

المحاضرة الخامسة

الرحلان الكهربائي

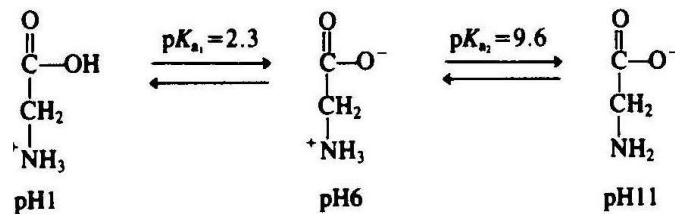
Electrophoresis

الخلاصة Summary:

سنتعرف في هذه المحاضرة على مفهوم ومبدأ الرحلان الكهربائي وطرقه المستوية وعلى العوامل المؤثرة على معدل الهجرة وهما الحقل الكهربائي المطبق على نظام الرحلان والمحلل الواقي المستخدم. والأوساط الحاملة وتصنيفاتها التي تتضمن الأشرطة والجل والطبقات الرقيقة، التي يجب أن تكون خاملة بصورة كلية أو يمكن أن تتمتع بفعل فيزيائي على الفصل، كما سندرس تقنيات الرحلان الكهربائي.

3-3 الرحلان الكهربائي Electrophoresis

يقوم الرحلان الكهربائي بصورة أساسية على المعدل التفاضلي لهجرة الجزيئات المشحونة (الأيونية) في محلول كهربائي تحت تأثير حقل كهربائي. وعلى الرغم من أن هذه التقنية ليست بالمبدأ تقنية كروماتوغرافية إلا أنها تستخدم على اتصال مع الكروماتوغرافيا الورقية والطبقات الرقيقة ومواد الجل مقدمة طريقة مفيدة جداً لفصل المواد المشحونة ابتداءً من الأيونات الصغيرة حتى الجزيئات الضخمة المشحونة ذات الاهتمام البيولوجي والكيميائي الحيوي، حيث تحوي العديد من هذه المركبات مجموعات حمضية أو أساسية السهلة التأين، ويعتمد مدى تأينها على تركيب pH القالب، فمثلاً تأخذ الحموض الأمينية قيمتي pK_a مميزتين وتعتمد الصيغة الفعلية لحمض أميني على pH المحلول، ويوضح الشكل (12-3) الصيغ الأيونية للغليسين المسيطرة عند قيم متنوعة من الـ pH.



Zwitterion

شكل (12-3) الصيغ الأيونية المختلفة للغليسين والـ pH الذي عنده الصيغة المسيطرة

تعرف الصيغة الثنائية القطب لحمض أميني بالزويتريون (Zwitterions) ويدعى الـ pH الذي تكون عنده الشحنة الصافية على حمض أميني تساوي الصفر نقطة التعادل الكهربائي (isoelectric point). وعند قيم pH أخرى يمكن أن تتواجد الحموض الأمينية والأنواع المماثلة في محلول إما على شكل كاتيونات (أيونات موجبة) أو أنيونات (أيونات سالبة) وتعتمد الشحنة المحمولة على pH المحلول. وعندما توضع هذه الأنواع المشحونة في حقل كهربائي سوف تهاجر باتجاه الإلكترود المناسب. وتنتج القوة المحركة للهجرة عن القوى الكهرواكتية للتجاذب بين الحقل الكهربائي والجزيئات المشحونة، وتنسب قوى التأخير للاحتكاك وقوى التدافع الكهرواكتية من جزيئات وسط النقل. تتناسب القوى الكهرواكتية للتجاذب مع نسبة الكتلة إلى الشحنة وبالتالي فإن الجزيئات المختلفة بنسبة الكتلة إلى الشحنة سوف تهاجر بسرعات مختلفة عند وضعها في حقل كهربائي ويتم بالنتيجة فصلها. ويمكن أن تمتد هذه التقنية إلى مركبات غير قطبية مثل الكربوهيدرات والسكريات بواسطة مشتقاتها على شكل بورات أو فوسفات.

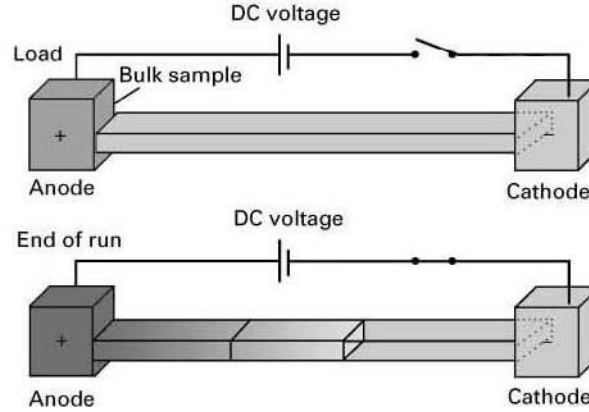
3-3-1 طرق الرحلان الكهربائي:

هناك أربع طرق مستوية للرحلان الكهربائي وهي:

- الرحلان الكهربائي لحركة الحدّ Moving boundary electrophoresis
- الرحلان الكهربائي للمنطقة Zone electrophoresis
- البؤر المتسق الكهربائي Isoelectric focusing
- الرحلان المتسق السرعة Isotachopheresis

طريقة الرحلان الكهربائي لحركة الحدّ:

تتم الهجرة عادة في وسط واق لتأمين pH ثابت، حيث يمكن للرحلان الكهربائي أن يتم في محلول حر (بدون وجود حامل) تكون فيه الأنواع حرة الحركة عندما يطبق عليها الحقل الكهربائي. كما تكون الهجرة سريعة نظراً لأن قوى الاحتكاك المقاومة في حدها الأدنى، وتدعى هذه التقنية بحركة الحدّ في الرحلان الكهربائي. ففي هذه الطريقة توضع العينة بالإضافة إلى المحلول الواق في حوض عينة مناسب (حجرة كهربيّة)، وقد استخدم تزيلبوس أنبوباً على شكل حرف U يحوي قالب العينة مع الواق وغمس في كل طرف إلكترود، واستخدم محلولاً واقياً واحداً لوصل الألكترودين عن طريق قالب جهاز الرحلان شكل (3-13).

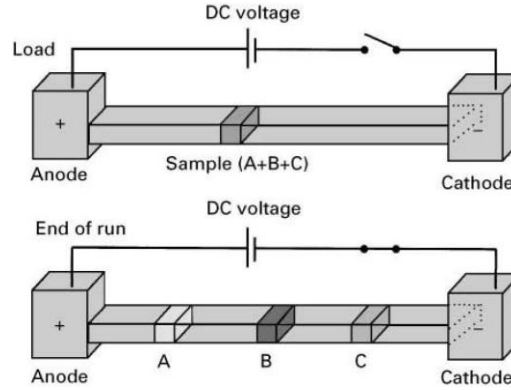


شكل (3-13) مبدأ الرحلان الكهربائي لحركة الحدّ

وعند تطبيق الكمون تنفصل المركبات وفقاً للاختلافات في حركياتها (سرعة + اتجاه) كما هو مبين بالشكل (3-13) حيث تتحرك الكاتيونات الأعلى بالحركية إلى الأمام عن البقية التي تكون جبهتها مفصولة عن الآخرين، وعلى أية حال فإن المذاب الأسرع والأبطء يكون مفصولاً عن الآخرين، لهذا يكون تباين المركبات بعضها عن بعض منخفضاً ويحتاج إلى ضوئيات ماسحة متقدمة لكشف التغير بقيرينة الانكسار. لذلك فإن مثل هذه الطريقة تستخدم في العمليات التحضيرية فقط علماً أنها استخدمت في البداية لفصل البروتينات.

طريقة الرحلان الكهربائي المناطقي:

إن الاستخدام الأكبر والأهم للرحلان الكهربائي كان مع هذه الطريقة التي تتم فيها عملية الفصل بالاعتماد على حركية الرحلان الكهربائي الحاصلة على وسط حامل خامل نسبياً مثل: الورق، الاغاروز، الجل، خلات السيليلوزوالأكريل أميد. وفي مثل هذا النظام تزداد مقاومة الاحتكاك بصورة ملحوظة وتفقد إلى هجرة المركبات وبالتالي فصلها على شكل مناطق أو أشرطة شكل (3-14).

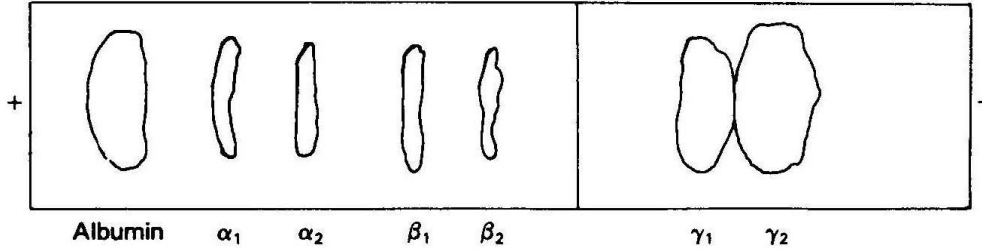


شكل (3-14) يمثل مبدأ الرحلان الكهربائي المناطق

ويمكن تحديد مواقع البقع على الإلكترودوروغرام بسهولة بالنهج ذاته المتبع في الكروماتوغرافيا الورقية والطبقة الرقيقة.

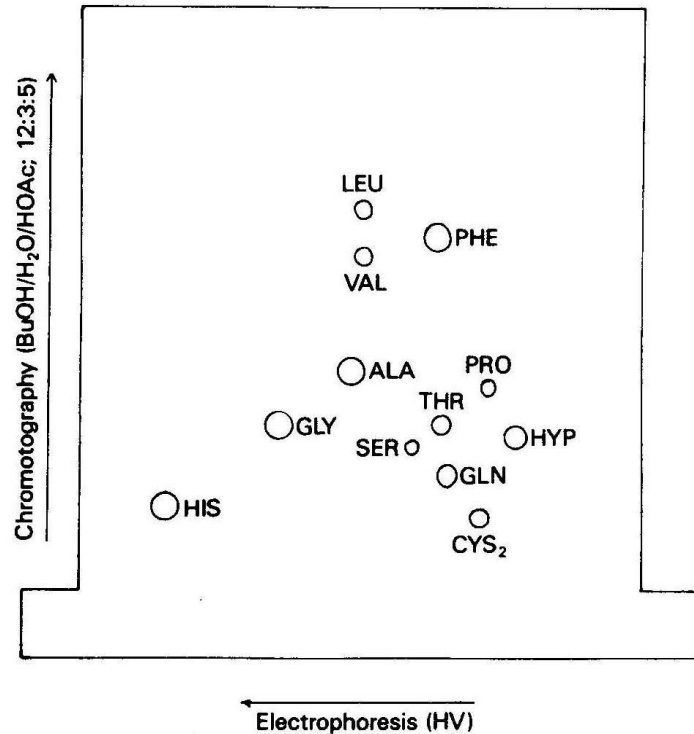
النهج المتبع في الطريقة: يستخدم في هذا النهج شريط ورقي كوسط حامل مناسب، يغمس من طرفيه في حجرتي الإلكترودين الحاويتين على محلول واق يعمل ككهرليت. ينقع الشريط في المحلول الوافي، ثم تطبق عليه العينة عند نقطة ما على الشريط بشكل شريط مستعرض، ثم يتم وصل الإلكترودين إلى مصدر dc ويطبق حقل كهربائي لفترة زمنية، بعد ذلك يرفع الشريط من الجهاز ويجفف ثم يتم تحديد مواقع الأشرطة بالطريقة نفسها التي تم تحديدها مع كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.

وهكذا تظهر المواد المفصولة على شكل سلسلة من الأشرطة تعتمد مسافاتهما عن مبدأ تطبيقها على: شحنة الأيون، حركيته في الحقل المطبق، التوتر المطبق والتيار و pH المحلول الوافي. بينما كان الفصل في الكروماتوغرافيا يتم بتدفق المذيب (الطور المتحرك) الذي يحرك تفاضلياً مختلف المركبات، لكن في الرحلان الكهربائي يكون الكهرليت ساكناً ويحدث تدفق الأيونات بفضل شحنتها تحت تأثير الحقل الكهربائي المطبق. أما حركة المذيب الوحيدة فتعود للتدفق الأسموزي الكهربائي الناتج عن الشحن الأيونية المحرصة على وسط الرحلان الحامل التي تكون خفيفة لكنها يمكن أن تعيق حركة بعض الأيونات ذات الحركية المنخفضة، وتدعى هذه الطريقة " الرحلان الكهربائي الورقي " بصورة مشابهة للكروماتوغرافيا الورقية، إذ يقوم الورق بدور وسط حامل للكهرليت والمواد المفصولة حيث يعيق انتشارها في المحلول الوافي ويحافظ عليها جافة من أجل تحديد مواقعها بكاشف مناسب شكل (3-15).



شكل (3-15) إلكتروفوروغرام لبروتينات البلازما على خلات السيليلوز عند $\text{pH} = 8.6$ (0.5M barbitone)

إن طبيعة الورق ذات صلة قليلة في عملية الفصل، وبما أن الحوامل الأخرى متاحة فإن طريقة الرحلان الكهربائي المناطقي أو الكروماتوغرافيا الكهربائية غدت شائعة الاستخدام ويمكن أن تستعمل بالارتباط مع الكروماتوغرافيا الاصطناعية، حيث تقطع الورقة وفق الشكل (3-16) التي يمكن أن تستخدم في جهاز مناسب للحصول على فصل مفيد بطريقتي الرحلان الكهربائي والكروماتوغرافيا لمواد مثل الحموض الأمينية والأنواع القطبية المماثلة.



شكل (3-16) ترتيب لصفحة ورقية لدمج الرحلان الكهربائي مع الكروماتوغرافيا

3-2-3 العوامل المؤثرة بمعدلات الهجرة:

هناك عاملان يلعبان الدور الأساسي بالتأثير على معدل الهجرة وهما الحقل الكهربائي المطبق على نظام الرحلان والمحلل الواقى المستخدم.

الحقل الكهربائي Electric field: تحدث حركة الأيونات على الورقة (الوسط الحامل) نتيجة تطبيق فرق بالكومون عبر الوسط الحامل، أما المتغير الأهم المحدد لمدى الهجرة (**d**) فهو تدرج التوتر الذي يتمثل بالتوتر المطبق (**V**) مقسوماً على المسافة (**L**) بين الإلكترودين:

$$d = \frac{V}{L} \text{ (V/L)}$$

ويزداد مدى الهجرة بازدياد تدرجات التوتر. وقد تبين أن سرعة الهجرة تصل بسرعة إلى قيمة ثابتة، السرعة النهائية، عندما لا توجد قوة صافية تؤثر على شحنة الأيون، أي أن قوى الاحتكاك الناشئة عن الحركة خلال الوسط الحامل توازن تماماً قوة الحقل الكهربائي المطبق. وتتحدد السرعة النهائية لأنواع من نفس الشحنة بقياسها وأشكالها، فالجزئية الأكبر تخضع لاحتكاك أكبر وتأثيرات كهروكادية تجعل حركتها متأخرة وتكون بطيئة، بينما الجزئيات المتماثلة القياس التي يمكن أن تمتلك أشكالاً مختلفة كحالة التأثيرات المتبادلة في الجزئيات الضخمة للبروتين الثانوي والثالثي التي تقود إلى البروتينات الليفية أو الكروية تخضع لفعل تفاضلي من الاحتكاك والقوى الكهروكادية التي تؤدي إلى خصائص هجرة مختلفة. كما أن خصائص كل نوع مثل: الشحنة الصافية، الشكل والقياس، توزع الشحنة الكلي، التأثيرات الكهروكادية وتأثيرها على مدى الهجرة تتجسد في حركتها الرحلانية μ . وهكذا فإن المسافة المتحركة d ترتبط مع تدرج التوتر المطبق (**V/L**) وزمن الهجرة t من خلال حركية الرحلان الثابتة μ :

$$d = \mu t (V/L)$$

أما فصل مركبين مختلفين بالحركية بعد زمن t فيعطى بالعلاقة:

$$d_1 - d_2 = (\mu_1 - \mu_2) t (V/L)$$

ولا بد من الإشارة إلى أنه خلال تدفق التيار بمسيرة الرحلان الكهربائي يحدث تحليل كهربائي للمحلل الكهربي وينطلق الأوكسجين والهيدروجين:



لذلك يجب إزالة التوتر قبل وصول الأيونات ذات الاهتمام التحليلي إلى الإلكترودين، لأن التيار المتدفق يولد حرارة خلال الوسط الحامل الأمر الذي يقود إلى تبخر المذيب. كما أن الزيادة الفعلية في تركيز الكهربي تؤدي إلى زيادة حركية الأيونات المنسوبة بدورها إلى انخفاض التدافع الكهروكادي من جزئيات المذيب،

بالنتيجة يزداد التيار المتدفق الذي يزيد في توليد الحرارة وتبخّر المذيب. ففي الرحلان الكهربائي على الورق تكون الحرارة المتولدة صغيرة نسبياً وتتبعثر بسهولة عند التوترات المنخفضة (100-400V). ويمكن تخفيض التبخر إلى حده الأدنى بإغلاق الجهاز بغطاء محكم، كذلك يمكن استخدام أوساط حاملة أخرى غير الورق مثل طبقات من خلات السيليلوز التي تكون مفضلة للعمل في شروط تيار ثابت. وهناك نهج آخر يخفض توليد الحرارة يمكن باستخدام واقيات عضوية مثل محلول مائي من البيريدين ومحاليل حمض الخل، أما الدراسات في توتر مرتفع فتتطلب نظام تبريد في الجهاز للمساعدة في تشتت الحرارة.

المحلول الواقي Buffer: لقد ناقشنا فيما سبق أهمية pH المحلول الواقي على طريقة تأين المركبات العضوية. فالحموض الأمينية والكهرليات المذبذبة تكون عند نقاط تعادلها الكهربائي موجودة على شكل زويتريون ولا تهاجر في حقل كهربائي، لكن جعل الـ pH بميل قليلاً إلى الحمضية فإن الصيغة المبرتنة لحمض أميني تكون مسيطرة وتهاجر نحو المهبط، وبالعكس عند زيادة pH المحلول تحدث الهجرة نحو المصعد. وهكذا فإن مدى واتجاه الهجرة للعديد من المركبات ذات الاهتمام البيولوجي تكون تابعة للـ pH.

هناك مجال واسع من المحاليل الواقية المتاحة سواء اللاعضوية منها أو العضوية مثل الـ EDTA، الفوسفات، تريس، السيترات، الباربيتون، الخلات والبيريدين، بالإضافة إلى أن استخدام البورات ككهرليت يوسع مجال تطبيق التقنية على الكاربوهيدرات وعديدات الأغوال، إذ تشكل هذه المركبات معقدات أيونية مع كواشف البورات. كما أن المحاليل الواقية العضوية تولد حرارة أقل خلال عملية إظهار الإلكتروليت فوروغرام الذي يرفع بسهولة من أجل تعيين مواقع المركبات.

إن معدل الهجرة يُضبط ليس فقط بـ pH المحلول الكهرلتي الواقي وإنما أيضاً بتركيزه الذي يحكم القوة الأيونية، فبازدياد القوة الأيونية للمحلول الواقي فإنه يحمل نسبة أعلى من التيار مع انخفاض مرافق بالنسبة المحمولة من قبل العينة. وعلى الرغم من أن ذلك يقود إلى مناطق متماسكة إلا أن الزمن اللازم لإظهار الإلكتروليت فوروغرام يكون مفراطاً، لكن استخدام التراكيز المرتفعة يجنب مشاكل توليد الحرارة وتبخّر المذيب. من جهة أخرى عند استخدام التراكيز المنخفضة جداً تنخفض أزمنة الهجرة لكن مع امتداد أكبر بانتشار المذاب الذي يقود إلى تباين أقل. لذلك لا بد من حل وسط بين التركيز المرتفع والمنخفض للكهرليت الواقي، إذ أن التراكيز المستخدمة تقع في المجال 0.05- 0.1 M.

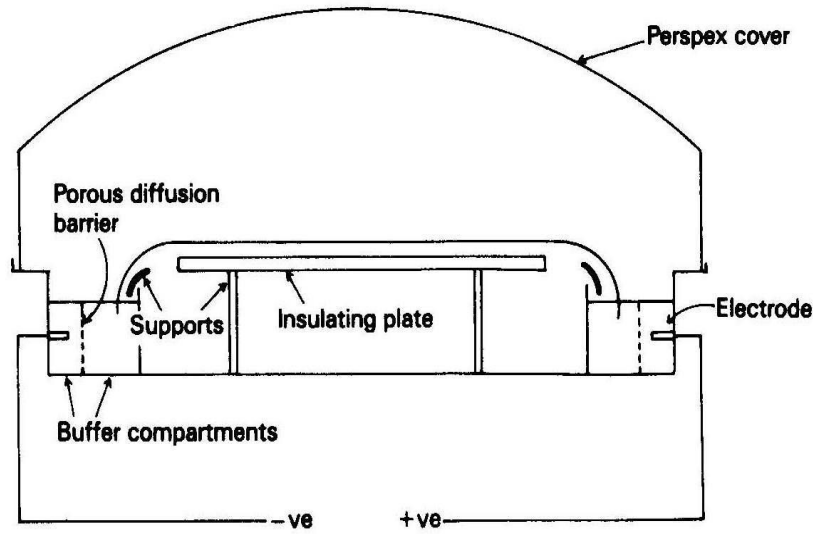
3-3-3 الأوساط الحاملة Supporting media

هناك عدة أوساط حاملة مختلفة مع تصاميم من أجهزة الرحلان الصالحة لاستخدام هذه الأوساط الحاملة، وإن التصنيف الواسع للأوساط الحاملة يتضمن الأشرطة والجل والطبقات الرقيقة، التي يجب أن تكون خاملة بصورة كلية أو يمكن أن تتمتع بفعل فيزيائي على الفصل، وهكذا نجد مواد مثل: ورق الترشيح، خلات السيليلوز،

الجل المحضر من النشاء، الآغار أو البولي إكريل أميد والطبقات الرقيقة من السيليكا والألومينا يمكن أن تستخدم كأوساط حاملة للمحلول الكهرليتي الواقي والعينة.

4-3-3 تقنيات الرحلان الكهربائي:

تتم عملية انجاز الهجرة في الرحلان الكهربائي إما بتقنية التوتر المنخفض أو التوتر المرتفع. تقنية التوتر المنخفض (LVE) Low Voltage: إن المبدأ العام لتصميم جهاز الرحلان الكهربائي باستخدام التوتر المنخفض (LVE) مبين بالشكل (3-17).



شكل (3-17) تمثيل تخطيطي لجهاز رحلان كهربائي يعمل بتقنية التوتر المنخفض (LVE)

يتضمن الجهاز بصورة أساسية حجرتين لسند الكهرليت، الإلكترودين وحامل مناسب للوسط الحامل بشكل تكون نهايتيه على اتصال مع حجرتي الكهرليت. ويتوقف تصميم الحامل على الوسط الحامل المستخدم في الهجرة (شريط ورقي، جل، كتلة، طبقة رقيقة) فالشكل السابق (3-17) ينسجم مع استخدام الأشرطة الورقية. وتجدر الإشارة إلى أن الورقة لا تغمس في حجرتي الإلكترودين لكن في حجيرات منفصلة تتصل بفتيل مع خليتي المصعد والمهبط، لأن الغاية من ذلك إعاقة انتشار منتجات التحليل الكهربائي للمحلول الكهرليتي الواقي على طول الورقة والحفاظ على الـ PH عند نهايتي الشريط. وفي التصميمات الحديثة يستعاض عن الفتيل بشبكة من الممرات الضيقة، ويغلق الجهاز بغطاء من أجل تجنب التبخر على الورقة ويتم تزويد الجهاز بنظام تبريد خارجي، كما يزود الجهاز بوحدة تغذية تؤمن 500V أو حتى 1000V و 10-15mA اللازمة لتأمين تدرج

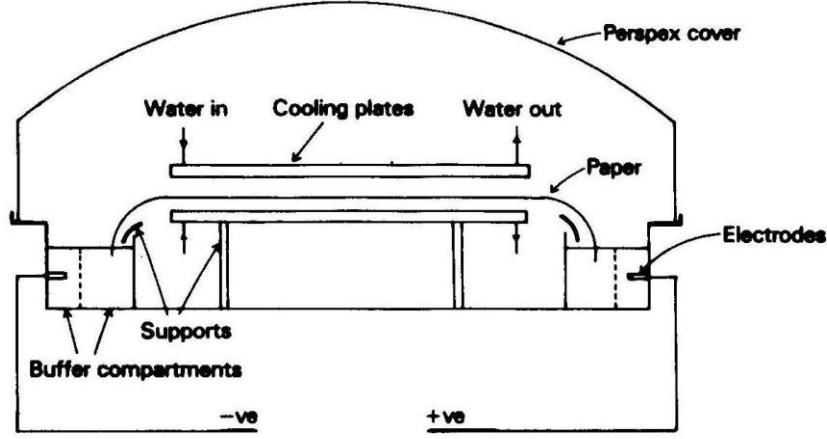
بالتوتر مقداره 5Vcm^{-1} . ويمكن أن تعمل الوحدة بنظام تيار ثابت أو توتر ثابت لكن النظام الأول يعطي نتائج أفضل.

تستخدم تقنية التوتر المنخفض بالمبدأ لفصل المواد الأيونية، وفي التطبيق العملي يكون استخدامها الرئيس لتشخيص نماذج بيولوجية وسريه للحموض الأمينية والبروتينات، ولإزالة فصل البروتينات حالياً أكثر سهولة بالرحلان الكهربائي من الكروماتوغرافيا. وهناك العديد من الأبحاث والتشخيصات الدورية للسيروم، البلازما والنماذج المماثلة التي تتم بهذه الطريقة. أما الوسط الحامل المناسب لمثل هذه العمليات من الفصل فهو شرائط من خلات السيليلوز أو أحد صيغ الجل المتنوعة. ويتم تعيين مواقع البروتينات بالتطبخ مع صباغ وتقدر كمياً بدقة جيدة بالمسح الآلي أو اليدوي. كذلك يمكن فصل السكريات في محلول واق من البورات التي تشكل معها أيونات معقدة، ويتم تحديد مواقعها بكواشف الكروماتوغرافيا المألوفة.

تقنية التوتر المرتفع (HVE) High-Voltage: إن الرحلان الكهربائي لمجموعة من المركبات ذات الوزن الجزيئي المنخفض مع تقنية LVE يبدو محدود النجاح نتيجة العجز بالتباين المنسوب لأفعال الانتشار على طول مسار الإظهار حيث يأخذ زمن الإظهار عدة ساعات، وقد قدر العديد من الباحثين أن التباين يتحسن بتخفيض زمن التحليل بصورة أكبر عند استخدام تدرج توتر مرتفع. ومع أن ازدياد معدل الهجرة يتم بصورة خطية مع ازدياد تدرج التوتر، فإن الحرارة المتولدة تزداد بشكل تربيعي، لهذا فإن تشتت الحرارة ذات أهمية بالغة في ضبط التبخر من أجل الإظهار وتطبيق تقنية HVE.

هناك ثلاثة أشكال لتطبيق طريقة HVE يتطلب الأول حشر نظم تبريد مباشرة داخل وحدة الرحلان الكهربائي كما هو مبين بالشكل (3-18) الذي يمثل جملة نموذجية عن تقنية HVE حيث تكون صفائح ماء التبريد معزولة عن وسط الرحلان الكهربائي من خلال صفيحتين من البولي اتيلين، ومع هذا النهج يمكن استخدام تدرجات بالتوتر تصل حتى 100Vcm^{-1} .

أما الشكل الثاني لهذه التقنية فيتم ببساطة عن طريق تخفيض تركيز المحلول الوافي، إذ أن تخفيضه بعشر واحد يقود إلى استخدام تدرج 30Vcm^{-1} . وفي الشكل الثالث فإنه يتطلب غمس الصفائح في سائل غير ناقل ومبادل حراري مثل ايتز البترول، المركبات الهيدروكاربونية الفلورية أو زيوت السيلكون، وهنا يمكن استخدام تدرج يصل فقط إلى $30-40\text{Vcm}^{-1}$.



شكل (3-18) نموذج وحدة رحلان كهربائي تعمل بتقنية HVE

أما فترة الإظهار النموذجية فلا تتجاوز الساعة. تعمل هذه التقنية بصورة أفضل مع الأيونات الصغيرة مثل تلك المشتقة من البيبتيدات الصغيرة والحموض الأمينية، وفي دراسات بنية البروتين يمكن الاعتماد على تقنية ثنائية الأبعاد يكون فيها البعد الثانيكروماتوغرافياً.

إضافات مدرس المقرر