوضوح إذا كان المادة المراد فصلها لها لون مميز.

3- 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 :


Load Sample
("Black")
Step
Elute 1
Step
Elute 2
Step
Elute 3
Note: Blue can
be eluted with
IPA/water
One cartridge can separate all three dyes

وبعد الحصول على كل مركب على حدة **يتم تقديرة كميا**

أ) بالوزن بعد تبخير المذيب من كل دورق.

ب) أو بإضافة جواهر كشافة تعطى لون معين ويقياس الكثافة الضوئية باستخدام جهاز Spectrophotometer يمكن معرفة تركيز كل مركب على حدة .

جـ) أو بإستخدام الأشعة الفوق البنفسجية وذلك فى حالة المركبات التى تعطى وميض مثل الفيتامينات الذائبة فى الدهون A, D, E,K .

العوامل التى تحدد مكان المادة المراد فصلها على العامود الكروماتوجرافى:-

1) طبيعة مادة الادمصاص.
2) طبيعة المذيب المستخدم.
3) طبيعة المادة المراد فصلها .
4) عوامل أخرى مثل التركيز ودرجة الحرارة .

2- تكلم باختصار عن كل مما يأتى :-

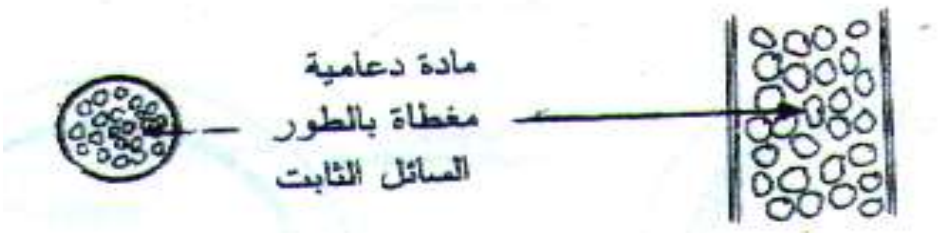
RRt – Chromatogram -Packed column – Rf value - thermal conductivity detector – Flame ionization detector- Hallow cathodes lamp

RRt عبارة عن مقارنة الزمن اللازم انقضاءة لخروج peak المادة القياسية مع العينة المجهولة

Chromatogram عبارة عن الشريط الورقى الذى يخرج من اجهزة التحليل الكروماتوجرافى وفية يحدد زمن خروج كل مركب وتركيزة

Packed column الأعمدة الحلزونية: Packed Column

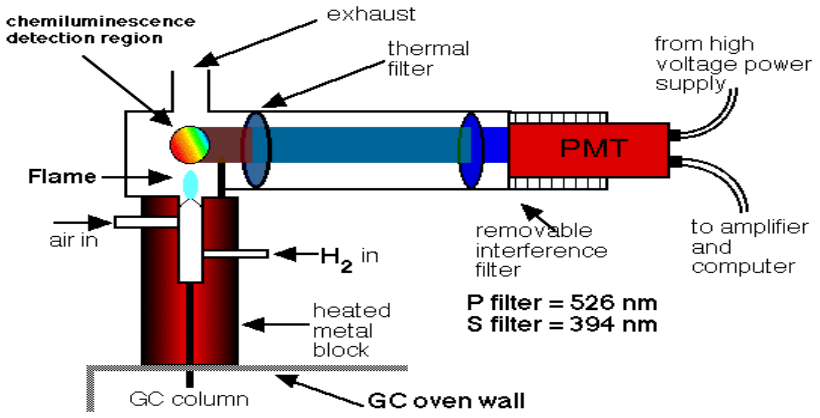
وتستعمل فى هذه الأعمدة مادة حاملة كدعامة support فى صورة حبيبات صغيرة الحجم بينهما فراغات تسمح بسريان الغاز خلالها بمعدل مناسب كما يمكنها أن تتغلف بطبقة رقيقة من السائل المستخدم كطور ثابت ومن المواد المستعملة الزجاج المجروش أو الرمل أو بعض الأتربة الطبيعية والسوائل التى تعمل كطور ثابت وتمسك فى صورة غشاء 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 .



Rf valu المسافة التى يتحركها المركب الى المسافة التى يتحركها المذيب

) جهاز الكشف القائم على التوصيل الحرارى Thermal conductivity detector

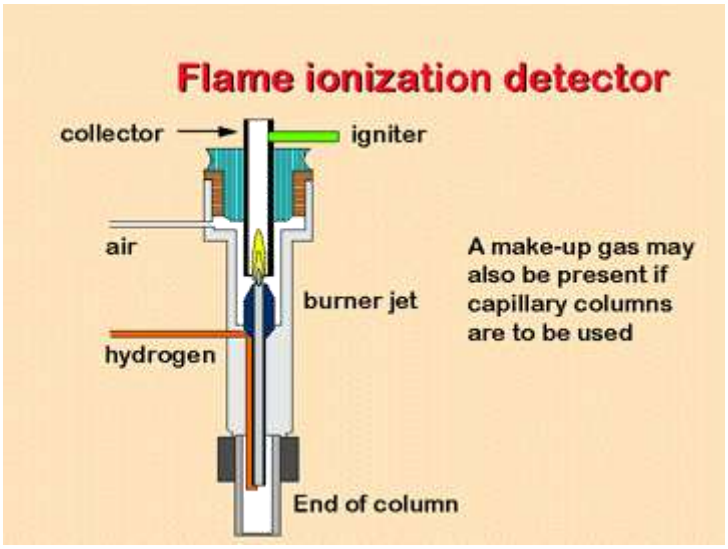
حيث يوجد بخلية التوصيل الحرارى سلك رفيع ترتفع درجة حرارته بتأثير تيار كهربى . وبمرور تيار ثابت من الغاز الخامل النقى فإن كمية الحرارة المفقودة من السلك تظل ثابتة وعندما يحمل تيار الغاز الخامل بعض المركبات المفصولة فإنه يحدث اختلاف فى درجة حرارة السلك يمكن تسجيله ومن الطبيعى فإن هذا الاختلاف يتوقف على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



2) جهاز الكشف القائم على التأين باللهب Flam ionization detector (FID)

يعتبر هذا النوع من أكثر الأنواع استخداما فى التحليل الكروماتوجرافى الغازى وأن سرعة استجابته هى 100 sec عندما تستخدم حجوم صغيرة جدا من العينات ويعتمد هذا الـ Detector على أساس أن التوصيل الالكترونى للغاز يتناسب طرديا مع عدد الأيونات الموجودة ويتكون أساسيا من Electrode gap ومصدر التأين لبعض الجزيئات وتنزح هذه الجزيئات المشحونة إلى

Electrode gap وبالتالى يمر خلال gap ويقاس من خلال دائرة.



ثالثا:- ماهو الاساس العلمى الذى بنى علية جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائل HPLC مع شرح مبسط لتركيب الجهاز

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 (

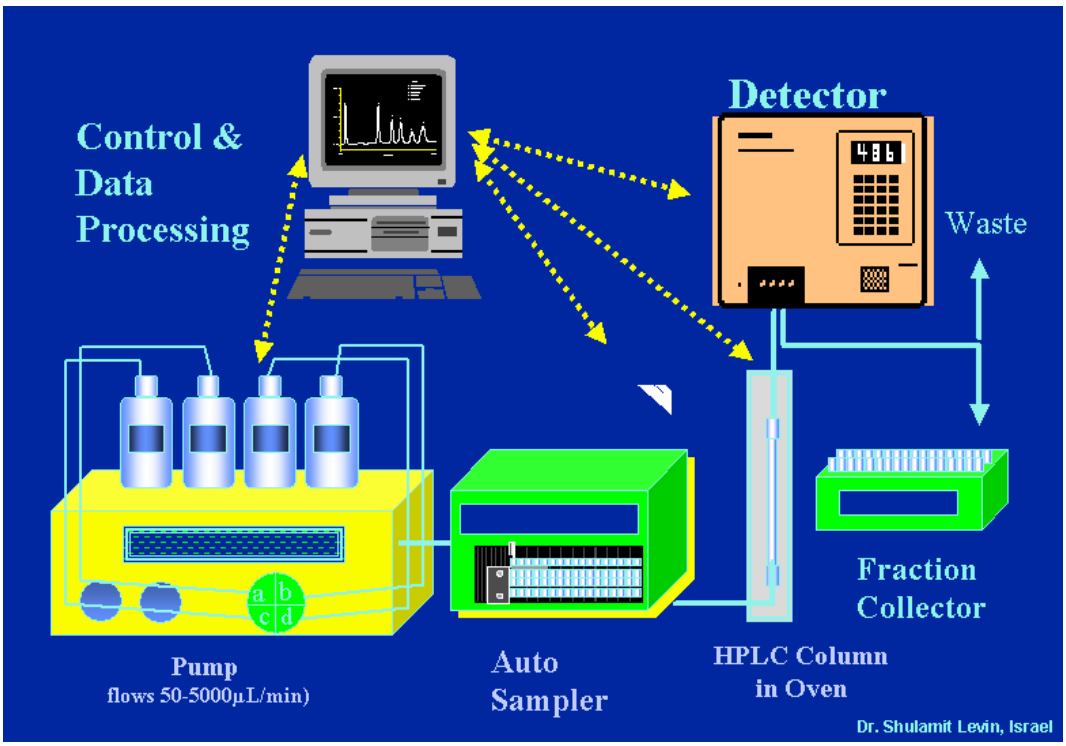
سائل أو صلب) وعادة يكون الطور الثابت فى عمود طوله حوالي 25 سم وقطره 4 مم . وتعتمد كفاءة الفصل على مواصفات العمود وبصفة خاصة قطر جزيئات المادة المعبأة ويلاحظ أن خفض قطر الجزيئات يؤدي إلى تحسين أداء العمود بالإضافة إلى أنه يرفع الضغط بالتالي نحصل على معدل سريان مناسب للطور المتحرك خلال العمود ولهذا السبب 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 .

ويمتاز الكروماتوجرام بالآتي :

1- المركب الذي يمر خلال العمود يكون تحت ظروف موحدة كما يكون ثابتاً ويسمى Retention time كما أن مقارنة الأرقام Retention مع المواد القياسية يعطي وسيلة للتحليل الوصفى .

2- المساحة تحت الـ Peak فى الكروماتوجرام تتناسب طردياً مع تركيز المكون فى العينة وبالتالي فإن التحليل الكروماتوجرافي السائل يمكن استخدامه فى التقدير الكمي .

تركيب جهاز التحليل الكروماتوجرافي السائل



المضخة : Pump

الشروط الواجب مراعاتها فى نظام ضخ المذيبات

* الضغط العام لا يزيد عن 6000 رطل / بوصة .
* تعطي مقدرة على ضخ المذيب بمعدل صفر – 10 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.

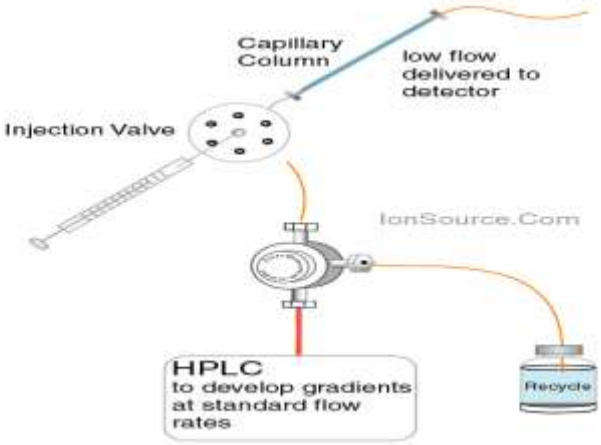
الأعمدة Columns

الأعمدة الشائع استخدامها فى جهاز الـ HPLC يتراوح طولها بين 10– 30 سم والقطر الداخلي يتراوح بين 4 – 10 مم وقطر الحبيبات الشائع استخدامها يتراوح بين 5–10 ميكروميتر . وعادة يكون العمود بطول 25 سم وقطره 4 مم وقطر الجزيئات 5 ميكروميتر وفى أجهزة الـ HPLC الحديثة تستخدم أعمدة ذات أبعاد أصغر حيث يتراوح طول العمود بين 3–7.5 سم وقطره 1–4.6 مم وقطر الحبيبات 3–5 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 1–2سم/دقيقة . فإذا كان عمود أبعاده 25سم × 4 مم ومعبأة بجزيئات قطرها 15 ميكروميتر فإنه يتطلب حوالي 30 ض.ج للحصول على معدل سريان 1سم على الدقيقة من الهيكسان وإلى ضغط جوي قدره 50 للحصول على معدل سريان مناسب للمذيبات والأكثر لزوجة مثل الماء .

وللحصول على معدل السريان المناسب لابد أن تكون حجم الحبيبات صغيرة يتراوح قطرها بين 3–10 ميكروميتر . وهذا هو الشائع فى أجهزة التحليل الكروماتوجرافي الحديثة كذلك لابد من وجود ضغط عالي يصل إلى 100 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 60–80 ^{5}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 .

3- To prepare a standard soln. 15 ml of 0.0215 M soln. of KMnO4 was diluted to 500 ml. A series of standard was prepared by diluting from 1 to 10 ml of the main soln. at intervals of 1 ml in 25 ml of water. A steel sample having a mass of 0.5 g was dissolved in acid and after appropriate treatment the soln. was

diluted to 100 ml. The resulting soln. had a color intermediate between the fourth and fifth standards.

Calculate the percentage of the Mn in the steel.

Con. of stock solution = 15x0.0215 = 500 xC

C = (15x0.0215)/500 = 0.000645 M

Con. of fourth standard = 4x0.000645 = 25xC

C = 0.0001032 M

Con. of fifth standard = 5x0.000645 = 25xC

C = 0.000129 M

Con. of steal solution = (0.0001032 + 0.000129)/2

= 0.0001161 M

Percentage of Mn of steel

= (0.0001161x100x55x100)/(1000x0.5) = 0.13%

السؤال الثاني:- **(30 درجة)**

1- Factors affecting 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 (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

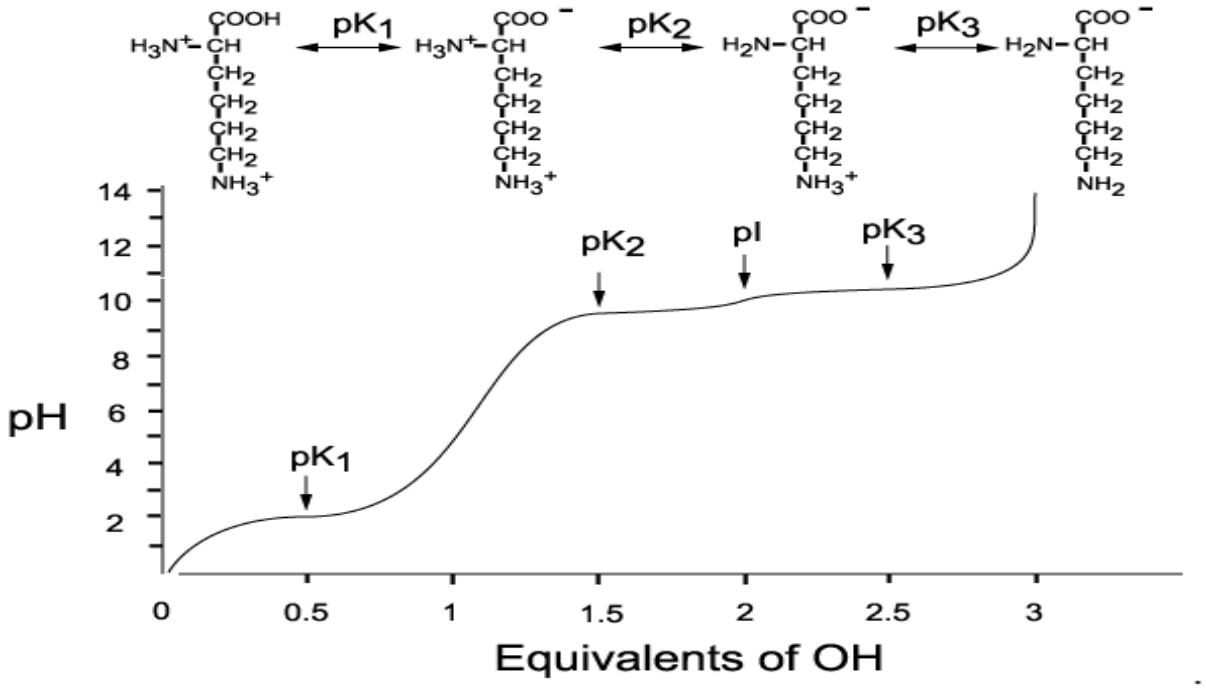
$PI= 1/2 (Pka_1+ Pka_2)$

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.

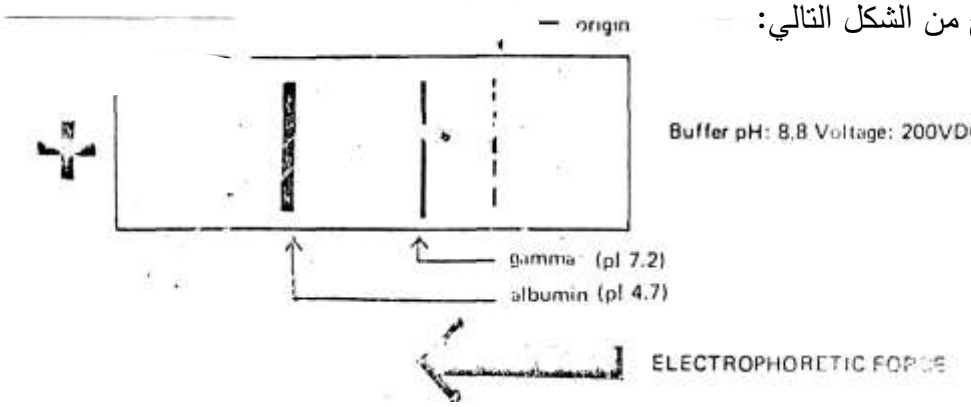
في حالة الأحماض الأمينية القاعدية مثل الليسين



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.

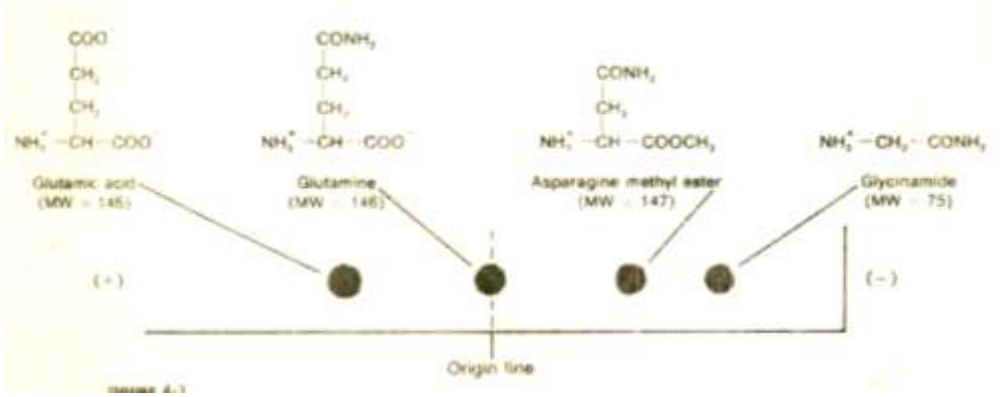
ويمكن وضع العوامل التي تؤثر علي معدل التحرك في المعادلة التالية

Mobility of molecule =

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

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.

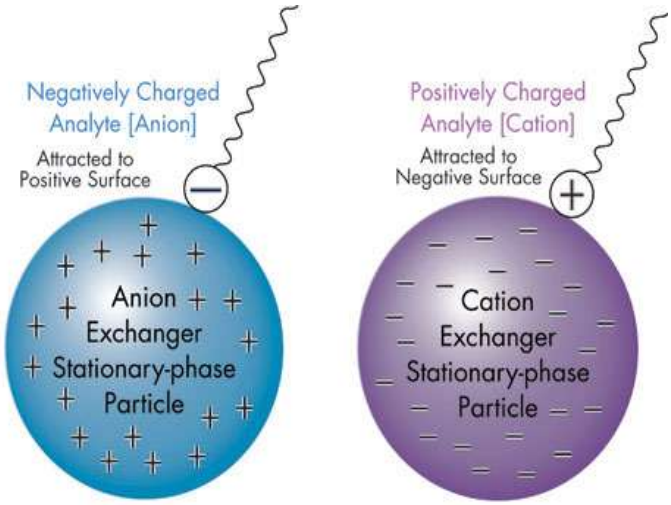
ومن المعادلة أيضا يتضح أنه كلما زاد حجم وشكل الجزئ قل معدل التحرك والمثال التالي يوضح ذلك:

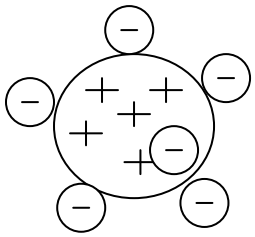


Ion exchange chromatography. (التبادل الايونى)

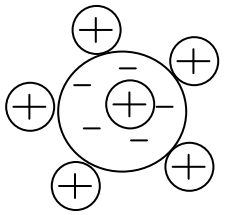
حيث يعتمد فصل وتحليل المركبات علي إمكانية تبادلها مع الأيونات الموجودة علي سطح مواد خاصة تعرف بمواد التبادل الأيونى Ion exchanger وهي عبارة عن مادة غير ذائبة تحتوي علي بعض المجموعات التي تحمل شحنات ويحيط بها أيونات ذات شحنات مضادة وهذه الأيونات حرة الحركة بعكس المجموعات المشحونة التي تكون مرتبطة كيميائيا 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:





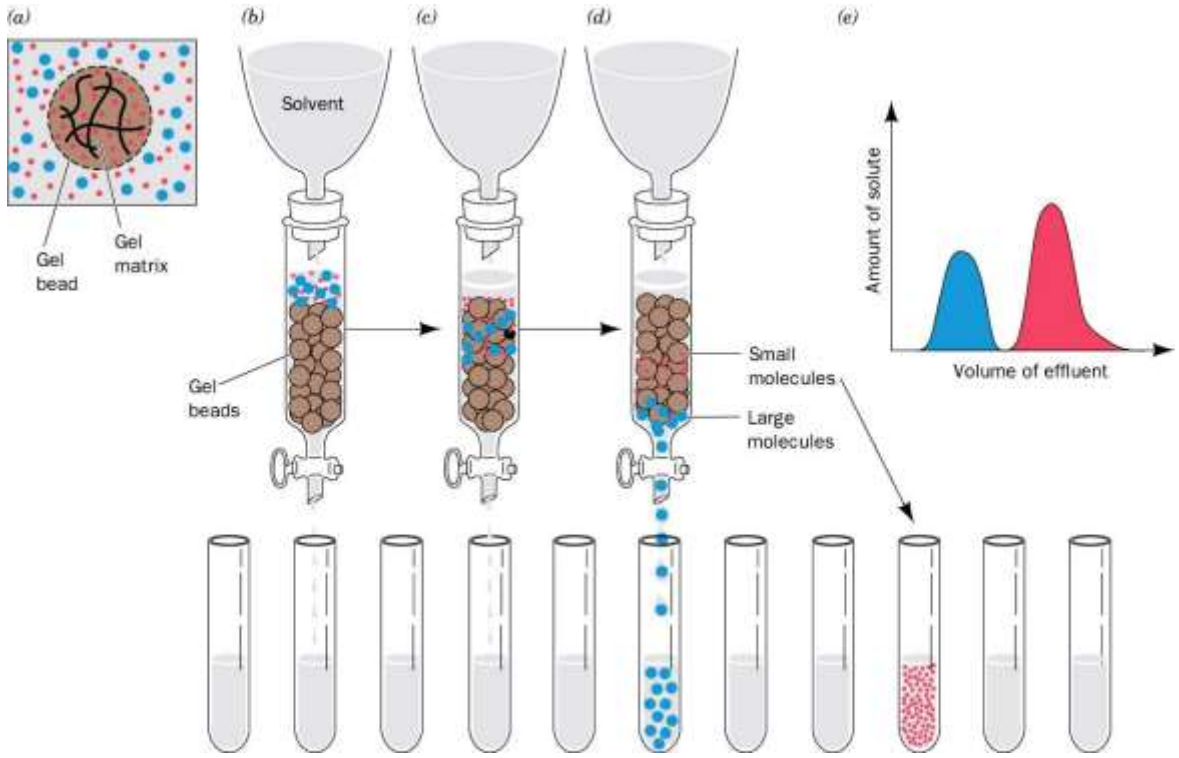
Anion exchanger with exchangeable counter-ions



Cation exchanger with exchangeable counter-ions

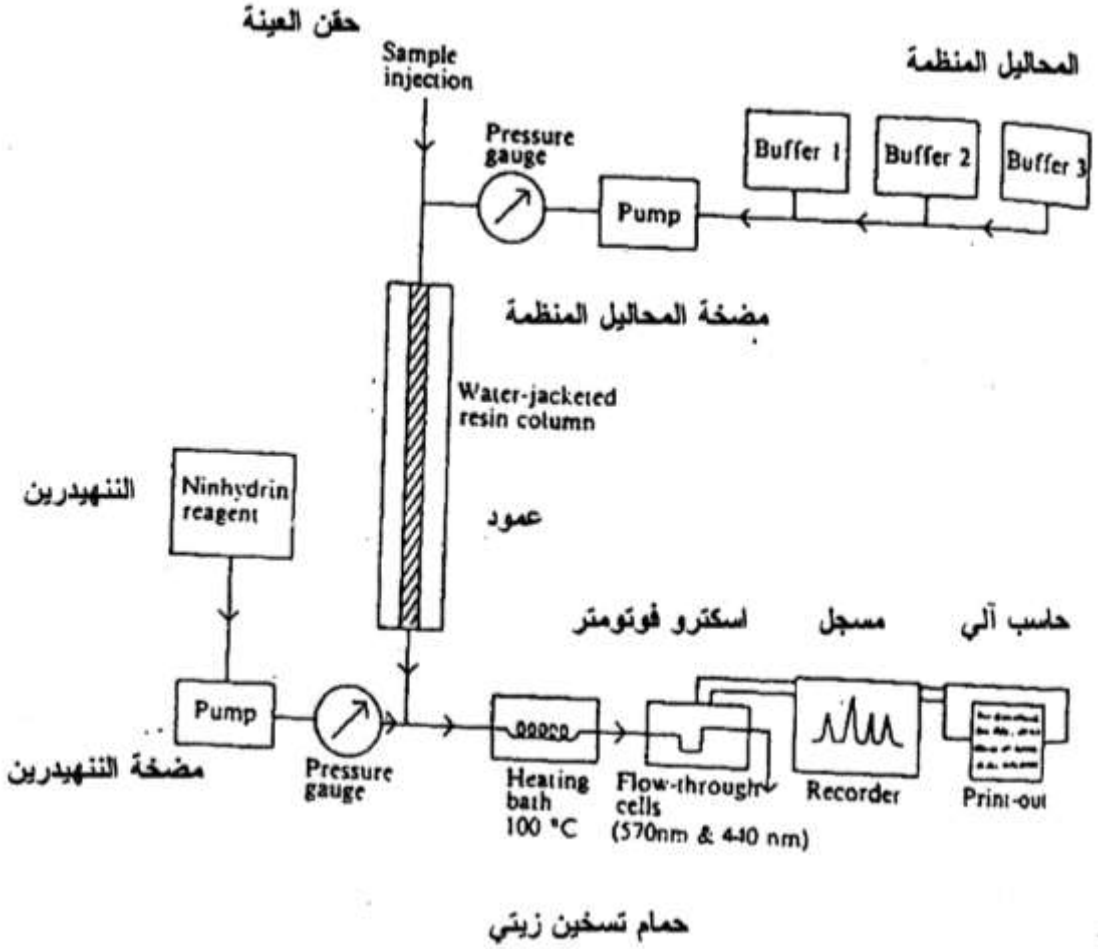
- **Gel Filtration .**

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 exolusion.



1- Determination of amino acids by using 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 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 السترات pH = 3 ثم تحقن العينة في جهاز تقدير الأحماض الأمينية Amino acid analyzer .

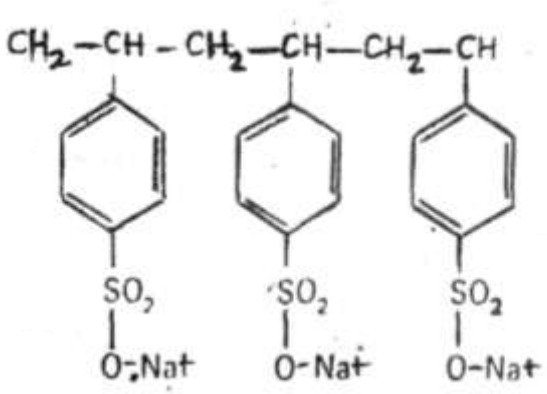
طريقة الفصل :

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

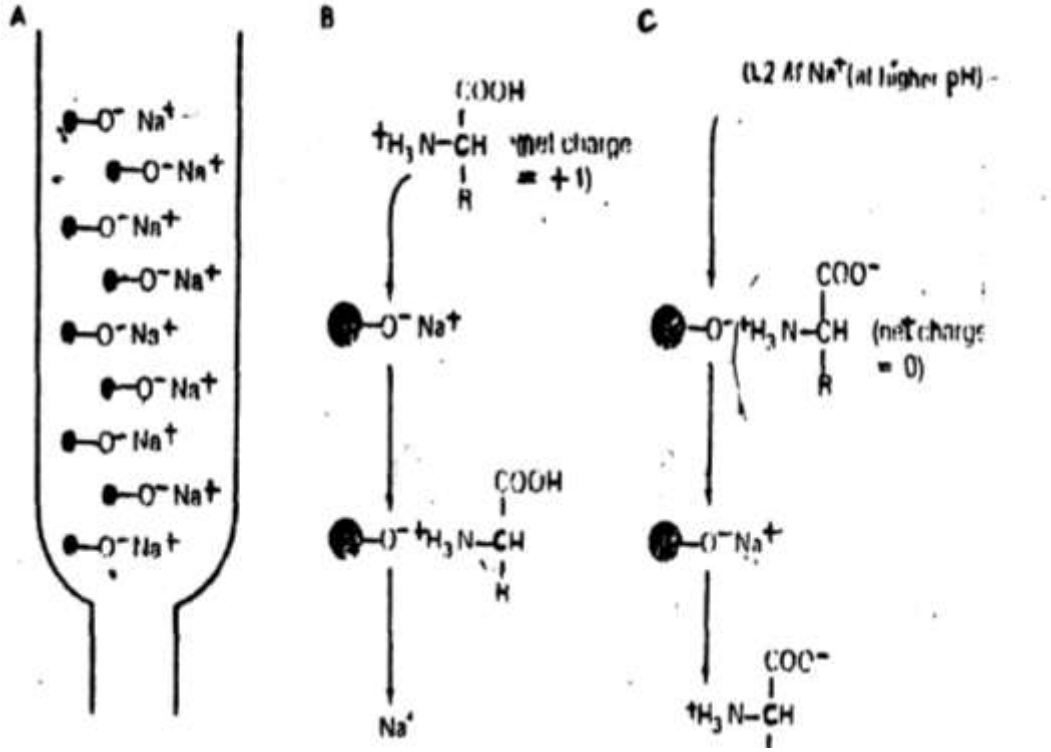
العمود الأول Short column: يستخدم في فصل الأحماض الأمينية القاعدية .

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 .

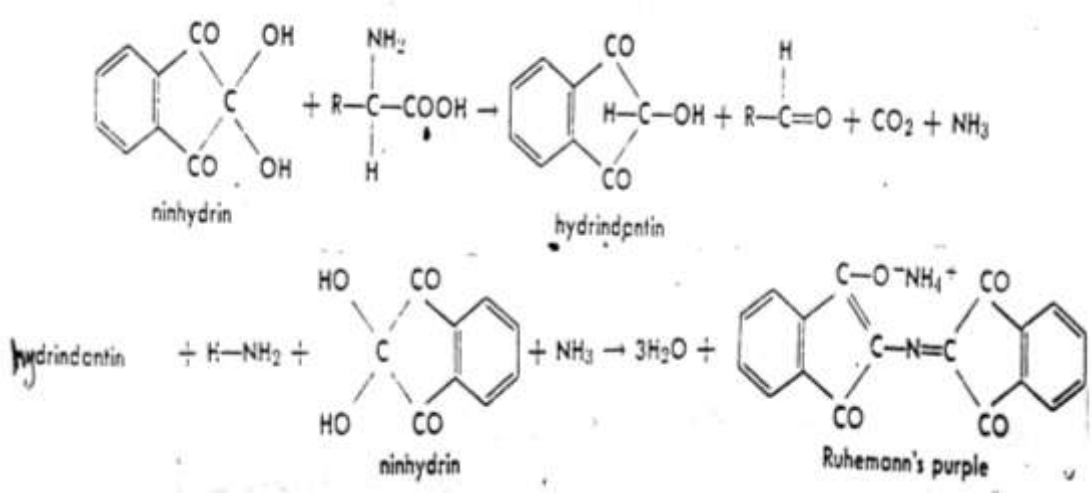
(C) إحلال Na^+ محل الحامض الأميني باستخدام محلول ذو pH عالى.

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:



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 :

1. 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 .
2. يزود الحاسب الآلى بالـ R_t لكل حامض أميني قياسى وتركيزه .
3. 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 .

4. يحول تركيز الحمض الأميني من nM إلي ng بالضرب في الوزن الجزيئى للحمض الأميني .
5. يحسب تركيز الحمض الأميني علي أساس % mg أو أى نوع أخر للدلالة علي التركيز. يجب الأخذ في الاعتبار أى تخفيف أجرى أثناء التحليل .

Formation of polyacrylamide gel. (تكوين الجيل