كروماتوكرافي السائل ذو الأداء العالي

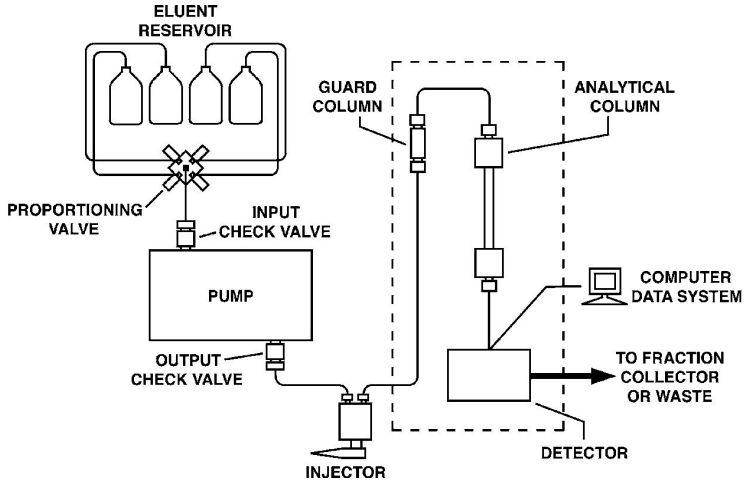
(High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)

طور كروماتوكرافي العمود السائل الذي ظهر في ستينات القرن الماضي من خلال التحسينات التي جرت في تكنولوجيا الأعمدة والوحدات الآلية الأخرى (المضخات وصمامات الحقن ووحدات التحسس). وجهاز كروماتوكرافي السائل ذو الأداء العالي هو مرادف لكروماتوكرافي السائل ذو الضغط العالي التي تعكس استخدام الضغط العالي في الأعمدة، إلاّ أن استخدام كلمة الأداء مفضل لتعكس الفصل الجيد في هذا الكروماتوكرافي. وهناك مميزات عدة لإستخدام كروماتوكرافي السائل ذو الأداء العالي:

1- السرعة (ويتم التحليل بمدة 30 دقيقة أو أقل)
2- استعمال أنواع واسعة مختلفة من الطور الثابت
3- الفصل الجيد
4- الحساسية (لاستخدام وحدات تحسس مختلفة)
5- سهولة استرجاع النموذج

مكونات نظام الـ HPLC

الشكل أدناه يبين مخطط لنظام الـ HPLC.



المكونات الرئيسة للنظام هي المضخة ووحدة حقن النموذج والعمود ووحدة التحسس وكذلك أوعية الطور المتحرك (المذيب) وجامع الأجزاء (Fraction collector) الذي يستعمل في حالة الرغبة في استرجاع مكونات النموذج.

1- المضخة (Pump)

تستعمل مضخة نظام الـ HPLC لإيصال مذيب الطور المتحرك إلى العمود ويكون بسرعة جريان 0,4 – 1 مل/دقيقة، وبصورة مسيطر عليها ودقيقة ومضبوطة. ويكون المحلول إما منفرداً (نوع واحد من المذيب) أو يكون بشكل نظام الغسل المتدرج، أي تغيير تركيز الطور المتحرك في أثناء عملية الفصل وذلك بمزج الطور المتحرك من إثنين أو أكثر من الأوعية. يعد الغسل المتدرج مهم جداً للفصل الجيد لجميع مكونات النموذج وللفصل الأمثل.

2- وحدة حقن النموذج (Sample injection port)

إن دور وحدة الحقن هو لوضع النموذج في مسار الطور المتحرك لايصاله إلى العمود.

3- العمود (Column)

يكون العمود مصنوعاً عادة من الفولاذ المقاوم للصدأ، ويكون ذو نهايتين تسمحان بوضعه بين وحدة الحقن ووحدة التحسس في النظام. كما توجد أعمدة مصنوعة من الزجاج والسيليكا والتيتانيوم وكذلك من مادة راتنج إيثر الكيتون متعدد الإيثر (Polyether ether ketone, PEEK). أعمدة الـ PEEK هذه ضرورية جداً عند استعمال محاليل الأس الهيدروجيني وتركيز الملح المرتفعين الضرورية لنظام الـ HPLC تبادل الأيونات. وتوجد هناك العديد من الأنواع والأحجام من الأعمدة التجارية وتكون عادة 5 سم × 50 سم (أو أكبر) لأعمدة الدراسات التحضيرية ونزولاً إلى الأعمدة الشعرية المبطنة الجدران.

الأعمدة الأولية (Precolumn): هناك ما يسمى بالأعمدة الأولية (Precolumns) التي تسبق أعمدة الفصل، وهي أعمدة قصيرة (5 سم أو أقل) وتسمى بالعمود الحارس (Guard column) والهدف منها هو لحماية عمود الفصل من المكونات التي تدمص

بقوة. ويوضع العمود الحارس بين وحدة الحقن وعمود الفصل. وتكون هذه الأعمدة نبيذة (Disposable) أي ذات استعمال قليل ورخيصة الثمن بالمقارنة مع عمود الفصل، ومعبأة بحبيبات دقيقة جداً.

الأعمدة التحليلية (Analytical column): إن طول الأعمدة التحليلية المستخدمة في الـ HPLC الأكثر شيوعاً هو 10 و 15 و 25 سم وبقطر داخلي 4,6 أو 5 ملم. وفي الآونة الأخيرة استخدمت الأعمدة القصيرة (3 سم) ومعبأة بحبيبات دقيقة بقطر 3 µ أو أقل والتي لاقت رواجاً كبيراً وذلك للفصل السريع. وفي السنوات الأخيرة إزداد استعمال الأعمدة ذات القطر الداخلي الصغير (أقل من 0,5 – 2 ملم)، التي تشمل الأعمدة الشعرية المبطنة. ومن ميزات استخدام الأعمدة ذات الأقطار الصغيرة هو خفض استهلاك محلول الطور المتحرك وزيادة تركيز منحنى المركب المفصول وزيادة جودة الفصل.

4- مواد التعبئة (Packing materials)

في معظم أنواع الكروماتوكرافي تشكل مواد التعبئة المادة المدعمة والطور الثابت معاً. ومن متطلبات مواد التعبئة المستخدمة في أعمدة الـ HPLC هي أن تكون ذات ثبات كيميائي جيد وتكون ذات قوة ميكانيكية كافية لتتحمل الضغط العالي وأن تتوفر بأحجام محددة ومدى توزيع حجم حبيبات ضيق. وهناك إثنين من المواد تلائم المتطلبات المذكورة أعلاه وهما السيليكا المسامية والراتنجات العضوية الصناعية.

مواد التعبئة المصنوعة من السيليكا المسامية (Porous silica): السيليكا المسامية تلائم بصورة جيدة متطلبات مواد التعبئة وممكن تحضيرها بأحجام حبيبات ومسامية مختلفة وبشكل واسع وأيضاً بمدى أحجام حبيبات ضيقة. إن حجم الحبيبات وأقطار المسامات جداً مهمة في الفصل وذلك لأن الحبيبات الصغيرة تقلل المسافة التي يقطعها المركب بين الطورين الثابت والمتحرك والتي تسهل عملية التوازن (توزيع المركب بين الطورين الثابت والمتحرك حسب معامل التوزيع) والتي ينتج عنها كفاءة عمود جيدة، إلاّ أنه ينتج عن ذلك أيضاً مقاومة كبيرة لجريان سائل الطور المتحرك. وتستخدم الحبيبات الكروية الشكل وبأقطار 3 و 5 و 10 ميكرومتر في الأعمدة التحليلية. إن استخدام الحبيبات ذات المسامات بأقطار صغيرة يزيد المساحة السطحية وسعة النموذج

بالحد الأقصى والتي هي عبارة عن كمية النموذج الذي ممكن فصله في العمود. وتستخدم مواد تعبئة ذات مسامات بأقطار 50 -100 أنكستروم وبمساحة سطحية 200 – 400 م2/غم لفصل المركبات ذات الأوزان الجزيئية الصغيرة (أقل من 500 دالتون)، في تستعمل حبيبات ذات مسامات بأقطار أكثر من 300 أنكستروم للمركبات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة مثل السكريات المتعددة والبروتينات.

مواد التعبئة المبلمرة المسامية (Porous polymeric column packings): وهي عبارة عن راتنجات عضوية صناعية تمتاز بثباتية كيميائية عالية وبإمكانية تحوير صفاتها التجاذبية الكروماتوكرافية من خلال التحويرات الكيميائية.

5- وحدة التحسس (Detector)

تعمل وحدة التحسس على ترجمة تغيرات تركيز مكونات النموذج في محلول الغسل إلى إشارات كهربائية. وهناك أنواع عدة من وحدات التحسس ممكن أن تستخدم في أجهزة الـ HPLC ومنها:

1- **وحدة تحسس سبكتروفوتومترية ذات الأشعة مرئية وفوق بنفسجية (UV-Vis absorption detectors):** وهذه الوحدات تقيس امتصاص الأشعة من قبل المركبات التي تحتوي على الكروموفورات.
2- **وحدة تحسس فلورومترية (Fluorescence detectors):** وتستعمل بالنسبة للمركبات العضوية التي ممكن أن تعيد انبعاث جزء من الأشعة فوق البنفسجية الممتصة على طول موجي أطول (طاقة أقل).
3- **وحدة تحسس معامل الإنكسار (Refractive index detectors):** وهذه الوحدات تقيس التغير في معامل إنكسار الطور المتحرك (المذيب) بسبب وجود المركبات المذابة.

تطبيقات في الـ HPLC

تعرفنا في المحاضرات السابقة عن أساسيات القيزيوكيميائية لعمليات الفصل الكروماتوكرافي – الإدمصاص والتوزيع والتبادل الأيوني والإقصاء الجزيئي، إلاّ أن أنماط عمليات الفصل التي تجرى في أجهزة الـ HPLC أكثر من تلك الموجودة في أنماط الكروماتوكرافي التقليدية. ومن أمثلة تطبيقات أجهزة الـ HPLC في تحليل مكونات المواد الغذائية مبينة في الجدول الآتي:

جدول يبين أمثلة لتطبيقات أجهزة الـ HPLC في تحليلات مكونات مختلف الأغذية.

المركبات	نظام الفصل	وحدة التحسس
سكريات أحادية وقصيرة السلسلة	Ion-exchange or Normal-or reversed phase	Refractive Index
فيتامين E	Normal or reversed phase	Fluorescence; UV
أحماض أمينية	Ion-exchange or reversed phase	Vis spectrophotometer
سموم فطرية	Reversed phase	
مضادات حيوية	Reversed phase	UV; Fluorescence UV

وفي الحقيقة، أن نظام كروماتوكرافي الطور المعكوس (Reversed-phase chrom.) هو الأكثر استعمالاً في أجهزة الـ HPLC الحديثة.

أنماط الفصل المستخدمة في أجهزة الـ HPLC

1- **الطور الإعتيادي (Normal phase):** في نظام الطور الاعتيادي في الـ HPLC، يكون الطور الثابت مادة إدمصاص قطبية (Polar)، مثل السيليكا أو السيليكا المرتبطة كيميائياً بمجاميع وظيفية غير أيونية مثل الهيدروكسيل (Hydroxyl) والنايترو (Nitro) والسيانو (النايترايل) (Cyano) أو الأمينو(Amino). في حين يكون الطور المتحرك عبارة عن محلول غير قطبي (Non-polar)، مثل الهكسان، المضاف له محورات أكثر قطبية مثل كلوريد المثيلين (Methylene chloride)، للسيطرة على قوة المحلول (Solvent strength). قوة المحلول تعود إلى الطريقة التي يؤثر فيها المحلول في سرعة حركة النموذج في العمود. فالمحاليل الضعيفة تزيد إحتجاز أو بقاء (Retention) (قيم الـ K' كبيرة)، في حين المحاليل القوية تقلل الإحتجاز (قيم الـ K' صغيرة).

ويستخدم نمط الطور الإعتيادي في هذه الأجهزة لفصل المركبات الفينولات المتعددة الحيوية المعزولة من المصادر النباتية الطبيعية، مثل العنب والكاكاو. كما يستخدم لفصل المركبات المحبة للماء مثل أنواع الكربوهيدرات، وكذلك الفيتامينات القطبية نسبياً.

2- **الطور المعكوس (Reversed phase):** أكثر من 70% من الفصل بأجهزة الـ HPLC تستخدم نمط الطور المعكوس، التي تستخدم طور ثابت غير قطبي وطور متحرك قطبي. الطور الثابت هو عبارة عن السيليكا المرتبطة بسلسلة مكونة من 18 ذرة كربون (C_{18})(-$(CH_2)_{17}CH_3$) هي الأكثر شيوعاً في الطور المعكوس، كما تستعمل هيدروكربونات ذات سلسلة أقل مثل C_8 و C_4 أو مجموعة الفينول. أما بالنسبة للطور المتحرك فيكون قطبي، وعادة ما يكون مزيج من الماء مع الميثانول أو الأسيتونايترايل. وتحتجز المركبات المفصولة عن طريق التداخلات غير المحبة للماء (Hydrophobic interactions) مع الطور الثابت غير القطبي، وتغسل بتدرج إنخفاض القطبية (أي تغسل المركبات القطبية أولاً ثم الأقل قطبية ثم الأقل). وأن زيادة قطبية محلول الغسل (زيادة الماء) يزيد من زمن الإحتجاز (Retention) (قيمK' كبيرة)، في حين زيادة المذيب العضوي لمحلول الغسل يؤدي إلى خفض الإحتجاز (قيم K' صغيرة).

ويستعمل نمط الطور المعكوس في معظم استعمالات أجهزة الـ HPLC وخصوصاً في تحليلات البروتينات النباتية، مثل بروتينات الحبوب. كما يستعمل هذا النظام في تحليل الفيتامينات الذائبة بالماء والدهون. كما يستخدم هذا النمط في كثير من التحليلات الغذائية مثل مركبات النكهة المضافات الغذائية مثل الكافائين والمحليات الصناعية والأصباغ وغيرها.

3- التبادل الأيوني (Ion-exchange): مواد التعبئة المستعملة في التبادل الأيوني هي راتنجات عضوية مثل الستايرين المتعدد المسلفنة (Sulfonated poly-styrene-divinylbenzene)) والطور المتحرك هو محلول منظم مائي ويتم السيطرة على إحتجاز المركبات بتغيير القوة الأيونية للطور المتحرك و/أو الأس الهيدروجيني، كما يستخدم الغسل المتدرج (زيادة القوة الأيونية بصورة متدرجة) بصورة كبيرة.

يستخدم التبادل الأيوني في تحليلات الأحماض الأمينية والكربوهيدرات والكشف عن الأيونات اللامعدنية. الشكل أدناه يبين تحليل الأحماض العضوية والأنيونات اللاعضوية في القهوة باستخدام التبادل الأيوني.

4- الإقصاء الجزيئي (Size-exclusion): يستعمل كروماتوكرافي الإقصاء الجزيئي (Size exclusion chromatography, SEC) في تجزئة المركبات إعتماداً على الحجم، فالجزيئات الكبيرة تغسل أولاً. ويختار الطور المتحرك في هذا النمط بقدرة المحول على إذابة المركبات وعادة تستعمل المحاليل المائية المنظمة لفصل البوليمرات الحيوية مثل البروتينات والسكريات المتعددة.

الطرائق الميكروبيولوجية الكمية (ANALYTICAL MICROBIOLOGY)

أسس التحاليل الميكروبيولوجية (Principles of Microbiological Assays)

نظراً لتشابه الاحتياجات التغذوية بين الأحياء المجهرية وحيوانات التجارب فإنه بالامكان استعمال الأحياء المجهرية لتقدير العديد من المواد الغذائية كمياً والتي تعد من المكونات الأساسية للخلايا الحية. إن احتياجات بعض الأحياء المجهرية إلى مواد غذائية متخصصة يشير إلى عدم إمكانيتها على تخليق هذه المواد الغذائية، ومن المعلوم أن الأحياء المجهرية تحتاج إلى جميع الفيتامينات الذائبة بالماء، وكذلك جميع الأحماض الأمينية التي تحتاجها الحيوانات المتقدمة، وإن التشابه الأساسي في الاحتياجات الأيضية (Metabolic requirements) بين العديد من الكائنات الحية قد ساعد إلى حد كبير على التعرف على المواد الغذائية التي تعد أساسية لكل من الأحياء المجهرية والحيوانات. كذلك، فإن استعمال الأحياء المجهرية للتقدير الكمي للفيتامينات والأحماض الأمينية والبيورينات (Purines) والبيريدينات (Pyrimidines) قد ساعد على توسيع معلوماتنا حول توزيع هذه المركبات العضوية في الطبيعة. وقد يعود التعرف على فعالية المضادات الحيوية (Antibiotics) أحياناً إلى التداخلات (Interactions) التي تحصل بين هذه المضادات الحيوية وبين بعض المركبات الوسطية الأيضية (Metabolites) المهمة التي توجد في الخلية الحية.

تعرف الطرق الميكروبيولوجية الكمية بأنها ذلك الفرع من الميكروبيولوجي الذي تستعمل فيها الأحياء المجهرية لتقدير بعض المركبات الكيميائية كمياً.

تعتمد التحاليل الميكروبيولوجية على أساس أن وجود كميات محددة من بعض المركبات سوف يقرر درجة نمو الكائن الحي، وعلى الرغم من أن ظروف الفحص تختلف من مختبر لآخر أو من باحث لآخر، إلاّ أن التقانات الأساسية تكون واحدة. فمثلاً تضاف مادة الفحص (Test substance) إلى وسط النمو الذي قد يكون سائلاً أو هلاماً ومن ثم يلقح وسط النمو بالأحياء المجهرية وبالتالي تقاس درجة تحفيز النمو أو تثبيطه. إن استجابة الأحياء المجهرية لتحفيز النمو أو تثبيطه يعتمد أساساً على تأثير المادة المضافة في وسط النمو على التفاعلات الكيميائية الحيوية التي تحدث خلال عمليات الأيض للكائن الحي. وعلى وجه العموم، فإن الاستجابة تكون ايجابية عادة عندما تكون المادة المضافة إلى وسط النمو عبارة عن مادة

غذائية، وبالمقابل تكون هذه الاستجابة سلبية عندما تكون المادة المضافة إلى وسط النمو عبارة عن مضادات حيوية.

وبالإمكان قياس الاستجابة (ايجابية كانت أم سلبية) بعدة طرق مثلاً (1) الامتصاص الضوئي (Absorbance) أو الوزن الجاف للخلايا أو قياس مساحة النمو. و (2) قياس المركبات الناتجة خلال العمليات الأيضية، كقياس كمية الحامض المنتجة أو قياس ثاني أوكسيد الكربون المنتج أو كمية الأوكسجين المستهلك أو اختزال النترات، أو تحلل كريات الدم الحمراء أو تثبيط إنبات السبورات.

الأحياء المجهرية المستعملة (The Microorganisms)

إن الكائن الحي المثالي المستعمل في الطرق الميكروبيولوجية الكمية يجب أن يكون:

1- حساساً تجاه المادة المضافة إلى وسط النمو، أي سريع الاستجابة.
2- يكون تكاثره سهلاً وسريعاً.
3- يفرز بعض المركبات الوسطية خلال العمليات الأيضية التي يكون من السهل قياسها.
4- من المفضل أن تكون الأحياء المجهرية المستعملة غير مرضية.
5- لها درجة معقولة من التخصص.

إن للنمو السريع للأحياء المجهرية عدة مزايا في سرعة الحصول على النتائج وزيادة الدقة ويكون من المفيد أيضاً أن تكون الأحياء المجهرية المستعملة مناسبة للفحص تجاه عدة مركبات.

تشتمل الأحياء المجهرية المستعملة في هذه الفحوصات على البكتريا والخمائر والفطريات والبرتوزوا، ويفضل استعمال البكتريا مقارنة ببقية الأحياء المجهرية لسهولة التعامل معها، إذْ إنها تستعمل للتعرف على الاحتياجات الغذائية الأساسية مثل البروتينات والأحماض الأمينية والكاربوهيدرات والفيتامينات وكذلك للتعرف على مدى كفاءة المواد المطهرة (Antiseptics) والمواد المعقمة (Disinfectants) والمواد الصيدلانية المستعملة للعلاج (Chemotherapeutics).

ومن البكتريا التي تستعمل بكثرة في التحاليل الميكروبيولوجية الكمية هي بكتريا حامض اللاكتيك Lactobacillus و Leuconostoc و Streptococcus وذلك بسبب أن

درجة تعقيد الاحتياجات التغذوية لهذه البكتريا تكون مشابه في درجة تعقيدها أو أكثر تعقيداً بالمقارنة مع الاحتياجات التغذوية للأحياء المجهرية الأخرى، كما أن درجة تعقيد الاحتياجات التغذوية لبكتريا حامض اللاكتيك لواحد أو أكثر من مجموعة فيتامينات B وللبيورينات والبيريمدينات والعديد من الأحماض الأمينة وكذلك قابلية تحلل هذه البكتريا للكربوهيدرات تجعلها مفيدة جداً للتحاليل الميكروبيولوجية.

إن التحاليل التي تستعمل فيها الخمائر تعطي مزايا أخرى مثلاً السهولة والسرعة وقد أخذت طريقها في مجال تحليل الفيتامينات، كما أنها تتمكن الخمائر من النمو في الظروف الهوائية وبصورة خاصة عند استعمال الهزاز الميكانيكي(Shaker). إلاّ أنه لا توجد للفطريات استعمالات واسعة مقارنة بالبكتريا كأحياء مجهرية للتحاليل، لكنها مع ذلك تستعمل للكشف عن تأثير المضادات الحيوية على نمو الأحياء المجهرية وكذلك الفيتامينات والعناصر النادرة. ومن الصعوبات التي تواجه إستعمال الفطريات في هذا المجال هو بطيء نموها، إلاّ إنها تستعمل في حالة عدم وجود أحياء مجهرية أخرى للفحص أو للتعرف على مدى فعالية المواد المضادة للفطريات (Fungicidal evaluation) أو المواد المحددة لنموها (Fungistatic evaluation).

للبروتوزوا احتياجات تغذوية متعددة تشتمل على الأحماض الأمينية والفيتامينات ومشتقات الأحماض النووية والهورمونات. تنتج البروتوزوا كميات لا بأس بها من الإنزيمات المحللة للبروتينات وهذا ما يجعلها مفيدة في فحوصات البروتينات والكميات المتاحة بيولوجياً (Biological availability) من البروتينات.

بصورة عامة، من الصعوبات التي تصاحب العمل مع الأحياء المجهرية هو حفظ المزرعة (Culture) في حالة فسلجية معينة. إذْ يجب أن يتم الحفاظ على المزرعة بحيث تعطي الأحياء المجهرية الموجودة فيها نفس الاستجابة مرة بعد أخرى في التحاليل المراد الكشف عنها. ومن أبسط الطرق لحفظ المزرعة البكتيرية تكون في الآكر المائل (Agar slants) على أن تجدد شهرياً. ومن الطرق الأخرى الشائعة لحفظ المزرعة البكتيرية هي التجفيد (Lyophilization).

إن الوقت اللازم لعملية التحضين الذي يستغرقه فحص ما في هذا المجال يتراوح من عدة ساعات بالنسبة لتحاليل التعكير(Turbidimetric assays) المستعملة للمضادات الحيوية

إلى 7– 8 أيام للفحوصات التي تستعمل فيها البروتوزوا، وفي الفحوصات التي تشتمل على فترات تحضين قصيرة، فإنه يتوجب استعمال المزارع البكتيرية في طور النمو اللوغارتمي (Log phase) لنموها. كما يجب أن تكون درجة الحرارة المختارة للتحضين مناسبة بحيث تعطي نمواً جيداً، لكن ليس بالضرورة أن تعطي أقصى درجة من النمو، كما ويجب أن تضبط درجة الحرارة في حدود معينة لا يكون التفاوت فيها كبيراً.

وسط النمو (The Medium)

إن وسط النمو المثالي في التحاليل الميكروبيولوجية الكمية يجب أن تتوفر فيه الشروط الآتية:

1- يجب أن يحتوي على جميع العوامل الضرورية للنمو، إذْ يجب تجهيز الأحياء المجهرية بمصدر جيد للطاقة ومصدر نيتروجيني، كما يجب أن يحتوي الوسط على الأملاح المعدنية الضرورية. أما وسط النمو المحضر مختبرياً (Synthetic media) فيجب أن يكون مجهزاً بعوامل النمو (Growth factors). وفي التحاليل المتعلقة بتأثير عوامل النمو والتي يتوقع فيها أن تكون استجابة الأحياء المجهرية ايجابية، فإنه يجب تحضير وسط النمو بحيث يكون محتوياً على جميع المغذيات الضرورية لنمو الأحياء المجهرية عدا واحد من المغذيات الذي يؤثر في النمو. بعد ذلك يضاف هذا المغذي بكميات متزايدة ويلاحظ تأثيره على نمو الكائن المجهري الحي. أما في التحاليل المتعلقة بتأثير عوامل النمو والتي تكون فيها الاستجابة سلبية، فإن عدم النمو الجيد يعود إلى وجود مادة مثبطة في وسط النمو.
2- يجب ألاّ يحتوي وسط النمو أو مستخلصات الأغذية المضافة على مواد محفزة أو منشطة للنمو (Stimulants) أو مواد أو مضادات (Antagonists) للمادة المراد الكشف عنها، ويجب ألاّ يحتوي الماء المستعمل في تحضير وسط النمو على العناصر المعدنية أي يجب أن يكون خالي من الأملاح (Demineralized)، كما يجب أن تكون المركبات المستعملة في تحضير وسط النمو نقية.
3- يجب أن يكون الأس الهيدروجيني (pH) لوسط النمو متوافقاً مع فعالية المادة المراد الكشف عنها وكذلك مع نمو الأحياء المجهرية. فمثلاً عند دراسة أهمية بروتين ما لنمو

كائن حي معين، فإنه من غير المناسب أن يكون pH وسط النمو عند الـ pH الذي تتغير فيها الصفات الطبيعية (Denaturation) لذلك البروتين.

الطرائق الميكروبيولوجية (Microbiological Methods)

هنالك أربع طرائق رئيسة للفحوصات أو التحاليل الميكروبيولوجية التي يمكن بوساطتها مقارنة فاعلية (Potency) النماذج أو التحاليل القياسية وهي: الانتشار (Diffusion) والتعكير أو التخفيف (Turbidity or dilution) والطريقة الوزنية (Gravimetric method) وأخيراً الاستجابة الأيضية (Metabolic response).

وسوف نناقش كل طريقة من هذه الطرائق بشيء من التفصيل:

1- طريقة الانتشار: في طريقة الانتشار، تتكون منطقة نمو (Growth zone) أو منطقة تثبيط (أي عدم نمو) (Inhibition zone) للكائن الحي المراد فحصه في منطقة وضعه على وسط النمو. ويسمح للمادة المراد فحصها أن تنفذ أو تنتشر خلال وسط النمو (الذي يكون صلباً عادة). وقد يكون الكائن الحي عبارة عن بكتريا أو بكتريوفاج (Bacteriophage)أو فطر أو بروتوزوا أو طحالب. وتتكون مناطق النمو (Growth zones) في حالة كون المادة المراد فحصها عبارة عن فيتامينات أو أحماض أمينية...الخ، وتتكون مناطق تثبيط في حالة كون المادة المراد فحصها عبارة عن مضادات حيوية. وتعطي حجم المنطقة (تثبيط أم نمو) مؤشراً على تركيز المادة المفحوصة، ويعبر عنها كعلاقة خطية مستقيمة بين المنطقة وبين لوغاريتم تركيز المادة المفحوصة. وبوساطة قياس المسافة التي نفذت أو إنتشرت فيها المادة ومقارنتها بمادة قياسية معلومة (Known standard) يمكن عندها التعريف على قوة أو فاعلية النموذج تحت الفحص.

2- طريقة التخفيف أو التعكير: إن التفريق بينهما يكمن في أن التخفيف أما أن يعطي نقطة نهاية في وسط الآكار الصلب أو الوسط السائل (Broth) أو لا يعطي(All-or-none endpoint). أما التعكير فيقيس النمو المتدرج أو الاستجابة الأيضية (Metabolic response). ولطريقة التخفيف أهمية كبيرة للعاملين في مجال تحليل الأغذية خاصة فيما يتعلق بالكشف عن المضادات الحيوية، وتعد طريقة التخفيف بسيطة، إذْ تعمل عدة تخافيف

للمادة المراد فحصها وتلقح بالكائن الحي وتحضن، ثم يؤخذ قيمة أقل تركيز من المادة التي تسبب تثبيطاً كاملاً لنمو الكائن الحي على أنه أوطأ تركيز مسبب للتثبيط.

أما في طريقة التعكير، فتوضع تراكيز متدرجة من المادة المراد فحصها في أنابيب اختبار أو في دوارق تحتوي على وسط نمو مغذي يكون سائل القوام، ويلقح وسط النمو بالكائن الحي ومن ثم يحضن لفترة مناسبة من الوقت. بعد ذلك تقاس استجابة الكائن الحي للنمو بوساطة جهاز الفوتومتر (Photometer)، ومن ثم تحول القراءات المتحصل عليها إلى كميات من المادة النقية (التراكيز) باستعمال(Calibration curve) لتقدير فعالية النموذج تحت الفحص.

تستعمل طرق التعكير لتقدير المضادات الحيوية والفيتامينات والأحماض الأمينية ومواد أخرى محفزة النمو، وتختار طريقة التعكير عندما يراد العمل مع أعداد كبيرة من النماذج محتوية على مركب معين ذو تركيز معروف وعندما تكون هذه النماذج غير ملوثة بمواد تؤثر (Interfering substances) على الفحص.

تعد طريقة التعكير أسهل نوعاً ما من طريقة الانتشار للأسباب الآتية:

1- طريقة التعكير أكثر حساسية للتخافيف الواطئة مقارنة بطريقة الانتشار.
2- طريقة التعكير أسهل نوعاً ما من طريقة الانتشار.

يجب أن تكون المحاليل التي يجري الفحص عليها معقمة خاصة عندما تكون مدة التحضين طويلة، كما ويجب أن تعمل منحنيات قياسية في كل مرة يجري فيها الفحص. تتأثر طرق الانتشار والتعكير بالمواد الملونة الموجودة في وسط التفاعل وللتغلب على ذلك يتم عمل عينات سيطرة غير ملقحة (Uninoculated blanks) في كل مستوى تخفيف. كذلك تحدث تجمعات (Clumps) للأحياء المجهرية خلال النمو ويكون من الصعب تشتيتها بحيث يكون المحلول متجانس في قياسات التعكير، لذلك يتوجب التأكد من انتشار الأحياء المجهرية بشكل متجانس وذلك بخضها قبل إجراء القياسات.

لتعقيم أوساط النمو تأثيرات عكسية على فحوصات التعكير، إذْ يؤدى التعقيم بالحرارة إلى حدوث تغيرات في اللون وخفض الـ pH وتحطيم بعض المكونات الغذائية نتيجة للتفاعلات التي تحدث بين الأحماض الأمينية والسكريات. ليس هناك مشكلات للتلوث عند العمل مع بكتريا الـ Lactobacilli بسبب سرعة نموها وحموضة وسط النمو، بالمقابل عند العمل مع أحياء مجهرية تتميز ببطيء النمو وعندما تطول فترة التحضين لتصل إلى 6-8 أيام، فإنه يجب اخذ

احتياطات خاصة لتفادي مشكلات التلوث، وللتغلب على مشاكل تغير اللون، فإنه يتم اللجوء أحياناً لتعقيم محاليل الكلوكوز بمفردها أو تخفيض محتوى الكلوكوز.

3 – الطريقة الوزنية: يعبر عن الاستجابة للكائن الحي في الطرق الوزنية للتخافيف المتدرجة من المادة المراد فحصها بوزن الخلايا الجاف. وتحت ظروف الفحص، فإن هذا الوزن يتناسب طردياً مع تركيز العامل المحدد (Limiting factor). وتعد الطرق الوزنية سهلة ودقيقة ومعتمد عليها وليست باهضة التكاليف. إلاّ إن إجراء الطرق الوزنية يستغرق وقتاً طويلاً ومن الصعب استعمالها عند التعامل مع أعداد كبيرة من النماذج، كما أننا نحتاج إلى عدد كبير من الحاضنات. وفضلاً عن ذلك، تكون احتياجات الطرق الوزنية إلى أيض النتروجين بوساطة الكائن الحي معقدة ويمكن أن تتأثر بعدة مركبات نتروجينية غير متخصصة.

4- طريقة الاستجابة الأيضية: يتم تقييم استجابة الكائن الحي إلى التراكيز المختلفة من المادة المراد تحليلها بعد التحضين لفترة مناسبة وتقدر المركبات الأيضية التي أفرزت إلى وسط التفاعل. ويعد تقدير الحامض من أكثر الطرق استعمالاً في هذا المجال. وفي طريقة الاستجابة الأيضية، لا تكون سرع النمو موازية لإنتاج الحامض. وبصورة عامة، فإن النمو (كما يقاس بطريقة التعكير) يصل إلى أقصى حد وقبل فترة لا بأس بها من وصول الحد الأعلى لإنتاج الحامض.

إن بعض الاحتياجات الواجب ملاحظتها في طريقة التعكير لا تكون مهمة في هذه الطريقة، مثل لون النموذج وتجمعات (Clumps) الأحياء المجهرية وتكون العكارة (Turbidity).

تستعمل طرق التعكير عادة عند العمل مع البكتريا حامض اللاكتيك مختلطة التخمر(Heterofermentative lactic acid bacteria) وكذلك عند العمل مع بكتريا القولون *E. coli* التي تنتج كميات قليلة من الحامض. أما عند العمل مع البكتريا متجانسة التخمر Homofermentative مثل بكتريا الـ Lactobacilli فإن طريقة التسحيح هي المفضلة.

تحتاج طرق التسحيح إلى نماذج وأوساط نمو معقمة وتستغرق وقتاً طويلاً نوعاً ما، ومن المشكلات التي تواجه طرق التسحيح كذلك، هي أن لوسط النمو قابلية تنظيم محددة(Limiting buffering capacity) وهذا مما يؤدي إلى عدم إمكانية السيطرة أو الحد من إنتاج الحامض عند وصول كميته المنتجة في وسط النمو إلى الحد الأمثل أو الحد الأعلى, تكون دقة طرق

التسحيح بحدود ± 10 %، لكنه يمكن الحصول على دقة بحدود ± 3% عند العمل بعناية والسيطرة على المتغيرات.

موثوقية الفحوصات الميكروبية(Reliability of Microbial Assays)

هنالك ثلاثة عوامل تعمل على زيادة دقة وموثوقية العديد من الفحوصات الميكروبية:

1 – اختبار مستوى الجرعات ودالة الاستجابة للنمو بحيث تعطي خطاً مستقيماً للعلاقة بينهما.

2 – التغيير العشوائي في مواقع أنابيب الاختبار المحتوية على المزارع البكتيرية الموضوعة في الحامل الخاص (Rack) في أثناء التعقيم والتلقيح والتحضين.

3 – يجب أن تعمل الفحوصات بصورة مكررة (Duplicates).

إن من أحسن وأبسط الوسائل لمعرفة موثوقية فحص ميكروبيولوجي ما، هي الحصول على نتائج متقاربة باستعمال طريقتين، كأن تقارن طريقة التخفيف مع طريقة التعكير .... وهكذا.

فحوص الفيتامينات والأحماض الأمينية والأحماض النووية ومشتقاتها

Assays of Vitamins, Amino Acids, and Nucleic Acids and Their) (Derivatives

تشتمل الخطوات الأساسية للفحص ما يلي:

1-تحضير أوساط النمو والحفاظ على المزارع البكتيرية.

٢-تحضير وسط النمو الذي لا يحتوي على المادة الغذائية المراد إجراء الفحص عليها.

3-تحضير وسط النمو الملقح بالكائن الحي ومزرعة التلقيح (Inoculum culture).

4-إستخلاص المادة المغذية (Nutrient) من النموذج قبل إجراء الفحص ويتم ذلك باستعمال عدة تراكيز من حامض الهيدروكلوريك تحت ضغط 15 باوند في قدر الضغط (Autoclave).

5-تعقيم أنابيب الاختبار المستعملة للفحص وكذلك أوساط النمو.

6-التلقيح بالكائن الحي والتحضين.

٨. تقدير الاستجابة للمادة المغذية وللمستخلص المحتوي على المادة المغذية.

9-حساب النتائج.

عند استعمال بكتريا إلـ Lactobacilli لفحوص الفيتامينات والأحماض الأمينة والأحماض النووية ومشتقاتها، يحفظ الكائن الحي على هيئة مزارع صلبة مائلة وينقل شهرياً إلى وسط نمو يتكون من ديكستروز الخميرة والآكار. تحضن المزارع البكتيرية على 37 م لفترة 24-48 ساعة لحين رؤية النموات الجديدة بالعين المجردة ومن ثم توضع على درجة حرارة الثلاجة لحين عمل نقله (Transfer) أخرى. قبل 24 ساعة من موعد إجراء الفحص، تعمل نقله من هذه المزرعة البكتيرية إلى أنبوبة اختبار تحتوي على وسط نمو معقم.

فمثلاً في الفحص المتعلق بالرايبوفلافين، فإنه يشتمل على استعمال وسط نمو يفتقر أساساً إلى الرايبوفلافين ومن ثم يضاف هذا الفيتامين (1 ميكروغرام/ مل). وتحضن مزرعة التلقيح (Inoculum culture) هذه على ٣٧ م لحين استعمالها.

الفحوصات الميكروبيولوجية واختبارات التغذية

Microbiological Assays and Feeding Tests)

(

ا- الأحماض الأمينية: للفحوص الميكروبيولوجية مزايا مقارنة بطرائق الفحوص الأخرى. إذْ تعد الفحوص الميكروبيولوجية على درجة عالية من التخصص والحساسية بالنسبة للأحماض الأمينية. وتمكن الفحوصات الميكروبيولوجية في هذا المجال من التفريق بين الأنواع المختلفة للعوامل المرافقة (Cofactors). كذلك بالامكان استعمال الفحوصات الميكروبيولوجية للأعمال اليومية الروتينية عند توفر المستلزمات المختبرية وخلفية. بصورة عامة، إذا كان المطلوب الحصول على تحليل كامل للأحماض الأمينية لمادة ما، فإن كروماتوكرافي تبادل الايونات يكون أفضل وسيلة لذلك. أما إذا كان المطلوب معرفة محتوى مادة ما لحامض أميني واحد أو لعدة أحماض أمينية، وإذا أريد معرفة ترتيب أو هيئة (Configuration) (فيما إذا كان D أم L) للحامض الأميني فإن الطريقة البسيطة والدقيقة والمتخصصة هي اللجوء إلى الفحوصات الميكروبيولوجية.

٢ - **الفيتامينات:** تعطي الطرق الميكروبيولوجية معلومات مفيدة حول المحتوى الكلي لمادة ما من الفيتامينات وكذلك تساعد في التعرف على نوع الفيتامين والتعرف أيضاً على الأنواع أو الهيئات الفعالة (Active forms) لهذا الفيتامين أو الفيتامينات.

ومن الجدير بالذكر، أن فاعلية المادة تحت الفحص (الفيتامين) التي تظهرها الطرق الميكروبيولوجية لا تعطي الصورة الحقيقية للكمية المتاحة من الفيتامين للأيض في الإنسان أو الحيوان. وقد أوضح بعض الباحثين محدودية (Limitation) الطرق غير الميكروبيولوجية لتقدير الفيتامينات، إذْ غالباً ما يتم اللجوء إلى استعمال طرق الاستخلاص أو التحلل التي غالباً ما تعطي نتائج أو أرقاماً عالية للمادة المراد الكشف عنها. فمثلاً تعرض المادة إلى التسخين تحت الضغط (لمدة 60 دقيقة مع تسليط ضغط 15 باوند) والتحلل باستعمال 6 عياري حامض الكبريتيك، وبالتأكيد لا توجد ظروف كهذه في جسم الحيوان أو الكائن الحي. أن الطرق غير الميكروبيولوجية تقيس المحتوى الكلي وليس المتاح (Available) من الفيتامين. ومن المشكلات التي تواجه تقدير فيتامين B ومن المشاكل التي تواجه اعتماد طريقة ذلك هو وجود هذا الفيتامين على هيئات متعددة ومرتبطة (Multiple bound forms) في المواد البيولوجية. فقد يوجد فيتامين B في الطبيعة إما مرتبطاً (Bound) أو حراً (Free)، ولتقدير هذا الفيتامين يجب أولاً تحريره قبل إجراء فحوصات ميكروبيولوجية أو كيميائية دقيقة. إلاّ أن ذلك لا يكون مشكلة حقيقية في الطرق الميكروبيولوجية (مقارنة بالطرق الكيميائية) فمثلا تتمكن الفئران من الاستفادة من فيتامينB المرتبط والحر. ويمكن القول أنه بسبب وجود الهيئات المتعددة من هذا الفيتامين واختلاف الأحياء المجهرية المستعملة للتقدير من مختبر لآخر ومن باحث لآخر، ولوجود مركبات أخرى محفزة لنمو الأحياء المجهرية والتي توجد في مستخلصات الأغذية، وكذلك للتداخلات الموجودة بين فيتامين B_6 ومركبات أخرى (مثل الثايامين والألانين في بعض البكتيريا المنتجة لحامض اللاكتيك)، ولجميع هذه الأسباب، فإنه من غير الممكن إعطاء توصية محددة باستعمال طريقة ميكروبيولوجية محددة لتقدير فيتامين B_6 في المواد البيولوجية المعقدة.

وفي الخلاصة، يمكن القول إن الطرق الميكروبيولوجية تتمكن من أن تعطي معلومات مفيدة عن محتوى الأغذية من الفيتامينات بشرط اختيار الكائن الحي المناسب واخذ الإحتياطات اللازمة. ومن الجدير بالذكر أن الفحوصات الميكروبيولوجية تقيس، وبصورة عامة، المحتوى

الكلي للفيتامينات بدلا من المتاح منها. إذْ إن اختبارات التغذية باستعمال بعض سلالات الأحياء المجهرية تعطي مزايا عديدة منها السرعة والدقة وعمالة قليلة وحيز صغير ومواد قليلة مقارنة باستعمال حيوانات كبيرة لنفس الاختبارات إلاّ أن النتائج النهائية لفحوصات الأحياء المجهرية لا تعتمد إلاّ بعد تطبيقها على حيوانات أكبر للتأكد من صحة وفاعلية النتائج.

الطرائق الميكروبيولوجية لتقدير القيمة الغذائية للبروتينات

Microbiological Methods for Assessing the Nutritional Value of Proteins)
).

مما لا شك فيه أن القيمة الغذائية للبروتينات تتحدد بمحتواها من الأحماض الأمينية الأساسية، لذلك أمكن الحصول على معلومات أساسية ومفيدة لتطوير الطرق الكيميائية والميكروبيولوجية المتعلقة بتحليل الأحماض الأمينية. إلاّ أنه على الرغم من ذلك، فإن محتوى الأحماض الأمينية للبروتينات لا يعكس قيمتها الغذائية الحقيقية وذلك لسببين: أولاً: على الرغم من معرفتنا الاحتياجات التقريبية للأحماض الأمينية للعديد من أنواع الكائنات الحية، إلاّ أن هذه الاحتياجات تتباين تبعاً للحالة الأيضية (Metabolic state) للكائن الحي. ثانياً: أن محتوى الأحماض الأمينية الذي نحصل عليه بالطرق التقليدية لتحاليل الأحماض الأمينية، لا يعكس بالضرورة كمية الأحماض الأمينية المتاحة (Available) للكائن الحي.

وهنالك من الأدلة التجريبية الجيدة التي تفيد بأنه توجد في بعض الأغذية نسبة من الأحماض الأمينية لا تكون متاحة للتمثيل. فمثلاً أثبتت احدى التجارب أن النسبة المتاحة من اللايسين (Lysine) للفئران الرضع تبلغ 50 % للذرة و70 ٪ للحنطة و85 ٪ للرز و90-95 ٪ لمسحوق الحليب المجفف بطريقة الرذاذ و98 % للحليب المجفف بطريقة الاسطوانات، وقد وجد عدد من الباحثين أن بعض الأحماض الأمينية مثل اللايسين وبدرجة أقل كل من الميثايونين والتربيتوفان لا تكون متاحة عند تعريض الحليب إلى درجات حرارية عالية، وحتى عند تعرض الحليب إلى درجات حرارية أوطأ في عمليات تصنيع الحليب أو حفظه، أو عند استخلاص الزيوت النباتية من البذور. أو في عمليات تصنيع مسحوق السمك فإن بعض الأحماض الأمينية التي تعد أساسية ومحددة في الأغذية تكون درجة إتاحتها أقل نتيجة للمعاملات المذكورة أعلاه.

وهناك عدة صعوبات تواجه تقدير الكمية المتاحة لكل حامض أميني على حدة في داخل الكائن الحي (*in vivo*)، لذلك لجأ الباحثون إلى قياس كمية الأحماض الأمينية المتاحة خارج الجسم الحي (*in vitro*) باستعمال الطرق الكيميائية والإنزيمية والميكروبيولوجية، والطريقة الكيميائية الوحيدة التي يمكن اعتبارها مفيدة لقياس كمية الحامض الأميني المتاح تعتمد على استعمال محلول سانكر(Sangers reagent) لتقدير اللايسين في الأغذية. إذ يفترض في هذه الطريقة أن سبب تناقص كمية اللايسين المتاحة تعود أصلاً إلى إتحاد المجموعة الأمينية الطرفية (NH_2-) للايسين مع مجاميع فعالة أخرى تحت ظروف التسخين بوجود الرطوبة لتكوين آصرة تقاوم التحلل بفعل الإنزيمات لكنها تتحلل بفعل الحوامض. ومن الجدير بالذكر، إن جزيئات اللايسين المتاحة تغذوياً هي تلك الجزيئات التي تكون فيها المجاميع الأمينية فعالة، إذْ تتفاعل هذه المجاميع مع المركب المسمى fluorodinitrobenzene (يختصر FDNB)لتعطي مركباً ملوناً (e–DNP) الذي يمكن قياسه بوساطة جهاز الـ Colorimeter بعد التحلل الحامضي.

تقسم الطرق الميكروبيولوجية المستعملة لتقدير القيمة الغذائية للبروتينات على قسمين، الأولى تعتمد استعمال البروتوزوا والثانية تعتمد على استعمال البكتريا وملاحظة نموها، وفيما يأتي شرح لاستعمال البكتريا.

إستعمال البكتريا لتقدير القيمة الغذائية للبروتينات: البكتريا الشائعة الاستعمال في هذا المجال هي أنواع من بكتريا الـ Streptococcus والـ Leuconostoc وغيرها. في حالة استعمال هذه البكتريا يتوجب هضم البروتينات أولاً وذلك بتحليلها باستعمال إنزيم أو أكثر محللة للبروتينات أو أن تهضم بالطرق الكيميائية وتستعمل نواتج التحلل المتحصل عليها كمصدر نتروجيني للأحياء المجهرية. في إحدى الدراسات تم تحلل البروتينات باستعمال إفرازات البنكرياس لمدة يومين واستعملت نواتج التحلل كمصدر نيتروجيني وحيد للسلالة *S. faecalis* التي تحتاج إلى الأحماض الأمينية العشرة الأساسية، ومن ثم قدرت كمية هذه الأحماض الأمينية التي يتوجب وجودها في وسط النمو للحصول على نصف الحد الأقصى للنمو(Half-maximum growth) (يمكن قياس نصف الحد الأقصى للنمو باستعمال الـ Photometer وذلك لقياس عكارة المزرعة البكتيرية بعد التحضين لمدة 48 ساعة.

تفحص نواتج تحلل البروتينات للتعرف على أي من الأحماض الأمينية العشرة يكون مهماً وأساسياً لنمو الكائن الحي والذي يحد من النمو عند فقدانه من وسط النمو ويتم ذلك أولاً بأن ينمو الكائن الحي في وسط النمو الذي يكون من نواتج تحلل البروتينات فقط. تضاف بعد ذلك 9 أحماض أمينية أساسية من أصل 10 إلى وسط النمو الأصلي الذي يتكون من نواتج تحلل البروتينات وملاحظة درجة نمو الكائن الحي وهكذا بالنسبة لبقية الأحماض الأمينية.

الطرائق الإنزيمية في تحليل الأغذية

Enzymatic Methods In Food Analysis

تقدير الإنزيمات (Determination of Enzymes)

تقدر الفعالية الإنزيمية للتعرف على مدى جودة المادة الغذائية ولتتبع التغيرات الحاصلة نتيجة المعاملات التصنيعية والحرارية وبالتالي التعرف على مدى الضرر الذي أصاب المادة الغذائية.

من التقانات الكمية المستعملة عادة لتتبع الفعالية الإنزيمية تشتمل على استعمال السبكتروفوتوميتر (Spectrophotometer) والمانومتر (Manometer) وطرائق الكروماتوكرافي المختلفة والبولاريمتر (Polarimeter) . تعرف الوحدة الإنزيمية (Enzyme unit) بأنها تلك الكمية من الإنزيم التي تحور(modify) مايكرومول واحد من المادة الخاضعة في الدقيقة تحت ظروف قياسية. فمثلاً قد يتم التفاعل على ٢٥م و على الـ pH الأمثل لعمل الإنزيم بحيث يكون تركيز المادة الخاضعة مشبعاً للإنزيم.

تتضمن طرائق تقدير فعالية الإنزيمات المحللة للبروتينات (Proteinases) على مدى التغير أو التحوير الحاصل في المادة الخاضعة نتيجة للفعل الإنزيمي أو مقدار ما تقطع (Split off) من المادة الخاضعة.

فيما يتعلق بمدى التغير أو التحوير الحاصل في المادة الخاضعة نتيجة الفعل الإنزيمي فإنها تشتمل على تقدير الخصائص الريولوجية (Rheological properties) كاللزوجة وثبات أو تركيب العجينة (Dough consistency) والتخثر(Coagulation) والذوبان أو تشتت الضوء Light dispersion)). أما فيما يتعلق بقطع جزء من المادة الخاضعة، فبالإمكان تقدير ذلك بتسحيح المجاميع الأمينية أو المجاميع الكاربوكسيلية أو تقدير الأحماض الأمينية الحرة بوساطة طرق متخصصة أو غير متخصصة. وتقاس البروتينات الذائبة التي لا تترسب بفعل حامض الخليك الثلاثي الكلوريد (Trichloroacetic acid) قبل وبعد فعل البروتيز على هذه البروتينات ويعطي الفرق دلالة على كمية البروتين المتحور نتيجة للفعل الإنزيمي،

ويتخثر الحليب نتيجة لفعل الإنزيمات المحللة للبروتينات ولهذا أهمية كبيرة في نوعية الحليب المستعمل في صناعات الألبان المختلفة.

تختلف الببتيديزات (Peptidases) في درجة تخصصها، وتقدر فعالية هذه الإنزيمات بوساطة التسحيح الدقيق (Microtitration) للأحماض الأمينية أو بوساطة السبكتروفوتوميتر. وتقدر فعالية بعض الببتيديزات (الكاربوكسي ببتيديز مثلاً) بدقة بوساطة السبكتروفوتوميتر بتقدير كمية البيتا- نافثول (β-naphthol) المتحرر من المادة الخاضعة المسماة

naphthoxycarboxylphenylanine .

وليس هنالك أهمية كبيرة لفعالية الأنزيم يوريز (Urease) في التصنيع الغذائي، إلاّ أنه يستعمل مؤشراً على المعاملة الحرارية لمسحوق فول الصويا وذلك لغرض زيادة درجة تقبله وقيمته الغذائية.

هنالك عدة طرائق تستعمل لقياس تحلل النشأ بوساطة الإنزيمات وتعتمد معظم هذه الطرائق قياس فعالية البيتا-أميليز على كمية المالتوز المنتج، وتستعمل هذه الطرائق على نطاق واسع في صناعة البيرة، وتقاس فعالية الألفا-أميليز أساس تغير لزوجة النشأ (Viscometric methods) أو باستعمال طريقة أخرى تعتمد على كمية الديكسترين(Dextrinogenic assays) المتكون نتيجة لفعل الألفا–أميليز على النشأ الذائب، ويعتمد هذا الفحص الأخير على كمية الوقت اللازم للوصول إلى مرحلة يكون فيها اللون بني محمر عند إضافة اليود إلى محلول النشأ، وبعد فعل الألفا-أميليز عليه بدلاً من أن يكون اللون أزرقاً، وتفيد فعالية الألفا–أميليز في التعرف على درجة إنبات الحبوب وفي السيطرة على إنتاج المولت .

يستعمل فحص إنزيم الفوسفاتيز مؤشراً على مدى كفاءة عملية البسترة، إذْ إن هذا الإنزيم يفقد فعاليته كلياً على الدرجة الحرارية المستعملة للبسترة. وتستعمل حموضة الدهن (Fat acidity) مؤشراً للدلالة على ظروف تخزين الحبوب، إذْ تزداد الحموضة في الحبوب المخزنة تحت ظروف تتميز بارتفاع مستوى الرطوبة ودرجة الحرارة الذي يؤدي بالتالي إلى زيادة فعالية إنزيم اللايبيز. وتقدر فعالية اللايبيز عادة بوساطة طريقة التسحيح في هذه الحبوب. إن إبطال أو تثبيط فعالية (Inactivation) إنزيم البيروكسديز يعد مؤشراً جيداً على كفاءة عملية السلق (Blanching) للفواكه والخضراوات.

للتعرف على نوع المعاملة الحرارية التي تعرض إليها الحليب، إن الحليب الطبيعي ذو النوعية الجيدة يحتوي على كميات قليلة من إنزيم الكاتاليز (Catalase)، لذا فإن وجود فعالية عالية لهذا الإنزيم في الحليب يشير إلى وجود آثار للبأ في الحليب أو مرض إلتهاب الضرع في الأبقار أو إلى تلوث بكتيري.

تقدير المثبطات (Determination of Inhibitors)

المثبط عبارة عن مركب يعمل على تقليل سرعة التفاعل الإنزيمي وذلك أما بتفاعل المثبط مع الإنزيم أو مع المادة الخاضعة لينتج عن ذلك تكوين مركب معقد. وبصورة عامة تقل السرعة الأولية (Initial rate) للتفاعل الإنزيمي بزيادة تركيز المثبط، وسوف تصل السرعة الأولية إلى الصفر عند زيادة تركيز المثبط أكثر من ذلك.

تعمل مبيدات الحشرات المحتوية الفوسفور العضوي (Organophosphorus) على تثبيط فعالية إنزيم الكولين إستريز (Choline esterase) الموجود في الحيوانات والحشرات، وهذا ما يفسر الفعالية العالية لهذا المبيد للسيطرة على الحشرات الضارة في الزراعة والسمية العالية لكميات قليلة جداً منه إذا لامست أو رشت على الأغذية الحيوانية .

الإنزيمات كأدوات تحليلية مساعدة (Enzymes as analytical aids)

استعملت الإنزيمات على نطاق محدود للحصول على البروتينات من الأنسجة وقد إزداد استعمالها على نطاق تجاري، وخاصة اللايبيزات والكاربوهيدريزات. وقد أمكن الحصول على البروتينات من النباتات والبكتريا. إن قابلية الإنزيمات المحللة للبروتينات على تحلل الأواصر الببتيدية أعطت عدة مزايا لتحلل البروتينات مقارنة باستعمال التحلل الحامضي أو إستعمال عوامل محللة أخرى. ومن هذه المزايا هو الحصول على ريع عال من الببتيدات أو الأحماض الأمينية وعدم تغير طبيعة الناتج النهائي للتحلل. وللإنزيمات المحللة للبروتينات مدى واسع من التخصص، إلاّ أنه ليس هناك إنزيم محلل للبروتينات يتمكن من تحليل جميع أنواع الأواصر وبالإمكان استعمال كروماتوكرافي تبادل الأيونات لفصل المواد الناتجة من تحلل البروتينات بفعل الإنزيمات.

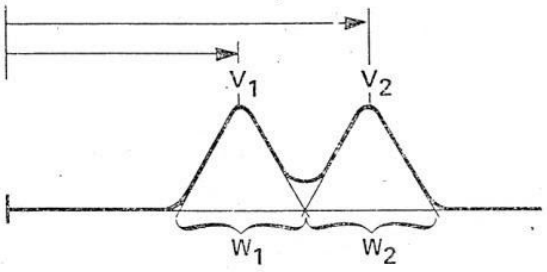
يستعمل التريبسين أحياناً في الدراسات التركيبية للبروتينات نظراً لدرجة تخصصه العالية تجاه بعض الأواصر الببتيدية. كما تستعمل إنزيمات أخرى أحياناً (مثل الببسين والكايموتريبسين) لهذا الغرض.

وقد يكون التحلل الأنزيمى أحياناً مفيداً في التعرف على الأواصر المساهمة في ربط البروتينات بالمجاميع البروستيتكية (Prosthetic groups) أو بالمرافقات الإنزيمية (Coenzymes) أو بالمثبطات.

الفصل (Resolution, R)

الفصل هو ما نريده، وهو القدرة على فصل المركبات بعضها عن البعض الآخر. هناك عدد من الطرائق للحصول على الفصل أو التلاعب ببعض العوامل للحصول على فصل أفضل. من مختلف المعادلات المستعملة للحصول على قيم رقمية للفصل (R) هي المعادلة الآتية:

RESOLUTION EQUATION



$$R = \frac{V_2 - V_1}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)}$$

وتعد هذه المعادلة الأسهل في الاستعمال. فالفصل (R) هو مقياس لفصل مركبين أو قمتين، مقسوماً على معدل عرضهما (Width).

نظرية الفصل (Resolution Theory)

ما نريده من أية عملية فصل هو القابلية على الحصول على الفصل، وهو القابلية على فصل مركب 1 عن المركب 2. ويعرف الفصل على أنه المسافة بين مركز القمة لقمتين (مركبين) مقسوماً على معدل عرض القاعدة للقمتين، وهذا يعني ببساطة قياس درجة الفصل لمكونين. وهناك ثلاثة عوامل تؤثر في الفصل الكروماتوكرافي.

Capacity Factor	$k' = \frac{V_1 - V_0}{V_0}$		(2)
Separation Factor	$\alpha = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0}$		(3)
Theoretical Plates	$N = 16 \left(\frac{V}{W}\right)^2$		(4)
(common expression of resolution)	$R_S = \frac{1}{4} \left| \underset{\text{Selectivity}}{\frac{\alpha - 1}{\alpha}} \right| \underset{\text{Efficiency}}{\sqrt{N}} \left| \underset{\text{Capacity}}{\frac{k'}{k' + 1}} \right|$		(5)

في هذه المعادلة، فإن α تساوي الإحتجاز النسبي (Relative retention)، و N هي عدد الصفائح النظرية (Theoretical plates)، والـ K' هي سعة العمود (Column capacity).

إختيارية العمود (Column selectivity)

تعود إخيارية العمود إلى المسافة أو الفصل النسبي بين قمتين

$$\alpha = (t_{R2} - t_o) / (t_{R1} - t_o) = K_2 / K_1$$

إذْ إن:

α = عامل الفصل (Separation factor)

t_{R1} and t_{R2} = زمن الإحتجاز للمركبين 1 و 2

$(t_o$ (or t_m = زمن الإحتجاز (Retention time)

K_1 and K_2 = معامل التوزيع (Distribution coefficient) للمركبين 1 و 2

فالـ α هي محصلة معدل زمن الإحتجاز لمكونين ويحسب من الكروماتوكرام. وأساساً فإن α تساوي النسبة بين ثوابت توازن التوزيع (Equilibrium distribution coefficients)، التي تعود لفصل قمتين لمركبين، وهي مقياس للفروقات الثرموداياناميكية في التوزيع.

فالإختيارية تتأثر بالطور الثابت و/أو الطور المتحرك، فمثلاً أن الإختيارية في كروماتوكرافي التبادل الأيوني تتأثر بطبيعة وعدد المجاميع الأيونية على الطور الثابت وكذلك ممكن أن يتلاعب بها عن طريق الأس الهيدروجيني والقوة الأيونية للطور المتحرك. فالإختيارية الجيدة ربما تكون أكثر أهمية من كفاءة العمود في الفصل.

وعندما α تساوي واحد، فإن الفصل يساوي صفراً، حتى إذا كان لدينا عدد كبير جداً من الصفائح النظرية. فالإختيارية الأفضل (α كبير) يعني الفصل الأسهل. وبتغيير بسيط في الـ α يحدث تغيير كبير في الفصل. وحتى إن كانت كفاءة العمود غير جيدة، فإذا كانت الـ α عالية فيحدث الفصل الجيد.

كفاءة العمود (Column efficiency)

العمود الجيد هو الذي يجعل الحزم غير منتشرة ويعطي قمم ضيقة. وتحسب كفاءة العمود كما يأتي: $N= 16 (t_R/ w)^2$

N = عدد الصفائح النظرية t_R = زمن الإحتجاز w = عرض القمة عند خط الأساس

إن مفهوم عدد الصفائح النظرية ممكن أن يفهم على أنه سلسلة من التوازنات بين الطورين المتحرك والثابت، لذا فإن العمود يتألف من أجزاء من عدد من الصفائح النظرية يحدث فيها توازن واحد فقط في كل صفيحة. إن عدد الصفائح النظرية يتناسب طردياً مع طول العمود. ويمكن قياس الإرتفاع (الطول) المكافئ لصفيحة نظرية واحدة (Height Equivalent to Theoretical Plates, HETP) كما يأتي: $HETP = L / N$

HETP = إرتفاع المكافئ لصفيحة نظرية L = طول العمود N = عدد الصفائح النظرية

إن قيم ارتفاع الصفيحة إذا كانت صغيرة فذلك يعني عدد أكبر من الصفائح النظرية وتكون كفاءة الفصل أفضل، وبالعكس فإن قلة عدد الصفائح ينتج عنه فصل غير جيد. وفي الحقيقة فإن العمود هو غير مقسم إلى صفائح نظرية محددة وهذا فقط لتبيان مفهوم التوازن.

إن عدد الصفائح النظرية هو مقياس لإنتشار حزمة القمة (المنحنى) في النظام الكروماتوكرافي. فالإنتشار الأقل، يعني العدد الأكبر للصفائح النظرية. ولهذا تعد كمقياس لجودة ملئ العمود بالطور الثابت. وهناك ثلاثة عوامل تؤثر في الصفائح النظرية في العمود:

1- حجم دقائق الطور الثابت

2- توزيع أحجام الدقائق

3- ما إذا كانت الدقائق مسامية (Porous) أو مغطاة بطور الثابت (Pellicular)

سعة العمود (Column capacity)

السعة أو عامل الإحتجاز (Retention factor)'K هو مقياس لمقدار الوقت للمركب الذي يقضيه في/على الطور الثابت بالنسبة للطور المتحرك. والعلاقة بين عامل السعة والإحتجاز هي: $K' = KV_s/V_m = (V_R - V_m)/ V_m = (t_R - t_o)/ t_o$

'K = عامل السعة (Capacity factor)

K = معامل التوزيع للمركب (Distribution coefficient)

V_s = حجم الطور الثابت في العمود (Volume of stationary phase in column)

V_m = حجم الطور المتحرك (Volume of mobile phase)

V_R = حجم الإحتجاز للمركب (Retention volume of solute)

t_R = زمن الإحتجاز للمركب (Retention time of solute)

t_o = زمن الإحتجاز للمكونات غير المحتجزة(Retention time of unretained components)

القيم الصغيرة للـ K' تدل على قلة الإحتجاز، والمكونات سوف تغسل مع المذيب، وينتج عنه فصل ضعيف. إن الإستعمال الكبير أو سوء إستعمال العمود يؤدي إلى فقد جزء من المجاميع الوظيفية مما يؤدي إلى خفض قيم الـ K'. والقيم العالية للـ K' ينتج عنها تحسين الفصل ولكن أيضاً يؤدي إلى زيادة عرض القمم وأيضاً زيادة وقت التحليل. وعملياً، فإن قيم الـ K' تكون بين 1 -5 .

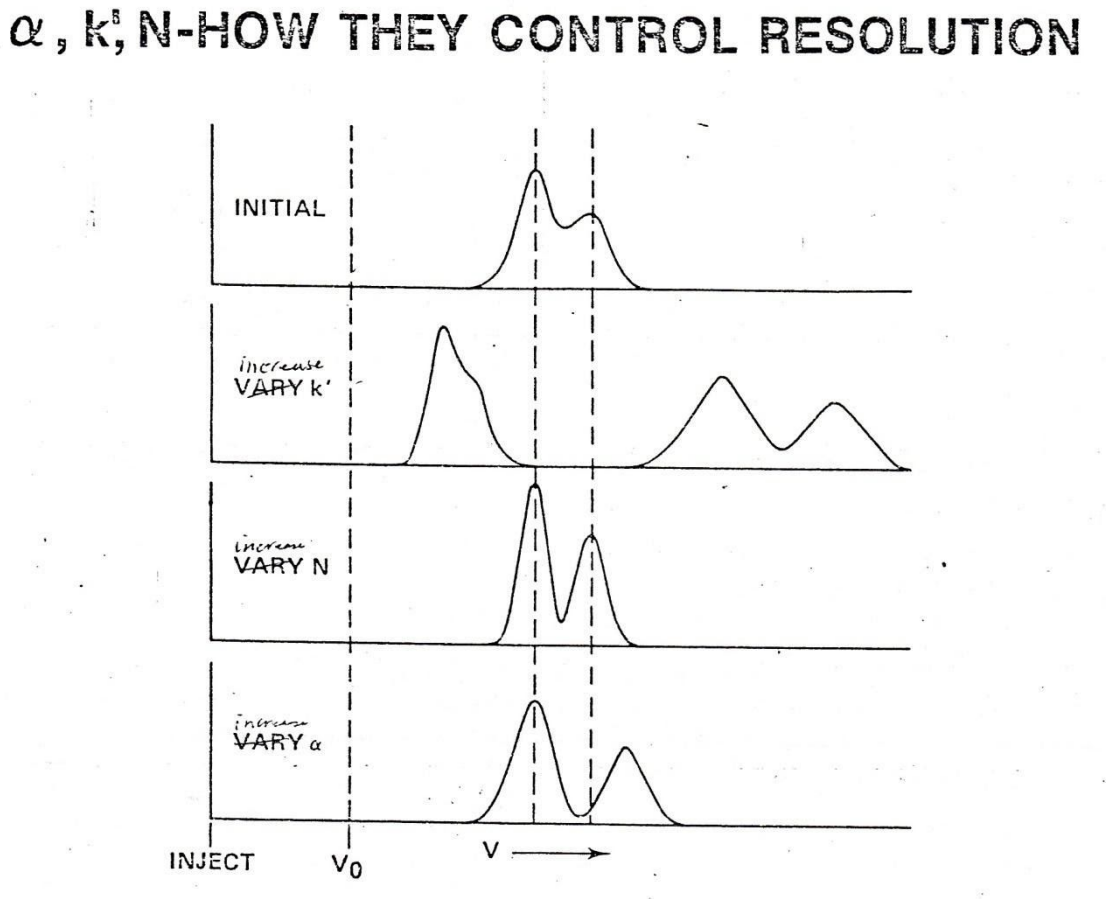
وعامل السعة K' هو زمن إحتجاز المركب في العمود. وتقدر بتحديد حجم الغسل للمركب الذي لا يحتجز ثم يقسم على حجم الإحتجاز للمركب المفصول وهذا يعطي قياس لعامل السعة. وكلما كان عامل سعة العمود أكبر كلما كانت سعة العمود كبيرة ويحتجز المركب لزمن أطول. كما يلاحظ بأنه إذا كبرت هذه القيمة، أي كانت السعة كبيرة وأن قيمة الـ K' وصلت إلى 8 -10 ، فإن هذه القيمة (أي قيمة عامل السعة) تصل إلى واحد في معادلة الفصل. كما يجب ملاحظة أن كلما بقي المركب لزمن أطول في العمود كلما يزداد إنتشاره ويكون من الصعب الكشف عنه. أما في أجهزة الـ HPLC، التي يستغرق فيها الفصل 10 -15 دقيقة، فإن عامل السعة يكون صغيراً. ونحن نرغب بقيمة K' صغيرة لزيادة سرعة الفصل، ولكن نرغب بقيمة K' كبيرة للفصل الأحسن، لذلك يجب التوافق بين الإثنين. وللفصل بين مركبين فيجب التوافق من حيث الفصل الأقصى لكل وحدة زمن، فإن قيم الـ K' لمركبين تكون عادة بين 2 و6. وفي حالة احتواء النموذج لأكثر من مكونين، فإن قيم الـ K' لمختلف الحزم يجب أن تكون بمدى أمثل (يساوي أو أكثر من واحد إلى يساوي أو أقل من عشرة) ($1 \leq K' \leq 10$).

وتتم السيطرة على قيم الـ k' في الكروماتوكرافي السائل بتغيير قوة المذيب (Solvent strength) . في بعض الحالات من الضروري تغيير الطور الثابت أيضاً ولكنها حالات قليلة. وكقاعدة عامة عند اختيار المذيب ذي القوة المناسبة (أي الذي يعطي قيم k' مناسبة) تكون من خلال معرفتنا بتركيب النموذج نبدأ بالمذيب الذي نشعر بأنه مناسب. وإذا لا يوجد سبب للتخمين

الأولي نختار المذيب بقوة متوسطة. وعلى أساس أداء المذيب الأول (أي بافتراض أن يكون قوي جداً أو ضعيف جداً) نقوم بتجربة مذيب آخر. لهذا فإذا كانت مكونات النموذج إرتحلت بسرعة (قيم الـk' جداً قليلة) باستعمال المذيب الأولي، فسوف نجرب مذيبات ذات قوة أكبر نسبياً وهكذا لحين الوصول إلى المذيب المناسب الذي يعطي فصل جيد.

كيف تؤثر العوامل α و k' و N على الفصل

الشكل أدناه يبين التأثيرات المختلفة للعوامل الثلاثة على الفصل. في البداية، نلاحظ بداية للفصل بين مكونين، ويمكن فصلهما بصورة أفضل بثلاثة طرق. فإذا زاد الـ k' ، يكون الفصل أفضل، ولكن تكون القمم عريضة. إذا زاد الـ N سوف يتحسن الفصل بسبب تضييق عرض القمم. وبزيادة عامل الـ α سوف يزداد الفصل وهذا هو العامل الأكثر قوة لزيادة الفصل.



المثال الآتي يوضح كيفية حساب تلك العوامل:

تم الحصول على الكروماتوكرام الآتي باستعمال عمود بطول 92 سم. إحسب (أ) K' للمركب 1 (ب) α للمركبين 2 و 3 (ت) N للمركب 1 (ث) R للمركبين 2 و 3 (ج) الـ HETP للمركب 1. علماً بأن: Vo = 0,90 مل ، W2 = 0,80 مل.

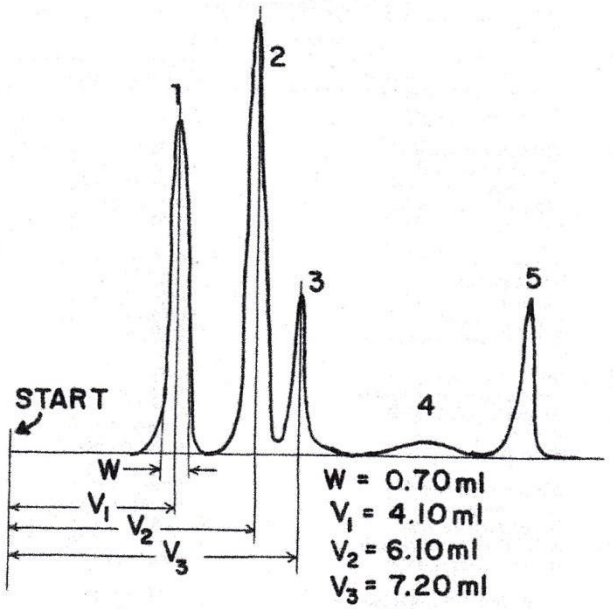


FIG. 20.25. CHROMATOGRAM OBTAINED USING A 92-CM COLUMN

The chromatogram shown in Fig. 20.25 was obtained using a 92-cm column. Calculate (A) k' for compound 1, (B) α for compounds 2 and 3, (C) N for compound 1, (D) R for compounds 2 and 3, and (E) HETP for compound 1. $V_o = 0.90$ ml, $W_2 = 0.80$ ml.

Answer:

(A) $$k' = \frac{4.10 - 0.90}{0.90} = 3.6$$

(B) $$\alpha_{2,3} = \frac{7.20 - 0.90}{6.10 - 0.90} = 1.2$$

(C) $$N = 16\left(\frac{4.10}{0.70}\right)^2 = 549$$

(D) $$R_{2,3} = 2\,\frac{(7.20 - 6.10)}{0.70 + 0.80} = 1.47$$

(E) $$\text{HETP} = \frac{920 \text{ mm}}{549 \text{ plates}} = 1.67 \text{ mm/plate}$$

الهجرة في المجال الكهربائي (أو الإرتحال الكهربائي) (Electrophoresis)

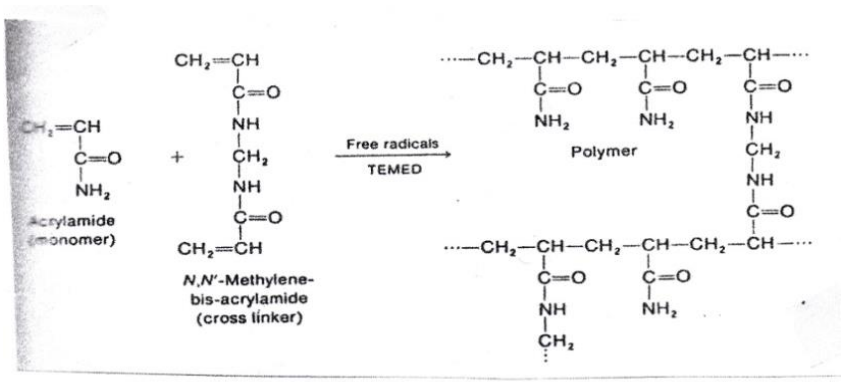
أطلق تعبير الهجرة في المجال الكهربائي أصلاً على حركة الجزيئات الغروية في المجال الكهربائي. وتتحدد استعمالات الهجرة في المجال الكهربائي فيما يخص تحليل الأغذية بالبروتينات بصورة عامة وكذلك في تحليل الأحماض النووية. ومن المعلوم أن الشحنة النهائية الموجودة على جزيئة البروتين تعتمد على الأس الهيدروجيني (pH) للمحلول أو الوسط الذي توجد فيه. ولا يهاجر جزيئ البروتين في المجال الكهربائي عندما تتساوى الشحنات الموجبة والسالبة التي يحملها الجزيئ، ويطلق على هذه الحالة بنقطة التعادل الكهربائي (Isoelectric point, IP)، وتكون محصلة الشحنة على جزيئ موجبة عندما توجد في محلول ذو pH أقل من الـ PI الخاص بذلك البروتين وفي هذه الحالة تتصرف جزيئة البروتين كـ كاتيون (Cation) وتهاجر إلى القطب السالب (Cathode) وتزداد عادة سرعة الهجرة بخفض الـ pH. وبالمقابل تكون محصلة الشحنة على جزيئ البروتين سالبة عندما توجد في محلول ذي pH أعلى من الـ PI الخاص بذلك البروتين وتتصرف الجزيئة كـ أنيون (Anion) ويهاجر إلى القطب الموجب (Anode) وتزداد سرعة الهجرة برفع الـ pH.

الهجرة في المجال الكهربائي باستعمال الهلام (Gel electrophoresis)

تستعمل الهجرة في المجال الكهربائي لفصل البروتينات والأحماض النووية. ولهذه الطريقة مزايا عدة، منها استعمال عدد كبير من النماذج في عملية الفصل الواحدة وكذلك استعمال حجم أكبر من النماذج نسبياً. وثانياً بالامكان التحكم بتركيز الهلام ودرجة التقاطعات المستعرضة (Cross linking) وبالتالي التحكم بحجم المسامات أو الفراغات البينية الموجودة بالهلام. ولهذه النقطة أهمية كبيرة، فمثلاً يؤدي زيادة تركيز الهلام إلى زيادة درجة التقاطعات المستعرضة وبالتالي يؤدي إلى زيادة الاحتكاك (Friction) وزيادة خاصية الغربلة الجزيئية (Molecular sieving). وبالمقابل يؤدي استعمال الهلام الأقل تركيزاً إلى قلة درجة التقاطعات المستعرضة وزيادة حجم المسافات البينية في الهلام وقلة الاحتكاك. إن العامل الأساسي الذي يقرر درجة تركيز الهلام المستعمل هو الوزن الجزيئي للمواد المراد فصلها. فإذا كان الوزن الجزيئي للمواد المراد فصلها عالياً فيتم اللجوء إلى استعمال هلام ذي تركيز واطئ نسبياً والعكس صحيح.

وهناك مواد هلامية عدة أو مواد مشابهة للهلام تستعمل في أنظمة المجال الكهربائي. فقد استعمل النشا (Starch) بنجاح في منتصف الخمسينات من القرن الماضي، كما استعمل الآكاروز (Agarose) وهو عبارة عن مادة متبلمرة متعددة الكالاكتوز (Polygalactose) في نهاية الستينات بنجاح لفصل الجزيئات الكبيرة مثل الأحماض النووية والبروتينات الدهنية. إلاّ أن أكثر المواد التي أثبتت نجاحها في هذا ا نتيجة لبلمرة لمجال هو الهلام متعدد الأكريلأمايد (Polyacrylamide) الذي يتمكن من فصل أنواعاً كبيرة جداً من البروتينات والأحماض النووية.

يتكون الهلام متعدد الأكريلأمايد من الأكريلأمايد ومادة أخرى تسمى بالـ N,N–methylene– bisacryamide .



تكوين هلام الأكريلأمايد المتعدد

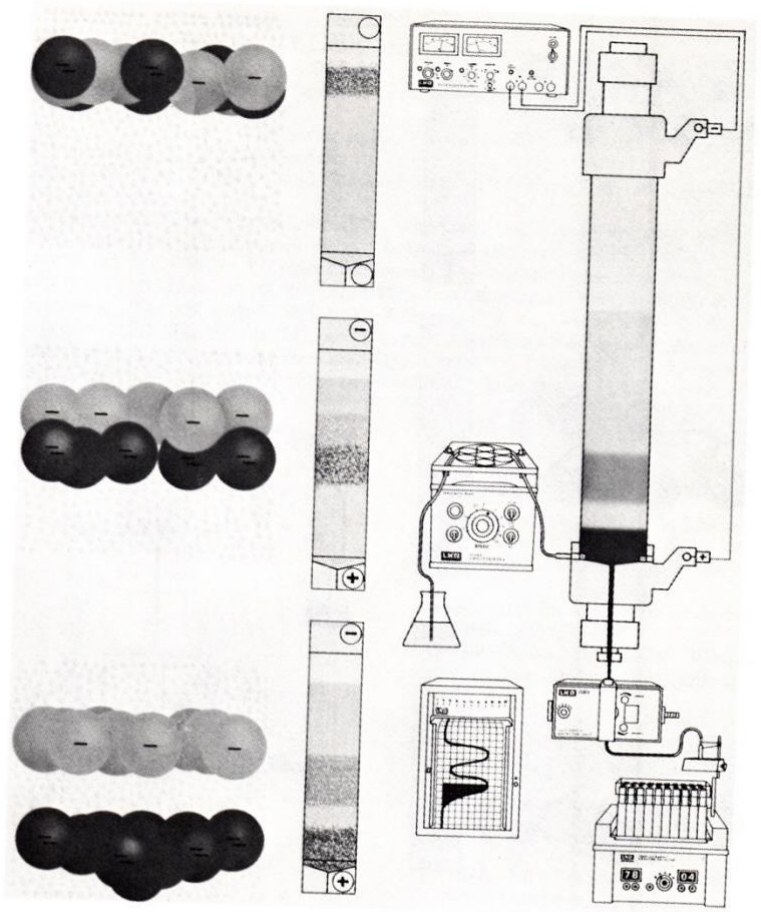
إن هاتين المادتين لا تتبلمران لوحدهما أو عند إضافة الواحدة للأخرى ولكن تحدث البلمرة بوجود مادة ثالثة تعمل على إطلاق جذور حرة (Free radicals) في الوسط ويطلق على هذه المادة بالـ Cross linker أي المادة التي تساعد في تكوين التقاطعات المستعرضة. إن مصدر الجذور الحرة إما يكون كيميائياً (Chemical) أو قد يكون ضوئياً–كيميائياً (Photochemical)، وتعمل هذه الجذور على تكوين الهلام. فالمصدر الكيميائي المستعمل لتكوين الجذور الحرة هو بيرسلفات الأمونيوم (Ammonium persulfate) وتختصر بـ APS وتضاف هذه المادة مع مادة مساعدة أخرى تسمى بالـ N,N,N,N–tetramethylenediamine التي تعمل على تكاثر الجذور

الحرة التي تساعد في عملية تكوين الهلام. أما الطرقة الضوئية–الكيميائية فيستعمل مركب حساس ضوئياً (Photosensitive) مثل الريبوفلافين الذي يحرر أو يطلق الجذور الحرة عند تعرضه للأشعة فوق البنفسجية. وبصورة عامة، تستعمل الطريقة الكيميائية في حالة تكوين الهلام عندما لا يحتوي على جزيئات بايولوجية كبيرة، وبالمقابل تستعمل الطريقة الضوئية–الكيميائية في حالة احتواء الهلام على جزيئات بايولوجية كبيرة.

تقانات الهجرة الكهربائية في الهلام متعدد الأكريلأمايد

1–تقانات الهجرة في الهلام المتعدد الاعتيادي (Conventional electrophoresis)

وهذه هي الطريقة الاعتيادية في الفصل في الهجرة في الهلام متعدد الأكريلأمايد. في هذه الطريقة فإن مكونات النموذج تفصل اعتماداً على الفرق في صافي الشحنات بالدرجة الأولى وكذلك والحجم والشكل. ويحدث الفصل على أس هيدروجيني وقوة أيونية ثابتين. ويوضع النموذج (الذي يحتوي على بروتينات مختلفة) على شكل منطقة ضيقة (Narrow zone) في أعلى العمود الذي يحتوي على هلام الأكريلأمايد. وعندما تطبق الدائرة الكهربائية فإن مكونات النموذج سوف ترحل أو تهاجر في داخل الهلام إلى القطب المعاكس. ويحدث الفصل بسبب الاختلاف في حركة مكونات النموذج نتيجة الفرق في صافي الشحنات وكذلك الحجم والشكل. وتفصل مكونات النموذج على شكل حزم أو مناطق ضيقة تسمى بالقرص (Disk) ولهذا يطلق على هذا النوع من الفصل بالـ Disk electrophoresis كما في الشكل.



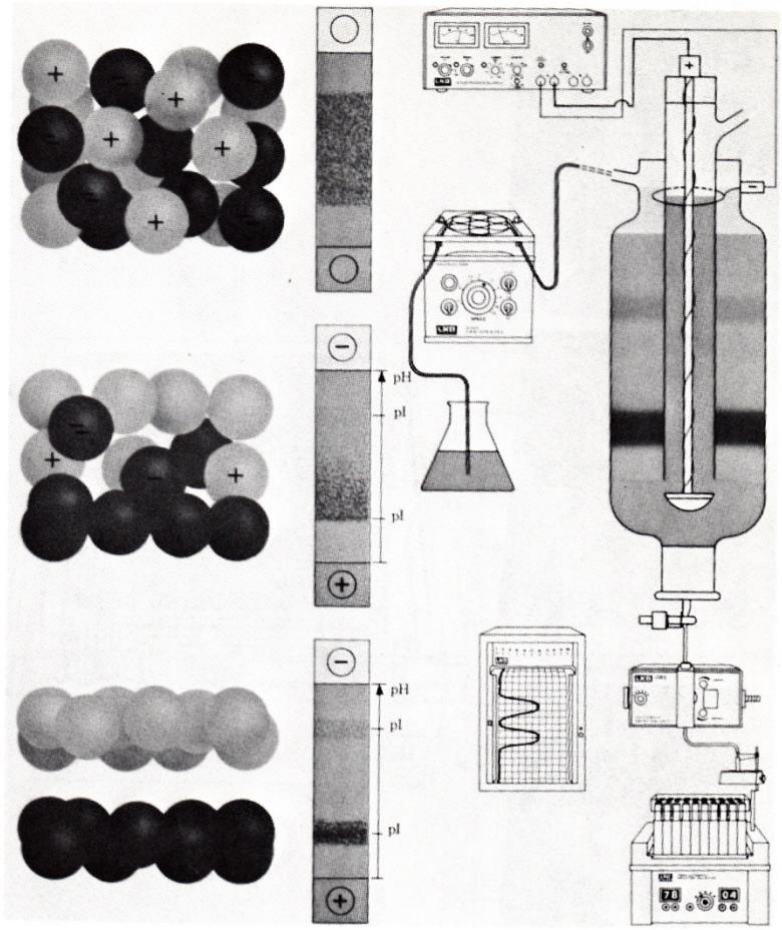
Courtesy of LKB Instruments

FIG. 20.46. ELECTROPHORESIS

In conventional electrophoresis the sample components are separated based on their differences in net charge, size and shape. The separation takes place at a constant pH and ionic strength. Polyacrylamide gel, cellulose or granulated gels are used as stabilizing media. The sample is applied as a narrow zone on top of the stabilizing gel and when the electric field is applied, the sample components will migrate into the gel. Separation in the stabilizing media takes place because of different mobilities of the sample components. The separated zones migrate one after the other out of the gel into the funnel-shaped elution chamber where they are then flushed out by a continuous stream of elution buffer.

2- تقانات الهجرة في الهلام متعدد الأكريلأمايد نوع Electrofocusing

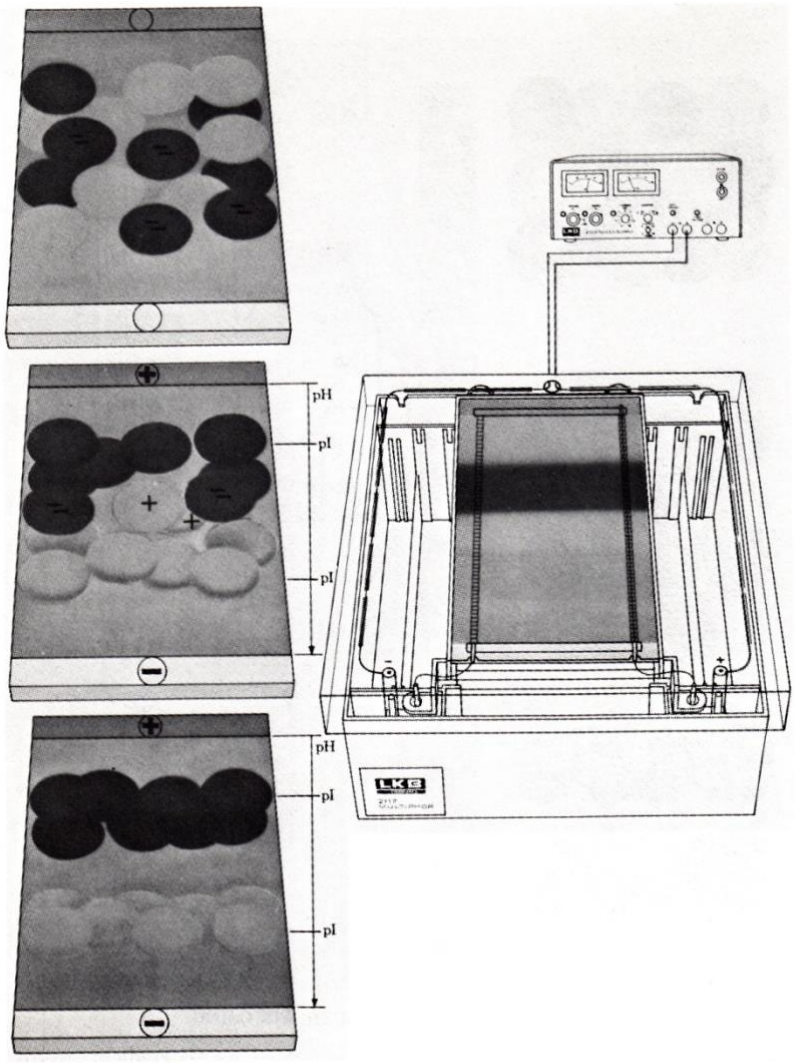
في هذا النوع من الهجرة في المجال الكهربائي فإن مكونات النموذج تفصل في وسط الهلام الذي يكون ذات أس هيدروجيني متدرج إعتماداً على الفروقات في نقطة التعادل الكهربائي (PI) للمكونات (البروتينات مثلاً)، وتستعمل مادة تسمى بالأمفولاين (Ampholine) لعمل هذا التدرج في الـ pH. وعندما تطبق الدائرة الكهربائية يتكون هذا التدرج في الـ pH بسرعة كبيرة في العمود أو قالب الهلام. ويوضع النموذج (المتكون من مزيج من البروتينات مثلاً) إما بمنطقة ضيقة في أعلى العمود أو أن يمزج مع مكونات الهلام. إن مكونات النموذج المشحونة سوف ترحل أو تهاجر كل إلى الأقطاب المعاكسة للشحنة التي يحملها البروتين (أي يهاجر البروتين ذي الشحنة الموجبة إلى القطب السالب ويهاجر البروتين الذي يحمل شحنة سالبة إلى القطب الموجب). وفي أثناء الهجرة في هذا الـ pH المتدرج فإن صافي الشحنة سوف تقل تدريجياً وبصورة مستمرة، وفي قيمة الـ pH المساوية لنقطة التعادل الكهربائي (PI) للنموذج (البروتين)، فإن صافي الشحنة التي يحملها تكون صفراً وسوف تتوقف الهجرة. إن مكونات النموذج سوف تتركز كل وفق قيمة نقطة التعادل الكهربائي له مشكلةً حزم ضيقة جداً، كما في الشكل.



Courtesy of LKB Instruments

FIG. 20.40. COLUMN ELECTROFOCUSING

In electrofocusing the sample components are separated in a pH-gradient according to differences in isoelectric point (pI). Ampholine® carrier ampholytes are used to create the pH-gradient and when an electric field is applied the pH-gradient is rapidly formed. The sample is applied either as a zone or throughout the whole column. Charged sample components migrate toward the electrode of opposite charge. The net charge is continuously reduced during migration in the pH-gradient. At a pH-value equal to the pI of the sample, the net charge will be zero and migration stops. The sample components are focused at their respective pI-values forming concentrated and narrow zones.



Courtesy of LKB Instruments

FIG. 20.41. FLAT-BED ELECTROFOCUSING

Preparative electrofocusing can also be performed in a flat-bed of granulated gel. In this case the sample can also be applied as a zone or throughout the whole gel bed. After the separation is completed, the gel bed is divided into sections by a fractionating grid and the sample components are eluted from the granulated gel.

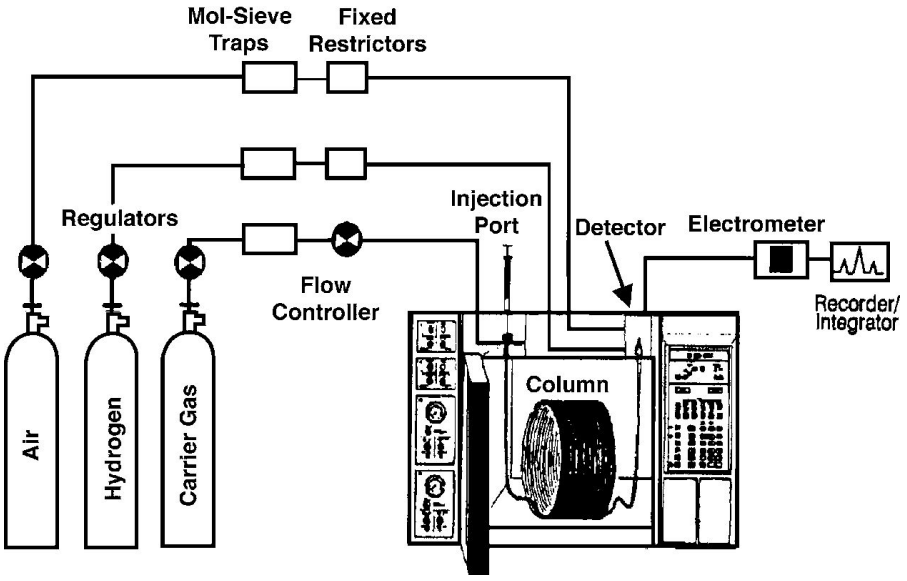
كروماتوكرافي الغاز (Gas Chromatography)

ذكر Martin and Synge في بحث نشر لهما في سنة 1941 بأن عمليات فصل مكونات النموذج ربما تكون أسهل وأسرع عند استعمال الغاز كطور متحرك بدلاً من السائل. وفي سنة 1952 تمكن Martin and James من نشر أول بحث حول الكروماتوكرافي الغازي، وفي سنة 1956 ظهر أول جهاز تجاري من أجهزة كروماتوكرافي الغاز – السائل في السواق ومنذ ذلك الحين نشرت آلاف البحوث التي استعملت هذه الطريقة.

هناك نوعان من أجهزة الكروماتوكرافي الغازي أحدهما يسمى كروماتوكرافي الغاز – الصلب (Gas – solid chromatography) ويرمز له بـ GSC وفيه يستعمل الغاز الحامل والطور الثابت هو عبارة عن مادة صلبة كالألومينا أو السيليكا أو الفحم المنشط ويستعمل في فصل الغازات الهيدروكربونية ذات الأوزان الجزيئية الواطئة كالأسيتيلين والأثيلين. أما النوع الثاني وهو الأكثر انتشاراً هو كروماتوكرافي الغاز – السائل (Gas-Liquid chromatography) ويرمز له بـ GLC ويستعمل الغاز ويكون الطور الثابت عبارة عن سائل محمول على مادة صلبة ويستعمل في فصل الحوامض الأمينية والدهنية والفيتامينات وغيرها. وفي كلا النوعين من أجهزة كروماتوكرافي الغاز فإن ميكانيكية الفصل لا تعتمد على توزيع مكونات النموذج بين الغاز والطور الصلب أو السائل وإنما يتم إدمصاص مكونات النموذج على دقائق المادة المدمصة في حالة كروماتوكرافي الغاز الصلب أو يتم إذابة مكونات النموذج في الطور السائل في حالة كروماتوكرافي الغاز السائل، وبحرارة الفرن الذي يوضع فيه عمود الفصل فإن مكونات النموذج تتطاير من الطور الصلب أو السائل ثم يقوم الغاز الخامل الحامل (Carrier gas) بحملها ونقلها إلى وحدة التحسس (Detector) خارج العمود. ومن مميزات هذه الطريقة أنها سريعة ودقيقة في فصل المركبات ولا يحتاج النموذج أكثر من 15 إلى 30 دقيقة لفصل مكوناته كما أن بمقدورها تميز العديد من المركبات في وقت واحد، كذلك أن العمود يمكن إعادة استعماله مرات كثيرة كما ويمكن استعمال أعداداً غير محدودة من سوائل الطور الثابت في هذا العمود. أما مشكلات هذا النوع من الكروماتوكرافي فهي الاختيار المناسب للحرارة لفصل المكونات والاختيار المناسب للطور الثابت وكذلك عدم حصول فصل كامل للمكونات وهذه جميعها يمكن التغلب عليها بالتجربة.

مكونات جهاز الكروماتوكرافي الغاز – السائل

الشكل يبين مخطط لجهاز كروماتوكرافي الغاز- السائل.



1- الغاز الحامل (Carrier gas)

هناك غازات مختلفة تستعمل لهذا الغرض ويتم اختيار المناسب منها حسب نوع وحدة التحسس (Detector) الموجود في الجهاز، فالغازات الشائعة الاستعمال هي النيتروجين والهيليوم والهيدروجين ويمكن توفيرها في اسطوانات مضغوطة وبصورة نقية وهناك منظمات موجودة عليها من أجل السيطرة على السرعة المناسبة لهذه الغازات عند دخولها العمود. ويتوقف معدل سرعة هذه الغازات على العمود المستعمل، فإذا كان قطر العمود 0,6 سم فهذا يحتاج إلى سرعة من الغاز تتراوح ما بين 50 - 70 مل/ دقيقة وإذا كان قطره 0,3 سم فيحتاج إلى غاز سرعته أقل تتراوح ما بين 25 – 30 مل/ دقيقة.

2- وحدة حقن النموذج (Sample injection port)

من الضروري إدخال النموذج إلى الجهاز بسرعة وبأقل وقت ممكن لأن الوقت الكثير يؤدي إلى تشوه القمم الناتجة. ويستعمل مزراق رفيع (Microsyrnge) خاص بحقن النموذج ويوجد بأحجام مختلفة إلا أن المزراق بحجم 10 ميكروليتر يفي بالغرض وبوساطته يمكن حقن

5 – 10 ميكروليتر من النموذج وإذا كانت وحدة التحسس عالية الحساسية فيمكن الاكتفاء بـ 1 ميكروليتر تركيزه 1%، ويجب أن تكون درجة حرارة وحدة الحقن (Injection port) أعلى من درجة حرارة العمود بمقدار 10 – 15 مْ.

3- العمود (Column)

يوجد هناك نوعين من الأعمدة في كروماتوكرافي الغاز السائل، فالنوع الأول ويسمى بالأعمدة المضغوطة (Packed columns) ويتكون من أنبوب طويل ملفوف ومملوء بالمادة الصلبة المدعمة (Support) المشربة بسائل الطور الثابت، أما النوع الثاني هو ما يسمى بالأعمدة الشعرية (Capillary column) وهو أنبوب رفيع بداخله طبقة رقيقة من سائل الطور الثابت وخال من المادة الصلبة المدعمة ويسمى أيضاً بعمود كوليه (Golay).

1- **الأعمدة المضغوطة (Packed column):** تصنع الأعمدة المختلفة من مواد كثيرة كالفولاذ أم الألمنيوم أو النحاس أو الزجاج وأكثرها استعمالاً هو الفولاذ لأنه يتحمل الحرارة العالية ولا يتفاعل مع مكونات النموذج. يتراوح القطر الخارجي من 1,6 إلى 12,7 ملم ويكون بطول من 0,5 –5,0 متر (عموماً 2 – 3 متر). ويعبأ بمادة حبيبية تتكون من مادة صلبة مدعمة خاملة مغطاة بالسائل. المادة المدعمة غالباً ما تكون من الـ Diatomaceous earth (وهي عبارة عن طحالب) منقاة ومحورة كيميائياً (أي معاملة بالسيليكون Silane) ثم تنخل لتعطي أحجام مختلفة. يضاف الطور السائل إلى المادة المدعمة بنسبة 1 – 10% وزناً. ويوجد هناك قرابة 200 نوع من سائل الطور الثابت إلاّ أنه الأكثر شيوعاً هي السوائل ذات الأساس السليكوني ونوع الـ Carbowax. إن الوظيفة التي تقوم بها المادة المدعمة هي توزيع السائل الثابت على مساحة كبيرة حول دقائقها الصغيرة ومن ميزاتها تجانس حبيباتها من حيث التركيب والحجم وتكون خاملة الفعالية لمنع الإدمصاص عليها. وتجري عملية التعبئة بالمادة الصلبة المدعمة بسد أحد طرفي الأنبوب بالصوف الزجاجي ثم تدخل المادة الصلبة المدعمة بصورة تدريجية مع التنقير المتواصل لضمان تجانس التعبئة بعدها تسد فوهة التعبئة ثم يطوى أو يلف للشكل المطلوب.

2- **الأعمدة الشعرية (Capillary columns):** العمود الشعري هو أنبوب مفتوح يتكون من زجاج السيليكا ويتراوح طوله من 5 إلى 100 متر ويكون القطر الداخلي للعمود الاعتيادي بحدود 0,2 – 0,32 ملم. أما عمود كوليه فيعبأ بالطور السائل الثابت بعد إدخاله بمساعدة الغاز الحامل بسرعة 2 – 5 مل بالثانية وبعد أن يبطن الأنبوب بطبقة رقيقة من السائل يستمر الغاز لمدة ساعة للتخلص من السائل الفائض.

4- الطور الثابت (Stationary phase)

من مواصفات سائل الطور الثابت أن يكون مادة غير طيارة (Non-volatile) في ظروف درجة الحرارة المستعملة في الجهاز ولكي نحصل على عمليات فصل جيدة للمركبات يتطلب هذا أن يكون التركيب الكيميائي للطور الثابت مشابهً لهذه المركبات، فمثلاً المركبات الهيدروكربونية المستعملة للطور الثابت تكون ملائمة لفصل المركبات الهيدروكربونية وبنفس الوقت تحتاج المركبات القطبية كالكحولات والأمينات إلى طور ثابت قطبي أيضاً. لذا فإن اختيار الطور الثابت يتوقف على درجة ذوبان مركبات النموذج فيه. فإذا كانت هذه المركبات غير ذائبة في الطور الثابت لتحركت بسرعة مع الغاز الحامل إلى خارج الجهاز بدون حصول عملية فصل كالهواء مثلاً مسجلاً قمة صغيرة تعد في التحليل الكروماتوكرافي الغازي هي البداية في قياسات وقت خروج منحنيات المركبات المراد فصلها.

ينزف العمود الجديد قسماً من الطور الثابت بوساطة الغاز المتحرك عندما تكون تعبئته حديثة وعليه يجب العمل على تكييف وثباتية العمود (Conditioning) العمود بعد التعبئة وذلك بتسخينه على درجة حرارة أعلى من درجة حرارة التشغيل بمقدار 10 – 20 مْ مع السماح بمرور الغاز من خلاله لفترة 10 ساعات (أو طوال الليل) مع عدم ربط وحدة التحسس في أثناء هذه الفترة لمنع تلفها.

5- درجة الحرارة (Temperature)

تعتبر درجة الحرارة عاملاً حاسماً في عمليات الفصل الكروماتوكرافي الغازي، وهناك بعض النقاط حول أهمية السيطرة على درجات حرارة الفرن الذي يوضع فيه العمود وهي:

1- كلما كانت درجة الحرارة عالية كلما قلت كفاءة العمود في فصل مكونات النموذج.
2- كلما كانت درجة الحرارة عالية كلما زادت سرعة تبخر المركبات بعد الزرق وتكون القمم الناتجة ذات أشكال متناسقة وتقل نسبة تكون الذنب (Tailing) فيها.
3- كلما كانت درجة الحرارة عالية كلما زادت خطورة نزف الطور الثابت من العمود مما يؤدي إلى تشويه القمم الناتجة وقد يؤدي إلى تلف العمود الكروماتوكرافي.

في الأجهزة الحديثة تستعمل درجة حرارة الفرن متدرجة أو متصاعدة وبصورة مبرمجة (Temperature programming) لضمان فصل المكونات كلياً، والدرجات الحرارية المستعملة قد تصل إلى 250 مْ.

6- وحدة التحسس (Detectors)

تعمل هذه الوحدة على تحسس وقياس كمية مركبات النموذج بعد خروجها من العمود مع الغاز الحامل، وتوجد عدة أنواع منها:

1- وحدة التوصيل الكهربائي (Thermal conductivity detector): عند تسليط تيار من الهواء على سلك ساخن موجود في نهاية العمود الكروماتوكرافي فإنه سوف يبرد وأن هذا السلك يسخن بمرور تيار كهربائي فيه، فالغاز المار عليه سيأخذ جزءاً من حرارته وبالتالي ستتغير مقاومته وفي هذه الحالة يعطي الجهاز خطاً مستقيماً على الورقة يسمى بخط الأساس (Base line). وعند مرور مكونات النموذج على هذا السلك الساخن فإن كل مركب من هذه المركبات سيأخذ كمية من حرارة السلك الساخن تتناسب مع كتلته مقارنة مع الغاز الحامل فمقدار المقاومة المتغيرة في السلك لكل مركب من هذه المركبات ستصبح إشارة (Signal) تسجل بشكل منحنى أو قمة (Peak) على الورقة (Chart) وكلما كان الفرق كبيراً في التوصيل الحراري ما بين الغاز الحامل ومركبات النموذج كلما كانت درجة الحساسية عالية. وتعد وحدة التوصيل الكهربائي غير مدمرة (Non-destructive) للنموذج وأنه يمكن استعمالها في تحليل جميع المركبات وكذلك الماء والمركبات غير العضوية بما فيها CO_2 و CS_2 و SO_2 و NO_2.

2- وحدة اللهب الهيدروجيني (Flame ionization detector): إن اللهب الموجود في هذا النوع من وحدات التحسس ناتج من حرق غاز الهيدروجين والهواء اللذان يدخلان إلى هذه الوحدة بسرعة 15 – 30 مل/دقيقة. أما غاز النتروجين وهو الغاز الحامل فعندما يخرج يحمل معه المركبات المفصولة إلى داخل وحدة اللهب فإذا كانت هذه المركبات عضوية (Organic) فإنها ستحترق وتنتج غاز ثنائي أوكسيد الكربون الذي بدوره ستتأين جزيئاته لتعطي أيونات داخل وحدة التحسس وأن كمية هذه الأيونات سيتم قياسها بشكل إشارة والتي ستكبر بعدئذ لتعطي منحنى أو قمة معينة على الورقة ممثلة لكل مركب مفصول. وتعد هذه الطريقة جيدة للدراسات الكمية وهي غير حساسة للماء وثنائي كبريتيد الكربون (CS_2) ولذا السبب يعد ثنائي كبريتيد الكربون مذيباً جيداً للمركبات القياسية المستعملة مع النموذج.

تشخيص المركبات المفصولة (Qualitative analysis of compounds)

يجري الكشف أو تمييز المركبات غير المعلومة بمقارنة الوقت أو المسافة لخروج منحنياتها مع مقدار الوقت أو المسافة لخروج منحنيات المركبات المعلومة القياسية. ويجري حساب الوقت بالدقائق أو الثواني والمسافة بالمليمترات أو السنتيمترات من خروج قمة الهواء وإلى خروج قمة المركب على درجة حرارة معينة وسرعة معلومة من الغاز المتحرك الناقل وعند تطابق بين المعلوم والمجهول يتم التشخيص النوعي للمركبات، ويشابه أسلوب تشخيص المركبات بهذه الطريقة قيمة الـ R_f المستعملة في كروماتوكرافي الورقة والطبقة الرقيقة.

التقدير الكمي للمركبات المفصولة (Quantitative analysis of compounds)

تقدر كميات المركبات المفصولة من خلال قياس مساحات القمم الناتجة منها في الكروماتوكرافي الورقة، كما يتم حسابات النسبة المئوية للمركبات كما يأتي:

1- قطع ووزن المنحنيات

2- حساب مساحة مثلث المنحنى

3- حساب محيط المثلث باستعمال البلانيميتر (Planimeter)

ويمكن تقدير الكميات من خلال استعمال أوزان معلومة لكل مركب من مزيج المركبات القياسية (External standard) وعندها يصبح الكشف النوعي والكمي في وقت واحد. ويتم حقن مزيج المركبات القياسية أولاً وبصورة منفردة ثم يتم حقن النموذج وتتم المقارنة فيما بينهم. الطريقة الأخرى المستعملة في التقديرات الكمية هي بإضافة مركب معين معلوم الوزن إلى مزيج النموذج غير المعلوم ويشترط أن يكون المركب المضاف غير موجود أصلاً بالنموذج وبعد ظهور القمم على الورقة يظهر ما بينها قمة المركب المضاف ومن خلال هذه العلاقة يمكن معرفة وزن كل مركب من مركبات النموذج وتسمى هذه الطريقة بطريقة المركب القياسي المضاف (Internal standard) ويعد الحامض الدهني الذي يحتوي على 17 ذرة كربون (C17) هو المركب الشائع الإستعمال في تحليل الحوامض الدهنية بهذه الطريقة.

تحليل الأحماض الدهنية (Fatty acid analysis)

تركيب الأحماض الدهنية أو ما يسمى بصورة الأحماض الدهنية (Fatty acid profile) للمنتجات الغذائية يقدر بمعرفة نوع وكمية الأحماض الدهنية الموجودة، عادة بإستخلاص الدهونات وتحليلها باستخدام كروماتوكرافي الغاز السائل باستخدام العمود الشعري.

وأساس الطريقة تعتمد على أسترة الكليسيريدات الثلاثية إلى أحماض دهنية مؤسترة وذلك قبل حقنها بجهاز الغاز السائل وذلك لزيادة درجة تطايرها. وتتم الأسترة باستعمال هيدروكسيد الصوديوم والميثانول الذي ينتج عنهما مركب ميثوكسيد الصوديوم الذي يتفاعل مع الأحماض الدهنية. كما تستعمل بعض المحاليل الحامضية مثل حامض الهيدروكلوريك الميثانولي أو البورون ثلاثي الفلوريد (Boron trifluoride, BF3) التي تتفاعل بسرعة مع الأحماض الدهنية الحرة. وتتم الطريقة باستخلاص الدهونات من الغذاء باستخدام مذيب مناسب مثل الهكسان–الأيزوبروبانول ومن ثم تبخير المذيب. وتتم عملية تحضير الأحماض الدهنية المؤسترة وكذلك الحامض الدهني القياسي وهو الـ C17 باستخدام هيدروكسيد الصوديوم-الميثانول والتسخين على درجة حرارة 100 مْ ثم إضافة البورون ثلاثي الفلوريد-المثانول ثم التسخين لمدة 30 دقيقة. لفصل الأحماض الدهنية في جهاز الغاز السائل يستعمل حديثاً عمود شعري يحتوي على مادة Phenyl 95% dimethyl %5 polysiloxane كطور ثابت.

قسم علوم الأغذية – المرحلة الرابعة – أ.د. موفق محمود أحمد
المادة: تحليل الأغذية

الكتاب المنهجي: تحليل الأغذية (1987) تأليف: باسل كامل دلالي وصادق حسن الحكيم

الكتب المساعدة: 1. Food Analysis: Theory and practice. Pomeranz

2. Food Analysis. (2010) S. Nelsen

الفصل الخريفي – العام 2020-2021

الجزء النظري:

الأسبوع الأول: أهمية تحليل الأغذية – أخذ العينات للتحليل – تحضير النموذج للتحليل - حفظ النموذج – الإعتماد على النتائج.

الأسبوع الثاني: التحليل الطيفي – طبيعة الأشعة الكهرومغناطيسية – تفاعل الأشعة مع المادة– قانون بير – المجاميع المسببة للألوان – أساس عمل أجهزة التحليل الطيفي – تركيب أجهزة التحليل الطيفي (المطياف Spectrophotometer) – الاستعمالات.

الأسبوع الثالث: أساس عمل أجهزة الفلورة والفسفرة – تركيب الأجهزة – الاستعمالات.

الأسبوع الرابع:أجهزة التحليل باللهب والإمتصاص الذري – تركيب الأجهزة – الاستعمالات.

الأسبوع الخامس: جهاز مطياف الأشعة تحت الحمراء – تركيب الجهاز – تشخيص المخطط الطيفي – الاستعمالات.

الأسبوع السادس: الامتحان الفصلي الأول.

الأسبوع السابع : الكروماتوكرافي – أنواع عمليات الكروماتوكرافي – كروماتوكرافي الادمصاص – كروماتوكرافي التوزيع – تقانات الكروماتوكرافي.

الأسبوع الثامن: الكروماتوكرافي: الورق – الطبقة الرقيقة – العمود – التشخيص والتقدير الكمي للمركبات المفصولة.

الأسبوع التاسع: كروماتوكرافي الغاز–السائل – تركيب الجهاز – التشخيص والتقدير الكمي للمركبات المفصولة.

الأسبوع العاشر : كروماتوكرافي التبادل الأيوني – جهاز تحليل الأحماض الأمينية.

الأسبوع الحادي عشر: كروماتوكرافي الترشيح الهلامي – فصل البروتينات.

الأسبوع الثاني عشر: الامتحان الفصلي الثاني.

الأسبوع الثالث عشر: الهجرة في المجال الكهربائي – الهجرة باستخدام الهلام.

الأسبوع الرابع عشر: الهجرة في المجال الكهربائي المعتمد على نقطة التعادل الكهربائي.

الأسبوع الخامس عشر: الطرائق الإنزيمية – الطرائق الميكروبيولوجية في تحليل الأغذية.

الجزء العملي:

الأسبوع الأول: تحضير المحاليل القياسية – المحاليل الحامضية والقاعدية.

الأسبوع الثاني: تقدير الرطوبة – طرائق التجفيف – الطرائق التقطيرية – الأشعة تحت الحمراء.

الأسبوع الثالث: تقدير الرماد – الترميد الجاف – الترميد الرطب - قاعدية الرماد.

الأسبوع الرابع: تقدير الدهن – طرائق استخلاص وتقدير الدهن – جهاز السوكسليت.

الأسبوع الخامس: تقدير البروتين – طرائق تقدير النتروجين البروتيني – طريقة كلداهل – طريقةالبايوريت

– طريقة المطياف – الطرائق الترسيبية – طريقة الارتباط بالأصباغ.

الأسبوع السادس: تقدير المركبات الكربوهيدراتية – الطرائق النوعية – الطرائق الكمية

– الطرائق الكروماتوكرافية - الطرائق الفيزيائية.

الأسبوع السابع: تقدير اللألياف.

الأسبوع الثامن: تقدير الحموضة والحوامض العضوية – تقدير الرقم الهيدروجيني.

الأسبوع التاسع: تقدير فيتامين (ج) – الطرائق التسحيحية – الطرائق الكروماتوكرافية.

الأسبوع العاشر: تقدير المضافات الغذائية – تقدير حامض البنزويك – تقدير ثاني أوكسيد الكبريت.

الأسبوع الحادي عشر: تقدير التانين – الطرائق الحجمية – الطرائق الترسيبية – الطرائق اللونية.

الأسبوع الثاني عشر: تقدير الصبغات الغذائية – تقدير الكاروتين.

الأسبوع الثالث عشر: جهاز المطياف – قياس تطور اللون – المنحنى القياسي.

الأسبوع الرابع عشر: الكروماتوكرافي – فصل الصبغات الغذائية.

الأسبوع الخامس عشر: الإنزيمات – تقدير ثابت ميكالس لإنزيم التربسين.

==========

=

الأسبوع الأول 8/ 12/ 2020:

أهمية تحليل الأغذية – أخذ العينات للتحليل – تحضير النموذج للتحليل – حفظ النموذج – الإعتماد على النتائج.

أهمية تحليل الأغذية

1- مراقبة جودة الغذاء

- تتم التحليلات المختلفة على المادة الخام
- استعمال الطرق السريعة على خطوط الإنتاج كالرفراكتومترات للكشف عن تغيرات الإنتاج
- تحليل الغذاء المصنع لمعرفة نوع وكمية الفيتامينات والمعادن والبروتينات وغيرها لأغراض تغذوية.
- لأجل وضع معلومات المكونات على غلاف العبوات الغذائية
- لمعرفة مدى تقبل المستهلك للغذاء
- لمعرفة القابلية الخزنية للغذاء

2- الأغراض التجارية

يكون أساساً للبيع والشراء وتثبيت الأسعار مثلاً:

- كقياس اللون
- نسبة الحامض / السكر في الحمضيات
- قياس السكر في البنجر السكري والقصب السكري
- قياس محتوى الدهن في البذور الزيتية

3- الأغراض الثانوية

- من أجل تنفيذ القوانين وتعليمات الرقابة الغذائية حول الحدود الأمنية للمستهلك فيما يتعلق بـ:
  - مبيدات الحشرات والأمراض

< المضافات الكيميائية الغذائية

< الملوثات

4- الشكاوى

- إستلام الشكاوى من المستهلك
- مدى الصلاحية للإستهلاك
- الكشف عن نوع التسمم في الغذاء

أخذ العينة للتحليل (Sampling)

إن صحة الإستنتاجات المستخلصة من تحليل الأغذية يتوقف على:

- الطرق المستخدمة في الحصول على النموذج
- طريقة حفظ النموذج لحين التحليل

النموذج المثالي

- هو الذي يكون ممثلاً لكتلة الغذاء المأخوذة منه بكل صفاته التركيبية
- الفشل في الحصول على نماذج ممثلة للغذاء يجعل نتائج التحليل عديمة الفائدة

طرائق أخذ النماذج

- النماذج المتجانسة(Homogenous)

< المساحيق تؤخذ بطرقة التقسيم الرباعي (Quartering)

< السوائل بالتقليب

- النماذج غير المتجانسة (Hetrogenous)

طريقة التخمين العقلي بتقسيم كتلة الغذاء صورياً إلى وحدات هندسية مجسمة ومنتظمة ثم تؤخذ عينات مصغرة (Subsample) من عدة أمكنة وتخلط مع بعضها ثم يؤخذ نموذج للتحليل

حجم النموذج

- حجم النموذج يكون كافياً لإنجاز كافة التحاليل
- كلما كان النموذج كبير كلما قلت نسبة الخطأ في النموذج

معلومات النموذج

- يجب تسجيل معلومات النموذج على ملصق العبوة (Label) مثل:
  - < كمية الغذاء الأصلي
  - < مقدار النموذج
  - < تاريخ تصنيع الغذاء
  - < تاريخ أخذ النموذج ومكان أخذ النموذج
  - < ظروف الحرارة والضوء وغيرها

الأدوات المستعملة في أخذ النماذج

- الأنبوب المعدني
- مثقب فول الصويا ومثقب الرز
- مثقب بذور القطن
- مثقب المواد الصلبة

تحضير النموذج للتحليل

- إزالة التربة والمواد العالقة بالفواكه والخضر بالغسل أو المسح
- إزالة الأغلفة السميكة من اللوزيات والبذور الحجرية من الفواكه

- إزالة القشور والأحشاء الداخلية للأسماك
- إزالة العظام من اللحوم
- إزالة ثاني أوكسيد الكربون من المشروبات الغازية
- إزالة العوالق والرواسب من العصائر
- المزج الجيد قبل أخذ العينة للتحليل

الطرائق المستعملة في تحضير النموذج للتحليل

1- الطرائق الميكانيكية

- طحن النماذج الجافة بالهاون المختبري أو الأجهزة الكهربائية
- النخل

الطحن بواسطة:

- طاحونة الكرات (Ball mill)
- طاحونة الكرات المبردة

< الخضراوات الورقية – تفرم بوساطة المقطعة الحوضية (Bowl cutter)

< اللحم - يفرم بفرامة اللحم (Meat mincer)

< الأنسجة تنعم بواسطة منعمات الأنسجة (Tissue grinder) أو الأمواج فوق الصوتية (Sonic vibrator)

< البذور والأجبان والخضر تفرم بوساطة الخلاط الكهربائي (Warring blender)

2- الطرائق الإنزيمية (Enzymatic methods)

تستعمل الإنزيمات في تفتيت وتفكيك النماذج الغذائية وتكسير المركبات ذات الوزن الجزيئي العالي إلى مركبات بسيطة:

- إنزيم السلليوليز (Cellulase) يستعمل للأنسجة النباتية

- إنزيمات البوتيزات (Proteases) لتحليل البروتينات
- الكربوهيدريسات (Carbohydrases)

3- الطرائق الكيميائية (Chemical methods)

تستعمل المركبات الكيميائية في تفكيك أو إذابة النماذج الغذائية:

- اليوريا (Urea)
- البايريدين (Pyridin)
- الفينول (Phenol)
- المنظفات التركيبية (Synthetic detergents)

حفظ النموذج (Preservation of samples)

التغيرات التي ممكن أن تحصل في نماذج الأغذية وطرائق إيقافها ومعالجتها:

1- التغيرات التركيبية

- فقدان أو إمتصاص الرطوبة
- فقدان المواد المتطايرة

< تعالج بحفظ النماذج في أوعية زجاجية أو معدنية محكمة الغلق

< النماذج الغذائية المجففة تحفظ بأوعية محكمة بالتبريد (4 مْ)

- أكسدة الدهون ولتقليل أو لإيقاف الأكسدة:

< تحفظ بالنتروجين أو تذاب بالإيثر النفطي

< إضافة مضادات الأكسدة مثل البروبيل كاليت (Propyl gallate) بنسبة 0.05 – 0.1 %

< تجميد النسيج الدهني على – 20 مْ.

2- التغيرات الإنزيمية

- تنشط الإنزيمات عند سحق الأنسجة النباتية والحيوانية مما يؤثر في المكونات الغذائية.
- عند تقدير المعادن أو مجموع المركبات النتروجينية أو السكريات لا يتطلب تثبيط الإنزيمات.
- تثبط الإنزيمات بطرائق عدة:

< المعاملة بالبخار< المعاملة بالكحول المغلي

< يستعمل حامض الميتافوسفوريك لتثبيط نشاط الإنزيم المحلل لحامض الأسكوربيك

< تغيير الرقم الهيدروجيني (pH)< التجفيف أو التجفيد< التجميد

3- التغيرات الميكروبية

- ممكن أن تتلف النماذج الغذائية بوساطة الأحياء المجهرية إعتماداً على:

< نسبة الرطوبة

< درجة الحموضة أي الرقم الهيدروجيني (pH)

< وجود أو عدم وجود المواد الحافظة

- لتجنب تلف النماذج يتم حفظ النماذج بالـ:

< التجميد على درجة حرارة أقل من -6.7 مْ

< التجفيف لمنع نمو الأحياء المجهرية بسبب عدم توفر الرطوبة الكافية للنمو

< إضافة المضافات الكيميائية الحافظة وتشمل:

- كلوريد الزئبقيك (Mercuric chloride) يضاف للحليب بنسبة 0.2%
- بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) تركيز 36% يضاف للحليب بنسبة 0.4%
- الكلوروفوم ($CHCl_3$) يضاف للحليب إذا أريد إختبار إنزيم الفوسفاتيز (Phosphatase)
- خلات الرصاص المتعادلة (Neutral lead acetate) تضاف للفواكه ومنتجاتها
- الفورمالديهايد (Formaldehyde) تضاف للبذور الزيتية والفواكه الزيتية كالزيتون والكوافة لإستخلاص الزيت في وقت لاحق

- التولوين (Toluene) و الثايمول (Thymol) لحفظ أنواع المشروبات والمستخلصات المائية
- بنزوات الصوديوم (Sodium benzoate) وحامض السوربيك (Sorbic acid) وغيرها

الإعتماد على النتائج (Reliability of results)

إن مقدار الثقة في نتائج التحليل يتوقف على:

- مصادر الأخطاء الموجودة في النموذج
- عمل المحلل
- طريقة التحليل

1- أخطاء النموذج (Sampling error)

- يجب أن يكون النموذج ممثلاً تمثيلاً جيداً للغذاء الأصلي المأخوذ منه
- مراعاة العشوائية في أخذ النماذج وعدم التحيز
- حفظ النماذج لتجنب التغيرات التركيبية والإنزيمية والميكروبية

2- أخطاء المحلل (Analyst error)

يجب أن يتميز المحلل بـ:

- المثابرة والحماس في العمل
- بعيد عن اللامبالية
- وضعه النفسي والفسلجي طبيعي

كما يجب على المحلل أن:

- ينفذ الطريقة بكل دقة وأمانة
- يتأكد من حسابات النتائج

3- أخطاء طريقة العمل (Determination errors)

يجب أن تكون طريقة التحليل:

- متخصصة (Specific) أي مصممة لتقيس مكون واحد فقط من مكونات النموذج
- أن لا تتأثر بالمواد المتداخلة (Interfering substances)
- عالية الحساسية (Sensitive) فالطريقة أو الأجهزة المستعملة بمقدورها أن تتحسس للكميات الصغيرة من المركب المراد تقديره.
- أن تكون الطريقة دقيقة (Accurate)، دقة الطريقة هي مدى إبتعاد القيم المتحصل عليها عن القيم الحقيقية.
- أن تكون الطريقة مضبوطة(Precise)، ضبط الطريق هي مقدار تقارب أو توافق المكررات التجريبية مع بعضها البعض.
- كما يجب أن تتضمن طريقة العمل خطوة أو خطوات عدة لإزالة المركبات التي تتداخل في التقدير مع المركب المراد تحليله.
-

الأخطاء التجريبية التي تؤثر في النتائج:

- **الأخطاء المقاسة (Determinate errors)**

< مصادر هذه الأخطاء معلومة ويمكن إزالتها أو تصحيحها

< ممكن أن تتأثر قراءة بالجهاز والظروف الخارجية أ بوساطة الخطأ الشخصي للمحلل أو تتحدد بمقدار نقاوة المواد الكيميائية المستعملة وترتيب إضافتها في خطوات العمل.

- **الأخطاء غير المقاسة (Indeterminate errors)**

هذا النوع من الأخطاء خارج عن سيطرة المحلل

من أمثلة هذا النوع من الأخطاء:

< إخلاء الأجهزة الحجمية كالماصة والدورق الحجمي

< تحديد نقطة النهاية

يستعمل التحليل الإحصائي لإزالة هذه الأخطاء

الأسبوع الثاني 13/12/2020:

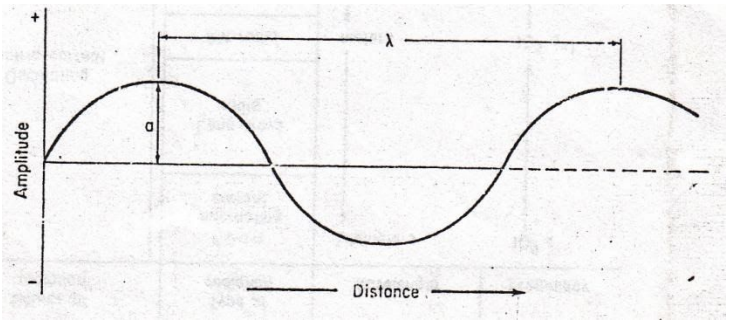
التحليل الطيفي – طبيعة الأشعة الكهرومغناطيسية – تفاعل الأشعة مع المادة– قانون بير – المجاميع المسببة للألوان – أساس عمل أجهزة التحليل الطيفي – تركيب أجهزة التحليل الطيفي (المطياف Spectrphotometer) – الاستعمالات.

التحليل الطيفي (السبكتروسكوبي، Spectroscopy)

السبكتروسكوبي هو عبارة عن دراسة تفاعلات أو تداخلات (Interactions) الأشعة الكهرومغناطيسية (Electromagnetic radiation) مع المادة.

تتميز الأشعة الكهرومغناطيسية بأن لها:

- تردد (Frequency) ويرمز له بـ v وهو عدد الموجات التي تعبر نقطة ثابتة خلال ثانية واحدة. ويعرف التردد أيضاً بأنه وحدات طول الموجة في سم واحد ويسمى برقم الموجة.
- طول موجي (Wave length) ويرمز له بـ λ وهو المسافة بين قمتين متعاقبتين.

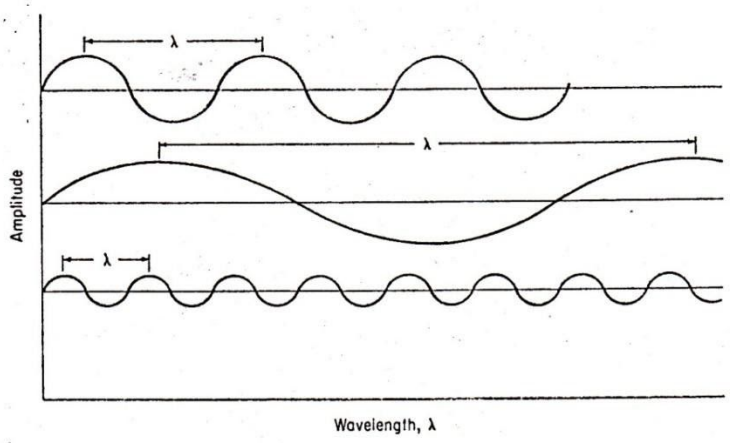


تتراوح الأطوال الموجية من أجزاء الأنكستروم (Angstrom)(Å) إلى الكيلومترات.

SPECTROSCOPY UNITS

Unit	Symbol	Length	Relation to Other Units
Micrometer (old micron, μ)	μm	10^{-6} meters	
Nanometer (old millimicron, mμ)	nm	10^{-9} meters	1/1000 μm
Angstrom	Å	10^{-10} meters	1/10 nm
Wavenumber	cm^{-1}	c/ν	$1/\lambda$ see equation 5.1
Electron volt	ev	23.06 kcal/mole or 8066 cm^{-1}	
Erg	erg	6.24×10^{11} ev/mole	

كلما زاد الطول الموجي كلما قل التردد وبالعكس كلما قل الطول الموجي كلما زاد التردد

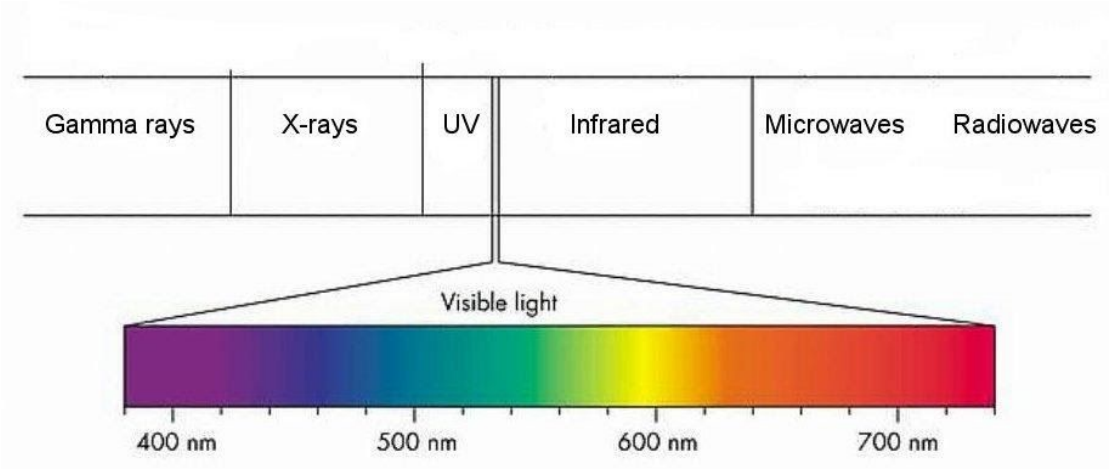


- سرعة الضوء V(Velocity) = الطول الموجي X التردد
- في الفراغ فان جميع الموجات الكهرومغناطيسية لها سرعة واحدة وهي $3X\ 10^{10}$ سم/ثانية
- هناك صنفين من الطيف:

1- طيف الإنبعاث (Emission spectra) ويتحصل عليه بتحليل الضوء المنبعث من مصدر ضوئي منير.

2- طيف الإمتصاص (Absorption spectra) ويتحصل عليه من التحليل الطيفي للضوء النافذ (المنتقل) (Transmitted light) خلال وسط ممتص (Absorption medium).

أنواع الأشعة الكهرومغناطيسية



الأطوال الموجية المستعملة في أجهزة المطياف

- الأطوال الموجية بين 400 – 750 nmللأشعة المرئية أو المنظورة (Visible light)

- الأطوال الموجية بين 100 – 400 nm تعود للأشعة فوق البنفسجية (Ultra violet)
  < 100 - 180 nm تسمى الأشعة فوق البنفسجية المخلخلة (Vacuum uv)
  < 180 – 400 nm تسمى الأشعة فوق البنفسجية

- الأطوال الموجية الأكثر من 750 nm تعود للأشعة تحت الحمراء (Infra red, IR)
- 0,75 – 2,5 مايكرومتر تسمى الأشعة تحت الحمراء القريبة Near IR
- 2,5 – 15 مايكرومتر تسمى الأشعة تحت الحمراء الوسطى (Mid IR)

- 15 – 300 مايكرومتر تسمى الأشعة تحت الحمراء البعيدة (Far IR)

- العين البشرية تكون حساسة فقط لنطاق ضيق من الطيف والذي هو الضوء المرئي وهو الأطوال الموجية 400 – 750 nm ، أما المناطق الأخرى فهي غير مرئية للعين ويمكن تحديدها بأجهزة أخرى.
- الضوء المرئي يحتوي على ألوان طيفية ولكل لون طول موجي خاص به:

اللون	الطول الموجي
بنفسجي	450 – 400
أزرق	500 – 450
أخضر	570 – 500
أصفر	590 – 570
برتقالي	620 – 590
أحمر	750 – 620

- إن اللون هو صفة للنور الذي يصل إلى العين وليس صفة الجسم الذي نراه فالقماش يبدو أبيضاً لأنه يعكس جميع الأشعة الضوئية التي تسقط عليه وقطعة القماش الخضراء تبدو خضراء لأنها تمتص جميع الأشعة الضوئية التي تسقط عليها وتعكس فقط الأشعة الخضراء ذات الطول الموجي 500 – 570 nm أما الجسم الأسود فهو يمتص جميع الأشعة الساقطة عليه.
- تزداد طاقة جزيئة ما عند إمتصاصها للإشعاع (Radiation) والزيادة الحاصلة في طاقة الجزيئة مساوية لطاقة الفوتون (Photon) وهي دقائق خاصة توجد في الأشعة الكهرومغناطيسية وتحتوي على كمية محدودة من الطاقة وتسير بسرعة الضوء وعلى أطوال موجية مختلفة)

حيث أن:

$$E = h\nu = hc/n\lambda$$

E= طاقة الفوتون بالارج (Erg)

v = التردد (Frequency) (دورة/ثانية) λ = الطول الموجي

h = ثابت بلانك (plank's constant) = $6{,}624 \times 10^{-27}$ إرج ثانية

c = سرعة الضوء

n = معامل الإنكسار

- فإذا كان تردد الفوتونات عالية (طول موجي قصير) فإن محتواها من الطاقة يكون كبيراً
- تتناسب شدة (Intensity) الحزمة الضوئية طردياً مع عدد الفوتونات
- إن إمتصاص ذرات وجزيئات أية مادة للأشعة الكهرومغناطيسية يؤدي إلى زيادة طاقة تلك المادة
- على حسب كمية الطاقة الموجودة بالفوتون تحدث تغيرات في المادة

< إذا كان الفوتون يحتوي على كمية كبيرة من الطاقة (مثلاً الأشعة فوق البنفسجية أو الأشعة المرئية) سوف يحدث ما يسمى بالإنتقال الأليكتروني (Electronic transition) وقد يصاحب ذلك تغيرات أخرى (تغيرات تذبذبية ودورانية)

< إذا كان الفوتون يحتوي على طاقة أقل (مثلاً الأشعة تحت الحمراء) فان ذلك يؤدي إلى حدوث تغيرات تذبذبية (Vibrational changes)

< إذا كانت الفوتونات لها طاقة قليلة جداً (مثلاً تلك التي تأتي من الأشعة تحت الحمراء البعيدة أو الميكرويف) فتؤدي إلى حدوث تغيرات دورانية (Rotational changes)

الإنتقالات الأليكترونية (Electronic transitions)

- عندما تمتص الجزيئة كمية كبيرة نسبياً من الطاقة فان ذلك يؤدي إلى حصول تغيرات في طاقة الأليكترونات (أي أن الأليكترونات تغير مدارها من مدار واطئ بالطاقة إلى مدار أعلى منه بالطاقة)
- يطلق على مستوى طاقة أليكترونات الجزيئة تحت الظروف الإعتيادية بالحالة الأصلية (Ground state) ، أما المستويات الأليكترونية الأعلى فتمثل الحالة المتهيجة (Excited state).
- وتحدث الإنتقالات الأليكترونية عند تسليط الأشعة المرئية والأشعة فوق البنفسجية على جزيئات المادة.
- كمية الطاقة التي تسبب الإنتقالات الأليكترونية هي كمية كبيرة وتكون بحدود 56 كيلوسعرة / مول.

التغيرات التذبذبية والدورانية (المحورية) (Vibrational and Rotational changes)

- أما إذا كانت كمية الطاقة المسلطة قليلة بحيث لا يستطيع الأليكترون أن يقفز إلى مدار أعلى فيحدث تغيرات تذبذبية (Vibrational changes)، وإذا ما كانت كمية طاقة الأشعة المسلطة أقل فتحدث تغيرات دورانية (Rotational changes). وسوف يتم شرح هذه التغيرات في موضوع لاحق.

- وتحدث التغيرات التذبذبية والدورانية عند تسليط الأشعة تحت الحمراء على جزيئات المادة.

المجاميع المسببة للألوان (Chromophores and Auxochromes)

< إن المواد الملونة تظهر ملونة لوجود آصرة غير مشبعة واحدة أو أكثر في تركيبها، ويطلق على هذه الأواصر او المجاميع المسببة للألوان في هذه المواد بالـكروموفورات (Chromophores) ومن أمثلتها N=N و C=O و C=C .

< هنالك مجاميع أخرى لا تضفي ألوان على المادة ولكنها تعمل على زيادة القوة المسببة للون للكروموفورات ويطلق عليها بالأوكسوكرومات (Auxochromes) ومن أمثلتها: CNH_2 و C-OH و C-Br

- الجزيئات العضوية المشبعة لا تظهر أي إمتصاص في المنطقة فوق البنفسجية القريبة أو في المنطقة المرئية (200 - 800 نانومتر)
- إن إدخال مجموعة أوكسوكروم (Auxochrom) إلى جزيئة مشبعة يؤدي إلى تغيير الطول الموجي لأعلى إمتصاص لتلك الجزيئة إلى طول موجي أعلى.
- وجود مجاميع الكروموفورات (Chromophores)(أواصر غير مشبعة) يؤدي عادة إلى الإمتصاص في الأطوال الموجية 200 – 800 نانوميتر.
- يختلف أقصى إمتصاص من كروموفور لآخر وبالتالي فان المواد التي تحتوي على مجاميع مختلفة يكون لها أقصى إمتصاصات مختلفة.

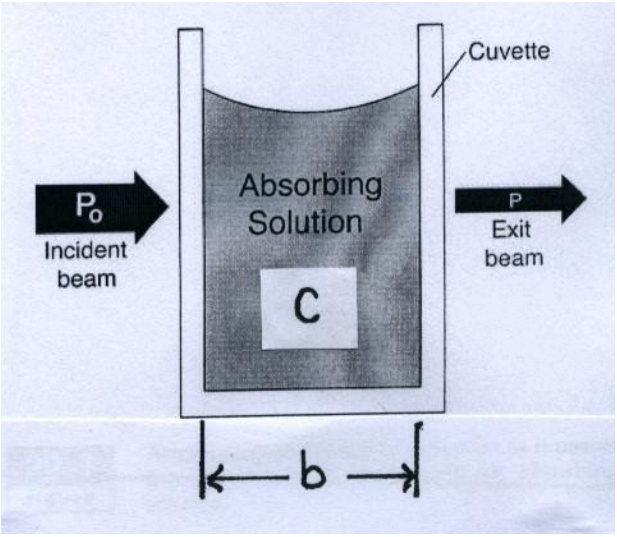
المركب	أقصى إمتصاص (نانومتر)
$H_2C = CH_2$	180
$CH_3)_2$-C=O	277)
$CH_3)_2$-C=S	400)

قوانين الإمتصاص الطيفي

- يعتمد إستعمال الضوء في التحليلات الكيميائية الكمية والوصفية على إمتصاص الضوء
- إن الهدف من الإمتصاص الطيفي الكمي هو لتقدير تركيز المادة الموجودة في محلول معين.
- التقدير يعتمد على قياس كمية الضوء الممتصة والمسلط من مصدر ضوئي معين أثناء عبوره من خلال محلول النموذج.
- قانون لامبرت (Lambert's law) ينص على: أنه في تركيز معين من المادة الممتصة فان شدة الضوء النافذ يقل لوغارتمياً بزيادة طول المسار الضوئي لتلك المادة.

- قانون بير (Beer's law) ينص على: أنه بزيادة تركيز المادة الممتصة يقل الضوء الخارج بصورة طردية. أي أن كمية الضوء الممتص تتناسب طردياً مع تركيز المادة الممتصة.

- تم دمج القانونين بقانون واحد يسمى **قانون لامبرت – بير (Lambert – Beer's law) ويطلق عليه أيضاً قانون بير (Beer's law) الذي ينص على: إن كمية الضوء الممتص تتناسب طردياً مع تركيز المادة وطول المسار الضوئي.**



P_o = شدة إضاءة الضوء الساقط

P = شدة إضاءة الضوء النافذ (الخارج)

b = طول المسار الضوئي

C = تركيز المادة (ملغم/مل أو ميكروغرام/مل أو تركيز مولاري وغيرها)

- فعند وضع محلول مادة ممتصة للضوء على طول موجي معين في خلية ذات أبعاد معلومة وأسقط عليها أشعة ذات طول موجي معين فان بعض الأشعة سوف تمتص من قبل المادة والبعض الآخر سوف ينفذ من الخلية. تتناسب كمية الأشعة الممتصة طردياً مع تركيز المادة، ويعبر عن هذه العلاقة بـ:

$$A = \text{Log } Po / P = \log Po - \log P = abc$$

حيث أن:

A = الإمتصاص (Absorbance) وتسمى أيضاً بالكثافة الضوئية (Optical Density, OD)

a = الإمتصاص المولاري (Molar absorbtivity) وله وحدة $liter\ mol^{-1}cm^{-1}$ or $liter\ g^{-1}\ cm^{-1}$

C = تركيز المادة (ملغم/مل أو ميكروغرام/مل أو تركيز مولاري وغيرها)

- الإمتصاص المولاري يسمى أيضاً بالـ molar extinction coefficient ويرمز له بـ ε ويكون

$$A = \varepsilon bc$$

- يضبط الضوء الساقط (Po) على 100. أي أن لوغارتم الضوء الساقط يساوي 2 (log 100 = 2)

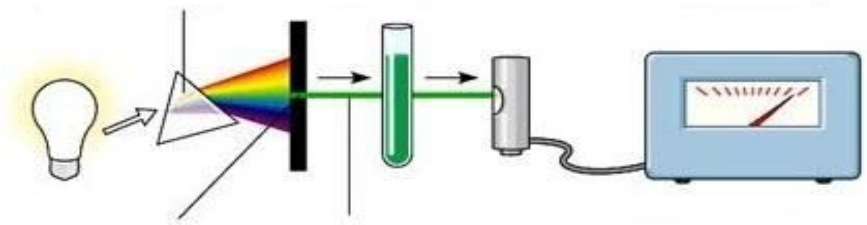
أما لوغارتم الضوء النافذ (log P) فيطلق عليه بالـ Transmittance وهو النسبة المئوية للضوء النافذ (T%)

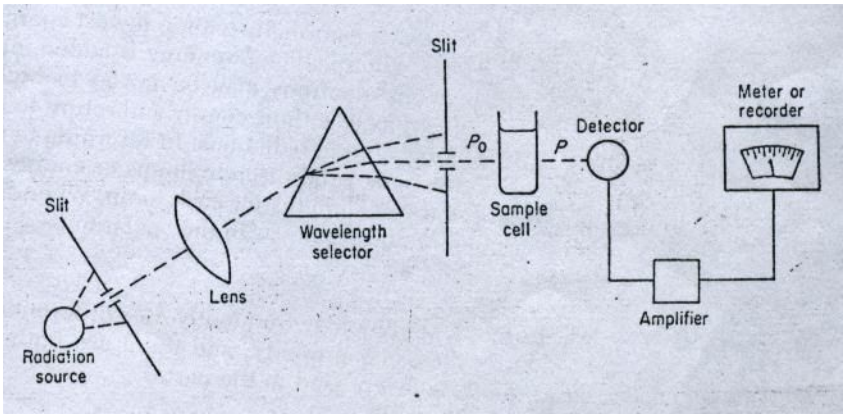
$$\% T = P / Po \times 100$$

$$\text{Log } Po - \log P = A \quad \text{then} \quad 2 - \log P = A = abc$$

- طبقاً لقانون بير فان الإمتصاص لمادة يتغير بتغير تركيز تلك المادة على طول موجي معين وبهذا يمكن استعمال قياسات الإمتصاص لايجاد تراكيز المحاليل وذلك بعد تحديد طول الموجة الملائمة لتلك المادة.
- يتم إمتصاص الأشعة المسلطة فقط عندما تكون طاقة تلك الأشعة مطابقة تماماً للطاقة المطلوبة لإنتقال المكونات الجزيئية أو الأيونية للمادة من مستوى طاقة إلى مستوى طاقة أعلى. إنتقالات الطاقة هذه تشمل الحالات الدورانية أو التذبذبية أو الأليكترونية. أي عندما تتطابق المكونات الكهربائية والمغناطيسية للأشعة الكهرومغناطيسية مع المكونات الكهربائية والمغناطيسية للجزيئات فيحدث التفاعل أو التداخل (Interaction) وعند التداخل يحدث إنتقال للطاقة (إمتصاص) وعندما لا يحدث تطابق فان الأشعة لا تتداخل وسوف تمر من خلال الجزيئة.

تركيب أجهزة المطياف (السبكتروفوتوميتر Spectrophotometer)





تتكون أجهزة المطياف بصورة عامة من:

- مصدر اِشعاع
- موحد الموجات (Monochromator)
- خلية لوضع العينة
- جهاز الكاشف
- مسجل

1- مصادر الإشعاع (Sources of radiation)

أ-مصدر الأشعة المرئية (Visible light)

- لمبة التنكستن (Tungsten lamp) تحتوي على خيط من معدن التنكستن يسخن بالتيار الكهربائي. وهي من أفضل المصادر للأشعة المرئية وكذلك للأشعة تحت الحمراء القريبة (Near IR) وتعطي أشعة على أطوال موجية 350 – 2500 نانومتر
- - لمبة التنكستن الهالوجينية (Tungsten – Halogen lamp) تملئ لمبة التنكستن بغاز يحتوي على بخار اليود وهذا يساعد على إعطاء ضوء ذو قوة واحدة لمدة طويلة.

ب- مصدر الأشعة فوق البنفسجية (Ultra violet radiation)

- لمبة الهيدروجين (Hydrogen lamp)
- لمبة الديتيريوم (Deuterium lamp)

هاتان اللمبتان من أكثر المصادر شيوعاً للحصول على الأشعة فوق البنفسجية. تتكون اللمبة من أنبوبة مصنوعة من الكوارتز (Quartz) وتملئ بغاز الهيدروجين ويؤدي مرور التيار الكهربائي إلى تهيج ذرات الهيدروجين تؤدي إلى إنبعاث أشعة على طول موجي 180 – 350 نانوميتر.

- كما يوجد العديد من اللمبات التي تعطي الأشعة فوق البنفسجية.

2- موحد الموجات (Monochromator)

- يعمل على تحليل الأشعة القادمة إلية من مصدر الإشعاع وإعطاء أشعة ذات طول موجي معين وهوذلك الطول الموجي الذي يحدث عنده أعلى نسبة من إمتصاص الأشعة من قبل المادة المراد قياسها، ويسمى الطول الموجي لأقصى إمتصاص.

يتكون موحد الموجات من:

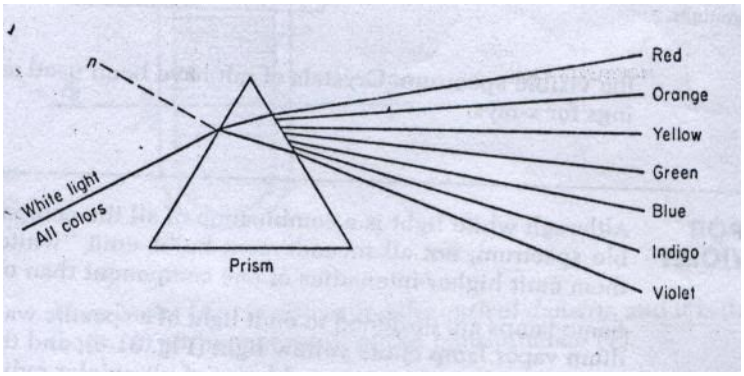
- شق دخول (Entrance slit) وهو شق ضيق لدخول حزمة من الأشعة القادمة من المصدر
- مفرق (مشتت) الأشعة (Dispersion unit) لتفريق (تشتيت) الأشعة الساقطة عليه.
- شق خروج الأشعة (Exit slit) وهو شق ضيق يسمح بخروج أشعة ذات طول موحي محدد، ويمكن تغيير فتحة هذا الشق لإخراج الأشعة ذات الطول الموجي المطلوب.

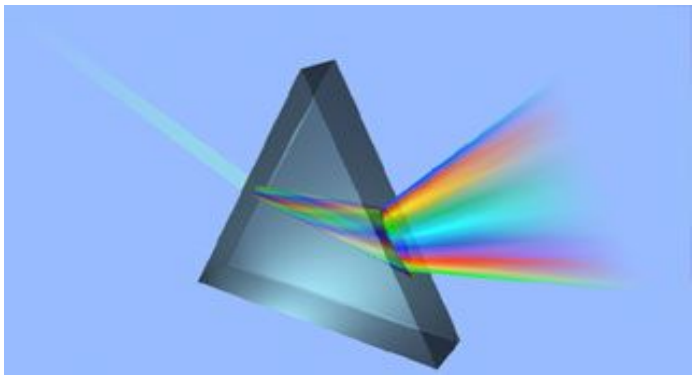
- **أنواع مفرقات الأشعة (Dispersion units)**

تقسم إلى نوعين رئيسيين:

1- المنشور (prism)

يعتمد على ظاهرة الإنكسار الضوئي (Refraction) في داخل المنشور عند سقوط الأشعة عليه. فعند مرور الِأشعة وهي مزيج من أطوال موحية مختلفة من خلال أسطح غير متوازية فيحدث إنحناء للأشعة بسبب أن كل طول موجي سوف ينحني أو ينكسر بدرجة مختلفة وبالتالي يحدث تشتت للأشعة. عموماً فان الضوء الأحمر ينكسر بدرجة أقل من الضوء الأزرق لذا فان الضوء الأزرق سوف ينكسر بزاوية أكبر.

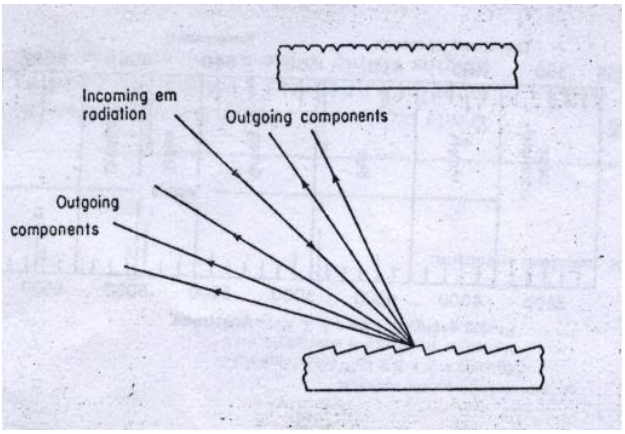




المنشور (prism)

2- المضلع (Grating)

وهو مبني على ظاهرة الإنعكاس (Diffraction). وهو عبارة عن قطعة صغيرة مصنوعة من البلاستك أو الزجاج أو المعدن تحتوي على آلاف الأخاديد المتوازية والمتجانسة والمصقولة. فعند سقوط الأشعة على هذه القطعة سوف تنعكس وتتفرق إلى مكوناتها من الأطوال الموجية المختلفة.



3- خلية النموذج (Cuvette or sample cell)

- يوضع محلول النموذج في خلية منفذة للأشعة وتكون ذات أبعاد معلومة ويكون عادة طول المسار الضوئي سم واحد. كما أن هنالك خلايا للنماذج بأطوال مسارات ضوئية أقل من سم واحد وهنالك أيضاً خلايا بأطوال موجية 2 أو 3 أو 4 سم، وتستخدم لأغراض مختلفة.
- عند القياس في منطقة الأشعة المرئية تستعمل خلايا مصنوعة من الزجاج

أما عند القياس في منطقة الأشعة فوق البنفسجية فتستعمل خلايا مصنوع من الكوارتز (Quartz) لأن الزجاج لا ينفذ الأشعة فوق البنفسجية.

4- الكاشف (Detector)

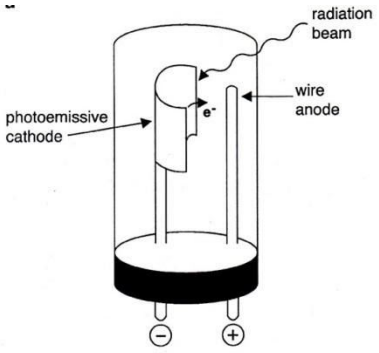
الكاشف يقوم بتحسس الشعاع النافذ من خلية النموذج وتحويل ذلك الشعاع إلى أليكترونات والتالي إلى تيار كهربائي، وأن قوة التيار الكهربائي أو الإشارة الكهربائية المتولدة تكون مكافئة لقوة أشعة الفوتونات الساقطة عليه. جهاز الكاشف يحب أن يكون على درجة عالية من الحساسية وذات ثباتية عالية وقليل الذبذبات.

هناك عدة أنواع من أجهزة الكشف وأهمها:

أ- الكاشف نوع Photoemissive tube

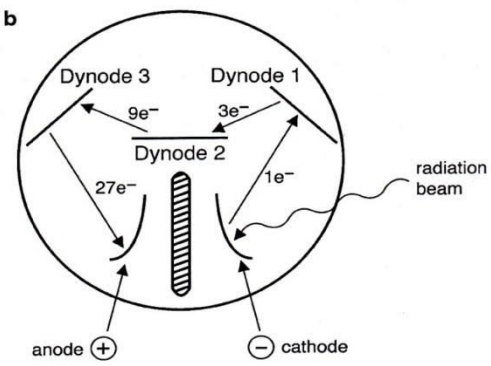
عبارة عن أنبوب مفرغ من الهواء يتكون من قطبين سالب (Cathode) وموجب (Anode) والقطب السالب يكون حساس للضوء وعلى شكل نصف إسطوانة ومصنوع من معدن ومطلي

بطبقة حساسة للضوء وهي خليط من أوكسيد السيزيوم وأوكسيد الفضة. عند سقوط الأشعة على القطب السالب سوف تهرب أليكترونات منه وترتطم بالقطب الموجب وتصبح بشكل تيار كهربائي ضعيف يتناسب طردياً مع كثافة الأليكترونات المتحررة من القطب السالب أي يتناسب مع قوة الفوتونات الساقطة أصلاً على القطب السالب.التيار الكهربائي المتكون يكون ضعيفاً ويستعمل مكبر التيار (Amplifier)لتكبير الإشارة ليتم تسجيلها.



2- الكاشف نوع Photomultiplier tube

وهي عبارة عن أنبوبة ضوئية يضاعف فيها الأليكترونات مرات عدة وتتكون من أنبوب ضوئي يحتوي على سلسلة من الدينودات (Dynodes) التي تعمل على مضاعفة الأليكترونات المتحررة منها والتي سوف ترتطم بالقطب الموجب لتكوين تيار كهربائي عالي يمكن قياسه بدون الحاجة إلى مكبر للتيار.

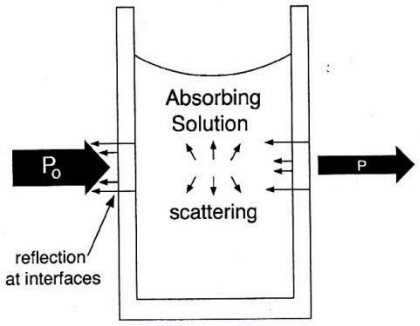


Photomultiplier Arrangement

إجراء التحليل

- يجب أولاً تصفير الجهاز (Calibration) بوضع المذيب فقط (Blank) ويصفر الجهاز لأعطاء إمتصاص (صفر) أو النسبة المئوية للشعاع النافذ 100٪ وذلك للتعويض عن الإمتصاص الذي يحصل من قبل المذيب وللتعويض عن الإشعاع الذي قد يفقد بفعل التشتت (Scattering) أو الإنعكاس (Reflection).

العوامل التي تتداخل مع إمتصاص الأشعة



أنواع أجهزة المطياف (Spectrophotometers)

- **جهاز المطياف ذو الحزمة الواحدة (Single-beam spectrophotometer)**

يستعمل خلية واحدة فقط ويصفر أولاً الجهاز بالـ Blank ثم يتم قراءة محلول النموذج.

- **جهاز المطياف ذو الحزمتين (Double- beam spectrophotometer)**

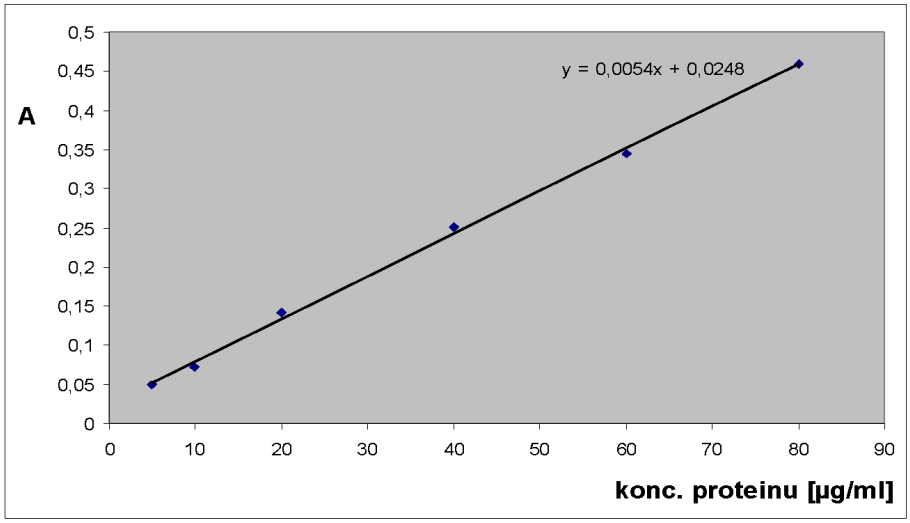
- في أجهزة المطياف هذه تستعمل عادة خليتين، يوضع في إحداها النموذج والأخرى تستعمل كـ Blank أو تستعمل كخلية مصدر (reference) حيث يوضع فيها محلول ذات تركيز معين من المركب المراد قياسه.

كيفية إيجاد تراكيز المركبات من قراءة الجهاز

- إن الجهاز سوف يعطي قراءة الإمتصاص (A) أو النسبة المئوية للشعاع النافذ (T %)
- ممكن تحويل الـ T % إلى الإمتصاص (A) باستخدام المعادلة المذكورة سابقاً.
- عند الحصول على قراءة الإمتصاص (A) هناك طريقتين للحصول على تركيز المركب المراد قياسه:

1- تطبيق القانون السابق ذكره A = abc إذْ إن A هي قراءة الجهاز و a هي الإمتصاص المولاري وتستخرج من المصادر أو يمكن إيجادها عملياً بالمختبر و b هو طول المسار الضوئي بالسم ويبقى الـ c وهو تركيز المركب المجهول.

2- عن طريق عمل منحنى قياسي (Standard curve) (الشكل أدناه) وذلك بعمل سلسلة ذات تراكيز معلومة للمركب المراد قياسه ثم إيجاد قراءة الإمتصاص لكل تركيز ثم يرسم المنحنى القياسي ثم تسقط قراءة الإمتصاص لمركب النموذج مجهول التركيز والحصول على التركيز من المنحنى.



3- في الأجهزة الحديثة يتم وضع محلول معلوم التركيز في خلية الـ Reference ويوضع محلول العينة في خلية العينة وتتم القراءة ويقوم الجهاز بإعطاء تركيز محلول العينة مباشرة بدون منحنى قياسي وبدون إجراء حسابات لاحقة ما عدا مراعاة التخفيفات التي جرت على العينة.

إستعمالات أجهزة المطياف

- تستعمل أجهزة المطياف لإيجاد تراكيز المركبات المختلفة وذلك بعد إستخلاصها من المادة الغذائية وتنقيتها بطريقة ملائمة وبشرط أن هذه المركبات لهل القابلية على إمتصاص الأشعة.
- إذا كانت المركبات المراد قياسها لا تمتص الأشعة فيمكن مفاعلتها مع مواد كيميائية وبصورة خاصة تلك التي تمتلك مجاميع الكروموفورات لجعلها تمتص الأشعة.
- يمكن قياس تراكيز المركبات المختلفة كالبروتينات والسكريات والأصباغ الغذائية والسموم المختلفة وغيرها.
- متابعة التفاعلات الكيميائية أو التسحيحات الكيميائية
- متابعة التفاعلات الإنزيمية عن طريق قياس زيادة نواتج التفاعل أو النقصان في المادة الخاضعة.
- متابعة تطور أو إزالة العكارة

تكملة المحاضرة الثانية

تمارين في السبكتروسكوبي -- استعمال المطياف (Spectrophotometer) لإيجاد تركيز المركبات:

مثال (1) تطبيق المعادلة A= abc

يقدر الكافئين في القهوة والشاي على طول موجي 276 نانومتر باستخلاص الكافئين بوساطة محلول هيدروكسيد الصوديوم المخفف، وفصله من المركبات الأخرى باستعمال عمود كروماتوكرافي غسله بالكلوروفورم. نموذج يحتوي على 0.5 ملغم كافئين / 50 مل كلوروفورم له قراءة تساوي 80% نفاذية (=%T80). إحسب تركيز الكافئين في محلول نموذج له النسبة المئوية للنفاذية تساوي 60 (T=60%) ، باستعمال خلية نموذج بقطر 10 ملم.

الحل:

For the standard	For the unknown
A = 2- log % T	A = 2 - % T
= 2 – log 80	= 2 – log 60
= 2 – 1.903	= 2- 1.778
= 0.097	= 0.222

To determine the absorptivity, a, employ Beer's law using the information obtained from the standard:

A = abc 0.097 = a x 1 cm x 0.5 mg /50 ml a = 0.194

The a thus can be used only when concentrations are expressed in mg/50ml.

For the unknown:

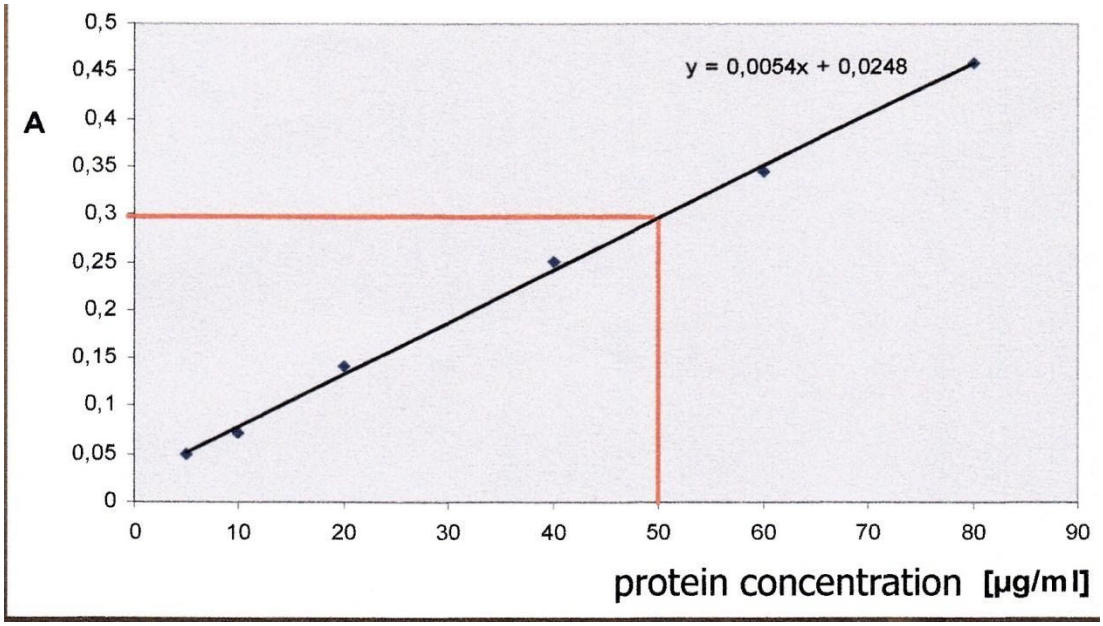
A = abc 0.222 = 0.194 x 1 cm x c

c = 1.14 mg caffeine / 50 ml chloroform.

مثال (2) باستعمال المنحنى القياسي (Standard curve)

لتقدير تركيز البروتين في العينة الغذائية تستعمل طريقة لوري (Lowry protein assay)، وذلك بتفاعل البروتين مع محلول تفاعل فيتكون معقد ملون يمتص الأشعة على طول موجي 750 نانومتر (= λ 750 nm)

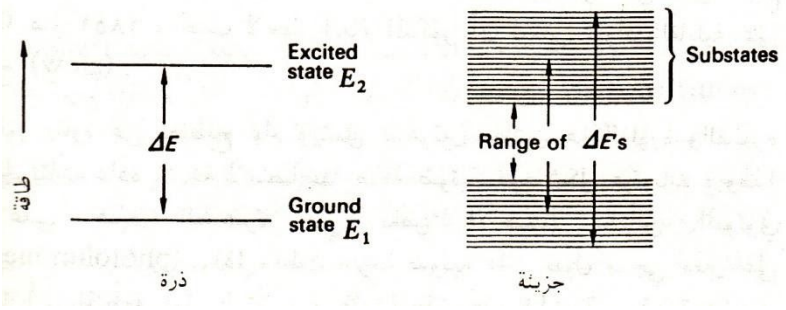
نقوم أولاً بتحضير عدة محاليل من البروتين النقي، مثلاً ألبومين مصل الأبقار (BSA, bovine serum albumin) ليكون التركيز النهائي للبروتين 5 ، 10 ، 20 ، 40 ، 60 و 80 ميكروغرام/ مل. ثم نظيف محلول التفاعل لكل عينة ونقرأ الإمتصاص على طول موجي 750 نانومتر فنحصل على قيم الإمتصاص ثم نرسم المنحنى القياسي للبروتين على ورق بياني كما في الشكل:



بعد ذلك نضيف محلول التفاعل على النموذج المراد قياس تركيز البروتين فيه ونقرأ على 750 نانومتر، ثم نسقط قراءة الإمتصاص للنموذج على المنحنى القياسي فنحصل على تركيز البروتين كما في الشكل الذي يبين بأن قراءة الإمتصاص للنموذج كانت 0.3 فيقابلها تركيز البروتين 50 ميكروغرام / مل.

الفلورة والفسفرة (Fluorescence and Phosphorescence)

- ظاهرة التألق (Luminescence) هي قابلية المواد على التوهج (Glowing)
- التألق هو مصطلح عام يشمل ظاهرتي الفلورة والفسفرة
- تتألق الجزيئات عند إمتصاصها طاقة ضوئية على شكل الفوتونات لذا يطلق عليها التألق الفوتوني (Photoluminescence)
- إذا سلطت حزمة من الأشعة، عادة في المنطقة فوق البنفسجية، على جزيئة فإن هذه الجزيئة سوف تصبح في حالة متهيجة (Exited state) نتيجة لإنتقال الأليكترونات من المدار الأصلي إلى مدار أعلى، ثم ترجع إلى حالتها الأصلية (Ground state) التي كانت عليها، ويصاحب ذلك إنبعاث طاقة على شكل أشعة مرئية، وهذه تسمى بظاهرة الانبعاث التألقي (Luminescence emission)، والذي يشمل الفلورة والفسفرة.
- عندما تمتص الذرة كمية من الطاقة الضوئية على شكل فوتونات، فإن طاقة هذه الذرة سوف تزداد بمقدار (hv) أي أن E = hv ، حيث أن E هي كمية الطاقة الممتصة؛ V هو التردد؛ h هو ثابت بلانك. إن التهيج يتناسب طردياً مع قوة الطاقة الضوئية الممتصة ويترتب على ذلك إنتقال الذرة بمدى (range) محدد وثابت من الحالة الأصلية إلى الحالة المتهيجة، أي أن: hv = E2 – E1 = Delta E ، ويترتب على ذلك أن إنتقال الجزيئة من الحالة الأصلية إلى الحالة المتهيجة لا يتحدد بمدى محدد وثابت بل يكون بمديات متعددة (ranges) كما موضح بالشكل:



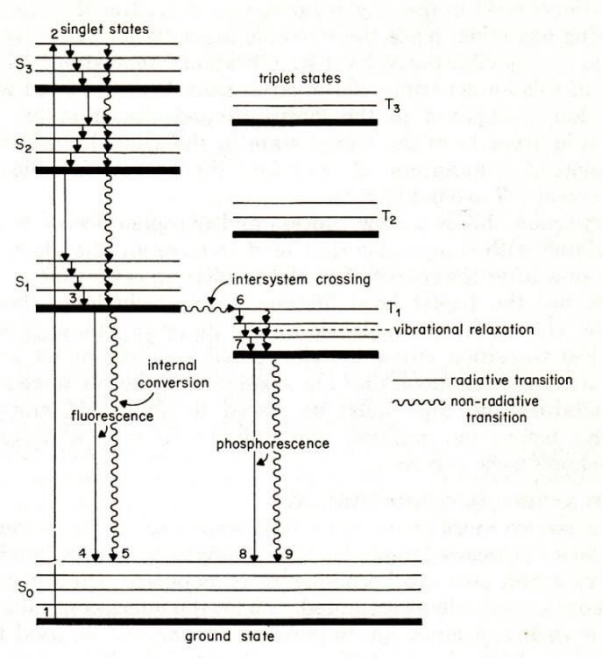
- بصورة عامة تحتوي المركبات التي تتفلور أو تتفسفر على:

<< مجاميع واهبة الأليكترونات مثل المجاميع الأمينية والكحولات.

<< أواصر مزدوجة مقترنة (Conjugated double bonds) مثل الحلقات العطرية.

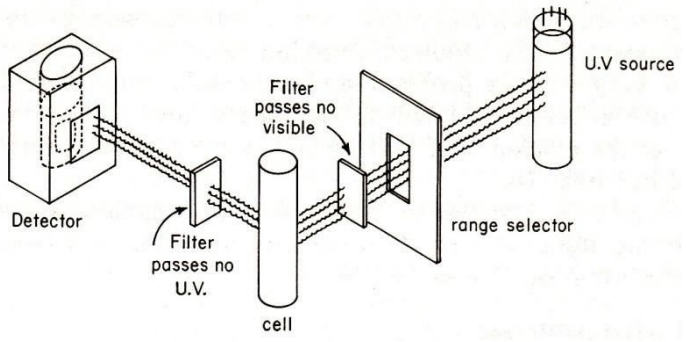
- المجاميع التي لها القابلية على سحب الأليكترونات (Quenching) تعمل على تثبيط الفلورة، وتشمل هذه المجاميع الكربوكسيل والهاليدات والنترات.

- مستويات الطاقة التي تتكون في عمليتي الفلورة والفسفرة مبينة بالشكل الآتي:



- مستويات الطاقة التي تتكون في عمليتي الفلورة والفسفرة مبينة بالشكل الآتي:
- عند إمتصاص الذرة للطاقة (عادة في المنطقة فوق البنفسجية) فإنها تنتقل من الحالة الأصلية إلى الحالة المتهيجة، أي أن الأليكترون ينتقل من 1 ⟵ 2 (في الشكل).
- الوقت اللازم لعملية التهيج هذه يقدر بـ 10^{-15} من الثانية.
- إن الحالة المتهيجة للجزيئة تكون غير ثابتة فتفقد الجزيئة مباشرة الطاقة التي امتصتها وترجع إلى حالتها الأصلية، ويطلق على هذه الحالة بالفلورة المترددة أو المتذبذبة (Resonance fluorescence).
- مصطلح الـ Vibrational relaxation هو العملية التي تفقد فيها الجزيئة الموجودة في الحالة المتهيجة طاقتها لتصل إلى أدنى مستوى من التذبذب (Vibration) وهي في الحالة المتهيجة 2 ⟵ 3.
- تستغرق هذه العملية بين 10^{-11} - 10^{-13} ثانية.
- يقدر عمر الذرة في أدنى مستوى في الحالة المتهيجة بين 10^{-7} - 10^{-9} ثانية.
- في حالة رجوع الجزيئة إلى حالتها الأصلية 3 ⟵ 4 فإن ذلك سوف يؤدي إلى إنبعاث ضوء وتسمى هذه العملية بالفلورة.
- إن عملية الفلورة هي عبارة عن عملية عكسية لإمتصاص الطاقة الضوئية، وهي عبارة عن صورة مرآة لإمتصاص الطاقة الضوئية.
- تكون كمية الطاقة الضوئية المنبعثة نتيجة لعملية الفلورة أقل من كمية الطاقة الضوئية الممتصة أصلاً لذلك تكون عادة الطاقة الضوئية المنبعثة في المنطقة المرئية أو تحت الحمراء (أي ذات أطوال موجية طويلة نسبياً) ويمكن رؤيتها بالعين المجردة.

- تستغرق عملية الفلورة 10^{-8} ثانية.
- في عملية الفسفرة فإن الجزيئة تسلك طريقاً مختلفاً للرجوع إلى الحالة الأصلية.
- في الفسفرة يحدث ما يسمى بالتقاطع الداخلي (Intersystem crossing) وهي العملية التي يتم فيها التحول من الـ Singlet state وهي الحالة التي يدور فيها زوج الأليكترونات مغزلياً إلى الـ Triplet state وهي الحالة التي يدور فيها كل أليكترون مغزلياً، أي إنتقال الأليكترون من 3 ← 6 (في الشكل)، وتستغرق هذه العملية 10^{-8} ثانية.
- بعد حدوث عملية التقاطع الداخلي تنزل الجزيئة مباشرة إلى أدنى مستوى من التذبذب في الحالة المتهيجة بواسطة الـ Vibrational relaxation.
- يقدر عمر الجزيئة في أدنى مستوى من الطاقة في الـ Triplet state بـ 10^{-4} ثانية إلى 10 ثوان.
- بعد ذلك تنزل الجزيئة إلى الحالة الأصلية (7 ← 8 في الشكل)، بإنبعاث كمية من الضوء، وهي عملية الفسفرة.



تركيب جهاز الفلورة

يتكون جهاز الفلورة من:

- **مصدر للأشعة فوق البنفسجية**
  - < لمبة الهيدروجين (Hydrogen lamp)
  - < لمبة الديتوريوم (Deuterium lamp)
  - < لمبة غاز الزئبق (Mercury lamp)
  - < لمبة قوس الزينون (Xenon arc)

- **مرشح لا يسمح بدخول الأشعة المرئية**
- **خلية النموذج (Sample cell)**، يجب أن تكون مصنوعة من الكوارتز

- **مرشح لا يسمح بدخول الأشعة فوق البنفسجية**

- **الكاشف من نوع الـ Photomultiplier tube**

الإحتياطات التي يجب مراعاتها في تجارب الفلورة

- إختيار المصدر الملائم للأشعة فوق البنفسجية: إستعمال مصدر قوي يؤدي إلى تحطم بعض المركبات بدلاً من تهيجها.
- إختيار الـ pH الملائم: خفض الـ pH يؤدي إلى شحن المركب بالشحنة الموجبة ويؤدي إلى تحطم الفلورة.
- السيطرة على درجة الحرارة. إن الإشعاع المنبعث من الجزيئات المتفلورة قد تفقد طاقتها بتصادمات أخرى بدلاً من أن تتفلور، لذا يعمد إلى تجميد النموذج أو خفض درجة حرارته للإقلال من هذه التصادمات.
- إستعمال تراكيز مناسبة لتفادي حدوث ظاهرة الإمتصاص الذاتي (Self absorption).
- وجود المواد الـ Quenching materials تؤدي إلى نتائج غير صحيحة.

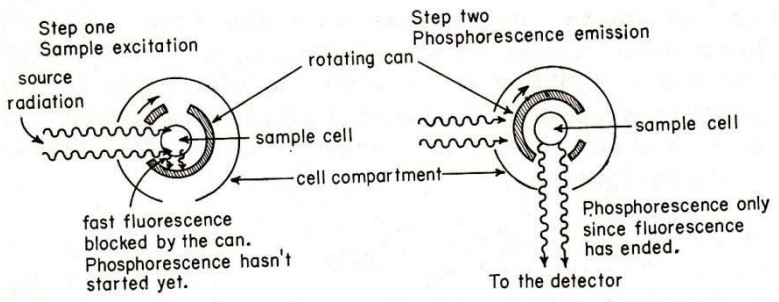
استعمالات جهاز الفلورة

- قياس تراكيز المركبات التي لها القابلية على الفلورة، ومنها:

< الفيتامينات مثل فيتامين A التي تمتص الأشعة على طول موجي 327 نانومتر

< السموم الفطرية مثل سم الأفلا (Aflatoxins) وتمتص الأشعة فوق البنفسجية على طول موجي 360 نانومتر.

< مركب الـ Benzopyrene المسبب للسرطان والموجود في الأسماك المدخنة.



تركيب جهاز الفسفرة

- يكون القياس على مرحلتين: أولاً عملية تهيج النموذج وثانياً عملية إنبعاث الفسفرة.

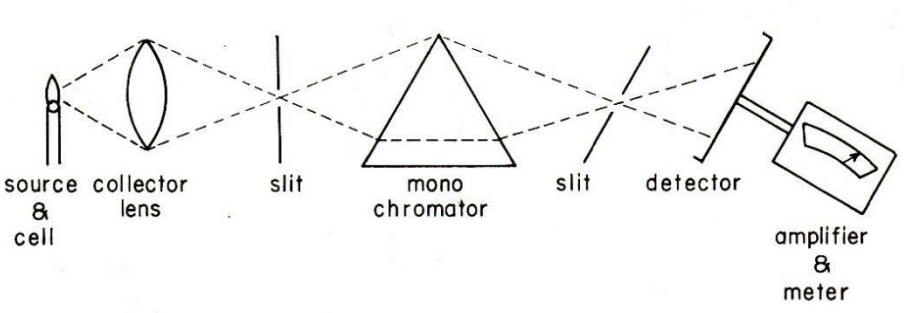
تختلف الفسفرة عن الفلورة بما يأتي:

- تأخذ الجزيئة وقتاً أطول بكثير للرجوع إلى حالتها الأصلية.
- لا يعد إنبعاث الطاقة الضوئية كصورة مرآة لامتصاصها.
- لا تحدث الفسفرة عادة في المحاليل على درجة الحرارة الاعتيادية.

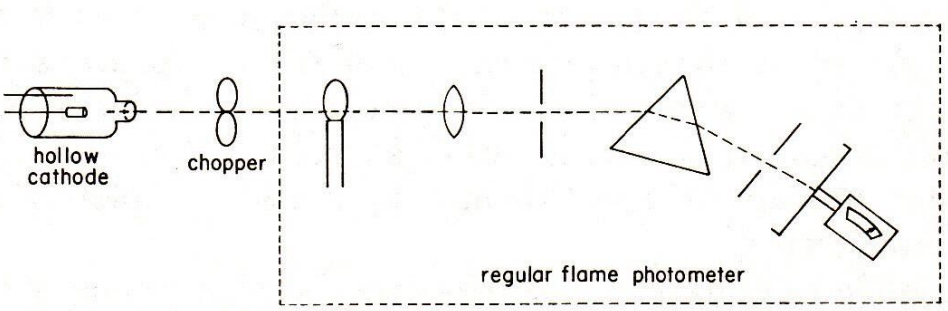
جهازي التحليل باللهب والامتصاص الذري (Flame photometry and Atomic absorption)

- أساس التحليل باللهب: التحليل باللهب يعتمد على تسخين النموذج السائل في اللهب على درجات حرارة عالية عندها تتهيج (Exited) ذرات العنصر الموجود في النموذج وبعد رجوع هذه الذرات إلى حالتها المستقرة الطبيعية يبعث أشعة موجية ذات طول موجي معين تميز هذا العنصر عن غيره من العناصر الموجودة في النموذج. إن شدة هذه الموجات الإشعاعية فتعطي فكرة عن كمية المعدن بعد مقارنتها موجات إشعاعية أخرى ناتجة عن محاليل معدنية ذات تركيزات معلومة (Calibration Curve).
- أساس الإمتصاص الذري: الذرات غير المتهيجة الموجودة فوق اللهب فيمكنها إمتصاص أشعة من مصدر خارجي (منبعثة من ذرات نفس العنصر المراد قياسه) على نفس طول الموجة، ومقدار هذا الإمتصاص يمكن أن يقاس ويعب عن تركيز المعدن في النموذج.

مكونات جهاز التحليل باللهب:



مكونات جهاز الامتصاص الذري:



- **المشعل (Burner)**

يعد المحور الأساسي في التحليل باللهب، فهو يعمل كوسيلة في تحوير النموذج السائل إلى دقائق صغيرة جداً ثم توجيهها إلى منطقة اللهب لإشعالها. في الوقت نفسه يعمل اللهب على تنشيط وتهيج الذرات المتعادلة وجعلها تبعث طاقة إشعاعية تستمر لفترة 1 – 2 دقيقة.

تقسم المشاعل على قسمين:

- مشعل الاحتراق الكلي (Total consumption burner)

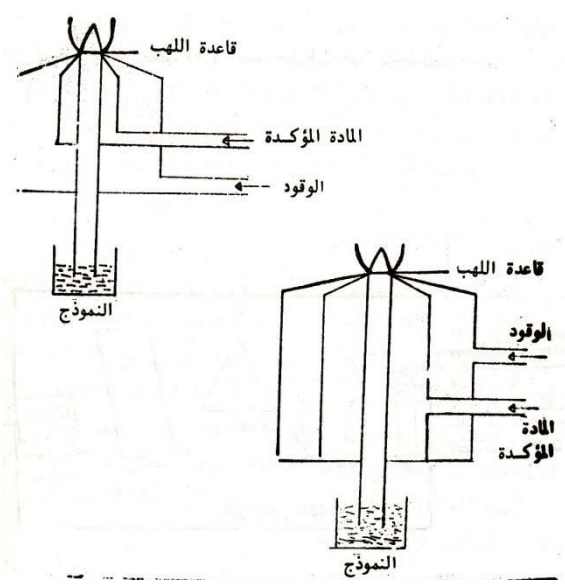
يعمل على مزج الوقود (Fuel) والمادة المؤكسدة (Oxidant) والنموذج المبخر كلياً عند قاعدة اللهب.

يتميز هذا المشعل بـ:

< أميناً من الانفجار

< نقطة لهب مركزة

يعمل على تحويل النموذج إلى ضباب أو رذاذ ناعم من تحت اللهب مباشرة بعدها يحرق ويحول إلى ذرات متهيجة بفعل الحرارة العالية.



- **مشعل لوندكارد (Lundgardh burner)**

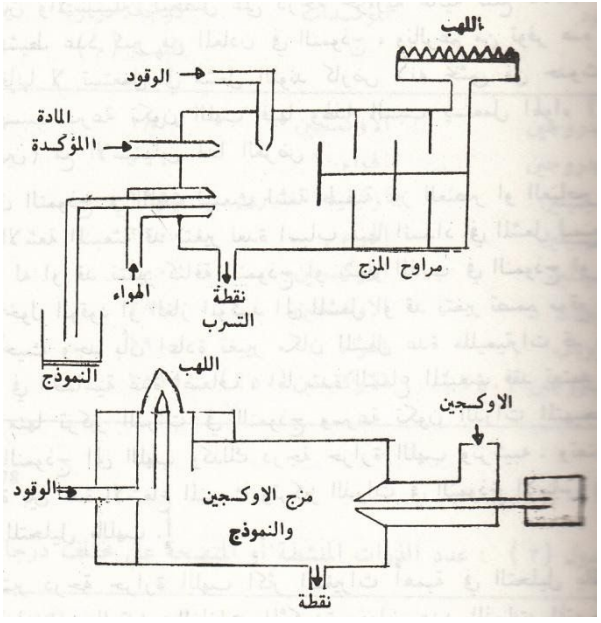
يعتمد في تصميمه على مزج الوقود والمادة المؤكسدة والنموذج المبخر في داخل حوض في المشعل، ثم بعدها يضخ المزيج إلى منطقة اللهب.

يتميز هذا المشعل بـ:

<< مستقر

<< خال من الضوضاء < يستعمل بصورة خاصة في أجهزة الإمتصاص الذري

<< خطورة حدوث انفجار المشعل بسبب مزج الوقود والمادة المؤكسدة والبخار النموذج في الحوض.



2- اللهب (Flame)

يتم الحصول على اللهب من تفاعل غازين مع بعضهما وهما غاز الوقود وأحد الغازات المؤكسدة

< غاز الوقود: الهيدروجين أو الأسيتيلين أو البروبان أو النتروجين

< الغاز المؤكسد: الأوكسجين أو الهواء أو أوكسيد النتروز

درجات الحرارة تعتمد على نوع المزيج لهذه الغازات، وكما في الجدول:

جدول (١): مزج الوقود مع المواد المؤكسدة للحصول على انواع مختلفة من الدرجات الحرارية والسرع اللهبية.

الوقود	المؤكسدات	درجة حرارة اللهب (مْ)	سرعة اللهب (سم/ ثانية)
الهيدروجين	الاوكسجين	٢٨٠٠	–
الهيدروجين	الهواء	٢١٠٠	–
الاسيتيلين	اوكسيد النايتروز	٢٩٥٥	١٨٠
الاسيتيلين	الهواء	٢٢٠٠	١٦٠
الاسيتيلين	الاوكسجين	٣٠٠٠	١١٣٠
البروبان	الاوكسجين	٢٨٠٠	–
البروبان	الهواء	١٩٠٠	٨٢
النتروجين (٥٠٪)	الاوكسجين (٥٠٪)	٢٨١٥	٦٤٠

- في مشعل الاحتراق الكلي يستعمل عادة مزيجاً من الأسيتيلين والأوكسجين للحصول على درجة حرارة 3000 مْ وهي كافية لتهيج عدد كبير من المعادن.
- في مشعل اللوندكارد لا تستعمل هذه الغازات خشية حدوث انفجار، ويستعمل الهواء بدل الأوكسجين مع الأسيتيلين.
- تعد درجة حرارة من أكثر المتغيرات أهمية في التحليل باللهب
- عدد الذرات المتهيجة يزداد بارتفاع درجة الحرارة ، وهذا يؤدي إلى وضوح الخطوط الطيفية المنبعثة، الجدول الآتي يبين مقدار تهيج الذرات باختلاف درجة الحرارة.
-

جدول (٢) : عدد الذرات المنشطة أو المتهيجة على مختلف درجات الحرارة .

العنصر	طول الموجة (نانوميتر)	درجة الحرارة (كلفن) ٢٠٠٠	٣٠٠٠	٤٠٠٠
الصوديوم	٨٥٢,١	٤×١٠^{-٤}	٧×١٠^{-٣}	٣×١٠^{-٢}
البوتاسيوم	٥٨٩	١×١٠^{-٥}	٦×١٠^{-٤}	٤×١٠^{-٣}
الكالسيوم	٤٢٢,٧	١×١٠^{-٧}	٤×١٠^{-٥}	٦×١٠^{-٤}
الزئبق	٢١٣,٩	٧×١٠^{-١٥}	٦×١٠^{-١٠}	٢×١٠^{-٧}

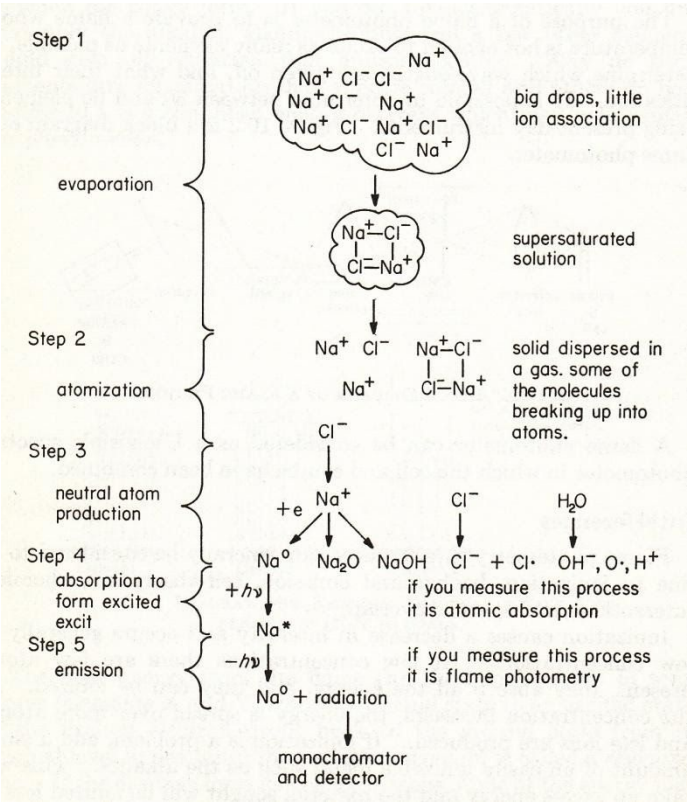
- **تحليل النموذج في اللهب**

1- يدفع محلول النموذج غلى اللهب بوساطة مزيج الغازات ويتكسر المحلول إلى قطرات رذاذية وأن 95٪ منها تعد كبيرة الحجم ولا يمكن للمذيب أن يتبخر منها بسهولة وتخرج من اللهب دون تغيير.

2- يتطاير المذيب بعد تبخره تاركاً المادة الصلبة منتشرة في اللهب ثم تليها عمليات تفتت وإنشطار إلى ذرات وأيونات وجذور حرة بفعل حرارة اللهب .

3- تكون الذرات المتعادلة (Neutral atoms) من أيوناتها وبهذا الشكل تحتاج إلى طاقة قليلة لتهيجها، وقد وجد بأن عدد الذرات المهيجة يبلغ 10 -15٪ من مجموع هذه الذرات وأما الباقي منها فتبقى على حالتها الطبيعية المستقرة. إن عدد الذرات المتهيجة يزداد بارتفاع درجة حرارة اللهب.

4- تميل الذرات المتهيجة للرجوع إلى حالتها المستقرة السابقة وفي أثناء رجوعها تفقد طاقتها بشكل أشعة مرئية ملونة تساعد في تشخيص المعدن وتقدير كميته.

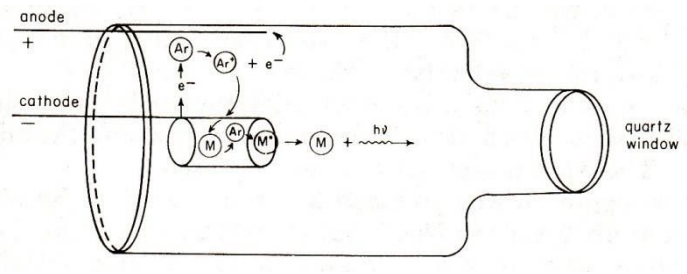


3- موحد الموجات (Monochromator)

4- الكاشف (Detector)

5- الاسطوانة الكاثودية المجوفة (Hollow cathode lamp) تستعمل هذه الاسطوانة في أجهزة الإمتصاص الذري فقط، وهي مصدر الأشعة التي توجه إلى ذرات النموذج في اللهب ثم يقوم جهاز التحسس (الكاشف) بقياس كمية الضوء الممتص من هذه الذرات وذلك لقياس شدة الأشعة قبل وبعد مرورها بذرات النموذج الموجودة في اللهب. من مزايا هذه الأشعة انها تمتص بسهولة من قبل ذرات العنصر المراد قياسه، لذا يجب أن تستعمل لكل عنصر إسطوانة كاثودية مصنوعة من ذلك العنصر.

<< تتكون الاسطوانة من أليكترودين، الكاثود (Cathode) والأنود (Anode) وتملأ بغاز الأركون أو النيون أو الهيليوم، وعند مرور التيار الكهربائي سينتج عنه خروج أليكترونات من الكاثود إلى الأنود وفي طريقها تصطدم بذرات الغاز وتأينها والأيونات المنتجة تتسارع باتجاه الكاثود وتصطدم معه مسببة نزع عدة ذرات من سطح الكاثود ثم تتهيج هذه الذرات المنزوعة باصطدامها مع أيونات الغاز تليها مرحلة فقدان الطاقة من الذرات المتهيجة مسببة خروج أشعة موجية ذات خطوط ثابتة تعكس نوع المعدن الذي صنع منه الكاثود.



6- مقطع الأشعة الدوار (Rotary chopper)

إن وظيفة هذه الوحدة في جهاز الإمتصاص الذري هي إشارات من الأشعة الخارجة من الكاثود المجوف لكي تتميز عن أشعة اللهب الممتصة بوساطة ذرات لعنصر لأن مثل هذه الذرات عادة تنتج وتمتص الأشعة باستمرار. فللتمييز بين الحالتين يستعمل مقطع الأشعة الكاثودية لكي يساعد جهاز التحسس على تمييز هذه الأشعة عن باقي الأشعة الممتصة والمنبعثة في داخل اللهب.

- **مقارنة التحليل باللهب مع الإمتصاص الذري:**

1- يعد التحليل باللهب أفضل من التحليل بالامتصاص الذري في التقدير النوعي للمعادن لأن طريقة الإمتصاص الذري تحتاج إلى توفير عدة مصادر كاثودية.

2- تتميز طريقة التحليل باللهب بأنها تقيس الأشعة المنبعثة من العنصر مباشرة، بينما الإمتصاص الذري فإنها تقيس مقدار الهبوط في شدة الأشعة المنبعثة من المصدر الكاثودي المجوف بسبب إمتصاصها بوساطة ذرات العنصر الموجود في اللهب.

3- يعد الإمتصاص الذري أفضل من التحليل باللهب في التقدير الكمي للعناصر لأنه لا يتأثر كثيراً بالمعوقات الكيميائية التي تتأثر بها عادة طريقة التحليل باللهب.

4- يعد الإمتصاص الذري أكثر حساسية في تقدير المعادن من التحليل باللهب لأنه يتحسس بصورة طردية للتركيزات المتعددة بينما تتحسس طريقة التحليل باللهب بصورة لوغارتمية.

- **معوقات تقدير المعادن بطريقة التحليل باللهب:**

1- التأين (Ionization)

تتسبب ظاهرة تأين بعض ذرات العنصر المطلوب تقديره في النموذج بهبوط الأشعة المنبعثة منه وتحدث هذه الظاهرة بالتركيزات القليلة. ممكن إضافة عنصر آخر سهل التأين يقوم بإمتصاص الأشعة الفائضة مما يعمل على تقليل تأين العنصر المطلوب قياسه.

2- الانبعاث من غير النموذج (Background emission)

نتيجة لاحتراق الوقود واحتراق المذيب والمركبات الأخرى المكونة للنموذج فيتكون مصدراً لطاقة طيفية معينة بمساحة واسعة من الأطوال الموجية ومن الممكن إجراء تصحيح للقراءة النهائية وذلك بضخ المذيب فقط مثلاً.

3- الإمتصاص الذاتي (Self absorption)

في التركيزات العالية، فإن الأشعة المنبعثة من ذرات عنصر متهيج تصبح نفسها الطاقة الإشعاعية الملائمة لامتصاصها ثانية من قبل ذرات نفس العنصر أو من قبل ذرات عنصر آخر مما تقلل قراءة الجهاز، لذا يستخدم تركيزات مناسبة.

4- تداخل الأشعة المنبعثة (Spectral interferences)

وهو تداخل أمواج الأشعة المنبعثة (Overlap) من معدنين أو أكثر فلا يستطيع الكاشف التمييز بين الأشعة مما يجعل القراءة غير صحيحة، لذا يجب إزالة هذه التدخلات بالاستخلاص الكيميائي أو اللجوء إلى إستعمال الخط البياني القياسي لمحلول يحتوي على كميات معلومة من المادة المعوقة.

5- المعوق الكيمائي (Chemical interference)

وهو إتحاد الأيونات السالبة مع الأيونات الموجبة بحيث تؤدي إلى إضعاف الأشعة المنبعثة كاتحاد الفوسفات مع الألمنيوم في مادة فوسفات الألمنيوم ولتلافي هذه الحالة تضاف مادة رابطة أو ماسكة (Chelating agent) لمسك أيونات الفوسفات السالبة وتحرير أيونات الألمنيوم الموجبة.

- **استعمالات أجهزة التحليل باللهب والامتصاص الذري**

>< جهاز التحليل باللهب يستعمل في الكشف النوعي لبعض العناصر كالصوديوم والبوتاسيوم والليثيوم والكالسيوم والسترونتيوم والباريوم وهذه العناصر تتميز بألوان خاصة بها.

>< يستخدم جهاز الإمتصاص الذري الأجهزة في التقدير الكمي للمعادن.

محاضرة تحليل أغذية (4)

الأشعة تحت الحمراء (Infra red spectroscopy)

- الأشعة تحت الحمراء هي جزء من الطيف الكهرومغناطيسي فهي أطول من الأشعة المرئية وأقصر من الأشعة الدقيقة (Microwave) وكمية الطاقة فيها أقل من طاقة الأشعة المرئية وأكثر من الأشعة الدقيقة.
- تقسم الأشعة تحت الحمراء إلى:

>< 0.75 – 2.5 ميكرومتر وتسمى الأشعة تحت الحمراء القريبة (Near infra red)

>< 2.5 – 15 ميكرومتر وتسمى الأشعة تحت الحمراء المتوسطة (Mid infra red)

>< 15 – 300 ميكرومتر وتسمى الأشعة تحت الحمراء البعيدة (Far infra red)

- المدى الطيفي الأكثر إستعمالاً هو في المدى المتوسط ويغطي طول موجي 2.5 – 50 ميكرومتر.

- تدرس منطقة الأشعة نحت الحمراء في الطيف الكهرومغناطيسي بصورة منفصلة عن المنطقتين المرئية وفوق البنفسجية لسببين:

1- إختلاف العدسات المستعملة في كلتا الحالتين إذْ تتوفر أجهزة تحليل طيفي (Spectrophotometers) تضم المرئية وفوق البنفسجية ولكن ليس هناك أي جهاز يغطي هذه المناطق الثلاثة.

2- إن إمتصاص الأشعة تحت الحمراء من قبل ذرات المركب مستند على آلية تختلف تماماً عن طبيعة إمتصاص الأشعة المرئية وفوق البنفسجية. فالطاقة الممتصة تنتقل بين المستويات الأليكترونية في الذرة (في المنطقتين المرئية وفوق البنفسجية) في حين أن الطاقة الممتصة في منطقة الأشعة تحت الحمراء تسبب زيادة في الحركة الإهتزازية والمحورية (الدورانية) في داخل المستوى الواحد من الأليكترونات أي في الآصرة المشتركة التي تربط الذرتين بعضهما مع البعض إي في الآصرة التساهمية (Covalent bond)، وأن هذه الزيادة في الحركة الإهتزازية والمحورية يجب أن تؤدي إلى تغيير الإستقطاب الجزيئي (Dipole)، وهذا يعني أن جميع الجزيئات التي تحتوي على هذا النوع من الأواصر المشتركة سيكون لها القابلية على إمتصاص الأشعة تحت الحمراء عدا الجزيئات التي تتكون من ذرتين فقط كالهيدروجين والنتروجين والأوكسجين (H_2 , N_2 , O_2) لا تمتلك حركات إهتزازية أو محورية تؤدي بها إلى إنتاج حالة الإستقطاب الضروري لإمتصاص الأشعة تحت الحمراء.

إمتصاص الأشعة تحت الحمراء (IR absorption)

تتوقف درجة إمتصاص المركبات الكيميائية للأشعة تحت الحمراء على العوامل الآتية:

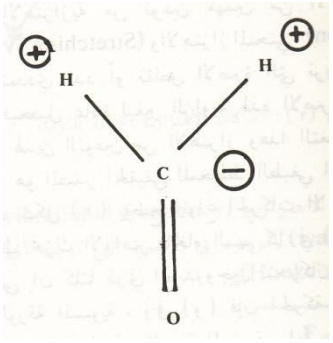
1- طول الموجة الملائم (Correct wave length)

تمتص الجزيئة الكيميائية (ذراتها أو مجاميع الذرات المكونة لها) الأشعة تحت الحمراء عندما تكون الحركة الإهتزازية لهذه الذرات هي نفس تردد (Frequency) الشعاع الممتص وبعد الإمتصاص تزداد مثل هذه الحركة. فمثلاً أن الحركة الإهتزازية لذرات جزيئة الفورمالدهيد (HCHO) وهي ذرات الـ H و C و O تحصل على تردد معين خاص بها، أي أن هذه الذرات تمتص الأشعة الملائمة لتجعلها في حركة إهتزازية مستمرة وأن هذه الأشعة يجب أن تمتلك التردد المناسب لتنتج هذا التأثير في الذرات وعندما يحصل هذا فانه يمكن القول بأن الأشعة الممتصة هي النوع المميز والخاص لجزيئة الفومالدهيد فقط دون غيرها.

2- الشحنة الكهربائية المستقطبة (Electric dipole)

تتوقف قابلية الجزيئة الكيميائية على إمتصاص الأشعة تحت الحمراء على مقدار تغير أو تبدل الشحنة الكهربائية على ذرات هذه الجزيئة. فالشحنة الكهربائية المستقطبة الاعتيادية تتصف بشحنة موجبة ضعيفة على جزء من ذرات الجزيئة وشحنة سالبة ضعيفة على الجزء الآخر منم هذه الذرات، والشحنات المختلفة والمجاورة بعضها لبعض تخلق إستقطاباً (Dipole) للشحنة على المركب وهذا الإستقطاب في الشحنة يجب أن يتغير بفعل الحركة الإهتزازية الناتجة عن إمتصاص الأشعة تحت الحمراء.

إن مركب الفورمالدهيد (الشكل) يمتلك شحنات موجبة ضعيفة على ذرات الهيدروجين يقابلها شحنة سالبة ضعيفة على ذرة الكربون، أما ذرة الأوكسجين فعليها شحنة سالبة أضعف من شحنة ذرة الكربون. لذا فان مركب الفورمالدهيد يمتلك إستقطاباً في الشحنة وأن إمتصاص الأشعة تحت الحمراء يحصل بين ذرة الكربون والذرات الأخرى في الجزيئة.



- إن مقدار إمتصاص الأشعة تحت الحمراء يزداد:

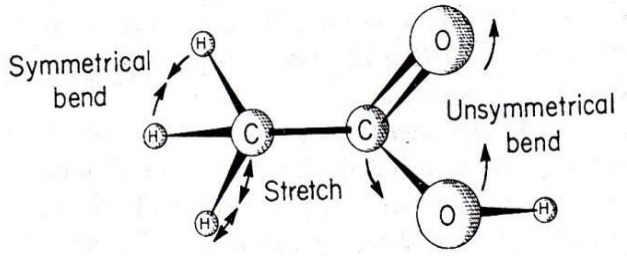
>< كلما إزدادت حركة الشحنات المستقطبة في الجزيئة

>< بين الذرات المتجاورة مقارنة مع الشحنات المتباعدة في نفس الجزيئة.

- **حركة الجزيئات (Movement of molecules)**

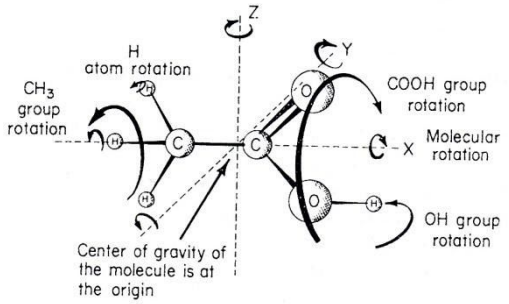
عندما تمتص الجزيئات الكيميائية الأشعة تحت الحمراء فإنها تمر بنوعين من الحركات:

1- الحركة الإهتزازية (Vibrational)



الشكل يبين الحركات الإهتزازية التمددية والمنحنية

2- الحركة الدورانية أو المحورية (Rotational)



الشكل يبين أنواع الحركات الدورانية أو المحورية

(دوران ذري – دوران مجموعة – دوران جزيئي – دوران مركزي)

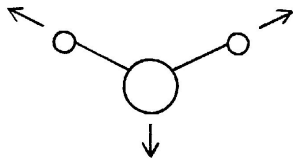
إن مقدار الطاقة في الحركة الأولى أكثر منها في الحركة الثانية لأن إمتصاص الطاقة يتم على أطوال موجية معينة مسببة حركة إهتزازية سريعة وحركة محورية أقل سرعة ويرجع مصدر هذه الطاقة للأشعة الممتصة.

تتكون الحركة الإهتزازية من نوعين من الإهتزازات:

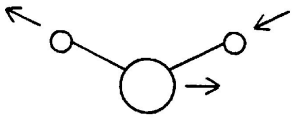
>< الإهتزاز التمددي (Stretching vibration) ويسبب تمدد وتقلص الآصرة التي تربط الذرتين مع بعضهما.

>< الإهتزاز المنحني (Bending vibration) ويسبب تغيير زاوية الآصرة التي تربط الذرات.

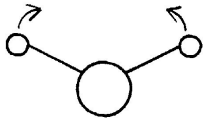
- إن تغير إستقطاب الجزيئة يرجع إلى هذين النوعين من الإهتزاز وهذا التغير هو المصدر الحقيقي للمخطط الطيفي الذي تتميز به الأشعة تحت الحمراء، الشكل يبين بعض أنواع الحركات الإهتزازية لذرات الجزيئة الواحدة:



SYMMETRICAL STRETCH



ASYMMETRIC STRETCH



SCISSORING

- تتحرك الجزيئات بعد إمتصاص الأشعة بسرعات مختلفة من الحركات الإهتزازية ونتيجة لذلك نحصل على عدة نتائج لقيم الـ E فبدلاً من الحصول على خط إمتصاص واحد نلاحظ أن هناك عدة خطوط نحيفة متراصة مع بعضها ومتداخلة لتكون خطاً رئيسياً واحداً يسمى خط الإمتصاص ((Absorption band
- قيمة هذا الخط الرئيسي هي التي يعتمد عليها في المخططات الطيفية (IR spectrum) للمركبات الكيميائية.

تشخيص المخطط الطيفي (Interpretation of IR spectrum)

- يتم عادة ضبط الجهاز (Calibration) بدقة بحيث ينتج عنه خطوط إمتصاص واضحة كل حسب طول الموجة الخاصة به. ويتم عادة ضبط الجهاز بإستعمال مادة الـ Polystyrene لثباتية خطوطها الطيفية مع موجات إمتصاصها المعلومة.

- هناك علاقة موجودة بين الحد الأعلى للإمتصاص الإهتزازي وبين المجاميع الذرية المسئولة عن هذا الإمتصاص وهذه العلاقة تستعمل كأداة فعالة في كشف وتشخيص المركبات.

الجدول يبين ترددات إمتصاص الأشعة تحت الحمراء للمجاميع الوظيفية العضوية المختلفة.

- الإمتصاص للمناطق الموجية القصيرة:

>< 0.7 – 4 ميكرون غالباً ما تشمل على الإهتزاز التمددي (Stretching vib.) للأواصر بين الهيدروجين والمعادن الثقيلة، وتستعمل للكشف عن المجاميع الفعالة التي تحتوي على الهيدروجين.

>< 4- 6.5 ميكرون تحتوي على إهتزاز الأواصر المزدوجة والثلاثية.

>< بعد الموجة 6.5 ميكرون تشمل الحركات الإهتزازية المنحنية (Bending vib.) ومنها الحركة لمجموع C-H .

- الإمتصاص للمناطق الموجية البعيدة أي بعد منطقة 25 ميكرون تشمل الحركات الإهتزازية للذرات الثقيلة مع الكربون وذرات الأوكسجين مع المعادن.

- وبما أن المركب الكيميائي يتكون من عدة ذرات أو مجاميع ذرية وأن لكل منها نوعاً خاصاً من الحركات الإهتزازية، فيخرج المخطط الطيفي بشكله المعقد من خطوط الإمتصاص المختلفة معبرة عن محتوى المجاميع الذرية المكونة للمركب.
- لكل مركب كيميائي له مخطط طيفي خاص به إذْ ليس هناك مركبات كيميائية متشابهة في مخططاتها الطيفية نتيجة لإختلاف عدد ذراتها أو مجاميعها الوظيفية المكونة لها.
- يتوفر أطلس (Atlas) كامل من المخططات الطيفية للمركبات الكيميائية ويمكن للمحلل الرجوع إليها في تشخيص المركب تحت الإختبار، كما يوجد هذا الأطلس في الحاسبات لتقوم الحاسبة بمقارنة المخطط الطيفي للمركب مع المخططات الطيفية المخزنة ويعطي إحتمالية لنوع المركب.

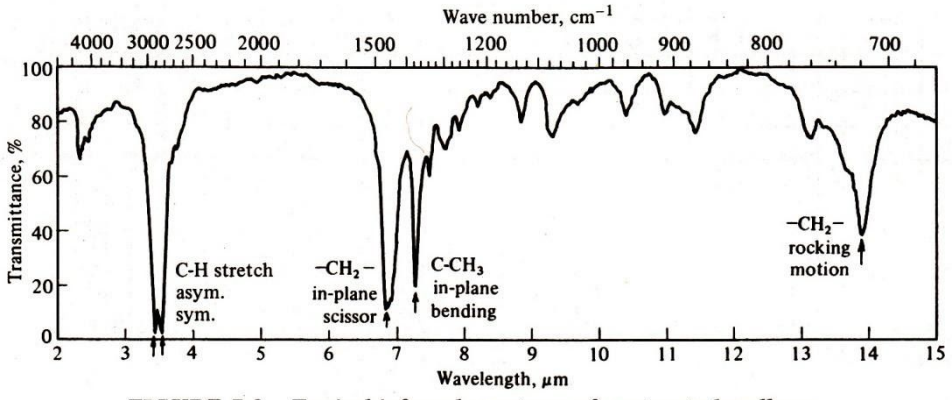


FIGURE 7-3 Typical infrared spectrum of a saturated *n*-alkane.

- **مكونات جهاز الأشعة تحت الحمراء**

هنالك نوعان من أجهزة مطياف الأشعة تحت الحمراء:

>< النوع الأول ذو الحزمة المنفردة (Single beam IR spectrophotometer)

>< النوع الثاني ذو الحزمة المزدوجة (Double beam)

وكلا النوعان يعتمدان على قانون بير (Beer's law) في عملهما.

تتكون أجهزة مطياف الأشعة تحت الحمراء من:

1- مصدر الأشعة (Radiation source)

>< المنطقة الموجية القريبة: - مصباح التنكستن

>< المنطقة الموجية المتوسطة: - مصباح كلوبار

- شعيرة نيرست

- مسخن النكروم

>< المنطقة الموجية البعيدة: - قوس الزئبق ذي الضغط العالي

2- حاجز إنتقاء الموجة (Monochromator)

>< المنشور

>< المضلع

3- وحدة التحسس (Detector)

>< البولوميتر (Bolometer)

>< المزدوجة الحرارية (Thermocouple)-

تحضير النماذج لجهاز الأشعة فوق البنفسجية:

>< النماذج الغازية

>< النماذج السائلة

>< النماذج الصلبة

- **إستعمالات جهاز الأشعة تحت الحمراء:**

1- تشخيص المركبات العضوية

2- تشخيص مركبات النكهة

3- تشخيص المركبات المكوثرة (المتبلمرة)

4- تشخيص ملوثات الهواء

5- تشخيص الملوثات في المكونات الأولية في الصناعات الغذائية

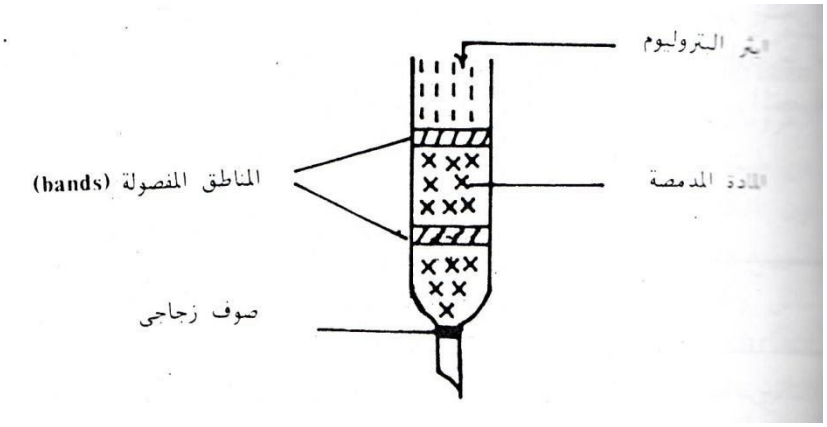
6- في السيطرة النوعية

7- تقدير الرطوبة والبروتين والدهون في الأغذية

الأسبوع الخامس – محاضرة 5 20 / 11 / 2017

الكروماتوكرافي(Chromatography)

تستخدم تقانات الكروماتوكرافي في فصل المركبات بعضها عن البعض. وتعني كلمة الكروماتوكرافي التخطيط الملون واكتشفه العالم الروسي الأصل Tswett عام 1905 عندما تمكن من فصل صبغة الكلوروفيل الخضراء من خليط الصبغات النباتية على عمود فصل يحتوي على كربونات الكالسيوم كما مبين في الشكل.



وتطلق كلمة الكروماتوكرافي اليوم على فصل المركبات والمواد المراد فصل بعضها عن البعض بالطرق المختلفة سواءً كانت ملونة أم غير ملونة.

يعتمد أساس الفصل الكروماتوكرافي على الاستفادة من بعض الخواص الفيزيائية للجزيئات مثل:

1- قابلية الجزيئات للذوبان (Solubility) في محلول ما (درجة الذوبان).
2- ميل الجزيئات للالتصاق على سطح الإدمصاص (Adsorption) .
3- ميل الجزيئات للتطاير (Volatility).

في الكروماتوكرافي يمكن الاستفادة من خاصية من هذه الخواص الفيزيائية مرتين في آن واحد أو الاستفادة من خاصيتين في آن واحد، فمثلاً لو وضعنا مادة ما في قمع فصل يحتوي على محلولين مختلفين لا يمتزجان كالماء والإيثر، فإن المادة سوف توزع أو تقسم (Partition) نفسها بين هذين المحلولين بنسبة تعتمد على درجة الذوبان النسبية لهذه المادة في كل من الماء

والإيثر، أي أن خاصية الذوبان استخدمت مرتين. وإذا وضعنا مادة ما في أنبوبة إختبار تحتوي على محلول معين ومسحوق الفحم (Charcoal)، فإن هذه المادة سوف توزع أو تقسم نفسها بين المحلول وأسطح دقائق الفحم، أي أننا استفدنا من الخاصيتين الأولى والثانية (الذوبان والإدمصاص) في آن واحد. وعند إذابة خليط من مواد متطايرة في محلول غير متطاير موجود على شكل طبقة رقيقة محمول على أسطح جسيمات صلبة، ثم عرض هذا الخليط لدرجة حرارة معينة فإن المركبات المكونة لهذا الخليط سوف تتطاير على حسب درجة التطاير أو نقطة غليان كل مكون، وهنا نكون قد استفدنا من الخاصية الثالثة أي خاصية التطاير في فصل المركبات بعضها عن البعض الآخر. وكما يلاحظ، فيمكننا القول بأن المادة أو المواد في عملية الكروماتوكرافي توزع نفسها بين طورين (Two phases) مختلفين أحدهما متحركاً ويطلق عليه الطور المتحرك (Mobile phase) والآخر ثابتاً ويطلق عليه بالطور الثابت (Stationary phase)ويكون الطور المتحرك عادة سائلاً، بينما يكون الطور الثابت طبقة رقيقة من محلول محمول على أسطح جسيمات صلبة أو يكون هذا الطور مسحوق دقيق من مادة صلبة. الجدول يبين أمثلة على الأطوار المتحركة والثابتة في الأنواع المختلفة من الكروماتوكرافي:

الأنواع المختلفة لعمليات الكروماتوكرافي

الطور المتحرك	الطور الثابت	الاختصار	الأمثلة
سائل (Liquid)	سائل (Liquid)LLC		كروماتوكرافي التقسيم
			كروماتوكرافي الورق
			كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة
سائل (Liquid)	صلب (Solid)LSC		كروماتوكرافي الإدمصاص
			كروماتوكرافي العمود
			كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة
سائل (Liquid)	صلب (Solid)		كروماتوكرافي تبادل الأيونات
			كروماتوكرافي الترشيح الهلامي
غاز (Gas)	سائل (Liquid)GLC		كروماتوكرافي الغاز السائل
غاز (Gas)	صلب (Solid)GSC		كروماتوكرافي الغاز الصلب

إلاّ أن عملية الفصل الكروماتوكرافي ليست بالحالة المستقرة أو الثابتة وإنما تمثل بنظام جاري أي نظام متحرك وبالإمكان تصور هذا النظام بحصول عدد من التوزيعات (Distributions) للمادة المذابة بين الطورين المتحرك والثابت وذلك اعتماداً على ما يسمى بمعامل التوزيع (Partition coefficient) ويرمز له بـ K ، وبشكل متسلسل، أي أنه يسمح لحصول حالة تعادل (Equilibiration) بين الطور المتحرك وأحد أجزاء الطور الثابت، وبعد ذلك ينتقل المذاب إلى الجزء الثاني من الطور الثابت وهكذا تستمر العملية لحين خروج مكونات النموذج من أسفل العمود الكروماتوكرافي. ويعرف معمل التوزيع K بأنه تركيز المذاب في أحد الطورين مقسوماً على تركيز المذاب الموجود بالطور الآخر بعد حصول درجة تعادل كاملة.

معامل التوزيع K = تركيز المذاب في الطور المتحرك / تركيز المذاب بالطور الثابت

فعندما يكون معامل التوزيع لمركب ما يساوي 1 فهذا يعني بأن المركب قد توزع بالتساوي بين الطورين أي أن 50% منه يذوب بالطور المتحرك و 50% يدمص على دقائق الطور الثابت.

وعلى الرغم من أن عملية الكروماتوكرافي هي عملية مستمرة، إلاّ أنه بالامكان تصورها على أنها تتكون من سلسلة من التعادلات النظرية تحدث لتوزيع المركب بين الطورين المتحرك والثابت ويمكن تخيلها بسلسلة من الصفائح تحدث فيها عملية التوزيع لمرة واحدة ويطلق عليها بالصفائح النظرية (Theoretical plates)، ويمكن تصور أن عمود (Column) الفصل أو الطبقة الرقيقة (Thin layer) تحتوي على أكداس من هذه الصفائح النظرية وأن كل صفيحة تحتل جزءاً من عمود الفصل أو الطبقة الرقيقة بطول معين يطلق عليها بالطول المكافئ لصفيحة نظرية واحدة (Height Equivalent to Theoretical Plate, HETP)، وهي مقياس لكفاءة كروماتوكرافي عمود الفصل، ويعد عمود الفصل جيداً في قابليته للفصل إذا كان كل 0.002 سم من طوله مكافئاً لصفيحة نظرية واحدة. ويجب أن يلاحظ بأن حجم الطور الثابت هو أقل بكثير من حجم الطور المتحرك وبذلك يمكن أن تتم عملية تصحيح بضرب معامل التوزيع (K) في حجم الطور المتحرك مقسوماً على حجم الطور الثابت لنحصل

على مصطلح جديد هو B ويسمى بمعامل التوزيع الفعال (Effective distribution coefficient)

K = B × حجم الطور المتحرك / حجم الطور الثابت

أنواع الكروماتوكرافي

كروماتوكرافي التوزيع (Partition chromatography)

يتكون نظام التقسيم من سائلين لا يمتزجان مع بعضهما البعض وتكون قطبية أحد السائلين أكبر بكثير من السائل الآخر، وقد يكون كل سائل من السائلين نقياً أو قد يكون كل سائل خليط من عدة مذيبات. على وجه العموم، تكون القوى التي تتحكم في أنظمة التقسيم أبسط من تلك التي تتحكم في أنظمة الإدمصاص. إن العامل المحدد الذي سوف يقرر فيما إذا المادة المذابة سوف تبقى في الطور الثابت أو سوف تتحرك مع الطور المتحرك هو درجة ذوبان المادة في السائلين، وبالإمكان قياس درجة توزيع المادة بين السائلين باستعمال قمع الفصل ومن ذلك يمكن الحصول على معامل التوزيع، وبالإمكان فصل المواد بعضها عن البعض إذا كانت هناك فروقات في قيم معامل تقسيمها.

كروماتوكرافي الإدمصاص (Adsorption chromatography)

يعد كروماتوكرافي الإدمصاص ملائماً لفصل المركبات ذات القطبية الواطئة، وهناك نوعان من القوى التي تؤثر في كروماتوكرافي الإدمصاص:

أولاً: القوى التي تجذب جزيئات المذاب (المركب المراد فصله) إلى المادة المدمصة (Adsorbent).

ثانياً: القوى التي تعمل على إزالة جزيئات المذاب من المادة المدمصة لتتحرك مع المذيب (الطور المتحرك) والتي تؤدي إلى فصلها. الجدول يبين بعض المواد التي تستعمل كمواد إدمصاص مرتبة تصاعدياً فيما يخص قوة الإدمصاص:

الجدول (1) بعض المواد المدمصة

1- مسحوق السيليلوز
2- النشاء
3- السكروز
4- كربونات الكالسيوم
5- المغنيسيا
6- هيدروكسيد المغنيسيوم
7- حامض السيليسيك (السيليك)
8- الألومينا

ويجب الأخذ بنظر الاعتبار النقاط الآتية عند إختيار المادة المدمصة:

1- يجب أن لا تذوب المادة المدمصة في المذيب (الطور المتحرك) المستعمل.
2- يجب أن تكون نقية وأن تكون درجة النقاوة ثابتة من وجبة إلى أخرى.
3- يجب أن لا تتفاعل المادة المدمصة مع مكونات النموذج المراد فصله ولا تساعد على تحلل مكونات النموذج.

من أكثر المواد استعمالاً في كروماتوكرافي الإدمصاص هي السيليكا ذات الطبيعة الحامضية التي تستعمل لفصل المركبات ذات الطبيعة الحامضية، والألومينا ذات الطبيعة القاعدية التي تستعمل لفصل المواد ذات الطبيعة الحامضية، بسبب أن المركبات الحامضية ترتبط بقوة على الألومينا بوساطة القوى الأيونية ويكون من الصعب إزالتها في حين ترتبط المركبات القاعدية على السيليكا بقوة أيضاً بوساطة القوى الأيونية ويكون من الصعب إزالتها. وكقاعدة عامة تستعمل الألومينا لفص المركبات ذات الطبيعة القاعدية وتستعمل السيليكا لفصل المركبات ذات الطبيعة الحامضية، بينما يمكن أن إستعمال كل من الألومينا والسيليكا لفصل المركبات المتعادلة.

هناك نوعان من القوى التي يعمل على حركة جزيئات المذاب (النموذج المراد فصله) ونزولها مع المذيب في عمود الفصل. النوع الأول ذوبان جزيئات المذاب في المذيب وفي هذه الحالة يقوم المذيب بحمل جزيئات المذاب أينما يتحرك، ويطلق على هذه الظاهرة بالغسل (Elution)، أما النوع الثاني من القوى فيطلق عليها ظاهرة الإحلال (Displacement) حيث تتنافس جزيئات المذيب مع جزيئات المذاب على مواقع الإدمصاص (Adsorption sites).

هناك العديد من المحاليل التي تستخدم كأطوار متحركة في كروماتوكرافي الإدمصاص والجدول الآتي يبين المحاليل المستعملة عادة وهي مرتبة تصاعدياً حسب قوتها.

1- إيثر البتروليوم 2-سايكلوهكسان 3- كربون تتراكلوريد 4- البنزين 5-تولوين 6 - كلوروفورم 7-إيثر 8- أسيتون 9-بروبانول 10-إيثانول 11- ميثانول 12- ماء 13- بايريدين 14- الحوامض العضوية والقواعد

ومن الضروري في اختيار المذيب الملائم أن يؤخذ بنظر الاعتبار درجة إذابة مكونات النموذج في المذيب بحيث تكون على درجة عالية من الإذابة وذلك لإبقاء النموذج عند أصغر حد ممكن. كذلك من الضروري اختيار القطبية (Polarity) الملائمة للمذيب لأنه سوف يحصل هنالك تنافس بين جزيئات المذيب والمذاب على مواقع الإدمصاص على سطح المادة المدمصة. فالمذيب الذي سوف يغسل (Elute) جزيئات المذاب بسرعة كبيرة سوف لا يتمكن من فصل هذه الجزيئات بصورة محددة وواضحة. أما المذيب الذي سوف يغسل جزيئات المذاب ببطء فإن ذلك يؤدي إلى تخفيف النموذج أكثر من اللازم ومناطق الفصل (Bands) التي سوف تنتج تكون عريضة، أي أن كفاءة الفصل تكون قليلة.

وبالإمكان مزج مذيبين أو أكثر من المذيبات المذكورة في الجدول (2) للحصول على الخليط المناسب للفصل. في حالات أخرى يستعمل ما يسمى بالغسل المتدرج (Gradient elution) ويستعمل مزيج من مذيبين أو أكثر بحيث تزداد كمية المذيب الأكثر قطبية تدريجياً في المزيج.

تقانات الكروماتوكرافي

كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة (Thin-layer chromatography, TLC)

توضع المادة المدمصة في هذا النوع من الكروماتوكرافي بشكل طبقة رقيقة بسمك يتراوح بين 0.1 – 0.2 ملم (100 – 200 ميكرون) على سطح مدعم مستوي ويكون عادة من الزجاج أو الألمنيوم وذات أبعاد مختلفة والأكثر شيوعاً تكون 20 × 20 سم، وتستعمل بعض المواد

التي تساعد على التصاق المادة المدمصة على السطح المدعم ومن هذه المواد النشا أو كبريتات الكالسيوم وتسمى أيضاً Plaster of Paris. يذاب النموذج المراد فصله في مذيب مناسب ويوضع على هيئة بقعة (Spot) صغيرة (بقطر 3 ملم) بوساطة أنبوبة شعرية على الطبقة الرقيقة بمسافة 2 سم من الأسفل. وبعد أن تجفف البقعة بالهواء الدافئ توضع الصفيحة (Plate) في وعاء التطوير (Development chamber) الذي يحتوي على المذيب (بعمق 1 سم) بحيث لا يلامس بقعة النموذج ثم يغطى الوعاء ويسمح للمذيب بالصعود خلال المادة المدمصة بفعل الخاصية الشعرية وتتم عملية التطوير (Development) بارتفاع المذيب إلى 10 – 15 سم فوق المنطقة التي وضع عليها النموذج. وعند اختيار المذيب الملائم للفصل سوف تفصل (Resolve) بقعة النموذج الأصلية إلى عدد من البقع وتمثل كل بقعة أحد مكونات النموذج الأصلي.

وتجرى عملية الكروماتوكرافي عادة في وعاء التطوير الذي يكون مشبعاً ببخار المذيب المستعمل وبالإمكان وضع قطعة من ورق الترشيح على جدران الوعاء من الداخل لتتم عملية التشبيع (Saturation). وتتم عملية تشبيع وعاء التطوير ببخار المذيب حتى لا تجف الصفيحة عند صعود المذيب بالصفيحة مما يؤدي إلى زيادة سرعة صعود المذيب وبالتالي لا يتم فصل المركبات بصورة واضحة.

وهناك بعض المصطلحات التي تستخدم في كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة وأيضاً كروماتوكرافي الورق نذكر منها:

نقطة الأصل (Origin): وهي البقعة المحتوية على النموذج المراد فصله، والذي يتكون من عدة مكونات، وتوضع قرب إحدى نهايتي الصفيحة. ويطلق على تقانة وضع هذه البقعة على المادة المدمصة بالتنقيط (Spotting).

الحافة الأمامية للمذيب (Solvent front): وهي أقصى نقطة وصل اليها المذيب خلال المادة المدمصة.

قيمة الـ R_f (R_f value): وهي قيمة يتحصل عليها بتقسيم المسافة التي قطعها المركب (تحسب من مركز البقعة) على المسافة التي قطعها المذيب، وتقاس كلتا المسافتين من نقطة الأصل.

وهذه القيمة ثابتة لأي مركب تحت ظروف معينة وهي تتأثر بتركيز وطبيعة المكونات ودرجة الحرارة ونوع المذيب ودرجة تشبع وعاء التطوير. وتتراوح قيمة الـ R_f من صفر (أي أن النموذج لا يذوب اطلاقاً في المذيب) إلى واحد (أي أن النموذج يذوب بصورة كاملة في المذيب) وفي كلتا الحالتين لا تحدث عملية الفصل وتفشل عملية الفصل الكروماتوكرافي. الشكل يوضح رسم تخطيطي لكروماتوكرام في الـ TLC.

كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة ذات الاتجاهين (Two-dimensional TLC)

يوضع النموذج في أحدى زوايا الصفيحة ثم توضع في وعاء التطوير الذي يحتوي على المذيب الأول ثم ترفع الصفيحة وتجفف ثم تدور 90 درجة وتوضع في وعاء التطوير الذي يحتوي على المذيب الثاني وبعد صعود المذيب الثاني إلى ارتفاع مناسب ترفع الصفيحة وتجفف ثم يتم إظهار البقع. ويستعمل هذا الكروماتوكرافي لفصل النماذج التي تحتوي على مركبات كثيرة لا يمكن فصلها بالتطوير باتجاه واحد مثل فصل الأحماض الأمينية لبروتين معين.

بعد إنتهاء عملية التطوير (أي بعد صعود المذيب إلى الارتفاع المناسب) تزال الصفيحة من وعاء التطوير وتجفف بالهواء الساخن،وفي حالة كون البقع غير ملونة ولا يمكن رؤيتها بالعين المجردة تجرى عملية إظهار البقع المفصولة بعملية تسمى الإظهار(Visualization) وتستخدم طرائق عدة منها:

1- الطرق الكيميائية: وتتم بمفاعلة المركب بالمواد الكيميائية إذ يتفاعل المركب مع المادة الكيميائية ليظهر لون معين وأحيانا يتم التفاعل بوضع الصفيحة بالفرن على درجة حرارة 100- 120 ْم، وهناك نوعين من هذا الكشف: أولاً الكشف التحطيمي(Destructive) وذلك برش الصفيحة بمحلول حامض الكبريتيك المركز (25 -50 %) ثم توضع الصحيفة في الفرن على درجة حرارة 120 ْم فيعمل على حرق المركب الذي يظهر بلون بني نتيجة الحرق. ثانياً الكشف غير التحطيمي (Non-destructive) وذلك برش الصفيحة بمواد كيميائية ممكن أن تتفاعل مع مكونات البقع فمثلاً عند فصل مجموعة الدهونات ممكن تعرض الصفيحة لبخار اليود

في داخل وعاء مغلق فتظهر البقع بلون الأصفر أو البرتقالي، كما أنه للكشف عن بقع الأحماض الأمينية يمكن مفاعلتها مع مركب النهايدرين لتظهر بلون أرجواني وفي كلتا الحالتين لا تتحطم المكونات.

2- الطرق الفيزيائية: تستعمل الأشعة فوق البنفسجية بالأطوال الموجية 240 – 380 نانوميتر إذْ إن العديد من المركبات لها القدرة على إمتصاص هذه الأشعة لتتوهج وتظهر بقع المركبات المفصولة بألوان مختلفة فمثلاً السم الفطري سم الأفلا B_1 يظهر بلون أزرق في حين أن سم الأفلا G_1 يظهر بلون أخضر، ويمكن تحديد هذه البقع بقلم الرصاص.

3- باستخدام جهاز مقياس الكثافة (Densitometer) ويعمل كمطياف ضوئي ويحول البقعة إلى شكل منحنى (Peak).

التشخيص النوعي للبقع المفصولة في كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة.

تشخص بقع لمركبات المفصولة على صفيحة الـ TLC (وكذلك على الورقة)، وتسمى في هذه الحالة بالكروماتوكرام، على أساس حركتها في المذيب ويعبر عن هذه الحركة بقيمة الـR_f للتشخيص النوعي للمركبات المفصولة (بعد إظهار البقع) ومقارنتها مع قيم R_f بقع مركبات قياسية نقية (Standard) توضع على الصفيحة نفسها.

التقدير الكمي للمركبات المفصولة

يتم التقدير الكمي للمركبات المفصولة بطرائق عدة تعتمد على نوع المركبات:

1- التقدير البصري: يوضع النموذج على الصفيحة بتركيز معين ثم يوضع على نفس الصفيحة تراكيز عدة معروفة من مادة قياسية وبعد التطوير وإظهار البقع تقارن مساحة بقع مكونات النموذج مع مساحة بقع المركبات القياسية. وفي حالة كون المركبات المفصولة قابلة للتوهج يتم مقارنة مساحة البقع وشدة التوهج لمكونات النموذج والمركبات القياسية.

2- الطرق الفوتومترية (Photometric methods): تعد هذه الطريقة دقيقة في التقدير فهي تقيس مقدار امتصاص الضوء من مساحة معينة من البقعة أو من مركزها وأن

مقدار هذا الامتصاص يتأثر بكثافة البقعة. كما يستعمل مقياس الكثافة (Densitometer) الذي يقيس كثافة البقع المجهولة والمعلومة التركيز مباشرة من على الصفيحة (أو الورقة) وذلك بقياس مقدار الضوء النافذ والنتائج تسجل بشكل قمم (Peaks) على ورقة التسجيل ومنها يمكن حساب المساحة تحت كل قمة ويتم معرفة التركيز النهائي للمادة المجهولة من تركيزات المواد المعلومة.

ومن الممكن تقدير تركيز المركب وذلك بعد استخلاصه أو استرجاعه من على الصفيحة (أو الورقة) وتتم عملية الاسترجاع بقشط المركب مع المادة المدمصة ثم إذابة المركب بمذيب مناسب ثم الترشيح ثم تقدير تركيز المركب باستعمال المطياف بتطبيق معادلة إيجاد التركيز المركبات أو باستعمال المنحنى القياسي.

وهناك نوعان من التحليلات أو الدراسات للمركبات باستعمال تقانة كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة وهي: الدراسات التحليلية: ويتم فيها التعرف على المركبات المفصولة بالكروماتوكرافي وتقدير كميتها فقط وتستعمل فيها صفائح مغطاة بالمادة المدمصة بسمك قليل وهو 250 ميكرون. وثانياً الدراسات التحضيرية وفيها يتم فصل المركبات بكميات كبيرة لاستعمالها في دراسات لاحقة ويتم فيها استخدام صفائح مغطاة بالمادة المدمصة بسمك 500 ميكرون أي بسمك أعلى من الصفائح في حالة الدراسات التحليلية وذلك لاستيعاب كمية أعلى من النموذج كما يوضع النموذج بشكل شريط. وبعد انتهاء عملية التطوير يتم قشط المادة المدمصة ويذاب المركب أو المركبات المفصولة بمذيب مناسب وتستعمل في الدراسة لاحقة.

كروماتوكرافي الورق (Paper chromatography)

يعد كروماتوكرافي الورقة طريقة سهلة وأدواتها وأجهزتها رخيصة الثمن وتستعمل نموذجاً صغيراً يقدر بالميكروغرام وتكون ذات كفاءة مناسبة في فصل المكونات. الورقة تكون عبارة عن السيليلوز عالي النقاوة ويقوم بتدعيم الطور الثابت الذي هو عبارة عن 2-5% أو أكثر من الرطوبة فيكون نوع الكروماتوكرافي هو كروماتوكرافي التوزيع (Partition chromatography) إذْ إن ميكانيكية فصل المركبات في الورقة تكون أساساً إلى عملية

توزيع المركبات ما بين الطور المتحرك والطور الثابت (الماء) الموجود في المادة السيليلوزية المكونة للورقة. وتستغرق عملية الكروماتوكرافي مدة زمنية بسيطة بعكس كروماتوكرافي العمود الذي يستغرق ساعات طويلة. وتتلخص طريقة العمل لكروماتوكرافي الورقة بوضع نقطة أو عدة نقاط على الورقة وبعد أن تجف البقعة توضع الورقة في وعاء التطوير المحتوي على سائل الطور المتحرك والمشبع ببخار المذيب، ويرتفع الطور المتحرك في الورقة بفعل الخاصية الشعرية ويقوم بإذابة المكونات وتوزيعها على حسب معامل التوزيع (Partition coefficient) وبالتالي فصلها، وبعد فترة زمنية مناسبة ترفع الورقة من الحوض ويؤشر منطقة وصول المذيب بخط بالقلم الرصاص ثم تجفف الورقة ويجرى تشخيص المكونات والتقدير الكمي كما ذكر في موضوع الطبقة الرقيقة.

أنواع الطرق الكروماتوكرافية الورقية: هناك أنواعاً من طرق كروماتوكرافي الورقة تستخدم في مختبرات التحليل ومنها:

1- الكروماتوكرافي الصاعد (Ascending chromatography)

يوضع النموذج في أسفل الورقة على بعد تقريباً 3سم وتوضع الورقة في وعاء التطوير ويصعد الطور المتحرك للأعلى لحين وصوله إلى ارتفاع مناسب ثم ترفع الورقة وتجفف ثم تشخص المكونات وتقدر كمياتها.

2- الكروماتوكرافي النازل (Descending chromatography)

يوضع النموذج على مسافة 5- 7,5 سم من حافة الورقة العليا ثم يغمر هذا الجزء من الورقة في حوض المذيب المثبت في أعلى وعاء التطوير ويقوم المذيب بإذابة المكونات وفصلها إعتماداً على الخاصية الشعرية والجذب الأرضي، ويسمح هذا النوع باستخدام ورقة طويلة.

3- الكروماتوكرافي الأفقي (Horizontal chromatography)

يوضع النموذج في منتصف ورقة دائرية ثم ينقط المذيب فتنفصل المكونات بعيدة عن المركز بشكل حلقات دائرية.

4- الكروماتوكرافي ذو الاتجاهين (Two-dimensional chromatography)

يستعمل الكروماتوكرافي ذو الاتجاهين في الورقة والطبقة الرقيقة. ويستعمل مذيبان في اتجاهين متعامدين. فبعد وضع النموذج في أحد زوايا الورقة، توضع الورقة في وعاء التطوير الذي يحتوي على المذيب الأول وبعد صعود المذيب للارتفاع المطلوب ترفع الورقة وتجفف ثم توضع بعد تدويرها 90 درجة (أي باتجاه متعامد مع الاتجاه الأول) في وعاء التطوير الذي يحتوي على المذيب الثاني، ثم يصعد المذيب الثاني بعدها تؤخذ الورقة وتجفف. وتستعمل هذه الطريقة لفصل النماذج التي تتكون من مكونات كثيرة لا يمكن فصلها باتجاه واحد.

كروماتوكرافي العمود (Column chromatography)

أعمدة الفصل (Column)

تصنع أعمدة الفصل الكروماتوكرافي عادة من الزجاج وتكون وضيفتها احتواء المادة المدمصة. يتراوح طول عمود الفصل عادة بين 10 - 100 ضعف القطر الداخلي للعمود نفسه. قد يكون الطور الثابت عبارة عن مادة مدمصة مطحونة بشكل دقيق كما هو الحال في كروماتوكرافي الإدمصاص (Adsorption chromatography)، أو قد يكون الطور الثابت عبارة عن طبقة رقيقة من السائل محمول على دقائق مادة خاملة (Inert material) وفي هذه الحالة يكون عبارة عن كروماتوكرافي التوزيع (Partition chromatography). ولإتمام عملية الفصل يوصل عمود الفصل بوساطة أنبوب مطاطي بخزان ذي سعة مناسبة يحتوي على المذيب. وبالإمكان التحكم بمدى ارتفاع الخزان عن عمود الفصل وبهذه الطريقة نتحكم بكمية المذيب الذي يخرج من النهاية السفلية لعمود الفصل في وحدة الوقت.

تعبئة عمود الفصل

إن نجاح عملية الفصل في كروماتوكرافي العمود يعتمد أساساً على دقة تعبئة العمود إذْ أن وجود فقاعات الهواء سوف تؤثر في كفاءة عملية الفصل وتجعل مناطق الفصل غير واضحة وغير محددة. كما يجب أن لا ينزل مستوى المذيب في عمود الفصل تحت السطح العلوي للمادة المدمصة لأن ذلك سوف يؤدي إلى جفاف السطح ودخول الفقاعات إلى المادة المدمصة. وهناك طريقتان لتعبئة العمود:

1- التعبئة الجافة: وتستعمل هذه الطريقة عادة للمواد المدمصة الجافة مثل السيليكا والألمومينا وفي هذه الطريقة تضاف المادة المدمصة الجافة على شكل دفعات ثم الضغط قليلاً لحين تعبئة العمود بالارتفاع المطلوب وبعد ذلك يسكب مذيب الطور المتحرك في العمود.

2- التعبئة الرطبة: وهي الأكثر استعمالاً إذْ يعمل خليط ذو قوام مناسب من المادة المدمصة والمذيب يطلق علية بالملاط (Slurry) ثم يصب هذا الخليط في عمود الفصل ويسمح للمادة المدمصة أن تترسب تدريجياً ثم يتم السماح بخروج الكميات الزائدة من المذيب من الفتحة السفلية للعمود ثم يضاف كميات أخرى من الملاط وهكذا لحين التعبئة للارتفاع المطلوب.

ولبدء عملية الكروماتوكرافي يوضع النموذج الذي يكون ذائباً بكمية قليلة من المذيب على السطح العلوي للمادة المدمصة ثم يسمح للنموذج بالنزول في العمود مع المذيب الذي يكون موجوداً في وعاء بمستوى أعلى من عمود الفصل وتبدأ عملية نزول المذيب وتسمى هذه العملية بالغسل (Elution) ويتم جمع أجزاء (Fractions) مناسبة من المذيب الذي يحتوي على مكونات النموذج المفصول في أنابيب اختبار متعددة بحيث تحتوي على جميع المكونات المفصولة للنموذج ثم تفحص بالطرق المناسبة وعادة ما تكون باستخدام الطرق السبكتروفوتومترية. ويتم عادة ربط عمود الفصل بجهاز يسمى جامع الأجزاء (Fraction collector) الذي يحتوي على جهاز سبكتروفوتوميتر صغير وأيضاً يحتوي على العديد من حوامل الأنابيب التي تضم الأنابيب التي سوف تستقبل المذيب ويتم عادة جمع كميات محددة من المذيب. كما يربط جهاز السبكتروفوتوميتر بمسجل(Recorder) ليحول قراءات الجهاز إلى منحنيات يمثل كل منحنى تركيز مكون معين من مكونات النموذج.

كلية الزراعة والغابات

قسم علوم الأغذية / المرحلة الرابعة

تحليل أغذية -- محاضرة 6 **2021 / 1 / 18**

كروماتوكرافي تبادل الأيونات (Ion Exchange Chromatography)

يعرف كروماتوكرافي تبادل الأيونات بصورة عامة بأنه كروماتوكرافي يتم فيه تبادل الأيونات بين مادة صلبة تحتوي على الأيونات وبين الوسط المحيط بهذه المادة الصلبة ولا يحدث أي تغير طبيعي يذكر خلال عملية التبادل هذه. لقد استعملت طريقة تبادل الأيونات قديماً لتحويل الماء العسر إلى ماء يسر بمعاملته بنوع من الرمل يدعى بالرمل الأخضر. وتستعمل مبادلات الشحنات الموجبة للتخلص من عسرة الماء وذلك بمبادلة أو أخذ أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم من الماء وإبدالهما بأيونات الصوديوم. في الوقت الحاضر تصنع مادة المبادلة الأيونية والتي تسمى بالراتنج (Resin) من مادة الستيرين المتعدد (Polystyrene) التي يضاف إليها 1 – 12% من مادة أخرى تسمى بالبنزين ثنائي الفينيل (Divinyl benzene, BVD) تقوم بعمل تقاطعات ليصبح الستيرين المتعدد بشكل شبكة ويحدد نسبة المادة المضافة عوامل عدة منها درجة الترابط التقاطع (Cross linking) المطلوبة ودرجة مسامية المادة الناتجة، وفي معظم المبادلات يضاف الـ BVD بسبة 8-10%.

تصنف المبادلات الأيونية إلى صنفين رئيسيين الصنف الأول هي المبادلات الأيونية الموجبة وهناك المبادلات الأيونية الموجبة القوية والمبادلات الأيونية الموجبة الضعيفة والصنف الثاني هي المبادلات الأيونية السالبة وهناك أيضاً المبادلات الأيونية السالبة القوية والضعيفة. وتظهر المبادلات الأيونية شيء من التفضيل لنوع معين، وغالباً ما يطلق على هذا التفضيل بمعامل الإختيار (Selectivity coefficient) الذي يعتمد على عوامل عدة أهمها القوة الأيونية لمحلول الغسل (Eluent) فكلما كانت تراكيز الأيونات في محلول الغسل عالية كلما كانت عملية إنزال النموذج من عمود الفصل أسرع وتكون قمم الفصل أكثر تحديداً لكنه لا يحصل فصل (Resolution) مثالي والعكس صحيح. كما أن للأس الهيدروجيني (pH) لمحلول الغسل تأثيراً كبيراً على عملية الفصل بهذا النوع من الكروماتوكرافي.إن مدى تحلل الحوامض

والقواعد الضعيفة وكذلك مدى تحلل الأملاح والأيونات المعدنية يعتمد أساساً على pH الوسط الذي توجد فيه ويترتب على ذلك أن الشحنة الكهربائية قد تزداد أو تقل أو حتى تعكس (أي أن المادة التي تحمل موجبة تتغير إلى شحنة سالبة) بتغير الـ pH. لذلك فإن كروماتوكرافي تبادل الأيونات يعد طريقة حساسة جداً ومؤثرة في فصل المركبات العضوية مثل الأحماض الأمينية التي قد تكون حاملة لشحنات موجبة أو سالبة أو قد لا تحمل أي شحنة (أي أن عدد الشحنات الموجبة يساوي عدد الشحنات السالبة) معتمداً على pH الوسط أو المحلول الغاسل.

مبادلات الشحنات الموجبة (Cation exchangers)

تضفي المبادلات الأيونية الموجبة القوية على المجاميع الفعالة السلفونيل $H\text{-}SO_3H$ و - CH_2SO_3H صفات حامضية قوية على المبادلات الأيونية وتتأين هذه المجاميع الفعالة في محاليل قاعدية قوية. أما مبادلات الشحنات الموجبة الضعيفة فتحتوي على مجاميع الكربوكسيل (-COOH) كمجاميع فعالة وتشابه هذه المجاميع في خواصها الأحماض الضعيفة.

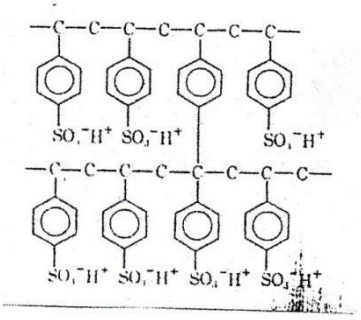
مبادلات الشحنات السالبة (Anion exchangers)

تحتوي مبادلات الشحنات السالبة القوية على مجموعة الأمونيوم الرابعة $(-N^+(CH3)_3OH)$، في حين تحتوي مبادلات الشحنات السالبة الضعيفة على المجاميع الأمينية $(-NH_2)$ الطرفية.

فصل الأحماض الأمينية باستعمال جهاز تحليل الأحماض الأمينية

(Amino Acid Analyzer)

يستعمل كروماتوكرافي التبادل الأيوني بشكل واسع لتحليل مزائج الأحماض الأمينية. والمبادل الأيوني الأكثر شيوعاً لهذا الغرض هو راتنج (Resin) المبادل الأيوني الموجب المسمى بالـ Dowex-50 وهو من نوع الستايرين المتعدد (Polystyrene)، المبين تركيبه الكيميائي في أدناه.

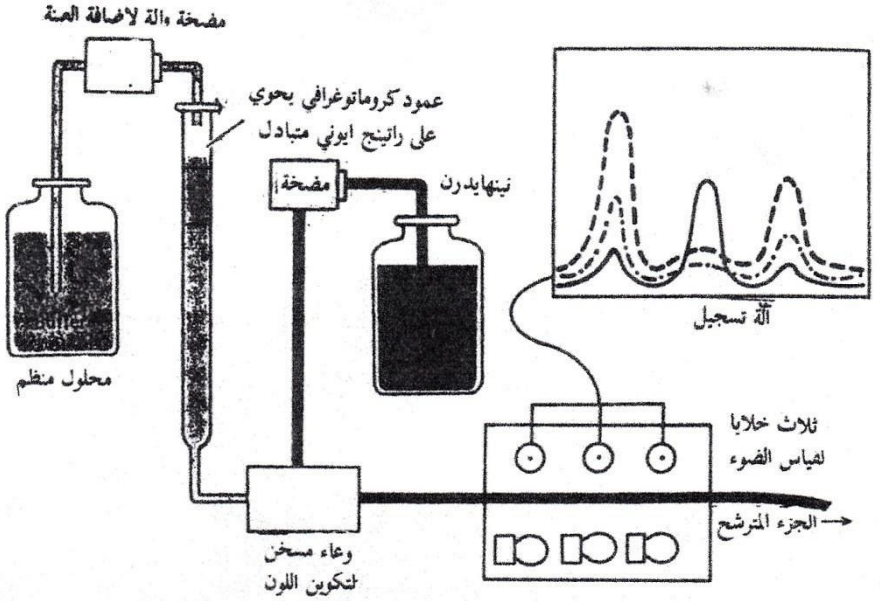


الستايرين المتعدد (Polystyrene) الذي يحمل المجاميع الفعالة السلفونيل $H\text{-}SO_3H$

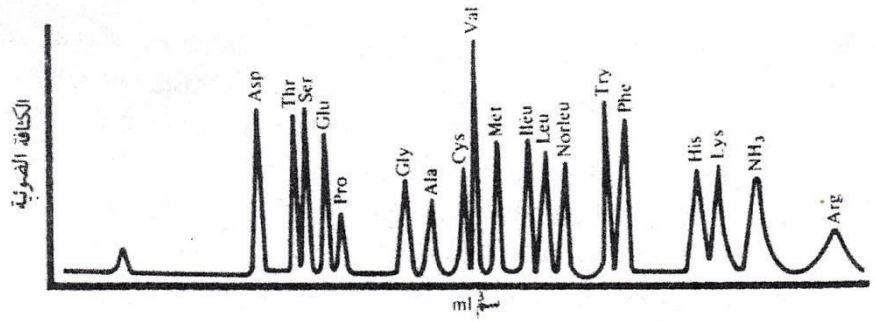
آلية تحليل الأحماض الأمينية في جهاز تحليل الأحماض الأمينية:

يتم أولاً تحليل البروتين المراد تحليل الأحماض الأمينية له بوزن كمية من البروتين (قرابة 100 ملغم) في أمبولة زجاجية ويضاف لها 4 مل من محلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز 6 مولار (M HCl 6) وضخ غاز النتروجين فيها لطرد الأوكسجين ثم قفل الأمبولة على اللهب ووضعها في فرن على درجة حرارة 120 ْم ولمدة 12 ساعة. بعد ذلك يفرغ محتوى الأمبولة وترشح ثم يبخر الحامض تحت التفريغ (Evaporator) ثم تذاب المحتويات بمحلول منظم من سترات الصوديوم (Sodium citrate buffer) ذو أس هيدروجيني 2,2، وذلك لجعل جميع الأحماض الأمينية تحمل شحنة موجبة. وقبل حقن عينة النموذج في جهاز تحليل الأحماض الأمينية (Amino acid analyzer) المبين مخططه في أدناه، يتم حقن محلول قياسي يتكون من مزيج الأحماض الأمينية وبكميات معلومة لتظهر نتائج الفصل بشكل منحنيات ثم بعد ذلك يتم حقن عينة النموذج في الجهاز. يتم حقن كمية معلومة من النموذج في أعلى عمود الفصل عن طريق وحدة حقن العينات في الجهاز. ويتم فصل الأحماض الأمينية بالغسل بثلاثة محاليل منظمة من سترات الصوديوم بأسس هيدروجينية متصاعدة بوساطة مضخة. فالمحلول الأول يكون ذو أس هيدروجيني 3,25 وبتركيز 0,1 مولار وهذا المحلول يعمل على غسل الأحماض الأمينية الحامضية وبعض الأحماض القطبية، أما المحلول الثاني فيكون بأس هيدروجيني 4,25 وبالتركيز نفسه ويعمل على غسل الأحماض الأمينية المتعادلة، في حين يكون المحلول الثالث ذو أس هيدروجيني 5,35 وبتركيز عالي وهو 0,4 مولار ويعمل على

غسل الأحماض الأمينية القاعدية. وبعد ذلك يغسل عمود الفصل بكمية من محلول هيدروكسيد الصوديوم لإعادة شحن المبادل الأيوني. بعد خروج الأحماض الأمينية المفصولة من العمود يتم تفاعلها مع محلول من النينهايدرين في حجرة صغيرة ثم ينقل الخليط إلى حمام مائي يغلي ليتم التفاعل وبعد ذلك ينقل المزيج المتفاعل إلى جهاز مطياف (Spectrophotometer) ليتم قراءة الإمتصاص على طول موجي 590 نانومتر لكل الأحماض الأمينية ماعدا البرولين الذي يقاس على طول موجي 440 نانومتر، ويتم نقل قراءات الامتصاصات إلى جهاز مسجل (Recorder) لتظهر النتائج بشكل منحنيات أو قمم، وكما مبين شكل الكروماتوكرام أدناه. يتم الكشف النوعي للأحماض الأمينية بمقارنة زمن خروج كل حامض أميني من الأحماض المكونة للنموذج من العمود وهو ما يطلق عليه بزمن الإحتجاز (Retention time) مع زمن الإحتجاز للأحماض الأمينية للمحلول القياسي. أما التقدير الكمي للأحماض الأمينية المفصولة فيتم بقياس مساحات المنحنيات أو قياس محيطها أو وزن كل منحنى وتقارن مع منحنيات الأحماض الأمينية للمحلول القياسي، أو تستخدم الطريقة الأكثر شيوعاً وهي حساب النسبة المئوية لكل حامض أميني موجود في النموذج بحساب مساحة كل حامض ويقسم على مجموع المساحات الكلية للأحماض المفصولة ويضرب الناتج في مائة.



مكونات الجهاز الآلي المحلل لمزيج الاحماض الامينية



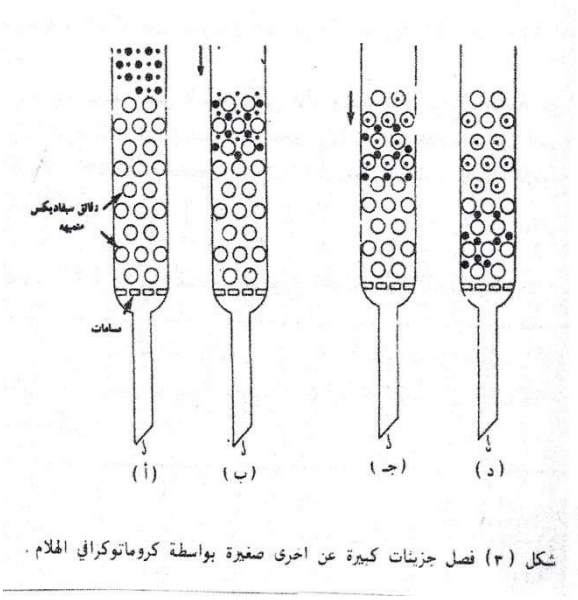
رسم بياني للتحليل الكروماتوغرافي لمزيج من الاحماض الامينية

كروماتوكرافي الهلام (Gel Chromatography)

بالإمكان فصل الجزيئات المختلفة بعضها عن بعض على أساس الفروقات الموجودة بينها بالحجم (وكذلك الشكل) عند إمرارها خلال عمود فصل يحتوي على جسيمات تسمى بالهلام (الجيل) وذلك بالاستفادة من عملية الغربلة (Sieving process) أو عملية الترشيح (Filtering process). وللهلام تركيب مفتوح ذو أبعاد ثلاثة مجسمة تتكون بواسطة الأواصر المتقاطعة (Cross linking) بين السلاسل. للعديد من أنواع الهلام مجاميع قطبية قادرة على امتصاص الماء أو أي مذيب قطبي آخر كما أن هناك بعض أنواع قليلة من الهلام يمكنها امتصاص المذيبات اللاقطبية، وعندما تمتص الماء فإن ذلك يؤدي إلى انتفاخ حبيبات الهلام مما ينتج فراغات بينية في الهلام، وتعتمد سعة هذه الفراغات البينية بالأساس على درجة كثافة الأواصر المتقاطعة. يوضح الشكل المراحل المختلفة بوساطة كروماتوكرافي الهلام، حيث

يلاحظ النموذج المحتوي على خليط من جزيئات كبيرة (▪) وأخرى صغيرة (.) على السطح

العلوي لعمود الفصل المحتوي على الهلام وخلال مرور هذه الجزيئات في عمود الفصل تعوق الجزيئات الصغيرة داخل الفراغات البينية الموجودة في الهلام وتقطع مسافات أطول مقارنة بالجزيئات الكبيرة التي لا تتمكن من دخول الفراغات البينية وبالتالي يكون مسار الجزيئات الكبيرة ملامساً للأسطح الخارجية بجسيمات الهلام، ويتم الفصل الكامل للجزيئات الصغيرة عن الكبيرة عندما تغادر الجزيئات الكبيرة أولاً عمود الفصل وتليها الجزيئات الصغيرة.



شكل (٣) فصل جزيئات كبيرة عن اخرى صغيرة بواسطة كروماتوكرافي الهلام.

من أنواع الهلام الأكثر شيوعاً المستخدمة في الغربلة الجزيئية هو هلام السيفادكس (Sephadex) الذي يحضر من السكريات المتعددة المسماة بالديكستران (Dextrans) كما يحضر أيضاً بفعل بعض أنواع البكتريا على السكروز. والسيفادكس من المواد المحبة للماء (Hydrophilic) وله خواص قطبية تعزى إلى وجود ثلاث مجاميع هيدروكسيلية في كل جزيئة كلوكوز، وبتهيئة الظروف الملائمة في أثناء تحضير السيفادكس يكون بالامكان التحكم في درجة الأواصر المتقاطعة والتحكم في حجم المسامات الموجودة في الهلام. وتصنف الأنواع المختلفة من السيفادكس حسب كمية الماء التي يمتصها وزن معين ويطلق على هذه الظاهرة باسترداد الماء (Water gain). الجدول يوضح بعض الصفات العامة للأنواع المختلفة من السيفادكس. وهناك تعبير آخر وهو ما يسمى بحدود الإقصاء (Exclusion limit) وله علاقة بالوزن الجزيئي للمواد والجزيئات المراد فصلها. فمثلاً حدود الإقصاء للسيفادكس 10 تكون 700 أي أن المادة التي لها وزن جزيئي أعلى من 700 لا تدخل في الفراغات البينية الموجودة في دقائق هذا النوع من السيفادكس وتنزل خلال العمود ملامسة للأسطح الخارجية لهذه الدقائق، أما المادة التي لها وزن جزيئي أقل من 700 فإن مسارها يطول داخل عمود الفصل لمرورها في الفراغات البينية.

جدول: بعض صفات الأنواع المختلفة من السيفادكس.

هلام السيفادكس	استرداد الماء	مدى التجزئة للوزن الجزيئي للبروتينات

	غم / غم سيفادكس جاف	
هلام 10	1	إلى 700
هلام 25	2.5	5000 - 1000
هلام 50	5	30000 – 1500
هلام 75	7.5	70000 _ 3000
هلام 100	10	150000 – 4000
هلام 200	20	200000 - 5000

أساس كروماتوكرافي الهلام

هناك بعض المصطلحات التي يجب التعرف عليها ومنها:

الحجم الكلي (Total volume) للهلام داخل عمود الفصل ويرمز له بـ Vt وهو حجم قالب الهلام (Gel matrix) ويرمز له Vg زائداً حجم الماء الموجود داخل دقائق الهلام ويرمز له بـ Vi ، زائداً حجم الماء الموجود خارج دقائق الهلام ويدعى بالحجم الميت (Void volume) ويرمز له بـ Vo وهو عبارة عن حجم المحلول الغاسل (Eluent) اللازم لإنزال مادة معينة من عمود الفصل يكون لها وزن جزيئي أعلى من درجة الإقصاء للهلام، أي أن:

$$Vt = Vo + Vi + Vg$$

ويمكن حساب الـ Vi والذي هو عبارة عن حجم الماء الموجود داخل جسيمات الهلام من المعادلة الآتية: $Vi = aWr$ وتمثل a الوزن الجاف للهلام والـ Wr هي درجة استرداد الماء (Water regain) لذلك النوع من الهلام.

أما حجم المحلول الغسل (Elution volume) ويرمز له بـ Ve لمادة ما فإنه ذلك الحجم من المحلول الغاسل (Eluent) اللازم لإنزال مادة معينة مادة معينة من عمود الفصل ويكون وزنها الجزيئي ضمن درجة الإقصاء لذلك الهلام، أي أن:

$$Ve = Vo + Kd\ Vi$$

وتمثل الـ Kd معامل التوزيع (Distribution coefficient) وهو نسبة تركيز المذاب (المادة المراد فصلها) في داخل وخارج الهلام.

$$Kd = (Ve - Vo) / Vi = (Ve - Vo) / aWr$$

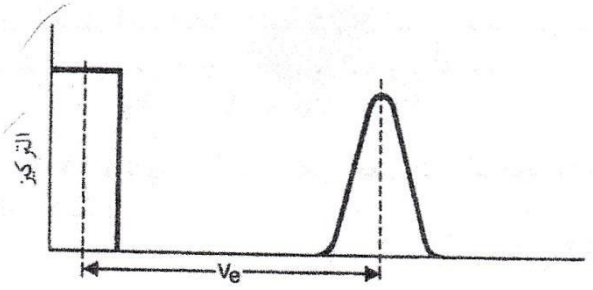
ومن البديهي فإن الحجم الميت للجزيئات الكبيرة لمادة ما، التي لا تدخل في فراغات حبيبات الهلام، يكون مساوياً لحجم محلول الغسل، أي أن: $Ve = Vo$

ويكون معامل التوزيع في هذه الحالة يساوي صفر ($Kd = 0$)، وبالمقابل إذا دخلت جزيئات مادة ما في الفراغات البينية للهلام فمعامل التوزيع يساوي واحد ($Kd = 1$) ويكون:

$$Ve = Vo + Vi$$

من هذا نستنتج أن معامل التوزيع يتراوح بين صفر وواحد في كروماتوكرافي الهلام.

ويقدر حجم محلول الغسل (Ve) لمادة ما في المختبر بحساب عدد المليلترات النازلة من عمود الفصل إبتداءً من أول قطرة إلى منتصف قمة (Peak) المادة المفصولة كما مبين في أدناه.



حجم المحلول الغاسل (eluant)

تحضير عمود الفصل

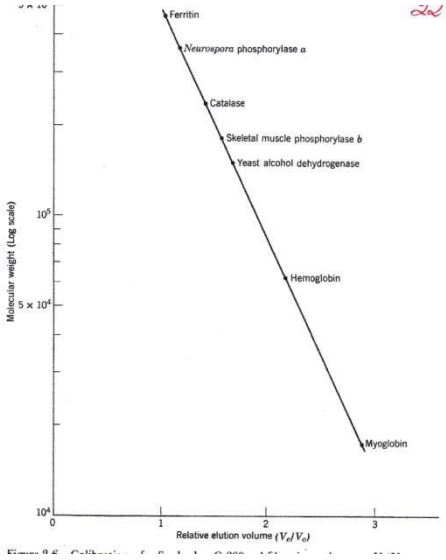
يجب وضع الهلام الجاف في الماء المقطر ليمتص الماء وتنتفخ دقائقه وتعتمد مدة وضع الهلام في الماء المقطر على نوعه، ثم يتم تحضير عمود الفصل بنفس الطريقة المذكورة في كروماتوكرافي الإدمصاص وتبادل الأيونات. الجدول يبين المدة الأصغرية اللازمة لانتفاخ الأنواع المختلفة من الهلام.

المدة الأصغرية للانتفاخ

نوع السيفادكس	على درجة حرارة الغرفة	في حمام مائي مغلي
G– 10، 20، 25، 50	3 ساعات	1 ساعة
G- 75	24 ساعة	3 ساعات
G- 100، 150، 200	3 أيام	5 ساعات

استعمالات السيفادكس

يستعمل السيفادكس في فصل البروتينات ذات الأوزان الجزيئية المختلفة عن بعضها البعض، كما تم شرحه سابقاً. كذلك يستعمل السيفادكس في إيجاد الوزن الجزيئي للمركبات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة كالبروتينات والأحماض النووية والسكريات المعقدة. ويتم ذلك من خلال تمرير مزيج من بروتينات معلومة الأوزان الجزيئية من خلال العمود الذي يحتوي على هلام السيفادكس ويتم رسم منحنى بوضع الوزن الجزيئي (يشكل لوغارتم) على المحور العمودي والمحور الآخر (الأفقي) حجم محلول الاحتجاز، ثم يمرر البروتين المراد إيجاد الوزن الجزيئي له ويثبت على المحور الأفقي ويستخرج الوزن الجزيئي من المحمر العمودي، كما في الشكل



وتستعمل بعض أنواع السيفادكس لإزالة الأملاح (Desalting) من المحاليل مثل السيفادكس نوع G-25، وفي عملية إزالة الأملاح تدخل جزيئات الأملاح الصغيرة في الفراغات البينية لدقائق السيفادكس ويتأخر خروجها من عمود الفصل، أما الجزيئات الأخرى ذات الوزن الجزيئي الأعلى من 5000 فإنها تنزل مع الحجم الميت (Vo) لعمود الفصل ولا تدخل ضمن الفراغات البينية للسيفادكس وتغادر عمود الفصل قبل الأملاح وبهذا يمكن فصل الأملاح عن الجزيئات الأخرى. كذلك يستعمل السيفادكس في فصل البروتينات ذات الأوزان الجزيئية المختلفة عن بعضها البعض. إضافة إلى ذلك يستعمل السيفادكس لتركيز بعض المحاليل البيولوجية المخففة التي تحتوي على جزيئات يكون وزنها الجزيئي أعلى من درجة الإقصاء (Exclusion limit) لذلك النوع من السيفادكس، فمثلاً بالإمكان استعمال السيفادكس G-200 لهذا الغرض إذْ يمتص غرام واحد منه عشرون غراماً من الماء.