البروتينات Proteins

البروتينات:هي مواد عضوية معقدة التركيب تتكون من تعدد الاحماض الامينية المرتبطة باواصر خاصة هي الاواصر الببتيدية peptide bonds .يعتبر الكاربون والهيدروجين والاوكسجين والنتروجين العناصر الرئيسية للبروتينات,واحياناً تحوي بعض البروتينات عناصر اخرى مثل الفسفور والكبريت والحديد والنحاس.

ملاحظات:

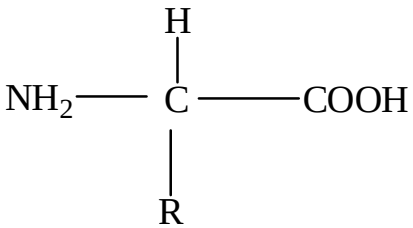
1-تعتبر البروتينات المكون الرئيسي للانسجة الحيوانية والنباتية سواء من ناحية التركيب structureاو الوظيفةfunction .

2-تكثر البروتينات في المنتجات الحيوانية والنباتية كالبيض واللحوم البذور كماتوجد بعض البروتينات الخاصة كما في الصوف والشعر وجلود الحيوانات.

3-تختلف البروتينات عن بعضها البعض في عدد ونوعية وتعاقب الاحماض الامينية المكونة لها .

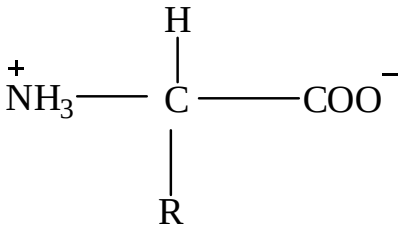
الاحماض الامينية : Amino Acids

هي احماض كاربوكسيلة حاوية على مجموعة امينية متصلة بذرة الكاربون الفا(ذرة الكاربون المتصلة بمجموعة الكاربوكسيل).وتختلف الاحماض الامينية فيما بينها باختلاف السلسلة الجانبيةR.



من ميزات الاحماض الامينية:

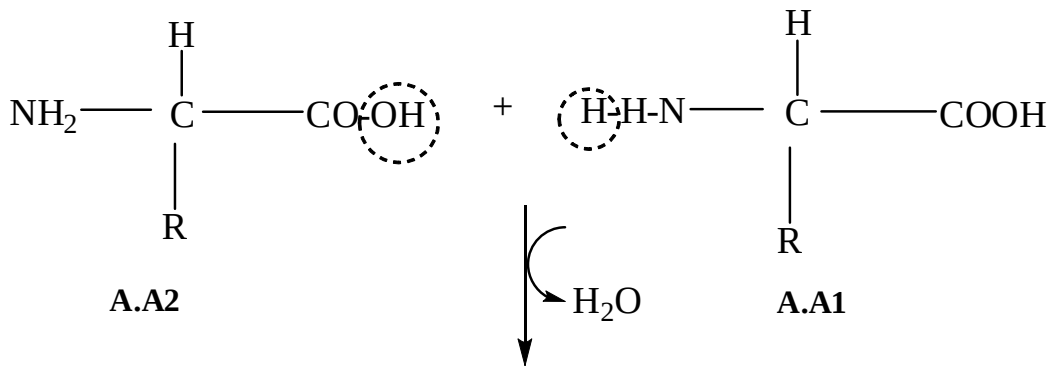
1-تكون في المحلول المتعادل ثنائية القطب Zwitter ion حيث تفقد مجموعة الكاربوكسيل بروتون لصالح مجموعة الامين كمايلي :

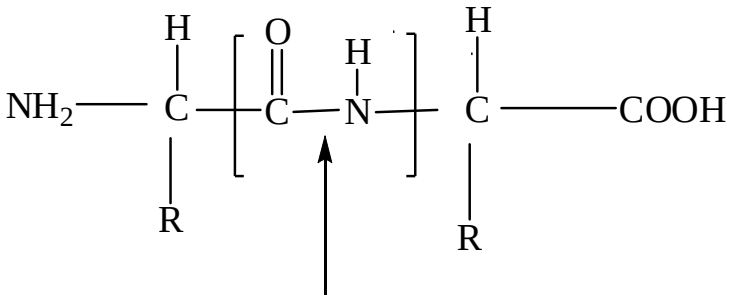


2-تذوب بالماء ولاتذوب بالايثر وقليلة الذوبان بالكحول وهي مركبات صلبة ذات درجات انصهار عالية.

البناء التركيبي للبروتينات: Structure of Proteins

كماهو معروف فان البروتينات تتكون من عدة آلاف الى عدة ملايين من الاحماض الامينية المرتبطة معاً بواسطة الاواصر الببتدية كمافي المعادلة ادناه.والاصرة الببتيدية هي اصرة تساهمية اميدية amid bond ناتجة من تفاعل مجموعة الامين للحامض الاميني الاول(A.A1) مع مجموعة الكاربوكسيل للحامض الاميني الثاني(A.A2) مع فقدان جزيئة ماء وهي مستقرة عند تغير الP^H وبالامكان كسرها بالتحلل الحامضي او القاعدي او بفعل انزيمات معينة (كما في حالة الهضم).



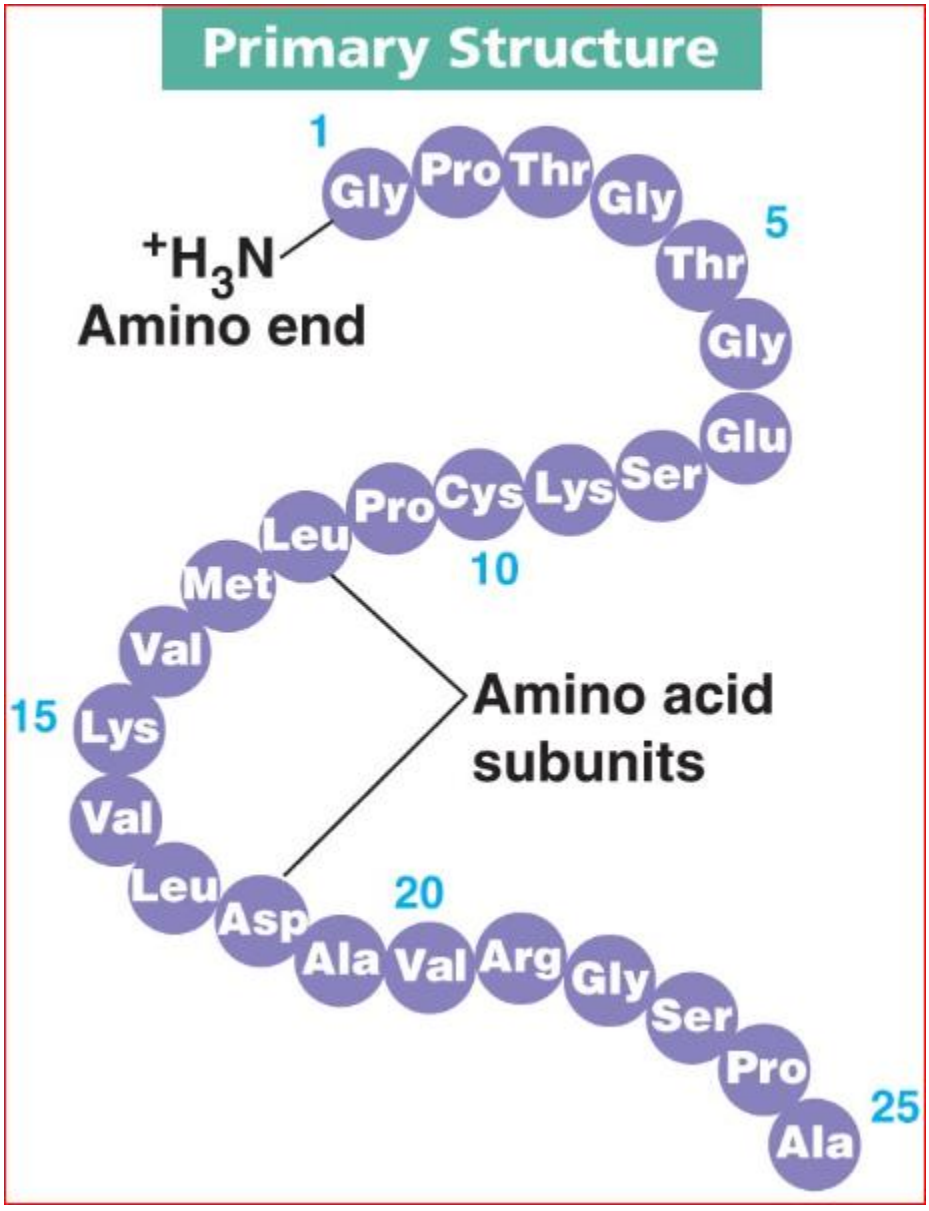


Peptide bond

وللبناء التركيبي للبروتينات اربع مستويات هي :

(1) البناء الاولي Primary Structure

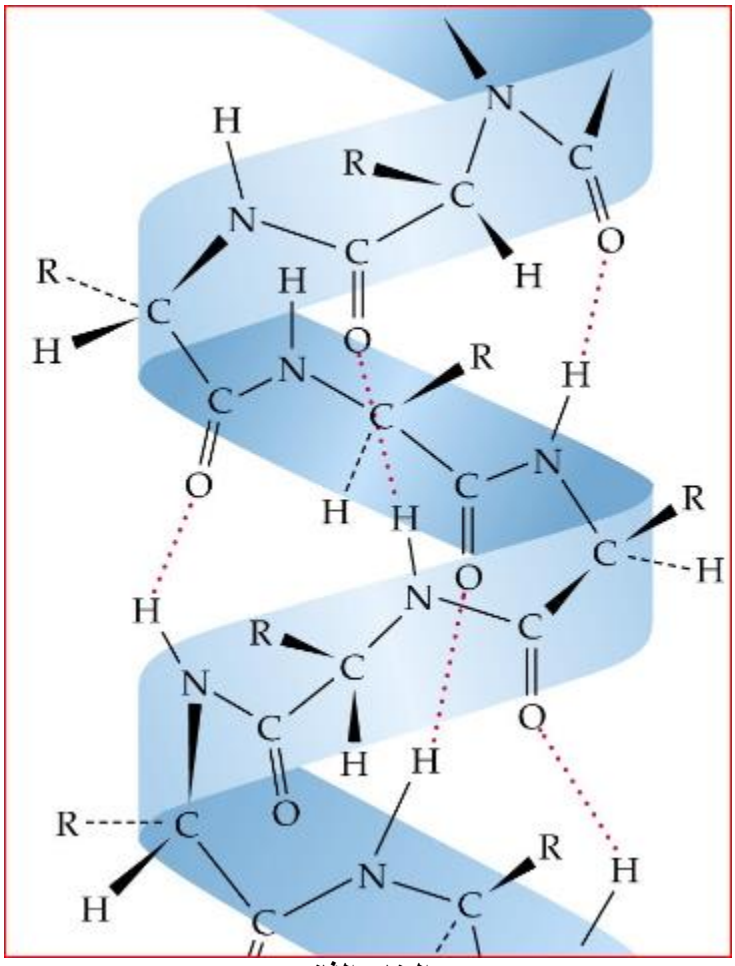
وهو عبارة عن تتابع الاحماض الامينية في السلسلة الببتيديةالتي تُكون هيكل جزيء البروتين وقدتكون السلسلة الجانبية متفرعة،حلقية،او مفتوحة.لهذا تُعد الاواصر الببتيدية هي المسؤولة عن البناء الاولي.اذن التركيب الاولي يشمل الاصرة الببتيدية فقط.



البناء الاولي

(2)البناء الثانوى : Secondary structure

هو الشكل الحلزوني للسلاسل الببتيدية.تكون الروابط الهدروجينة هي المسؤولة عن تركيب الحلزونα-helix حيث تلتف سلسلة الاحماض الامينية بشكل اشبه باللولب (برغي) ذي الاتجاه اليميني.ان سبب هذا الالتفاف هو الاصرة الهيدروجينية المتكونه بين ذرة الهيدروجين في مجموعة الامين مع ذرة الاوكسجين في مجموعة الكاربوكسيل التي تقع في اللفة اعلى تلك الاصرة.

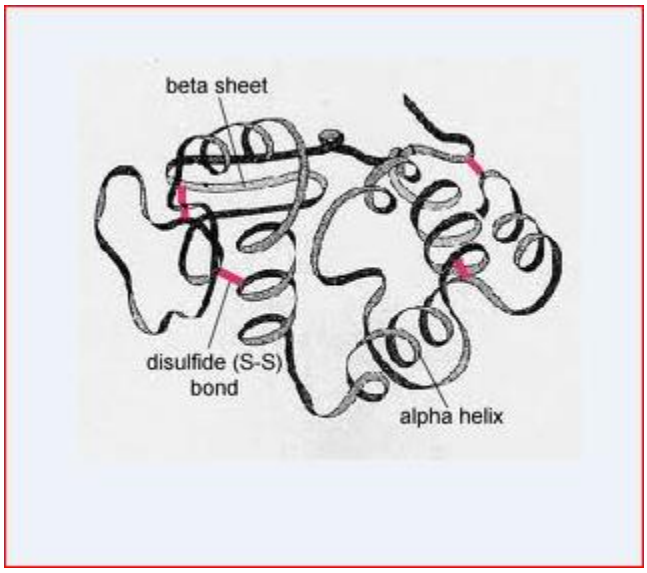


البناء الثانوي

ان للاصرة الهيدروجينية اهمية كبيرة في تثبيت التركيب الثانوي للبروتين على الرغم من ضعفها فان الاعداد الكبيرة منها تؤديى اعطاء متانة للتركيب الثانوي .

(3)البناء الثالثي : Tertiary structure

في هذا التركيب هناك اواصر اخرى اضافة الى الببتدية والهيدروجينية مثل اواصر فان درفالز والاواصر ثنائية الكبريت والجسور الملحية والاواصر الايونية .نتيجة لهذه الاواصر يكون البروتين بشكل ثنيات وطويات.

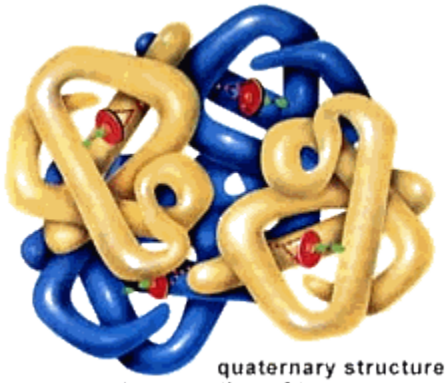


البناء الثالثي

ان الشكل الثالثي يمثل البروتينات الناضجة لان شكلها متكامل من الناحية التركيبية وهو اكثر مقاومة للظروف المختلفة لاحتوائه على اواصر اكثر (مثال للتركيب الثالثي هو الانزيمات).

(4)البناء الرابعي : Quaternary structure

وهو التحام البناء الاولي والثانوي والثالثي على شكل طبقات اوتجمعات كما في الهيموكلوبين, بوجود قوى فان درفالز والذي يثبت هذا التركيب هي الاواصر ثنائية الكبريت .



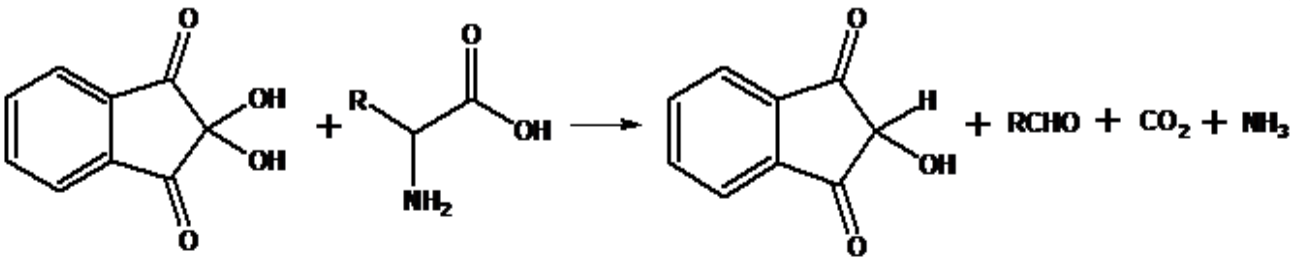
quaternary structure
(aggregation of two or more peptides)

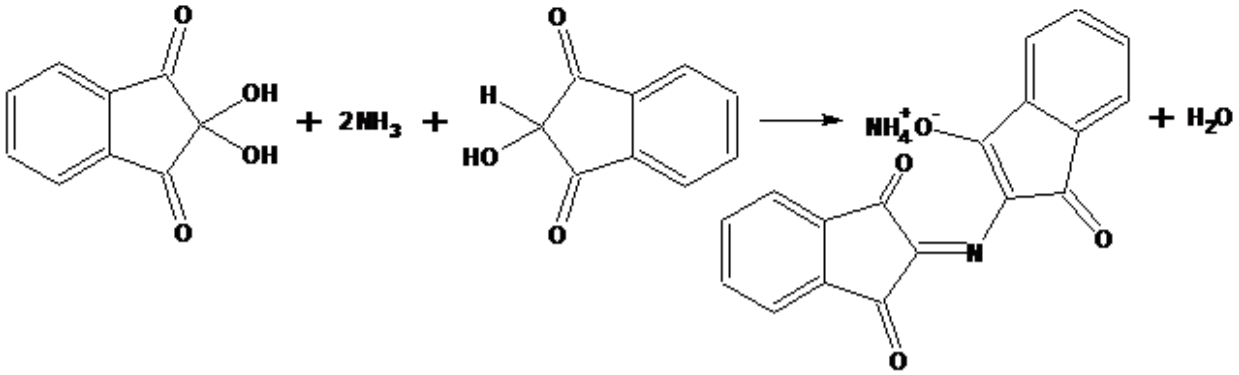
البناء الرابعي

اولاً / كشف النـنهيدرين: Ninhydrin Test

يعتمد هذا الكشف على وجود جذر الامينα-Amine وجذر الكاربوكسيل بصورة حرة، لذا فجميع الاحماض الامينية وبالتالي البروتينات تستجيب لهذا الكشف.

النـنهيدرين:مادة مؤكسدة قوية جداً,تتفاعل مع الاحماض الامينية في P^H(4-8)لتعطي مركبات ونواتج ملونة.التفاعل حساس جداً ومثالي لكشف الكميات القليلة جداً من الاحماض الامينية في تجارب كروماتوغرافيا الورق.اذن يتفاعل النـنهيدرين مع جميع الاحماض الامينية معطياًالون البنفسجي وفق المعادلة ادناه:





Ruhemauns purple

Reagents:(1)زلال البيض Egg albumin(5%)

(2)محلول النهيدرين(1%){Tri ketoninhyhydrin hydrate}

Procedure: اضف 8 قطرات من محلول النهيدرين الى 2 مل من زلال البيض.سخن لمدة دقيقتين لدرجة الغليان.لاحظ اللون الازرق.

ملاحظات:

(1)يعتبر الكشف عاماً لجميع الاحماض الامينية والبروتينات.
(2)بالامكان تقدير كمية الاحماض الامينية من خلال حساب كميةCO_2 المتحررة.

ثانياً/ تفاعل الزانثوبروتيك: Xanthoproteic Reaction

يعتمد هذا الكشف على وجود المركبات البنزينية حيثُ تحدث عملية النترجة لحلقة البنزين الموجودة بالحامض الاميني ولان مركبات النترو الناتجة تكون صفراء اللون لذا سمي الكشف بالزانثوبروتيك (اصفر=xantho) .

☹**Reagents**(1) محلول زلال البيض او.Tryptophan,Tyrosin

(2)حامض HNO_3 المركز.

(3)هيدروكسيد الامونيوم المركزNH_4OH

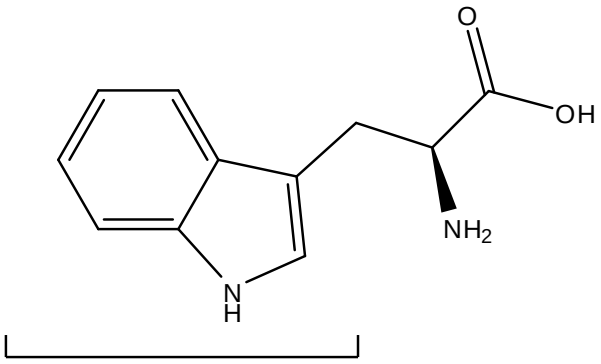
Procedure:اضف بضع قطرات من HNO_3 المركز الى محلول البروتين,سخن لدرجة الغليان(لمدة دقيقة واحدة) لاحظ اللون او الراسب الاصفر المتكون.برد الانبوبة ثم اضف اليها قليل من محلول هيدروكسيد الامونيوم المركز ولاحظ اللون البرتقالي المتكون. ان الاحماض الامينية التي تحوي حلقة اروماتية تكون مشتقات نتروجينية صفراء اللون عندمعاملتها مع HNO3 المركز اما املاح هذه المشتقات فتكون برتقالية اللون.

ملاحظات: (1)يدل هذا الكشف على وجود احماض امينية اروماتية (تايروسين,تربتوفان)في جزيء البروتين. (2) الجلاتين يعطي كشفا سالبا لنقص الاحماض الامينية الاورماتية فيه.

س/لماذا يترك حامض النتريك المركز بقعة صفراء عند سقوطه على الجلد؟

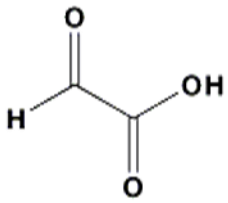
ثالثاً/ كشف هوبكنز كول الخاص بالتربتوفان: Hopkins-col Test

ان حلقة الاندول الموجودة في الحامض الاميني التربتوفان تتفاعل مع حامض الكلايوكسيلك(Glyoxylic acid) بوجود حامض قوي مثل حامض الكبريتيك المركز لتعطي حلقة بنفسجية وهذا دليل على احتواء البروتين على الحامض الاميني التربتوفان.**اذن فهذا الكشف مميز للتربتوفان, لاحتوائه على جذر الاندول.**



Indol Ring

Tryptophan



Glyoxylic acid

Reagntse:(1)عينة من احد البروتينات التالية(زلال البيض ,جلاتين,كازئين الحليب)

(2)كاشف هوبكنزكول(Glyoxylic acid)

(3)حامض الكبريتيك المركزH_2SO_4

Procedure:اضف(2مل) من كاشف هوبكنز كول الى (2مل) من محلول البروتين.امزج جيداً ثم اضف باحتراس حوالي (5مل)من حامض الكبريتيك المركز بحيث ينزلق على جدران الانبوبة الداخلية ولاحظ تكون حلقة وردية او بنفسجية عند سطح الانفصال.

ملاحظات:

(1)يُعد الكشف مميزاً للتربتوفان الحاوي على جذر الاندول.
(2)الجلاتين لايعطي الكشف لانه خالي من حامض التربتوفان.

رابعاً /كشف ميلون: Millon's Test (Tyrosine)

يعتمدهذا الكشف على وجود مجموعة الفينول في الحامض الاميني. وبما أن التايروسين هو الحامض الاميني الوحيد الذي يمتلك هذه المجموعة ، لذا يعتبر هذا الكشف خاصاً بالتايروسين.

Reagents:(1) محلول زلال البيض (%5)Egg Albumin

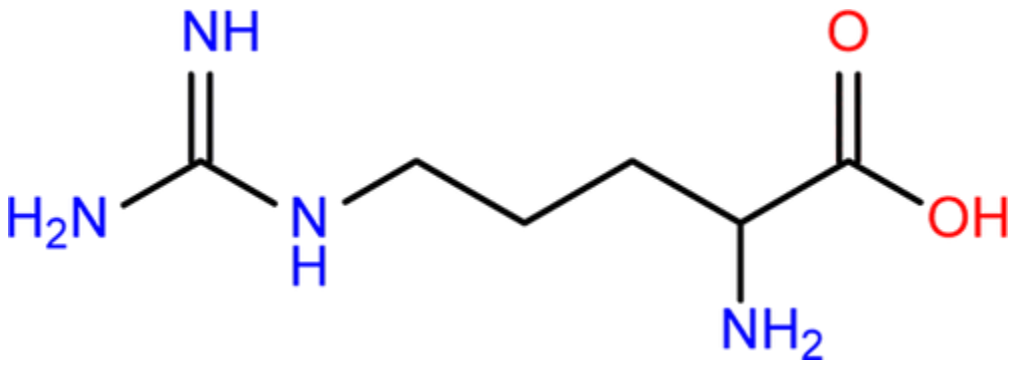
(2)كاشف ميلونMillons Reagent (نترات الزئبقوز والزئبقيك بوجود حامضي النتروز والنتريك)

Procedure:اضف بضع قطرات من محلول ميلون (حديث التحضير) الى (2مل)من محلول البروتين ، ثم سخن في حمام مائي مغلي ولاحظ ظهور اللون الوردي.

ملاحظة:الجلاتين يعطي كشف ضعيف لاحتوائه على كميات قليلة من التايروسين.

خامساً /كشف زاكاكوجي : sakaguchi Reaction

هو تفاعل خاص بجذر الكوانيدين guanidine الموجود في الحامض الاميني Arginine وجميع البروتينات اللتي تحتوي عليهِ ،حيث ان الكوانيدين في المحلول القاعدي يعطي لون احمر زاهِ عند معاملته مع α -naphthol وهايبوبروميت او هايبوكلوريت الصوديوم.



Guanidine group

Arginine

Arginine +α-naphthol+Soduim .hypochlorite ⟶ لون احمر زاه

Reagents:Egg Albumin(1)

NaOH % 10 (2)

Sodium hypochlorite % 10 (3)

α - naphthol(4)

Procedure: اضف بضع قطرات من محلول(10 %) NaOH مع بضع قطرات من α–naphthol واخيرا قطرات من(10 %) Sodium hypochlorite الى (1 مل)من محلول البروتين حتى يتكون لون احمر زاهٍ.

ملاحظة:هذا الكشف من الدقه والحساسية بحيث يمكن اعتباره كشفاً عاماً لجميع البروتينات؟؟

لان جميع البروتينات المعروفة تحتوي على الحامض الاميني الارجنين والحاوي على جذر الكوانيدين بالقدر الكافي لاعطاء كشف موجب.

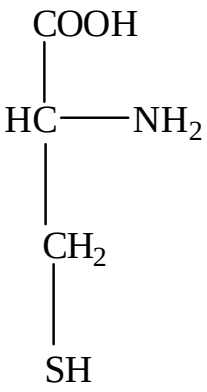
سادساً /كشف الكبريت غير المستقر قلويا(تفاعل الاحماض الامينية الكبريتية):

يعتمد هذا الكشف على حقيقة أن غلي محلول البروتين مع (NaOH %40)يؤدي الى ان الكبريت العضوي الموجود في الحامض الاميني السستين (Cystine)والسستائين(Cysteine) يتفاعل معNaOH مكوناً كبريتيد الصوديوم(Na_2S){تحول الكبريت الى كبريت لاعضوي} والذي يتفاعل بدوره مع خلات الرصاص$(CH_3COO)_2Pb$مكونا كبريتيد الرصاص الاسود اللون.

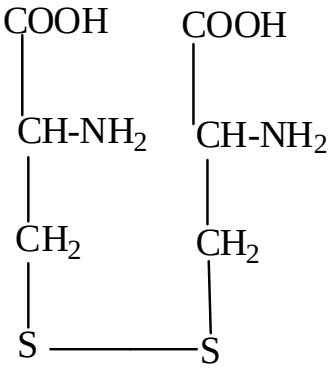
$$R\text{-}SH + 2NaOH \longrightarrow Na_2S + R\text{-}OH + H_2O$$

$$Na_2S + (CH_3COO)_2Pb \longrightarrow \underset{\text{راسب اسود اللون من كبريتيد الرصاص}}{PbS\downarrow} + 2CH_3COONa$$

وعليه يمكن القول بان الكبريت الموجود في الحامضين الامينيين السستين والسستائين هوكبريت **غير** مستقر قلوياً.

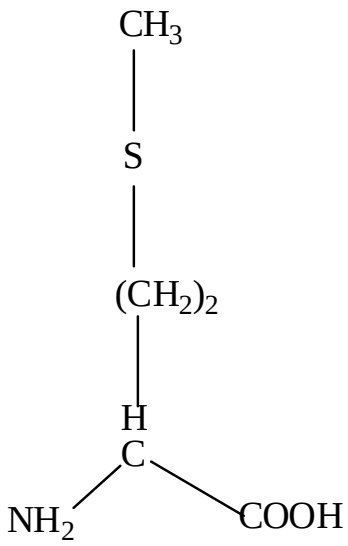


Cysteine



Cystine

اما الكبريت الموجود في الحامض الاميني الميثوينين (Methionine) فهو كبريت مستقر قلويا **ولا** يعطي راسب اسود من كبريتيد الرصاص مع NaOH



Methoionine

Reagents: (1)محلول البروتين.

NaOH (40%) (2)

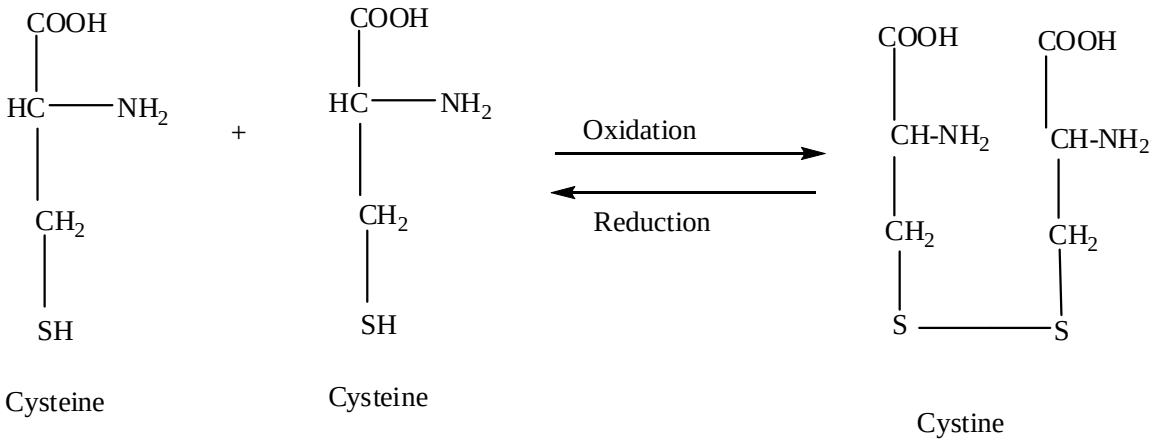
(3) خلات الرصاص Lead Acetate

Procedure:

امزج قليلاً من محلول البروتين(1مل) مع (1مل)من NaOH%40.اغلي المحلول ثم برده وأضف اليه حامض الخليك (10 قطرات) ثم أضف قليلا من محلول خلات الرصاص , ولاحظ تكون راسب اسود، دلاله على ان البروتينات تحتوي في تركيبها على احماض امينية حاوية على كبريت غير مستقر قلوياً.

ملاحظات☹

(1)يتكون الحامض الاميني السستينCystine من الحامض الاميني السستائينCysteine وحسب المعادلة التالية:

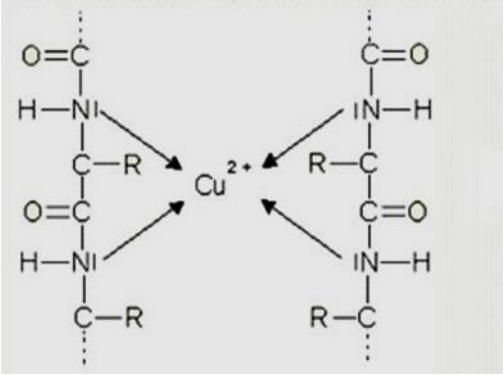


Cysteine Cysteine Cystine

(3)يدخل السستائين في تركيب عدد كبير من الانزيمات كما يرجع نشاطها لوجود مجموعة (-SH) وتسمى السلفاهايدريل او المركبتان. Sulfhydryl or Mercaptanوعند حجب هذه المجموعة فان نشاط هذه الانزيمات يتأثر كثيراً ويكبت عمله.

سابعاً/ كشف بايوريت: Biuret Test for peptide bonds

هذا الكشف خاص بوجود الاتصالات او الاواصر الببتيدية(جميع المركبات التي تحتوي على آصرتين من الاواصر الببتيدية على الاقل) , وعليه يعطي هذا الكشف نتيجة ايجابية (لون بنفسجي) مع جميع البروتينات ونواتج تحللها المائي (الببتيدات) وحتى مرحلة الببتيدات الثلاثية (Tri peptides) ،اما الببتيدات الثنائية (Dipeptides) والاحماض الامينية فلا تعطي كشفاً موجبالاحتواء الاولى على آصرة واحدة وعدم وجود هذه الاصرة في الحامض الاميني .ويعزى كشف بايوريت الى قوة عمل الاواصر التناسقية لمركب معقد من (Cu^{+2}) واربعة ذرات نتروجين ببتيدية مكونا مايسمى بمعقد النحاس التناسقيCopper coordination complex



معقد النحاس التناسقي

Reagents:(1) Egg albumin (%5)

NaOH(%10) (2)

Copper sulfate (%1) (3)

Procedure: اضف الى (1مل) من زلال البيض في (T.T) بضع قطرات من NaOH(%10) ثم اضف قطرة واحدة من كبريتات النحاس (1%) ولاحظ ظهور اللون البنفسجي .

ملاحظات:

(1) ان الببتيدات الثنائية والاحماض الامينية لاتعطي هذا الكشف.

(2) ان تغير اللون من الازرق الفاتح الى الازرق الغامق هو نتيجة سلبية للكشف سببه تكون $Cu(OH)_2$ في المحيط القاعدي ، لذا نتجنب استعمال كمية كبيرة من $CuSO_4$.

ترسيب البروتينات Protein's Precipitation

ان قابلية ذوبان البروتينات تعتمد على عاملين:

1-وجود الشحنة التي يتحكم بها الPH .

2-وجود الماء، مع قليل من التسخين في اغلب الاحيان.

وبدون احدهما لايمكن للبروتين ان يكون بصورة ذائبة او مستحلبة .

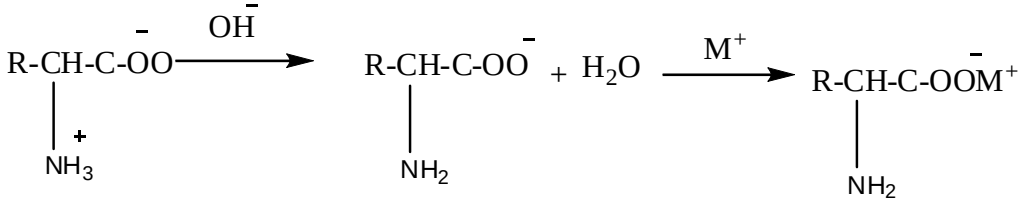
نقطة التعادل الكهربائي: **Iso Electric Point(I EP)**

هي عبارة عن الP^H التي يكون فيها البروتين حاملا لعدد متساوي من الشحنات الموجبة والسالبة. وعليه فالبروتينات في نقطة تعادلها الكهربائي لاتتحد مع الحامض او القاعدة.اما فوق(-) او تحت(+)نقطة التعادل الكهربائي فالبروتينات تكون غير متعادلة (مشحونه)ولذلك فهي تتحد مع الايونات المعاكسة لها مكونة املاح يكون كثير منها غير ذائب(راسب)مع البروتين.
مماتقدم فان البروتين يكون غير ذائب في نقطة التعادل الكهربائي(راسب).

طرق ترسيب البروتينات:

اولا /الترسيب بواسطة املاح الفلزات الثقيلة {الايونات الموجبة (+)}:

تعتمد فكرة الترسيب على اضافة محلول فلز ثقيل مثل(Pb^{+2},Zn^{+2},Hg^{+2},Fe^{+3},Ag^{+})الى محلول البروتين الحامل لشحنة سالبة(نتيجة معاملته بالقاعدة) وترسيبه على شكل بروتينات الفلز (Metal Protein) , حيث يُعادل الايون الموجب الشحنة السالبة على جزيئة البروتين فيرسبها.



Metal Proteinate

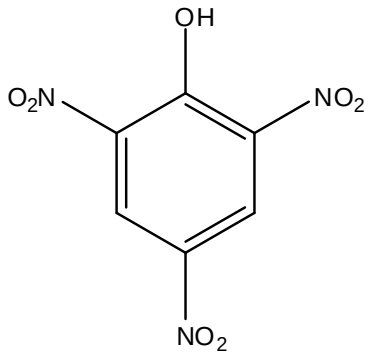
Procedure:يوضع (3مل) من محلول زلال البيض في انبوبة اختبار ونضيف قطرة من محلول NaOH.ثم نضيف(1مل) من احد املاح الايونات الموجبة($FeCl_3$) ثم نكرر التجربة مع كل من $HgCl_2, CuSO_4, (CH_3COO)_2Pb, AgNO_3$.ونسجل ونلاحظ تكون الراسب ولونه في كل مرة.

ملاحظات(1) عند اضافة كمية كبيرة من محاليل املاح الفلزات الثقيلة فان الراسب يصبح ذائبا؛ وذلك لاكتساب جزيئات الراسب للشحنة الموجبة.(البروتين يكون ذائب عندمايكون غير متعادل).

(2)لترسيب البروتينات بواسطة المعادن الثقيلة اهمية خاصة(صحياً)؛ اذ انه عند حدوث تسمم بواسطة هذه المعادن يمكن استخدام زلال البيض او الكازئين(الحليب)كترياق (Anti dot)،حيث يترسب المعدن الثقيل على شكل بروتينات الفلز الثقيل, وهنا نؤكد على وجوب التقيء مباشرةً حيث ان البروتينات تتحلل ثانية داخل المعدة.

ثانياً /ترسيب البروتينات بواسطة الكواشف القلويدية{الايونات السالبة (-)}:

بالامكان ترسيب البروتينات عندما تحمل شحنة موجبة بواسطة الايونات السالبةAn ions لبعض الحوامض مثل TCA,Picric Acid وتعرف هذه الحوامض بالكواشف القلويدية لانها استخدمت اصلا في ترسيب مجموعة من المركبات العضوية التي تعرف بالقلويدات alkaloids .هذه الطريقة تجد استعمالا واسع النطاق في ازالة البروتينات Deproteinization من الدم قبل اجراء بعض التحاليل عليه. وتعتبر هذه الطريقة اساس للكشف عن البروتينات في الادرار والتقدير الكمي لها في المصل Serum وفي الادرارUrine.

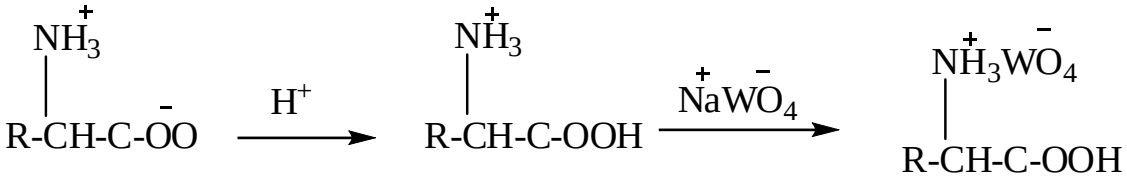


picric acid

$Na^{+}WO^{-}_{4}$ Sodium Tungstate

CCl_3COOH TCA(**T**ri **C**hloro **A**cetic acid)

ان البروتينات في المحيط الحامضي, تحمل شحنة موجبة , وتتحد مع الايونات السالبة مكونة رواسب وكمايلي في ادناه:



Procedure: يُحمض زلال البيض بقطرات من حامض الخليك ويضاف اليه(1مل) من الايونات السالبة المذكورة في اعلاه ويلاحظ لون الراسب المتكون في كل مرة.سجل ملاحظاتك....

ثالثاً /ترسيب البروتينات عند نقطة التعادل الكهربائي(IEP):

تكون البروتينات ذائبة فوق نقطة تعادلها الكهربائي (عندما تحمل شحنة سالبة في المحيط القاعدي)،وكذلك تحت نقطة تعادله الكهربائي(عندما تحمل شحنة موجبة في المحيط الحامضي).اما في نقطة التعادل الكهربائي فيكون عدد الشحنات الموجبة والسالبة متساوٍ ،وبذا يكون البروتين اقل ذوبانا في هذه الPH(راسب).

Procedure:ضع(1مل)من البروتين وليكن كازئين الحليب في T.T(نقطة تعادله الكهربائي+5.4) ثم اضف له بضع قطرات من صبغة البروموكريزول الاخضر(Green Bromocressol) فاذا ظهر لون ازرق دَلَ ذلك على ان المحيط قاعدي فيجب اضافة قطرة من حامض HCl مع الرج المستمر الى ان يصبح اللون اخضر مزرق مع تكون راسب كثيف دلاله على الوصول الىIEP لكازئين الحليب في (PH 5.4).

اما اذا ظهر اللون الاصفر دَلَ ذلك على ان الوسط حامضي فيجب اضافة قطرة...قطرة من NaOH مع الرج المستمر الى ان يصبح اللون اخضر مزرق مع تكون راسب كثيف , دلالة على الوصول الى نقطة التعادل الكهربائي لكازئين الحليب (PH 5.4).

ملاحظة: تجنب اضافة كمية كبيرة من الحامض او القاعدة دفعة واحدة ، لان ذلك يؤدي الى تغيير المحيط بسرعه(تغير IEP) ممايؤدي اويمنع ظهور اللون الاخضر المزرق وعدم تكون الراسب.

س/لماذا يترسب محلول بياض البيض عند التسخين؟

ج/ اذا سخناه كماهو في حالته الطبيعية (PH=4.7)(نقطة تعادله الكهربائي) يترسب كمافي سلق البيض.لكن اذا اضفنا قليل من HClاو NaOH اي نغير نقطة تعادله الكهربائي (جعل الPH أكثر اواقل من 4.7)سنلاحظ ان لايترسب بالتسخين مهما رفعنا درجة الحرارة او اطلنا زمن التسخين.

رابعاً/ الترسيب بالتمليح الداخلي والتمليح الخارجي:

التمليح الداخلي : **Salting in**

ويقصد به ذوبان البروتين(وليس ترسيبه) في المحلول الملحي عند اضافة تراكيز قليلة من الاملاح المتعادلة بحدود(M0.02) من {$(NH_4)_2SO_4$,NaCl} وفي هذه الحالة تعمل ايونات الملح على زيادة ايونية البروتين وبالتالي تزيد ذوبانه(وعدم ترسيبه).

التمليح الخارجي: **Salting out**

ويقصد به فصل وترسيب البروتين من المحلول على شكل راسب، باضافة محلول مركز(M0.1) من {$(NH_4)_2SO_4$,NaCl}.ففي هذه الحالة الملح يزاحم البروتين، لانه اكثر ذوبانا من البروتين ويفصلهُ (اي يترسب).

Procedure:

1- اضف محلول مخفف من NaCl الى محلول البروتين وسجل ملاحظاتك.
2- اضف محلول مركز من NaClالى محلول البروتين وسجل ملاحظاتك.
3- اعد الخطوتين 1،2 مستخدما محلول $(NH_4)_2SO_4$.وسجل ملاحظاتك.

خامساً / الترسيب بواسطة الكحول(المذيبات العضوية اللاقطبية):

تترسب البروتينات بواسطة الكحول لكونهِ اكثر ذوباناً في الماء من البروتين، وبذا لاتبقى كمية كافية من الماء لذوبان البروتين فينفصل ويترسب.

Procedure:

اضف بضع قطرات من الكحول الاثيلي (95%) الى (1مل) من محلول زلال البيض ولاحظ تكون الراسب الابيض.

س/لماذا يستعمل الكحول في تعقيم الجروح وقتل الجراثيم؟

سادساً / الترسيب بواسطة التجلط الحراري: Precipitation by Heat Coagulation

عند تسخين البروتين لدرجة حرارة عالية تتغير سلسلة الاحماض الامينية المكونه للبروتين ممايساعد على تكتلها كما في حالة تعرض البيض للحرارة عند السلق ويعَرف التغير في جوهر البروتين بالدنترة (denaturation)وهو تحوير(مسخ) في جزيئة البروتين بما يؤدي الى تغير في خصائص البروتين الفيزياوية والبايولوجية.

ويحدث التغيير في التركيب الثانوي والثالثي ولايتاثر التركيب الاولي.(السلسلة الببتيدية).

تشخيص الاحماض الامينية بواسطة كروماتوغرافيا الورق:

Identification of Amino acids by paper chromatography

تعتمد هذه الطريقة بصورة رئيسية على مدى اختلاف سرعة انتقال جزئيات الحوامض الامينية المختلفة على ورق خاص وبواسطة خليط من المحاليل المذيبة التي تسير بفعل الخاصية الشعرية للورق، حيث تختلف سرعة انتقال هذه الحوامض المذابة بالنسبة لنوعية خليط المحاليل المذيبة فتنفصل مكونات الخليط عن بعضها في صورة بُقع (spots)وتُعرف الورقة بماعليها من بقع بأسم الكروماتوغرام chromatogram.

ان حركة المذيب تُعرف بأسم الجبهة (Front) والمسافة التي يتحركها مركب من مكونات الخليط تقاس من خط البداية حتى مركز البقعة ويعبر عنها برمز Rf:

$$\mathbf{Rf} = \frac{\text{المسافة التي يقطعها المركب المجهول}}{\text{المسافه التي يقطعها المذيب}} = \frac{\mathbf{A}}{\mathbf{B}}$$

Rf: **R**etardation **F**actor (عامل الاعاقة)

ان مقدار Rf يعبر عن صفة مميزة لكل مركب عند تثبيت ظروف التجربة .هناك نوعان من كروماتوغرافيا الورق:

(1) الكروماتوغرافيا الهابطة: Descending chromatography

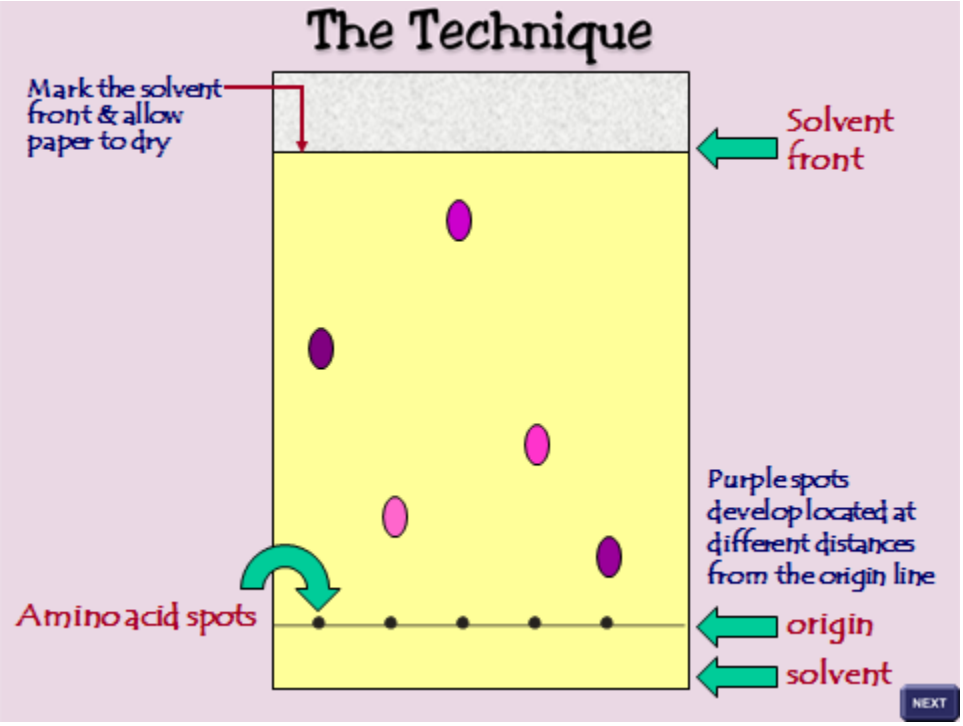
وفيها ينتقل المذيب على الورق بفعل الجاذبية (والخاصية الشعرية) اي من الاعلى الى الاسفل.

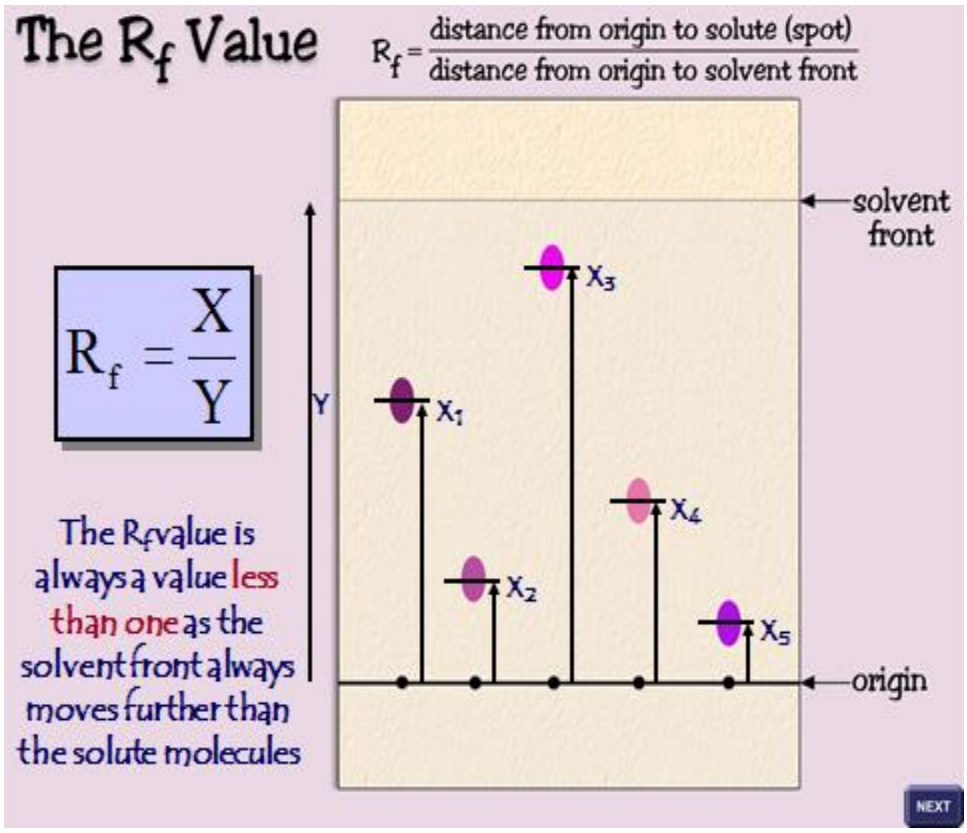
(2) الكروماتوغرافيا الصاعدة: Ascending chromatography

فيها ينتقل المذيب على الورق بفعل الخاصية الشعرية من الاسفل الى الاعلى وهي الطريقة المفضلة.

:Procedure

اقطع ورقة ترشيح(No 1)بشكل شريط عرضه أقل من عرض انبوبة الاختبار ثم أشر بقلم الرصاص(لاتستخدم قلم حبر او جاف)خط على بُعد (2Cm)من أحد حافتيها وضع نقطة في منتصف الخط ، بعد ذلك خذ بواسطة انبوبة شعرية محلول الحامض الاميني وضعهُ على النقطة بحيث تكون البقعة على اصغرها.جفف واعد العملية حتى تنقل كمية مناسبة من المحلول في اصغر بقعة ممكنة.ضع قليل من خليط محلول المذيب (1-2ml) في قعر انبوبة الاختبار ثم اغمر الجزء الاسفل من الشريط المحمل بالنموذج في محلول المذيب في الانبوبة (بحيث تكون بقعة النموذج فوق مستوى سطح المذيب).سد الانبوبة بواسطة فلينه واتركها لمدة نصف ساعة (الى ان يصعد المذيب اكثر من نصف المسافة)ومن ثم ارفع الشريط وأشر بالقلم الرصاص الحد الذي وصل اليه المذيب ثم جفف الشريط في فرن درجة حرارته(110c°)وبعد ذلك رُشه بواسطة رشاش يحتوي على محلول النهيدرين(كاشف عام عن جميع الاحماض الامينية حيث يلون الحامض الاميني) ،جفف ثانية فتظهر بقعة الحامض الاميني في موقعها المناسب على الشريط بعد ذلك احسب قيمة Rf واستدل منها على الحامض الاميني المجهول.




The R_f Value
$R_f = \frac{\text{distance from origin to solute (spot)}}{\text{distance from origin to solvent front}}$
$R_f = \frac{X}{Y}$
The R_f value is always a value less than one as the solvent front always moves further than the solute molecules
Y
solvent front
origin
X_1
X_2
X_3
X_4
X_5
NEXT

تعتمد سرعة انتقال جزيئة الحامض الاميني او المواد المراد فصلها على:

1- نوعية المذيب (الذي يعتبر الوسط الناقل).(الطور المتحرك).Solvent

2- نوعية الجزيئات المراد فصلها.(المذاب).Solute

3- نوعية الورق المستخدم للفصل.(الطور الساكن).Whatman No1

4-درجة الحرارة.

توجد انواع مختلفة للكروماتوغرافيا:

1-كروماتوغرافيا الورق.PC

2- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.TLC

3-كروماتوغرافيا الاداء العالي .HPLC

4-كروماتوغرافيا التبادل الايوني .Ione exchange

5-كروماتوغرافيا الغاز .GC

ملاحظة مهمة: لكل حامض اميني RFخاص به(صفة فيزيائية) وقيمته اقل من واحد. **{ RF<1}**

وهو قيمة عديمة الوحدات.

$$\mathbf{Rf} = \frac{x}{Y} = \frac{\text{الجزء}}{\text{الكل}} < 1$$