

الباب الخامس:

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

لو أنضيت وفيت وعمري أتفرط
مش عاوز الجأ للحلـول الوسـط
وكمان شطط وجنون مائش عاوز
يامين يقول لي الصح فين والغلط؟؟
عجبي !!!

صلاح جاهين ... رباعيات

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

خلال السنوات الأخيرة ظهر العديد من الأجهزة العلمية وانتشر بصورة كبيرة على مستوي العالم ولا يكاد يوجد معمل علمي يخلوا من الأجهزة العلمية الدقيقة المستخدمة في التحليل. ونظراً لأهمية استخدام تلك الأجهزة والاعتماد عليها بصورة كبيرة فأنا في هذا الباب سوف نتناول بالشرح أهم الأجهزة العلمية العملية الدارجة الوجود في المعامل من حيث نظرية عملها وتركيب الجهاز بأجزائه المختلفة حتى يتسني لنا استخدام تلك الأجهزة بدقة للحصول على النتائج المرجوة من الدراسة.

الأجهزة التي تعمل بنظرية الضوء

(Spectrophotometry and Colorimetry)

للتعرف على كيفية عمل هذه الأجهزة لابد من التعرف أولاً على النظرية الكهرومغناطيسية للضوء والتي نستدل منها أن الضوء يسير في صورة موجات ضوئية يمكن وصفها بالعوامل الرئيسية الثلاث التالية:

- الطول الموجي Wave length
- التردد Frequency
- الطاقة Energy

وكما سبق أن ذكرنا في تقدير لون الثمار أن الضوء المرئي هو المنحصر بين طول موجي قدرة 400 إلى 770 نانوميتر والشعاع الضوئي الذي يزيد طوله عن هذا الحد يقع في مجال الأشعة فوق البنفسجية، والشعاع الذي يقل طوله عن المدى المذكور يقع في مجال الأشعة تحت الحمراء وكلاهما لا يمكن رؤيته بالعين المجردة.

عملية امتصاص الضوء Light Absorption

لكل ذرة وبالتالي لكل جزيء لأي مادة كيميائية مستوى طاقة معين (Energy Level) وعندما يتطابق مستوى الطاقة للأشعة التي تسقط على مادة معينة مع مستوى الطاقة لجزيئات هذه المادة يحدث امتصاص لطاقة الإشعاع داخل المادة. وعملية نقل الطاقة من الإشعاع إلى المادة تعرف بالامتصاص Absorption والسوائل والمواد الشفافة الأخرى تظهر لونا معيناً عندما تمتص اختياريًا أطوال موجية من طاقة الإشعاع الطيفي في المجال المرئي Visible Region. وتتناسب الطاقة الإشعاعية الممتصة داخل عينة ما عند طول موجي محدد مع تركيز المادة الفعالة في تلك العينة.

ولإيضاح الأمر لابد لنا أن نتعرف على قانون بير Beer والذي يتناول هذه النظرية

قانون بير Beer Law

ينص قانون بير على أن الكثافة الضوئية O.D. لمحلول ما تتناسب طردياً مع تركيز المحلول وطول المسار الضوئي داخل المحلول.

• لنفرض أن I_0 هو شدة الشعاع الضوئي الداخل للمحلول و I هو شدة الشعاع النافذ من المحلول

• فإن نفاذية المحلول T هي $T = \frac{I}{I_0}$

• ونسبة النفاذية = $T \times 100$ وتُعرف الكثافة الضوئية للمحلول

بأنها مقلوب لوغاريتم النفاذية $OD = \log \frac{1}{T}$

- إذاً $OD = 2 - \log T \%$
- ووفقاً لقانون بيرفان $OD \propto C \times L$ حيث C تركيز المحلول و L طول مسار الضوء داخل المحلول.
- إذاً $OD = ECL$ حيث E ثابت ويعرف بـ Extinction Coefficient

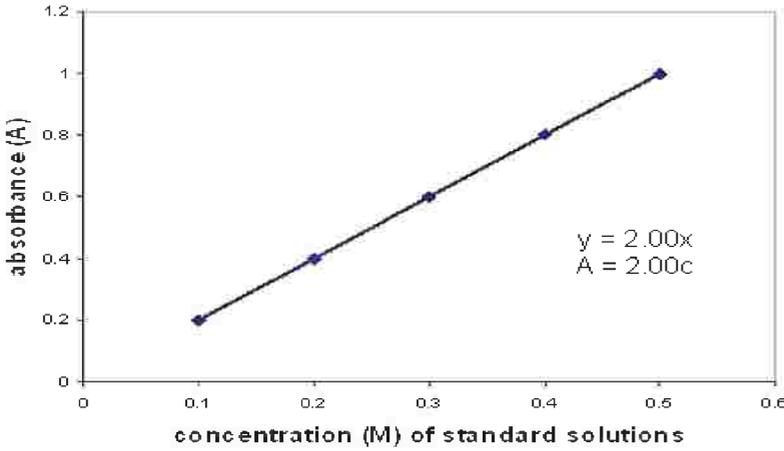


Figure 1: Beer's Law "standard curve"

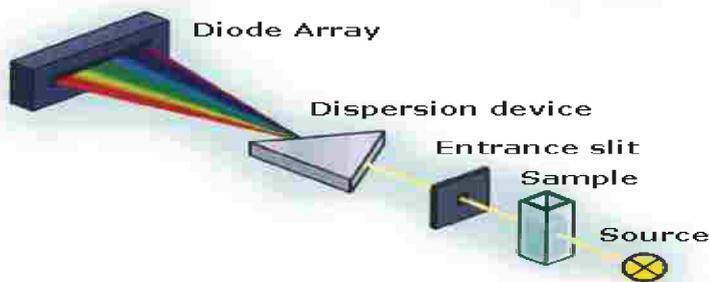
: Colorimeter جهاز الكلوريميتر

يستخدم في هذا الجهاز لمبة تنجستن Tungsten lamp كمصدر للإشعاع الطيفي. ويوجد فلتر يقوم بعزل موجات الطيف التي عندها يكون للمواد المختبرة أعلى قدرة علي الامتصاص ثم يمرر الطيف المعزول من الضوء بواسطة الفلتر خلال العينة

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

الموجودة داخل الأنبوبة الخاصة للجهاز (الكيوفت) والمثبتة في مسار الضوء حيث تقوم بامتصاص جزء من طاقة الأشعة الساقطة. بالتالي فإن الطيف الضوئي النافذ من العينة تنخفض شدته بما يتناسب مع تركيز العينة في المحلول.

والضوء النافذ من العينة يمر على خلية ضوئية Photo cell والتي تحول الإشارات الضوئية إلى إشارات كهربائية والتي يتم قراءتها بعد ذلك على تدريج مناسب في صورة نفاذية Transmittance أو كثافة ضوئية optical density (O.D.)



رسم تخطيطي يوضح المكونات الرئيسية للجهاز وكيفية عملة

وعند القياس على الجهاز يتم ترك الجهاز يعمل لمدة ربع ساعة تقريباً ثم بعدها يتم تقدير العينات بعد ضبط حساسية الجهاز.

جهاز الأسبكتروفوتوميتر Spectrophotometer



الشكل العام لجهاز الأسبكتروفوتوميتر

جهاز الأسبكتروفوتوميتر يتكون بصفة عامة من جزأين أساسيين وهما الأسبكتروميتر Spectrometer والذي يمثل مصدر الضوء المتصل عند الطول الموجي المرغوب والجزء الثاني هو الفوتوميتر Photometer الذي يقيس كثافة الضوء في الحزمة الضوئية بعدد مروره على العينة المراد قياسها .

وتوضع العينة بين الجزئين السابقين بحيث تمر الحزمة الضوئية خلالها فيتم امتصاص أشعة معينة وينفذ الجزء الباقي من العينة. وكمية الأشعة النافذة يتم قياسها أوتوماتيكياً بواسطة الـ Photometer حيث يتم تحويله من طاقة ضوئية إلى كهربائية تقاس غالباً باستخدام الجلفانوميتر Galvanometer.

ومصدر الضوء في جهاز الأسبكتروفوتوميتر هو لمبة تنجستن في حالة القياس في الضوء المرئي الذي يتراوح ما بين 380 : 770 nm ولمبة هيدروجين أو ديتريوم

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل
(Hydrogen or deuterium lamp) للقياس في المنطقة فوق البنفسجية UV
(280 : 380 nm) من الطيف الضوئي.

ويستخدم موحد للطول الموجي Monochromator والذي يتكون من برزما
Prism or Agrading أو كليهما للحصول علي مجال ضيق ومستمر من الطيف
الضوئي يختار بواسطة فتحة موحد الطول الموجي. الطيف الضوئي النافذ من العينة
يتم تقديره كما سبق وأوضحنا .

وعند مرور الضوء الموحد الطول الموجي Monochromatic light خلال
المحلول فأن هناك علاقة كمية ما بين تركيز المادة الذائبة في المحلول وبين كثافة
الضوء الذي يمر عبر المحلول كما سبق وأوضحنا في قانون بير (Beers Law) .

$$I = I_0 \times 10^{-KCL}$$

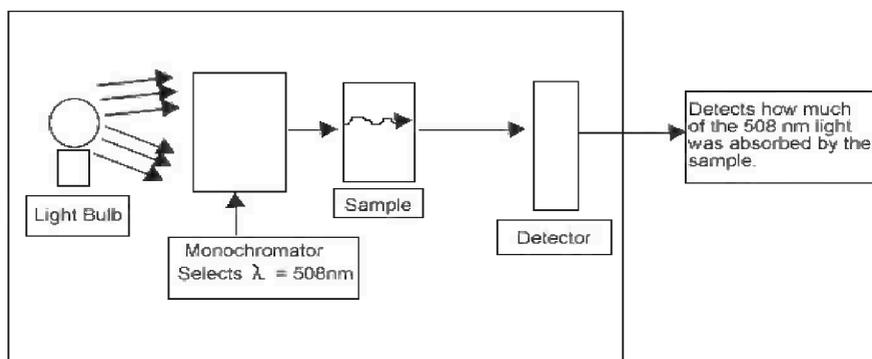
وال I_0 عبارة عن كثافة الضوء المرار خلال المحلول النقي (بدون العينة)، وال I عبارة عن
كثافة الضوء المرار خلال المحلول المقاس ، وال C تركيز اللون الذي يتم مقارنته أو
قياسه وال K عبارة عن ثابت، وال L عبارة عن المسافة أو المسار الذي يقطعه الضوء خلال
المحلول (قطر الكيوفت وهو غالباً ثابت ويساوي اسم) بالتالي يمكن كتابة المعادلة
كالتالي:

$$I / I_0 = 10^{-KC} = T$$

حيث ال T عبارة عن ال Transmittance of the solution أو نفاذية المحلول

ومن المعروف أن هناك علاقة لوغاريتمية بين نفاذية المحلول وتركيز
اللون في المحلول بالنالي تكتب المعادلة كالتالي:

$$-\text{Log } T = \text{Log } 1/T = KC = \text{Optical density (O.D.)}$$

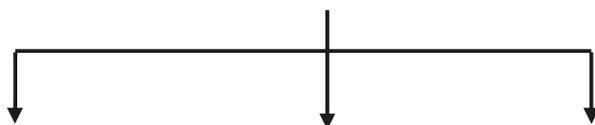


شكل تخطيطي يوضح نظرية عمل الأسبكتروفوتوميتر

والـ OD تتناسب مباشرة مع تركيز اللون في المحلول. بالتالي أجهزة الأسبكتروفوتوميتر تقيس الكثافة الضوئية أو الـ O.D ومنها يحسب تركيز المادة الفعالة.

أجهزة الـ Fluorimetry

ويقع تحت هذه الأجهزة ثلاثة أنواع هي:



Fluorescence

Fluorimeter

Spectrofluorimeter

Fluorescence (أ) الفلوروسنس

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

يعرف علي أنه الانبعاث الفوري للضوء علي طول موجي أعلي من الجزئي عقب امتصاصه للأشعة الضوئية. فعندما يتم تنشيط محلول فلوروسنتي بواسطة الضوء من مصدر مناسب وعلي طول موجي أقصر نسبيا فإن هذا الضوء يمتص بواسطة المحلول والذي يقوم بإعادة إشعاع وانبعاث ضوء فلوروسنتي ذات طول موجة أعلي. ويسقط علي وحدة تقدير Detector مناسبة يمكنها قراءة شدته ومنه يتم حساب تركيز المادة الفعالة في العينة.

(ب) الفلوريميتر Fluorimeter

نفس الأساس السابق ويستخدم في التقدير الكمي للمادة ذات النشاط الفلوروسنتي الموجودة في المحلول مع استخدام لمبة بخار زئبق كمصدر للضوء mercury vapour lamp والتي يتم التحكم في طول موجتها باختيار الفلاتر المناسبة المعروفة بالفلاتر الأولية Primary filters. ينبعث الضوء الفلوروسنتي من المحلول ثم يمرر خلال فلتر يعرف بالفلتر الثانوي Secondary ويسقط علي وحدة قياس Detector مناسبة ويمكن قراءة الاستجابة علي مقياس رقمي مناسب.

(ج) الأسبكتروفلوريميتر Spectrofluorimeter

في هذا الجهاز يستخدم لمبة زينون أرك Xenon arc lamp والتي تعطي حزمة ضوئية مستمرة A continuous band علي أطوال موجيه تتراوح من ٢٠٠ إلى ٧٠٠ نانوميتر. يتم الحصول علي حزم ضوئية عرض طول موجتها 1 نانوميتر من خلال موحدات أولية وثانوية لطول الموجه باستخدام محرزات تفريقية Diffraction grating. وعدد كبير من المركبات المعروف طيف تنشيطها وطيف انبعاثها يمكن تقديرها بدقة باستخدام هذا الجهاز.

احتياطات

- وهنا يجب التنبيه على أن الأرك الموجود في لمبة الزينون والمستخدم كمصدر للضوء ربما يحدث له تغير في الحساسية Shift وبالتالي يجب أن تجري للجهاز عملية معايرة بالمحاليل القياسية من وقت لآخر.
- القياسات الفلوروسنتية بصفة عامة تتأثر بشدة برقم حموضة المحلول (رقم الـ pH).
- يجب ترك الجهاز يعمل لعدة دقائق قبل الشروع في تقدير العينات.

أجهزة الفلام فوتوميتر والامتصاص الذري

Flame photometry and atomic absorption spectrophotometry

(أ) الفلام فوتوميتر Flame photometer



الشكل العام لجهاز الفلام فوتوميتر

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

هذا الجهاز يقيس شدة التوهج الضوئي. وأجهزة الفلام فوتوميتر تعمل بفكرة تقدير تركيز العنصر في المحلول عن طريق قياس انبعاث الضوء بواسطة ذرات العنصر عند تعريضه للهب قوي. فمن المعروف أن هناك إشعاعات ضوئية ملونة تنتج عن تعريض أملاح مثل الصوديوم والبوتاسيوم والنحاس للهب. وهذا الإشعاع الملون يكون من خصائص كل عنصر. وانبعاث هذا الإشعاع الملون المميز لكل عنصر وكذلك شدة الإشعاع والتي تتناسب مع تركيز العنصر في المحلول هي الأساس في التقدير باستخدام Flame photometer.

وفي هذا النوع من الأجهزة يتم تجهيز العينة في صورة محلول يضح علي صورة رزاز علي اللهب تحت ظروف معينة. والضوء الصادر عن اللهب يدخل إلى موحد الطول الموجي لعزل المنطقة المرغوبة من الطيف ويزود الجهاز بخلية ضوئية Amplifier photocell لقياس شدة الإشعاع المعزول.

ويجب من وقت لآخر معايرة الجهاز باستخدام محاليل معلومة التركيز لضبط دقة الجهاز. وباستخدام محاليل معلومة القوة كعينات يمكن عمل المنحني القياسي للجهاز كعلاقة ما بين شدة خط الطيف المتحصل عليه وتركيز العنصر. وهذا الجهاز يعطي نتائج دقيقة للغاية مع البوتاسيوم والصوديوم والكالسيوم ولكن بالنسبة للعناصر الأخرى فإن حساسية هذه الطريقة تكون أقل بالتالي ينصح باستخدام Atomic absorption لتقدير باقي العناصر الكبرى والصغرى. كما أن النتائج المتحصل عليها متوقفة بدرجة كبيرة مع حرارة اللهب بالتالي يجب مراعاة تثبيت درجة حرارة اللهب طول مدة القياس.

Atomic absorption spectrophotometry (ب)

والقياس بهذه الطريقة يعتمد علي تقدير تركيز العنصر عن طريق قياس امتصاص الإشعاع الضوئي بواسطة البخار الذري للعنصر. حيث أنه عندما يمر الإشعاع الضوئي المميز لعنصر ما خلال البخار الذري لنفس العنصر يحدث امتصاص للإشعاع الضوئي يتناسب هذا الامتصاص مع تركيز الذرات في مسار الضوء. ومصدر الإشعاع الضوئي في هذه الأجهزة هو لمبة هالوجين تستخدم ككاثود Halogen cathode lamp ويصنع الكاثود من مادة العنصر المطلوب تقديره "وهذا يعتبر عنصر إضافي يستخدم في هذا الجهاز".

ويجب علينا التعرف علي النقاط التالية لفهم كيفية عمل الجهاز.

■ طيف الامتصاص الذري Atomic absorption spectra ويحدث هذا الطيف عندما تمتص الذرات في حالتها الصلبة طاقة من مصدر إشعاعي. ولقياس هذا الطيف يتم تقدير امتصاص الذرات المنفصلة عن بعضها (نتيجة حدوث إثارة للذرة بالحرارة أو استخدام البلازما) لهذا الإشعاع بواسطة الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet ويناسب هذا النظام التحليلات المطلوبة لدينا حيث أن الطيف الذري يكون في صورة خطوط منفردة ولكل عنصر طيف خاص به بالتالي يمكن التعرف عليه وسهولة قياسه.

■ طيف الانبعاث الذري Atomic emission spectra بعد اكتساب الذرة لهذه الطاقة تبدأ في الاستقرار وتعود إلى حالتها الطبيعية مرة أخرى فاقدة ما اكتسبته من أشعة ويتم تقدير هذه الكمية المنبعثة من الأشعة والتي تتناسب مع العنصر المراد تقديره.

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

- **تفتيت العنصر (المركب) إلى ذرات Atomization :** كما سبق وأوضحنا في الطيف الذري أنه يلزم أن يكون العنصر في صورة ذرات منفصلة حتى يتثنى لنا تقديره. وفي العينات النباتية توجد العناصر غالباً علي صورة جزيئات بالتالي يجب أولاً فصل العنصر إلى ذرات. ويتم ذلك عن طريق تزويد الجهاز بألة من خلالها يتم ضخ المحلول الموجود به العنصر علي صورة رزاز (كما في الفلام فوتوميتر) علي مصدر حرارة عالية وهنا يتم تبخير السائل الموجود في المحلول، وبتعريض المركبات إلى الحرارة العالية تثار الذرات وتنفصل عن بعضها البعض وتصبح في صورة منفردة وتبدأ في اكتساب أو فقد طاقة إشعاعية.
- **مصدر الحرارة المطلوبة لحدوث الإثارة وفصل الذرات:** قد يكون لهب درجة حرارته تتراوح من ١٧٠٠ إلى ٣٢٠٠ درجة مئوية أو وحدة تسخين حراري كهربائية وحرارتها تتراوح من ١٢٠٠ إلى ٣٠٠٠ درجة مئوية أو باستخدام البلازما ودرجة الحرارة المتحصل عليها تتراوح من ٦٠٠٠ إلى ٨٠٠٠ مئوية
- ويمتاز هذا جهاز ال Atomic absorption بالتالي:
- الكمية المأخوذة من العينة قليلة جداً بالتالي يمكن تطبيق العديد من القياسات علي نفس محلول العينة الواحدة حتى ولو كانت الكمية المتاحة منها قليلة جداً.
- يمكن قياس كل العناصر الموجودة بالجدول الدوري عن طريق هذا الجهاز
- دقة النتائج المتحصل عليها عالية بالمقارنة بالطرق الأخرى
- لا يستغرق زمن القياس مدة طويلة بالتالي يمكن إنجاز العديد من القياسات في اليوم الواحد.
- يسهل أخذ العديد من المكررات لنفس العينة ثم يحسب المتوسط لهم لزيادة الدقة.

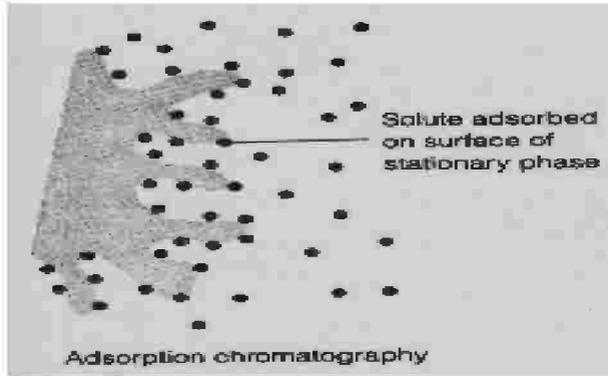
نظم الفصل الكروماتوجرافي

Chromatography

يعد فصل المركبات وتقديرها باستخدام الكروماتوجراف من أوسع طرق التقدير المنتشرة في الوقت الراهن وأهمها أيضاً. وتستخدم أجهزة الكروماتوجراف لفصل وتقدير العديد من المركبات الهامة في النبات وأساس الكروماتوجراف هي طريقة أو تقنية لفصل المركبات. وتعتمد علي اختلاف في أتران توزيع المكونات المراد فصلها بين وجهين غير قابلين للامتزاج وهما الطور أو الوجه الثابت **Stationary phase** والطور أو الوجه المتحرك **Mobile phase** وهذا الاختلاف في اتران التوزيع يحدث نتيجة لطبيعة ودرجة تفاعل المكونات أو ارتباط المكونات بهذين الوجهين.

والوجه الثابت **Stationary phase** هو عبارة عن بيئة مسامية يمرر من خلالها مخلوط العينة بتأثير مذيب متحرك عبارة عن **Mobile phase**. وهناك عدة طرق من الارتباط بين العينة والطور الثابت للكروماتوجراف والتي تؤثر في فصل المركبات أو المكونات المراد فصلها. وفي العادة تأخذ طرق الفصل الكروماتوجرافي اسمها من نوع الارتباط الرئيسي بين العينة والطور الثابت مثل:

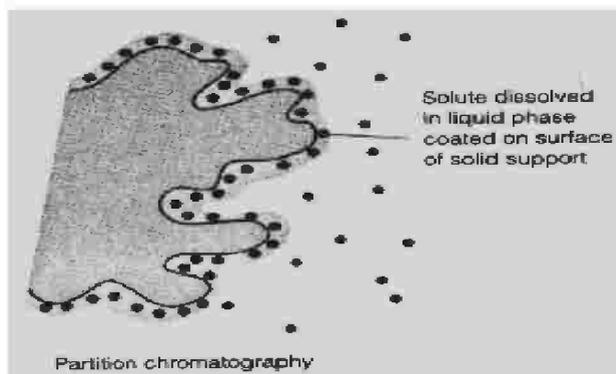
Absorption Chromatography



الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

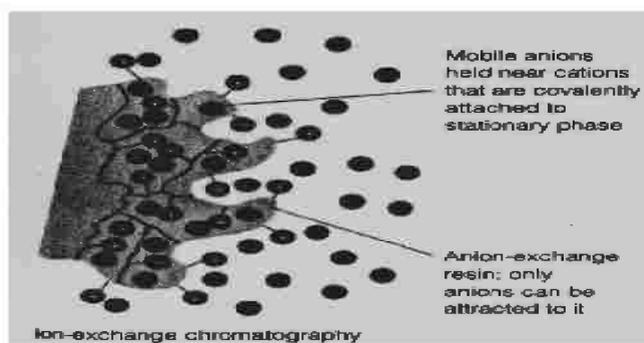
ويعد هذا النوع من أقدم أنواع الكروماتوجراف ويكون فيه الطور المتحرك سائل أو غازي والذي يدمص علي أسطح الطور الثابت. والنسبة ما بين الطور الثابت أو المتحرك تختلف علي حسب الملح أو المادة التي يتم فصلها.

Partition Chromatography



وهذه النوعية من الكروماتوجراف تعتمد علي تكوين طبقة رقيقة علي سطح مادة مدعمة وذلك عن طريق الوجه أو الطور الثابت. والطور المتحرك هنا عبارة عن سائل. ويمرر الطور المتحرك حاملا معه المادة المراد فصلها والتي يحدث لها هجرة علي سطح الطور الثابت وتثبت علي أسطح الطور الثابت.

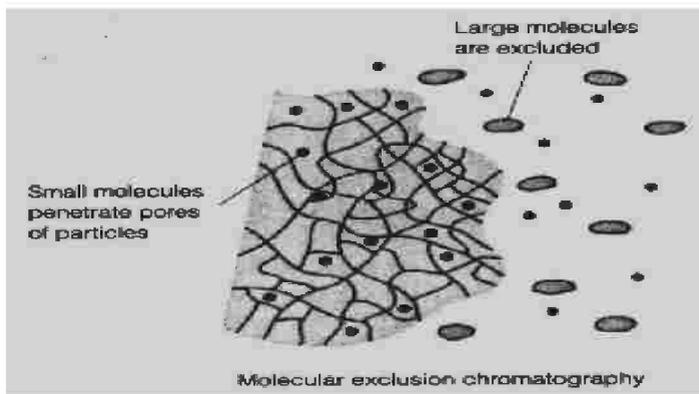
Ion exchange Chromatography



الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

في هذه النوعية من الكروماتوجراف يستخدم فيها راتنجات Rseins عديدة التكافؤ وهي مواد غير قابله للذوبان في البيئة المائية. هذه الراتنجات تحتوي علي مجموعات لها المقدرة علي تبادل الأيونات (كاتيونات أو انيونات) مع البيئة المحيطة وترتبط معها. وتمثل الراتنجات هنا الطور الثابت والأيونات الموجبة أو السالبة التي تمر مع الطور المتحرك السائل ترتبط مع نهايات الراتنجات بقوي التجاذب الكهربائي. ويستخدم هذا النوع بصورة كبيرة في تقدير البروتين والأحماض الأمينية. وفي هذه التقنية يتم إمرار المحلول المراد فصله وتقديره مع الطور السائل في أعمدة مملوءة بالراتنجات، ويكون الطور السائل عبارة عن محاليل منظمة متدرجة في رقم الـ pH.

Molecular exclusion or Gel filtration Chromatography



ويسمى هذا النوع أيضا بالـ gel permeation or gel filtration. وهو واحد من أهم طرق فصل البروتينات عن بعضها والفصل هنا يعتمد علي حسب حجم الجزيئات وليس شحنتها عكس ما يحدث في كروماتوجراف تبادل الأيونات. وفي هذا النوع من الكروماتوجراف Gel filtration يتم إذابة مخلوط البروتينات الموجودة في العينة في محلول منظم مناسب ثم يسمح لها بالسريان خلال عمود زجاجي تحت تأثير الجاذبية، هذا العمود مملوء بمادة خاملة عبارة عن كريات من بوليمر عديد التأدرت

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

highly hydrated polymeric material ويتم غسيل هذه المادة قبل التحليل بواسطة المحلول المنظم المستخدم. وأهم المواد الشائعة الاستخدام كمادة خاملة في هذا النوع من الكروماتوجراف هي:

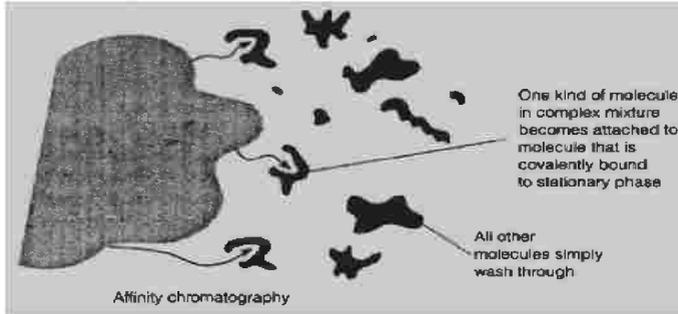
Sephadex, Agarose (polysaccharide derivatives)
Bio-Gel (polyacrylamide derivative).

ويمكن تحضير كلا منها علي درجات متفاوتة من التحبب.

وفي هذه الطريقة يمرر مخلوط البروتينات ذات الأحجام الجزيئية المختلفة علي الطور الثابت. فمنها ما يخترق المسام الداخلية للكريات السابق ذكرها وتندفع خارجة من العمود بمعدلات مختلفة مع الـ Exclusion volume والذي يعرف بأنه حجم الطور السائل الموجود خارج كريات الجيل. أما البروتينات ذات الجزيئات الكبيرة جداً لا يمكن دخولها مسام كريات الجيل. ومن ناحية أخرى فإن البروتينات ذات الوزن الجزيئي الكبير تمر بسرعة خلال العمود أما البروتينات ذات الوزن الجزيئي الصغير تتأخر في المرور وفي المدة بينهما تكون الجزيئات المتوسطة الوزن الجزيئي.

تستخدم هذه الطريقة في فصل أنواع أخرى من Macromolecules وكذلك التركيبات الحيوية عالية الوزن الجزيئي مثل الريبوسومات والفيروسات... وذلك باستخدام جيل ذو درجات مختلفة من المسامية.

Affinity Chromatography.



الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

وهذا النوع من الأنواع الأكثر أهمية واستخدام. ويعتمد علي التفاعل المتخصص بين نوع معين من جزيئات المكونات وبين جزيئات الطور المتحرك للكروماتوجراف. والذي يتحرك علي الطور الثابت أخذاً معه هذه الجزيئات. وللتوضيح نذكر علي سبيل المثال إذا كانت الجزيئات المراد تقديرها في العينة أجسام مضادة متخصصة لبروتين معين في عينة مخلوط بروتين فأن جزيئات الطور المتحرك (المحتوية علي البروتين الخاص بهذه الأجسام المضادة) سوف ترتبط بهذه الأجسام فقط تاركة باقي الجزيئات الأخرى وتتحرك معها علي الطور الثابت. وبالتالي يمكن عزلها وتقديرها.

ويمكن أيضاً تسمية الطرق الكروماتوجرافية علي حسب طبيعة الطور الثابت وهذا

هو الأكثر انتشار كالتالي:

- 1- Paper chromatography (P.C)
- 2- Thin layer Chromatography (TLC)
- 3- Column Chromatography
- 4- Gas Liquid Chromatography (GLC)
- 5- High Pressure liquid Chromatography (HPLC)

كما إنه من الممكن تقسيم طرق الفصل الكروماتوجرافي علي حسب طبيعة الطور

المتحرك إلى:

- Liquid Chromatography الكروماتوجراف ذات الوجه المتحرك السائل
- Gas Chromatography الكروماتوجراف ذات الوجه المتحرك الغازي

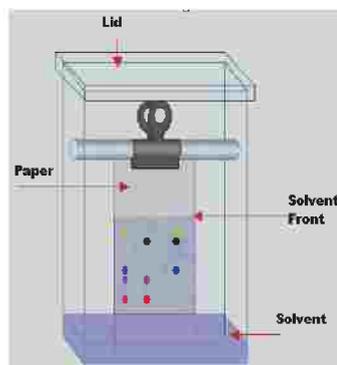
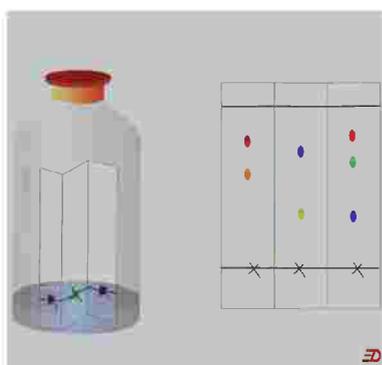
وعموما سوف نتناول بالشرح المبسط أهم أنواع أجهزة الكروماتوجراف المستخدمة في

مجال البحث العلمي لمعرفة نظرية عمل هذه الأجهزة:

أولاً: الكروماتوجراف الورقي و الكروماتوجراف ذات الطبقة الرقيقة Paper and Thin layer Chromatography

يعد هذان النوعان هما الأسهل و الأبسط من الكروماتوجراف حيث تتطلب تحضيرات وأجهزة سهلة وبسيطة. والنتائج المتحصل عليها غالباً ما تكون وصفية ولكن مع العناية بتفاصيلها نستطيع تحويلها إلى نتائج كمية بالمقارنة بتركيزات قياسية من المادة المراد قياسها.

والفكرة في عملها هي وضع نقطة صغيرة بطرف الماصة على القرب من حافة ورقة الكروماتوجراف (على بعد واحد بوصة) أو على الطبقة الرقيقة وتترك لتجف قليلاً. توضع قاعدة الورقة أو الطبقة الرقيقة في مخلوط من المذيبات بحيث تكون نقطة العينة أعلى مستوي سطح المذيب كما في الشكل. يحدث هجرة للمذيب من أسفل إلى أعلى عن طريق الخاصية الشعرية وفي أثناء سيرة يلتقي مع العينة ويتم فصل المخلوط المختبر إلى مكوناته المختلفة وتعرف هذه العملية بالـ **Development** ويحدث هجرة لمكونات مخلوط العينة مع المذيب وبعد الزمن الأمثل للغمر في المذيب ترفع الورقة أو الطبقة الرقيقة وتجفف ويقدر موقع وحجم العينة على الورقة باستخدام جوهر مناسب وتقارن بالمحلول القياسي المعلوم التركيز



الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

وهنا تعمل الورقة أو الطبقة الرقيقة من السليكا جيل كمادة حاملة ومدعمة Inert support وتحمل الوجه الأكثر قطبية من مخلوط المذيب (عادة الماء) كما تعمل كوجه أو طور ثابت. والفصل ينتج عن الاختلاف في أوزان مكونات المخلوط. وفي كل الأحوال فإن الورق المستخدم وكذلك السليكا جيل ترتبط "بالأدمصاص ودرجة معينة من التبادل الأيوني" مع المكونات وهذا يؤثر في عملية الفصل.

ولمعرفة المادة أو المكون المطلوب عن طريق الكروماتوجراف الورقي لابد من معرفة قيمة معامل الإعاقة (Rf) Refractive index والتي يمكن حسابه كالتالي

المسافة التي تحركتها المادة بداية من نقطة الأصل

$$\frac{\text{المسافة التي تحركتها المادة بداية من نقطة الأصل}}{\text{المسافة التي تحركها المذيب بداية من نقطة الأصل}} = Rf$$

المسافة التي تحركها المذيب بداية من نقطة الأصل

كيفية تحضير الطبقة الرقيقة من السليكا جيل :Preparation of TLC

- يتم إحضار ألواح زجاجية أبعادها 20 x 20 سم
- يتم خلط 30 جرام السليكا جيل مع 55 ملي من الماء وترج جيدا وهي تكفي لتغطية خمسة ألواح زجاجية أبعادها كما سبق بسمك 0.3 ملليمتر
- تترك الألواح لتجف ويعلم السطح المغطي بالسليكا جيل
- قبل الاستخدام تُسخن الألواح لدرجة حرارة 90 درجة مئوية. ثم يتم استخدامها كما سبق الشرح.
- عندما يصل المذيب قرب الطرف الأعلى للطبقة ويستغرق ذلك من 30 إلى 60 دقيقة يتم رفع الألواح وتجفف. وتحدد أماكن العينة بواسطة الرش بدليل الصبغ المناسب.

ثانياً: الأعمدة الكروماتوجرافية (الكروماتوجراف ذات العمود) Column Chromatography

وتسمى الكروماتوجراف ذات العمود - أو طريقة الكروماتوجراف السائل الكلاسيكية Classical liquid Chromatography ويستخدم هذا النوع بانتشار في مجال الطب الحيوي للأغراض التحضيرية Preparative purposes وهي طريقة مهمة في التقدير الكمي وفي مجال التنقية purification أيضاً. ويستخدم في هذه الطريقة أعمدة زجاجية (أبعادها متوقفة على كمية العينة) تملأ بالوجه أو الطور الثابت Stationary phase (وهي مادة مدمصة Adsorbant أو بيئة تبادل أيوني Ion exchange affinity media) ويتم وضع العينة في صورة نقطة أو قطرة دقيقة على قمة العمود ثم يمرر الطور أو الوجه المتحرك Mobile phase من خلال العمود وعادة ما يتم ذلك تحت ضغط الهواء الجوي العادي.

ووفقاً لطبيعة الفصل المستهدف يتوقف نوع السريان Elution المستخدم:

- Isocratic elution (solvents in a fixed ratio)
- Gradient elution (concave-linear-convex-stepwise)

وهناك العديد من المواد المستخدمة في هذا النوع من الكروماتوجراف العمود

ولكل منها استخدام ونذكر منها على سبيل المثال:

Gel permeation or affinity; Ion exchange; Partition; Adsorption

ثالثاً: Gel filtration chromatography

وهو من أهم وأقوي وسائل فصل البروتينات عن بعضها البعض علي أساس حجم الجزيئات ويسمي بالـ Molecular Exclusion chromatography ويعرف أيضا بالـ Gel filtration أو الـ Molecular sieve chromatography. ويختلف هذا النوع عن كروماتوجراف التبادل الأيوني والذي يقوم بفصل الجزيئات المذابة علي حسب شحنتها الكهربائية وخصائص الحموضة والقلوية في أن هذا النوع يتم فيه الفصل علي حسب حجم الجزيئات.

وفي هذا النوع من الكروماتوجراف Gel filtration يتم إذابة مخلوط البروتينات الموجودة في العينة في محلول منظم مناسب ثم يسمح لها بالسريان خلال عمود زجاجي تحت تأثير الجاذبية، هذا العمود مملوء بمادة خاملة عبارة عن كريات من بوليمر عديد التآدرت Beads of an inert, highly hydrated polymeric material ويتم غسيل هذه المادة قبل التحليل بواسطة المحلول المنظم المستخدم. والمواد الشائعة الاستخدام كمادة خاملة في هذا النوع من الكروماتوجراف هي:

- Sephadex, Agarose (polysaccharide derivatives).
- Bio-Gel (polyacrylamide derivative).

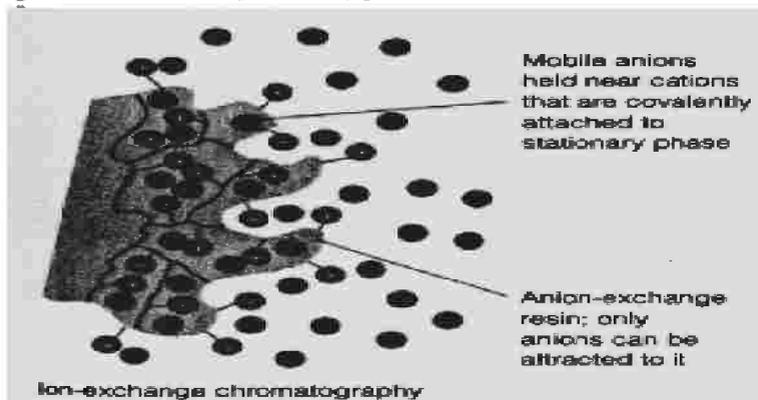
وفي هذه الطريقة يمرر مخلوط البروتينات ذات الأحجام الجزيئية المختلفة - فمنها ما يخترق المسام الداخلية للكريات السابق ذكرها وتندفع خارجة من العمود بمعدلات مختلفة مع الـ Exclusion volume والذي يعرف بأنه حجم الطور السائل الموجود خارج كريات الجيل، أما البروتينات ذات الجزيئات الكبيرة جداً لا يمكن دخولها في مسام كريات الجيل. ومن ناحية أخرى فإن البروتينات ذات الوزن الجزيئي الكبير تمر بسرعة خلال العمود أما البروتينات ذات الوزن الجزيئي الصغير تتأخر في المرور وفي المدة بينهما تكون الجزيئات المتوسطة الوزن الجزيئي.

تستخدم هذه الطريقة في فصل أنواع أخرى من Macromolecules وكذلك التركيبات الحيوية عالية الوزن الجزيئي مثل الريبوسومات والفيروسات... وذلك باستخدام جيل ذو درجات مختلفة من المسامية.

رابعاً: كروماتوجراف التبادل الأيوني وتقدير الأحماض الأمينية Ion exchange chromatography and amino acid analysis

ويستخدم في هذا النوع راتنجات التبادل الأيوني Ion-exchange resins أو ما تسمى بالمبادلات الأيونية والتي تعرف بأنها بصفة عامة بأنها مواد عديد التكافؤ وغير قابلة للذوبان في البيئة المائية وهي عبارة عن مركبات عضوية ذات جزيئات كبيرة غير تحتوي على مجموعات وظيفية لها المقدرة على تبادل الأيونات من البيئة المحيطة. بالتالي يوجد منها المبادلات الأيونية الموجبة والسالبة. وتمتاز المبادلات الموجبة باحتوائها على مجموعات حامضية قابلة للتبادل مثل مجموعة الكربوكسيل أو مجموعة السلفونيك. أما المبادلات الأيونية السالبة وتمتاز باحتوائها على مجموعات قاعدية قابلة للتبادل مثل مجموعة الهيدروكسيل. والأكثر شيوعاً في الاستخدام هي الراتنجات الصناعية التي تعتمد في تركيبها على Polystyrene matrix والأساس في عملية الفصل يعتمد على اختلاف ميل الأحماض الأمينية المختلفة نحو المجاميع الوظيفية الموجودة على راتنجات التبادل الأيوني.

بعد مدة من استخدام المبادلات الأيونية تفقد المبادلات طاقتها التبادلية حيث تكون قد استنزفت كل ما لديها من المجموعات القابلة للتبادل. بالتالي يجب غسلها وإعادة تنشيطها عن طريق تزويدها بالمجموعات التبادلية مرة أخرى.



ويمرر مخلوط الأحماض الأمينية المراد فصله من خلال عمود معبأ بالراتنجات Resin ويتم إمرار العينة من العمود باستخدام محاليل منظمة Buffers solutions متدرجة في رقم الحموضة (pH) من خلال العمود.

خامساً: الكروماتوجراف الغازي GLC or GC Gas Chromatography or Gas liquid chromatography



الشكل العام لجهاز الكروماتوجراف الغازي

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

الكروماتوجراف الغازي- السائل **Gas-Liquid Chromatography** أو ما يطلق علي للتبسيط بالكروماتوجراف الغازي **Gas Chromatography** يختلف عن باقي الأنواع في أن الطور المتحرك فيه **mobile phase** عبارة عن غاز وليس سائل مثل باقي الأنواع سابقة الذكر. والطور الغازي هنا عبارة عن غاز حامل مثل الهليوم أو غاز قليل التفاعل مثل النيتروجين ويعمل فقط كحامل **Carrier** . والأكثر شيوعاً واستخداماً هو الهليوم وهو غاز غير قابل للاشتعال ومتوافق مع أنظمة عديدة من الـ **Detectors** .

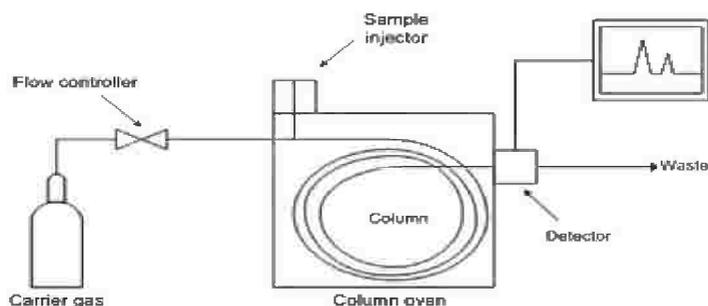
والطور الغازي المتحرك يحمل معه المخلوط المراد فصله وتقديره ليمر علي الطور الثابت (السائل) الموجود بداخل أنبوبة زجاجية أو معدنية يطلق عليها الـ **Column** أو عمود الفصل ويوجد الطور السائل داخل الـ **Column** في صورة شرائح أو شرائط دقيقة جداً محمولة علي مادة مدعمة خاملة **Inert solid support** . ويتم حقن العينة عند بداية عمود الفصل مع دخول الطور الغازي وعند مرور مخلوط العينة مع الطور المتحرك داخل العمود **Column** فإن مكونات المخلوط تنفصل وتتفاعل مع الطور السائل المائل للأنبوبة أو العمود وتنفصل علي حسب الشحنة والحجم. وعند خروج هذه المكونات من طرف الأنبوبة يتم تسجيلها وتسجيل زمن الخروج أوتوماتيكياً بواسطة وحدة القياس والتسجيل **Detector** . ويظهر كل مركب في صورة قمة يمكن التعرف عليها وحساب التركيز باستخدام التركيزات القياسية المعلومة من المركبات المراد قياسها. ويتم تسجيل نتائج تحليل العينات أوتوماتيكياً علي جهاز كمبيوتر ملحق بجهاز الكروماتوجراف.

وسرعة الحركة والخروج من الطرف لأخر لعمود الفصل، أي الوقت الذي تستغرقه العينة داخل الجهاز حتى الخروج من الأنبوبة **Column** يسمى بالـ **Retention time** وهذا الزمن يختلف من جهاز لأخر ويحدد القدرة التحليلية

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

لجهاز الكروماتوجراف الغازي Analytical power of GC. ويتأثر الـ بعدة عوامل منها درجة حرارة العمود وطول العمود وطبيعة الطور الثابت والمتحرك. وبصفة عامة فإن برنامج التقدير علي هذا الجهاز يختلف علي حسب المواد المراد فصلها وتقديرها حيث نجد أن درجة حرارة حجرة الحقن ودرجة حرارة عمود الفصل Column ودرجة حرارة الـ Detector تختلف علي حسب المواد المفصولة. كما إن نوعية الغاز الخامل وكذلك سرعة اندفاع هذا الغاز داخل عمود الفصل وأيضاً طول عمود الفصل الكروماتوجرافي وقطره يختلف باختلاف الجهاز والمواد المراد تقديرها.

المكونات الرئيسية الكروماتوجراف الغازي



الشكل يوضح المكونات الرئيسية للجهاز

جهاز الكروماتوجراف الغازي يتكون بصورة رئيسية من الأجزاء التالية:

- ١- مصدر الغاز (الطور المتحرك) Carrier gas: وهو عبارة عن أسطوانة من الغاز المستخدم كحامل للعينة (طور متحرك) وغالباً ما يكون الهليوم أو النيتروجين المعبأ تحت ضغط. وتتصل الأسطوانة بالجهاز عن طريق صمام أمان ينظم مرور الغاز Flow controller
- ٢- حجرة حقن العينة Sample injector: وتتصل ببداية عمود الفصل الكروماتوجرافي Column ويوجد بها صمام يعمل علي مرور العينة في اتجاه واحد

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

فقط إلى داخل العمود. ويتم الحقن بواسطة سرنجة دقيقة خاصة **Micro syringe**. ويوجد من حجرة الحقن عدة أنظمة علي حسب الجهاز كالتالي:

الـ **Split/Splitless injector (SISL)**: يتم حقن العينة بواسطة السرنجة الخاصة في حجرة حرارية صغيرة وذلك من خلال صمام يسمح بالمرور في اتجاه واحد وفي الحجرة الحرارية يتم تبخير محتويات العينة بتأثير الحرارة ثم يتم دفع الغاز (الطور المتحرك) إلى داخل الحجرة حاملاً معه مكونات العينة ليعود مرة أخرى مندفعاً إلى داخل الـ **Column**.

الـ **On-Column inlet** وفي هذا النوع يتم حقن العينة مباشرة في عمود الفصل الكروماتوجرافي أو الأنبوبة الكروماتوجرافية **Column** عند طرفها أو بدايتها.

الـ **Programmed Temperature Vaporising Injector (PTV)**: وفي هذا النوع يتم ضبط البرنامج الحراري لإدخال العينة بعد الحقن بالسرنجة الخاصة. وتختار درجة حرارة أقل من درجة حرارة غليان المذيب قليلاً بالتالي المواد الأروماتية سوف تتبخروتمر خلال مسار محدد لتختلط مع الطور الغازي مندفعة ناحية طرف عمود الفصل الـ **Column**

الـ **Gas source inlet or Gas switching valve**: وهذا النوع يستخدم مع العينات الغازية فقط حيث يتم توصيل حجرة حقن العينة مع مسار الغاز الخارج من مصدر الغاز (الطور المتحرك) بواسطة صمام وبعد حقن العينة وعند مرور الغاز تندفع معه العينة الغازية من داخل حجرة الحقن إلى داخل طرف أو بداية الـ **Column**

الـ **(Purge and Trap) system (P/T)**: هذا النوع يعتمد علي دفع تيار من الغاز داخل محلول العينة في حجرة الحقن علي درجة حرارة الغرفة (دون تسخين) وهذا يؤدي إلى حدوث فقاعات عديدة يتطاير معها المواد الأروماتية في صورة نقية. هذه المواد يتم مسكها أو ادمصاصها علي عمود يطلق عليه عمود الادمصاص الـ

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

absorbent column تحت درجة حرارة الغرفة. ثم يتم تسخين هذا العمود

لتنطلق المواد الأروماتية تجاه مسار الطور المتحرك إلى داخل العمود الكروماتوجرافي.

• ٣- عمود الفصل الـ **Column** : وهو عبارة عن أنبوبة دقيقة تلف وتثبت داخل

فرن لضبط درجة حرارتها وجعلها ثابتة طوال التقدير. وهناك عدة أنواع من أعمدة

الفصل الكروماتوجرافي **chromatographic columns** ولكن هناك نوعان

يستخدمان بصفة رئيسية مع جهاز الكروماتوجراف الغازي وهما:

○ الـ **Packed columns** وهذا النوع مصنوع من **Stainless steel**

الأستانل ستيل أو الزجاج المدعم أو المغلف بطبقة من مادة صلبة خاملة مثل الـ

Diatomaceous earth. ويكون طول العمود متراوح من ١.٥ متر إلى ١٠

متر والقطر الداخلي له من ٢ إلى ٤ ملليمتر. وهنا طبيعة المادة المغلضة أو المدعمة

تحدد طبيعة المواد الممكن ادمصاصها عليها بالتالي طبيعة المواد التي يتم

تقديرها، وبالتالي هذا النوع يوجد تحته العديد من الأنواع علي حسب المادة

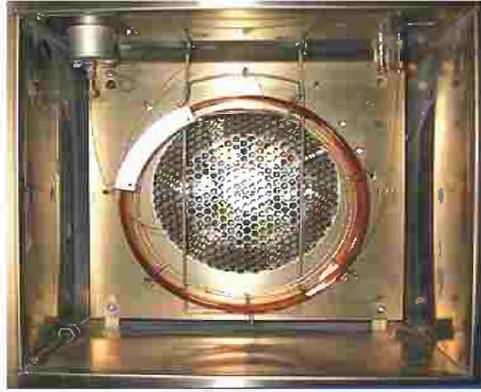
المدعمة والمواد المراد تقديرها.

○ الـ **Capillary columns** وهذا النوع من الأعمدة ذات قطر داخلي دقيق

جداً ويكون طول العمود كبير إذ يتراوح من ٢٥ إلى ٦٠ متر. وغالباً يتم

تصنيعه من السليكا مع تغطيتها بطبقة خارجية من الـ **polyamide** لتكسبه

المرونة اللازمة.



الشكل يوضح عمود الفصل الكروماتوجرافي داخل الفرن

• ٤- وحدة القياس الـ **Detector** : هناك أنواع متعددة من الـ **Detectors** تستخدم في مجال الكروماتوجراف الغازي من أهمها وأوسعها انتشاراً هو الـ **flam Ionization Detector (FID)** والـ **Thermal Conductivity Detector (TCD)** ويرجع انتشار استخدامهم إلى الحساسية العالية في قياس العديد من المركبات والمدى الواسع من تركيز المركبات التي يمكن تقديرها، ويمتاز النوع الأول (FID) عن النوع الثاني (TCD) أنه أكثر حساسية ودقة في قياس المركبات الهيدروكربونية التركيب **Hydrocarbons component**. وهناك أنواع أخرى من الـ **Detectors** حساسة فقط للأنواع معينة من المركبات مثل بالتالي تستخدم في حالات معينة ومنها: الـ **Discharge Ionization Detector (DID)** والـ **Flame Photometric Detector (FPD)** والـ **Mass Selective Detector (MSD)** والـ **Helium Ionization Detector (HID)** وغيرها من الأنواع.

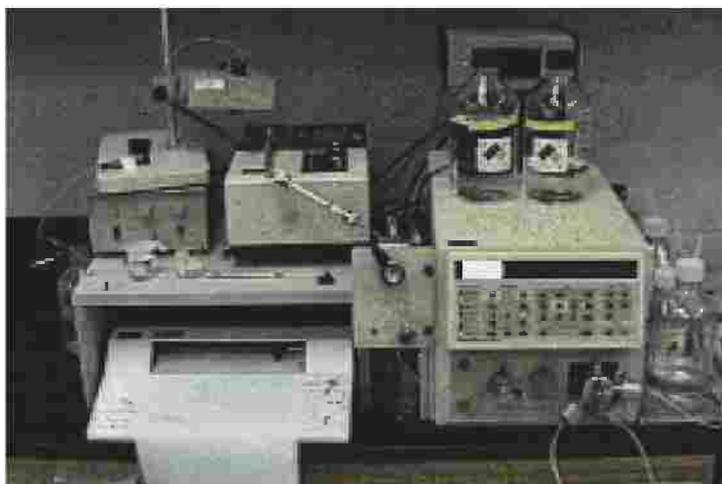
سادساً: الكروماتوجراف السائل عالي الكفاءة (عالي السرعة) **HPLC (High Performance Liquid Chromatography)**

بالرغم من أن الكروماتوجراف عالي الكفاءة (أو عالي السرعة) HPLC تم تصنيعه منذ وقت ليس بالبعيد (١٩٧٠) مقارنة بالطرق الكروماتوجرافية الأخرى إلا أنه يعد من أهم طرق الكروماتوجراف وأوسعها استخداماً في الوقت الراهن. كما أنه يعد أرقاها جميعاً حيث يمتاز بقدرة فصل عالية ويمكنه فصل وتقدير العديد من المركبات في وقت قياسي بصرف النظر عن طبيعة تلك المركبات ، على سبيل المثال يمكن فصل وتقدير حمس مركبات عطرية في أقل من دقيقة واحدة.

ذوالفكرة الرئيسية في كروماتوجراف الـ HPLC هي تطوير لكروماتوجراف الأعمدة **Column Chromatography** أو ما يسمى الكروماتوجراف السائل

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

الكلاسيكية Classical liquid Chromatography (سابق الحديث عنها) والتطوير هنا يكون في ثلاثة محاور الأول هو دفع الطور المتحرك إلى داخل العمود الكروماتوجرافي حاملاً معه العينة تحت ضغط عالي (يصل إلى ٨٠٠٠ رطل / البوصة المربعة) أما في كروماتوجراف العمود يكون السريان غالباً تحت تأثير الجاذبية الأرضية بالتالي يكون بطيء. والتطور الثاني كان في نوعية الطور الساكن أو الثابت وتركيبه والتعديل الثالث عبارة عن استخدام وحدات القياس الدقيقة ذات الحساسية العالية في التقدير (الـ Detector).

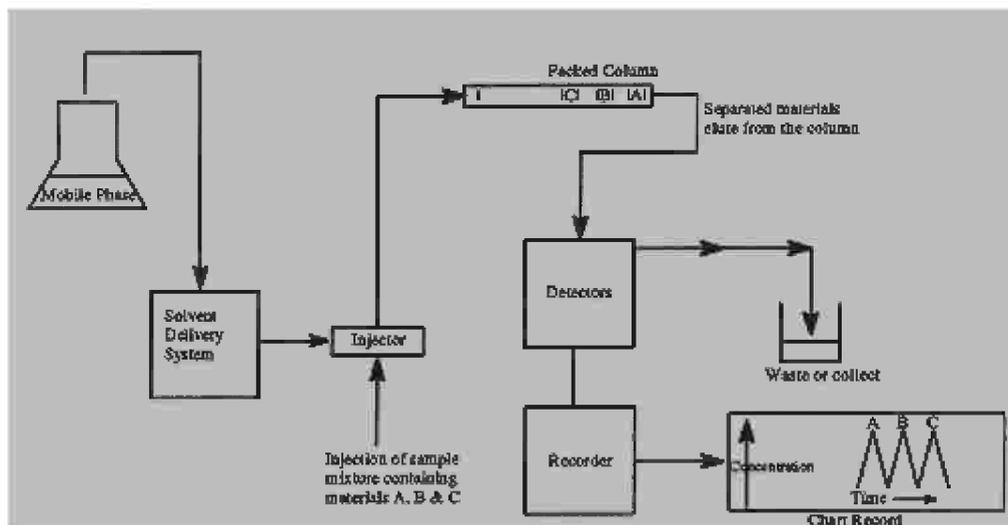


الشكل العام لجهاز الكروماتوجراف السائل عالي الكفاءة

وتعتمد فكرة الفصل على استخدام طورين أو وجهين إحداهم ثابت والآخر متحرك ويكون الطور المتحرك هنا عبارة عن سائل ذات مواصفات خاصة يحمل معه العينة إلى داخل عمود الفصل المحتوي على الطور الساكن أو الثابت من خلال مضخة تعطي قوة ضغط تصل إلى ٨٠٠٠ رطل / البوصة المربعة وتضمن معدل سريان ثابت طوال الوقت. وبهذه الطريقة يضمن فصل وتقدير المركبات صعبة التطاير أو التي تتأثر بالحرارة. ويكون الطور الثابت عبارة عن جسيمات دقيقة الحجم ذات قدرة على الادمصاص أو التبادل الأيوني أو المواد الهلامية المحتوية على مسامات محددة.

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

والرسم التوضيحي التالي يوضح المكونات الرئيسية لجهاز الـ HPLC.



المكونات الرئيسية للجهاز:

(١): مستودع الطور المتحرك وأنظمة معالجة المذيب

وهو عبارة عن وعاء من المعدن الغير قابل للصدأ Stainless Steel أو الزجاج. ويتكون هذا الجزء من عدد ١ إلى ٥ خزانات. وفي الغالب تزود هذه الخزانات بمرشحات لمنع مرور المواد العالقة أو الغبار إلى العمود الكروماتوجرافي كما تزود بنظام لسحب فقاعات الهواء حتى لا تندفع إلى داخل الجهاز وتحدث خطأ في القراء عند مرور العينة علي وحدة القياس والتقدير (الـ Detector).

(٢): مضخة الطور المتحرك Pumping Systems

ومن خلالها يتم ضخ الطور المتحرك الموجد خارج الجهاز إلى داخل الجهاز ليمر علي العمود الكروماتوجرافي حاملاً معه العينة المراد تقديرها. والمضخة مصممة بحيث تعطي قوة ضخ ثابتة وبالتالي معدل سريان ثابت طوال فترة التقدير.

(٣): نظام التحكم في السريان والبرمجة Flow control and programming

وهذا الجزء يشمل الكمبيوتر الملحق بالجهاز والذي يصمم له برامج خاصة تضمن معدل سريان معين وثابت باستمرار خلال التقدير كما يحتوي علي نظم وبرامج أخرى خاصة بتشغيل الجهاز.

(٤): نظم حقن العينة داخل الجهاز Sampling injection systems

ويتم حقن العينة داخل الجهاز باستخدام سرنجة خاصة (أو يتم الحقن أوتوماتيكياً) عن طريق حجرة حقن وهي حجرة صغيرة بها مكان للحقن وصمام يسمح بمرور العينة في اتجاه واحد إلى داخل الجهاز. ويوجد مضخة خاصة تقوم بضخ العينة إلى داخل الطور المتحرك خلال سريانه داخل الجهاز ليحملها معه إلى العمود الكروماتوجرافي المملوء بالطور الثابت أو الساكن. وعلي كلاً هناك عدة طرز من حجرات حقن العينات علي حسب نوعية الجهاز المستخدم .

(٥): أعمدة الفصل Liquid chromatographic columns

والأعمدة الكروماتوجرافية في هذا الجهاز تصنع من الزجاج المبطن أو من معدن غير قابل للصدأ Stainless steel وهي ذات أطوال تتراوح من ٢٠سم إلى ٢ متر ونصف قطرها من ١ إلى ٥ ملليمتر. وهناك نوعان من الأعمدة في هذا الجهاز النوع الأول يعرف بالأعمدة التحليلية Analytical Columns وتمثل الأعمدة الأساسية للجهاز ومن خلالها يتم فصل العينة وغالباً ما تكون مستقيمة الشكل والنوع الثاني يعرف بأعمدة الحماية Guard Columns ووضع هذه الأعمدة داخل الجهاز يكون قبل الأعمدة التحليلية.

(٦): منظم حرارة أعمدة الفصل Columns Thermostats

ووظيفة منظم الحرارة هي جعل حرارة الجهاز ثابتة خلال فترة التقدير. ومن لمعلوم أن درجة حرارة عمود الفصل من العوامل المؤثرة علي سرعة مرور العينة داخل العمود

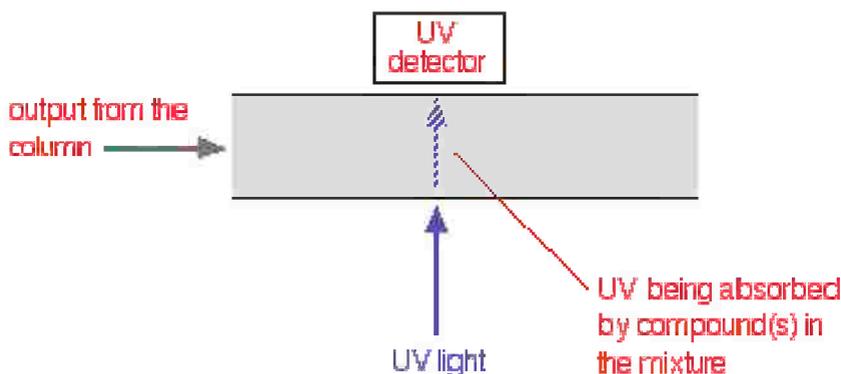
الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

وكذلك علي كفاءة فصل وتقدير العينة. وعلي حسب طبيعة المواد التي يتم فصلها وتقديرها يتم ضبط درجة حرارة الترموستات.

(٧): وحدة القياس الـ Detector

يزود الجهاز كما بالشكل بمصدر للأشعة فوق البنفسجية مسلط علي عمود الفصل الكروماتوجرافي ويتم اختيار الطول الموجي المناسب (علي حسب المواد التي يتم تقديرها) وفي الجهة الأخرى من العمود يوجد خلية حساسة لقياس معدل امتصاص الضوء خلال مروره داخل عمود الفصل وعند مرور مركب من المركبات التي يتم تقديرها يتغير الامتصاص الطيفي. وهكذا يمكن تقدير تركيز المادة الفعالة داخل المحلول عن طريق قياس الـ OD (قانون بير).

وهناك طرق أخرى للقياس منها الاعتماد علي معامل الانكسار Refractive index detectors حيث يتغير معامل الانكسار للمحلول عند مرور إحدى المركبات المفصولة فيه. كما إن هناك أجهزة يعتمد فيها الـ Detector علي وجود كشافات خاصة تعتمد فكرة القياس بها علي تأين المواد المذابة في اللهب Flam ionization detectors بعد تبخير المذيب. ويوجد أيضاً الـ Radiochemical detectors والمقياس الفلورسنتي Fluorescent detectors وغيرها من المقاييس العالية الحساسية.



شكل يوضح طريقة القياس باستخدام الأشعة فوق البنفسجية

Stationary phase الطور الثابت أو الساكن

ويكون الطور الثابت عبارة عن وسط سائل به جسيمات صلبة دقيقة قطرها عدة ميكرومترات لها خاصية الأدمصاص كما يمكن استخدام مواد لها القدرة علي التبادل الأيوني أو استخدام مواد هلامية ذات مسام محددة.

ولتحضير الطور الثابت هناك ثلاثة طرق :

الطريقة الأولى ربط السائل المستخدم مع الجسيمات الصلبة بروابط كيميائية مثل الرابطة (C-Si) التي تقاوم التميح ويستخدم الطور السائل المحتوي علي هذه الروابط في تحليل الهيدروكربونات المشبعة ذات السلاسل الطويلة والأثيرات المفلورة.

الطريقة الثانية: تحميل الجزء السائل للطور الثابت كغشاء رقيق علي أسطح الجسيمات الصلبة بهدف تقليل مسارات الانتشار والانتقال خلال الوسط الساكن وبالتالي يزيد من كفاءة الفصل. ولكن يعاب علي هذه الطريقة قلة سعة الوسط (الطور الساكن) مما يستدعي استخدام تركيزات منخفضة جداً من العينة لعدم تحميل عمود الفصل أكثر من سعته.

الطريقة الثالثة: ويكون فيها الوسط الثابت أو الساكن علي شكل جسيمات مسامية كروية منتظمة الشكل نصف قطرها صغير جداً من ٥ إلى ٣٠ ميكرومتر. وفي هذا النوع تكون الأعمدة الكروماتوجرافية قصيرة وتتراوح من ١٠ إلى ٢٥ سم.

نظم الفصل الكهربائي Electrophoresis

تُعد نظم الألكتروليتوفورزيس واحدة من أوسع الطرق المستخدمة في الفصل والتقدير لعدد من المركبات انتشاراً. سواء في فصل الجزيئات كبيرة الحجم مثل جزيئات البروتين والأحماض النووية أو الجزيئات صغيرة الحجم. ونظم الفصل باستخدام الهجرة الكهربائية تم اكتشافها بواسطة Reuss في عام ١٨٠٧ حيث لاحظ أن غرويات الطين الذائبة في الماء يحدث لها هجرة عند تعرضها لتيار كهربائي (وضعها داخل حقل كهربائي). ونظم الفصل بالـ Electrophoresis يمكن تبسيط الفكرة العامة لها كالتالي:

- عند وضع جزيئ مشحون في وسط سائل (محلول منظم) بين قطبين كهربائيين فإن الجزيء يتحرك مهاجراً داخل الحقل الكهربائي في اتجاه القطب الذي يحمل شحنة مضادة لشحنة الجزيء.
- حركة الجزيء وسرعته تتوقف على شحنة الجزيء وكتلته ويمكن التعبير عن ذلك بالمعادلة التالية $F = EQ$ حيث الـ F هي القوة التي يتحرك بها الجزيء في الحقل الكهربائي والـ E عبارة عن الحقل الكهربائي الموجود فيه الجزيء والـ Q هي شحنة الجزيء المتحرك.
- نستنتج من هذا أنه كلما زادت الشحنة الموجودة على الجزيء زادت القوة التي يتحرك بها، أي أن الأيونات الشائبة الشحنة أسرع في حركتها جهة القطب المضاد عن الأيونات الأحادية. وكذلك كلما زادت كتلة الجزيء قلته حركته داخل الوسط المشحون نتيجة زيادة قوي الاحتكاك مع جزيئات الوسط بالتالي الجزيئات كبيرة الحجم أو ثقيلة الوزن تتحرك ببطء داخل الحقل الكهربائي عن الجزيئات الخفيفة الوزن. بالتالي سرعة الحركة داخل الحقل الكهربائي هي دالة في النسبة ما بين شحنة الجزيء ووزنه.

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

■ عند مرور الجزيئات علي نقطة معينة بالقرب من القطب يتم تسجيلها باستخدام الأشعة فوق البنفسجية في حالة الـ Capillary electrophoresis أو عن طريق الصبغ بصبغة معينة في حالة الـ Gel electrophoresis وبالتالي يمكن معرفة زمن الهجرة والمسافة التي يقطعها الجزيء باستخدام محاليل قياسية من نفس المواد المقدره.

High- Voltage supply وجهاز الألكتروليتوفوريزس يتكون بصفة عامة من مصدر تيار عالي- Buffer solution ومادة حاملة أو مدعمة للمحلول المنظم وقد تكون هذه المادة عبارة عن ورق ترشيح Cellulose Filter paper أو ألياف أو شرائط من أسيتات السليولوز أو أنبوبة acetate strips أو جيل البولي أكريليميد Polyacrylamid gel أو أنبوية دقيقة من السليكا جيل Capillary tube كما في حالة الـ Capillary electrophoresis

أنواع الألكتروليتوفوريزس Types of electrophoresis

١- SDS- Page electrophoresis

الـ Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide gel Electrophoresis ويختصر بالـ SDS-Page وهو واحدة من الطرق الواسعة الانتشار للفصل الكهربائي والتي تستخدم بصفة عامة في فصل البروتينات. والفكرة الرئيسية فيه مبنية علي أساس ربط الطرف المحب للماء في البروتين بجزيئات مشحونة بشحنة سالبة وتغليف البروتين بها وتمثل هذه الجزيئات في الـ SDS بالتالي تسود الشحنة السالبة علي أسطح الجزيئات وعدد الشحنات السالبة المرتبطة بجزيء البروتين تتناسب مع الأطراف المحبة للماء به ومع حجم هذا الجزيء. وفي حالة وضع الجزيئات بعد معاملتها بالـ SDS في وسط مشحون كهربائيا فأن جزيئات البروتين

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

تتحرك في اتجاه القطب الموجب وقوة تحركها تتوقف على عدد الشحنات السالبة المرتبطة بالجزيء وكتلة الجزيء أو حجمه. والواقع أنه يتم تحميل المحلول المنظم المستخدم على مادة خاملة عديدة التبلور ويستخدم لذلك البولي أكريليميد Polyacrylamide وهذه المادة تحتوي على ثغور أو ثقوب دقيقة قطرها يختلف على حسب الغرض من استخدامها وبالتالي تحدد أي وزن جزيئي من البروتين يمكن فصله.

٢- Native gel Electrophoresis

وهذا النوع يشبه كثيراً النظام السابق ولكن يتم فصل البروتين دون استخدام الـ SDS وتعتمد الفكرة هنا على تغيير في طبيعة البروتين Denature وتعمل الشحنة الموجودة على سطح جزيء البروتين وكتلة الجزيء على تحديد حركة البروتين وسرعة هجرته في الوسط ومن ثم نحدد نوع البروتين المفصول.

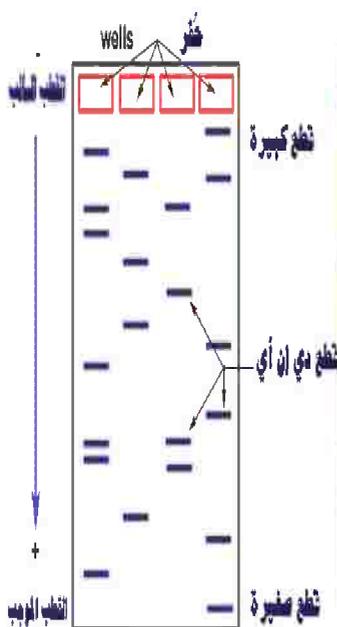
٣- الجيل الكترولفوريزس Electrophoresis gel

وهذا النوع من الطرق الشائعة والمعروفة في فصل البروتينات والأحماض النووية. ويكون الجيل في صورة قالب في أحد أطرافه أخاديد أو حفر صغيرة يتم حقن العينات بها. ويوضع الجيل داخل محلول منظم وبين قطبين من التيار الكهربائي ويمرور التيار يتكون حقل كهربائي يحدث خلاله الهجرة للطرف الآخر. والبروتينات بصفة عامة قد تكون ذات شحنة سالبة وقد تكون ذات شحنة موجبة ولكن الأحماض النووية تكون مشحونة بشحنة سالبة راجعه إلى مجموعات الفوسفات بالتالي هجرتها دائماً ناحية القطب الموجب.

وتتوقف الحركة على حسب حجم قطعة الـ DNA حيث تكون القطع الأصغر حجماً ذات سرعة أكبر في الحركة هذا وتستخدم قطع مرجعية معلومة الحجم لتحديد أو معرفة القطع المفصولة. وفي حالة القطع الكبيرة من الـ DNA فإنها قد تتمدد وتأخذ مسار ملتوى خلال هجرتها وللتغلب على هذه الظاهرة يتم تعريض لوح

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

الجيل إلى مستويات متدرجة من القوي الكهربائية علي طوال لوح الجيل، فتستمر في الحركة في صورة مستقيمة حتى تصل إلى النقطة التي تتوقف عندها، ويطلق علي هذا التعديل بالفصل عن طريق المجال الكهربائي المتردد Pulsed-field gel electrophoresis . وفي كل الحالات يتم الصبغ في النهاية لإظهار البروتينات أو قطع الـ DNA . وبالنسبة للـ DNA فأشهر مواد الصبغ وأكثرها استخداما هي بروميدات الأثيديوم Ethidium Bromide



شكل توضيح يبين تركيب الجهاز وعلي اليسار قالب الجيل عليه قطع الـ DNA

4- Electofocusing Gel

أيضا في نظام الفصل بالـ Gel electrophoresis يمكن ذكر نوع آخر وهو الـ Electofocusing Gel في هذا النوع يتم استخدام Gel متدرج في رقم الـ pH

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

ويحقن علياً مخلوط البروتينات المراد فصله بعد وضعه داخل حقل كهربائي. فتحدث هجره للبروتينات وتنفصل كلاً علي حسب حجمه وشحنته وتبدأ في الحركة علي سطح الجيل حتى يصل البروتين إلى نقطة معينة عندها يتناسب عندها رقم الـ pH مع الشحنة الموجودة علي الجزيء ويطرسب عند هذه النقطة. ولوح الجيل المستخدم قد يكون Agarose gel وهو عبارة عن مستخلص من الطحالب البحرية وهو مادة غير سامة مكونة من مواد عديدة التسكر Polysaccharide وتحضر بتركيز يتراوح من ٠.٥٪ إلى ٢٪ أو يستخدم Polyacrylamide gel وهو مادة عديدة التبلور (جزيئات عديد من acrylamide المرتبطة ببعضها البعض) وتركيزها يتراوح من ٣.٥٪ إلى ٢٠٪. تستخدم الأولى مع الأحجام الكبيرة للـ DNA والثانية مع القطع صغيرة الحجم (التي يتراوح حجمها من ٢٠٠ إلى 50000 bp).

٥- DNA denaturing polyacrylamide gels

وهذا النظام هو واحد من تقنيات الـ Gel electrophoresis ويطلق علياً أيضاً Sequencing gels ويستخدم لفحص جزيئات أو قطع الـ DNA الصغيرة الحجم حيث يمتاز بزيادة واضحة في الـ Resolution. ويتم ذلك عن طريق أحداث تغيير Denaturing في طبيعة الـ DNA بالتسخين ثم يحقن علي جيل البولي أكريليميد Polyacrylamide gel علي درجة حرارة قريبة من تلك المستخدمة لأحداث الـ Denaturing.

٦- Capillary electrophoresis

في هذا النوع يتم استبدال لوح الجيل بأنبوبة دقيقة القطر (٧٥ ميكرومتر) من السليكا جيل مثبتة علي قرص خاص وتملئ هذه الأنبوبة الدقيقة بمحلول منظم علي حسب المادة المفضولة وتوضع بين قطبين كهربائيين ويتم حقن العينة أوتوماتيكياً داخل الأنبوبة دقيقة القطر. فتتم هجرة الجزيئات علي حسب شحنتها إلى القطب

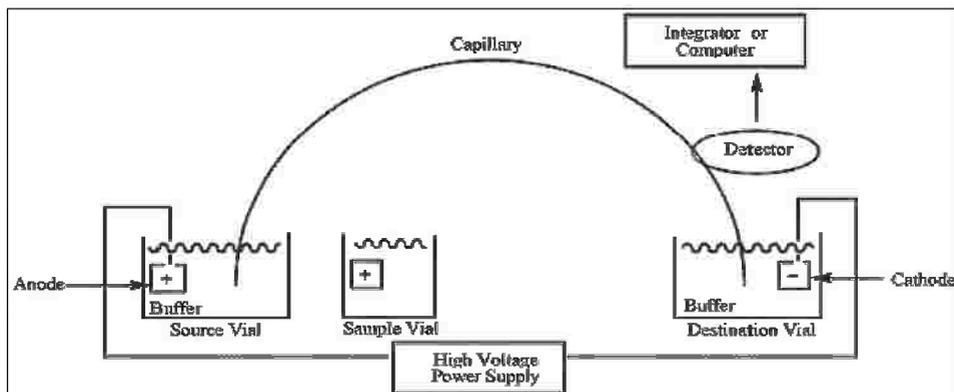
الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

المضاد في الشحنة والهجرة هنا تكون تحت تأثيرين الهجرة الكهربائية والخاصية الشعرية للأنبوبة الدقيقة والتي تدفع الجزيئات جهة القطب المضاد في الشحنة في حين أن هناك قوي أخري تعيق أو تقلل من سرعة هذه الهجرة وهي قوي الاحتكاك مع الجدران ومع جزيئات المحلول المنظم. وعند وصولها إلى نقطة معينة أثناء هجرتها يتم رصدها باستخدام الأشعة فوق البنفسجية علي طول موجي يختلف باختلاف المواد المقدره وتسجيل ذلك أتوماتيكيا بواسطة الـ Detector. وتسجل البيانات علي جهاز كمبيوتر ملحق بالجهاز وتظهر المركبات في صورة قمم يتم التعرف عليها باستخدام محلول قياسي مناسب التركيز من المواد المراد فصلها. وعن طريق ارتفاع كل قمة والمساحة التي تشغلها يتم حساب تركيز كل مركب.

وهذا النظام من أدق نظم الفصل حيث يتثني لنا فصل العديد من المركبات وبدقة عالية. بصرف النظر عن حجم الجزيء كما أن الكمية المأخوذة كعينة لاتتعدى بعض الميكروترات

والجهاز بصفة عامة يتكون من التالي:

- ultra violet Detector ويتراوح مداها من ١٩٠ إلى ٨٠٠ نانوميتر
- جهاز لضبط الحرارة Thermostat ويتراوح مداه من ١٥ درجة مئوية إلى ٦٠ درجة مئوية
- قرص لوضع زجاجات العينات سعته غالبا ٨٠ زجاجة
- الـ Capillary أنبوبة دقيقة من السليكا جيل يتراوح طولها من ٤٤ سم إلى ٩٠ سم وقطرها الداخلي ٧٥ ميكروميتر مثبتة علي قرص خاص تستخدم
- مولد تيار عالي الجهد يولد تيار حتى ٤٠ كيلو فولت
- حاقن أوتوماتيكي للعينة في وقت حوالي ٢ ثانية
- لمبة أشعة فوق بنفسجية
- جهاز كمبيوتر ملحق يتم توصيله بالألكتروفوريزسس لتسجيل وتدوين البيانات.



شكل تخطيطي يوضح المكونات الرئيسية للجهاز وطريقة عمله.

أجهزة قياس تركيز أيون الهيدروجين (حموضة المحاليل)

للتعبير عن حموضة الوسط نستخدم قياس اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الهيدروجين في الوسط ($-\text{Log} [\text{H}^+]$) وهو ما يعرف بالـ pH أو نستخدم قياس الحموضة الكلية أو الحموضة القابلة للمعايرة باستخدام محلول قلوي مخفف (NaOH) تركيزه 0.1 عياري في وجود دليل لوني. وقياس الـ pH يعتبر أدق لأنه يأخذ في الاعتبار قوة الحامض كما سبق أن أوضحنا ذلك في الباب الثاني عند تقدير حموضة الثمار.

ولتقدير الـ pH هناك عدة طرق مثل استخدام الأدلة اللونية التي يتغير لونها بتغير رقم الـ pH في المحلول وهذه ذات دقة منخفضة وغير دارجة الاستخدام. كما أن

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

هناك الأشرطة اللونية لمقارنة الـ pH للمحلول ويطلق عليها pH Strips وحساسيتها ودقتها تقع بين ٠.٢ إلى ٠.٥ وحدة.

والأكتر دقة وهو أجهزة قياس فرق الجهد potentiometric methods الناشئ عن تولد قوي دافعة كهربائية Electromotive Force في المحلول ما بين قطبين مختلفين نتيجة تأثير أيونات الهيدروجين في الوسط أو ما يطلق عليها بأجهزة الـ pH meter ودقة هذه الطريقة عالية جداً تصل إلى ٠.٠١ وحدة.

وقياس الـ pH يعد ضرورة حتمية عند العمل في المجالات العلمية المختلفة. ورقم الـ pH من العوامل الهامة حيث يتوقف عليه العديد من الصفات الهامة مثل ذوبان الأملاح ونشاط الأنزيمات وتيسير العناصر الغذائية الموجودة في التربة وامتصاصها ونشاط الكائنات الحية الدقيقة بالتربة وغيرها من العوامل الهامة. بالتالي لا يكاد يخلو مختبر علمي من جهاز لقياس رقم الـ pH .

جهاز الـ pH meter

أول من فكر في قياس الحموضة عن طريق استخدام تركيز أيونات الهيدروجين في المحلول هو Sorenson عام ١٩٠٩. وأوضح أن رقم الـ pH يتدرج من ٠ إلى ١٤ وعبر عنة باللوغاريتم السالب لتركيز أيونات الهيدروجين في المحلول. وأول جهاز لقياس رقم الـ pH تمت صناعته واعتماده عام ١٩٣٤ بواسطة Arnold Beckman. ثم بعدها تطورت الصناعات وأنتج العديد من الأجهزة العملية السهلة الاستخدام لقياس حموضة الوسط.

ولفهم كيفية عمل الجهاز لابد من إيضاح بعض النقاط الهامة التالية:

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

القوي الدافعة الكهربائية (emf) Electro-motive Force : في

حالة وضع قطبين كهربائيين في محلول يحتوي على تركيز مختلف من أيونات الهيدروجين الموجبة $[H^+]$ تتولد قوي دفع كهربائية بين القطبين نتيجة حركة أيونات الهيدروجين تجاه القطب المعاكس في الشحنة يطلق على هذه القوي بالقوي الدافعة الكهربائية emf. هذه القوي ينشأ عنها فرق في الجهد وعند توصيل الألكترود بجهاز لقياس الجهد Potentiometer يمكن قياس فرق الجهد الناتج عن نشاط أو فاعلية تركيز أيونات الهيدروجين في المحلول.

القطب المرجعي standard reference electrode : وهو ما

يعادل تركيز محلول من الهيدروجين مقداره 1 عياري عند ضغط يساوي واحد ضغط جوي يكافئ فرق جهد مساوي للصفري. ويأخذ هذا كقطب مرجعي.

معادلة نيرنست Nernst equation : هذه المعادلة توضح فرق

الجهد في الخلية الكهروكيميائية كدالة في تركيز الأيونات التي تؤثر على التفاعل أو الداخلة في التفاعل وتصاغ هذه المعادلة كالتالي:

$$E = E_0 - \frac{RT}{nF} \ln Q$$

حيث الـ Q هي النسبة التفاعلية Reaction quotient ، والـ n هي عدد الإلكترونات المتبادلة عند درجة حرارة ثابتة يعبر عنها بالـ RT/F وتساوي ثابت. وبالتالي يكون هذا الثابت مقداره 0.0591 عند درجة حرارة قدرها 25 درجة مئوية. وللتبسيط نطبق المعادلة على التفاعل التالي:

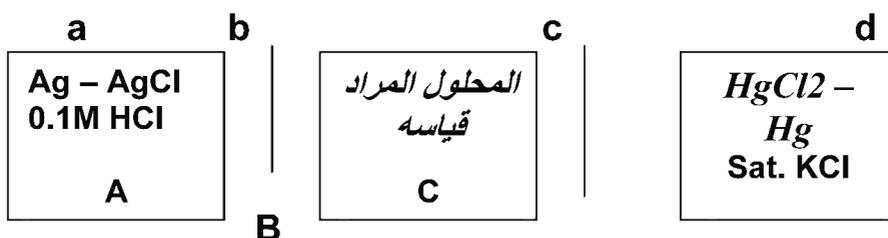


الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

فإن فرق الجهد الناشئ يمكن حسابه كالتالي:

$$E = 1.51 - \frac{0.0591}{5} \text{Log} \left(\frac{[Mn^{2+}]}{[MnO_4^-][H^+]^5}} \right)$$

- **القطب الزجاجي Glass electrode**: وفكرة عمل القطب الزجاجي هي أساسية في جهاز الـ pH meter وهي بسيطة وسهلة ويمكن إيجازها في التالي: وجد أن الغشاء الرقيق المصنوع من الزجاج النقي ذات نفاذية اختيارية لأيونات الهيدروجين الموجبة $[H^+]$ وعند تصميم خلية كما الشكل يمكن عندها قياس تركيز أيونات الهيدروجين ومنه قياس رقم الـ pH.



حيث الـ A توضح عنصر الفضة المرتبط بكلوريد الفضة وهي عبارة نصف الخلية الأول المحتوي علي محلول الـ HCl تركيزه 0.1 M والـ C عبارة عن محلول غير معلوم مراد قياسه، أما الـ D فعبارة عن نصف الخلية الثاني وهو مرجعي أو قياسي. والـ B عبارة عن الغشاء أو الجدار الزجاجي وهو ذات تركيز محدد وثابت من H^+ .

إذاً هناك جانب من الزجاج علي تركيز أيونات الهيدروجين معروف وثابت (0.1 من HCl) وعلي الجانب الأخر هناك نشاط متغير ناتج عن تركيز أيونات الهيدروجين المراد قياسه. وهنا فرق الجهد عبر الجدار الزجاجي الناشئ عن تباين

الأجهزة العلمية المستخدمة في التحليل

نشاط أيونات الهيدروجين يمكن قياسه. كما أن هناك فروق في الجهد عند a, c, d وهذه يمكن اعتبارها ثوابت يرمز لها بالرمز $E'c$. ويمكن معرفة الـ $E'c$ باستخدام محلول معلوم الـ pH عند النقطة c وقياس فرق الجهد E . بالتالي رقم الـ pH لأي محلول مجهول نستطيع حسابه من المعادلة التالية:

$$pH = \frac{E - E'c}{0.00019837 \times T}$$

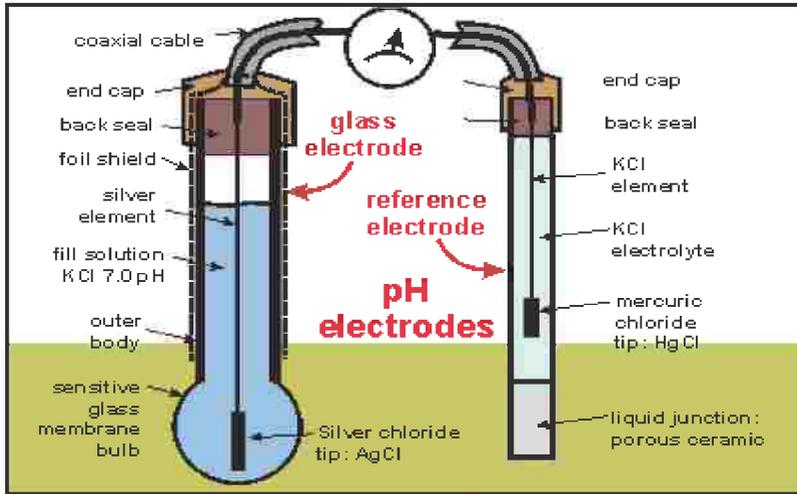
علماً بأن الـ E عبارة عن الـ emf للمحلول المراد قياسه والـ $E'c$ هي الـ emf للألكتروليت وهي ثابتة أما الـ T فهي درجة الحرارة المطلقة.

واستخدام القطب الزجاجي له عدة مميزات أهمها:

- أ. يمكن استخدامه بدقة حتى مع المحاليل المحتوية على مواد مؤكسدة أو مختزلة.
- ب. يمكن استخدامه لقياس رقم الـ pH للمواد النصف جافة مثل الجبن وغيرها
- ج. استخدامه قياسي في حالة المحاليل البيولوجية.
- د. لا يحدث تلف أو تلوث في المحلول المقاس بالتالي يمكن استخدام المحلول لأجراء القياسات الأخرى بأمان.
- هـ. دقة القراءات عالية ونسبة الخطأ لاتتعدى ٠.١.

ويعاب عليه فقط أنه في حالة المحاليل العالية القوة pH أكبر من ١٠ تكون القراءات غير دقيقة.

ويجب معايرة الجهاز من وقت لآخر باستخدام سلسلة من المحاليل المنظمة المعلومة القوة pH series of buffers of known pH متدرجة من ١ إلى ٩ ورسم منحنى دقة الجهاز.



شكل يوضح تركيب جهاز الـ pH meter وكيفية عمله.