3_3_12 الكتروفوريسز (أو الفصل بالأنتقال الكهربائي)
(Electrophoresis)

الكتروفوريسز هي التقنية التي ترتبط ارتباطاً قريباً مع الكروماتوغرافيا وتستعمل في الغالب بالاشتراك معه .

تعتمد عمليات الفصل بهذه الطريقة على الاختلافات في الخواص الكهربائية للمكونات في خليط . وعليه فالمواد التي غالبا يصعب فصلها بطريقة الكروماتوغرافيا تفصل بسهولة بوساطة هذه التقنية (والعكس بالعكس)

يعد الكتروفوريسز شكلا غير كامل من التحليل بالكهرباء الذي فيه تقف الدقائق المشحونة في مكان ما على طول مسارها نحو الالكترودات . يوجد نوعان من هذه التقنية :

أ- الكتروفوريسز الحر : (Free Electrophoresis)

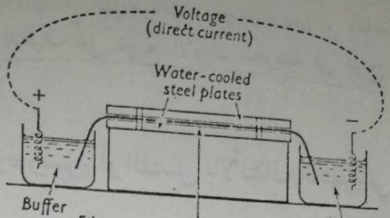
تكون المواد المفصولة في هذه التقنية في محلول . ولهذا السبب نجدها تنتشر حرة في لحظة قطع التيار الكهربائي .

ب- الكتروفوريسز المنطقة : (Zone Electrophoresis)

ينجز الفصل بهذا النوع على وسط ساند . مثل : جل النشاء (starch gel) او شرائط من ورق ترشيح .

يكون النوع الثاني محور اهتمامنا هنا .

يرسم خط بقلم الرصاص عمودياً على طول الورقة . وتطبق بقع من العينات على مواقع مؤشرة على الخط . ولكون عدم وجود مقدمة للمذيب لتقارن معها حركة كل مادة . فان الحركة عادة تقارن مع مركب قياسي هو الآخر يطبق الى خط الاصل . تبلل الورقة بعناية في محلول منظم مناسب ليحدث فصلاً . ويغمس كلا الطرفين في وعاءين من نفس المحلول المنظم بترتيب يشابه ذلك المبين في شكل (3 _ 45) .



Apparatus for high-voltage electrophoresis

شكل (3_45) جهاز الكتروفوريسر (اوجهاز الفصل بالانتقال الكهربائي ذي جهد عال

فعند مرور التيار الكهربائي يعمل الوسط الساند جسراً بين وعاءي المحلول المنظم . واي مادة في الخليط تحمل شحنة كهربائية ستنتقل نحو القطبين (سيكون الاتجاه محكوماً وفقاً لطبيعة الشحنة) .

في عدة حالات . يمكن ان تكون للجزيئات التي لاتحمل شحنة كهربائية حركة كهروفوريتية (electrophoretic mobility) حيث انها تكون ايونات معقدة مع ايونات توجد في المحلول المنظم . ويمكن فصل عدة جزيئات سكرية بهذه الطريقة . وبعد وقت مناسب يقطع التيار الكهربائي . وتزال الورقة من الجهاز .

وبعد السماح للورقة بان تجف . يمكن تحديد موقع المواد المفصولة بوساطة كاشف مشخص . اذا كانت المواد غير ملونة بطبيعتها . وبالطريقة نفسها كما وصفت لكروماتوغرافيا الورقة .

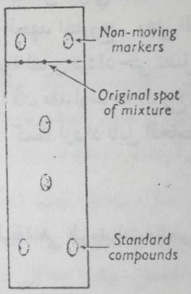
يعتمد معدل سرعة هجرة مادة خلال عملية الكتروفوريسز على عدة عوامل . مثل : الجهد المستخدم . التركيب للايون . وغيرها .

من الضروري ان يوضع على الورقة مؤشرا غير متحرك (non _ moving marker) ويعني المركب الذي لاتكون له حركة الكتروفوريتية . حيث يوجد ميل للمواد لتنتقل

باتجاه معاكس لحركتها الالـكتروفوريتية بوساطة التنافد الـكهربائي (electro _ osmosis) ويمكن تمثيل مسافة انتقال مادة (distance of migration) خلال الكتروفوريـــز بقيمتها M_x . حيث هذه المسافة المقطوعة من قبل المركب قيد الدرس من المؤشر غير المتحرك مقسمة على المسافة المقطوعة من قبل المركب القياسي X من المؤشر غير المتحرك . ويمكن توضيح ذلك من الكتروفوريتوغرام مظهر . (developed electrophoretogram) كما في شكل (3 _ 46) .

لاتعتمد الحركة الالـكتروفوريتية لمركب في خليط على المواد الاخرى الموجود فيه .

في حالات عدة يمكن اجراء الفصل للمكونات في خليط بوساطة كروماتوغرافيا الورقة باتجاه واحد وبالاقتران مع الـكتروفوريـــز بزوايا قائمة (كروماتوغرافيـــا الورقـة باتجاهين (two _ way paper chromatography) .



A developed electrophoretogram

شكل (3_46) الكتروفوريتوغرام مظهر .

ويمكن توسيع مجال الكتروفويسز بالورقة (paper electrophoresis) وذلك باستعمال شرائط خلات السللوز (cellulose acetate strips) وهذه تكون تقريباً شفافة . وتركيبها اكثر انتظاماً ومساميتها اصغر حجماً من ورقة الترشيـح الاعتيادية . وتسمح بفصل افضل بكثير منها . وباقتران هذه الصفات مع قابليه خلات السللوز لفصل كميات صغيرة من مادة تجعلها تقنية ذات قيمة خاصة في التشخيص الطبي (clinical diagnosis) والذي يتضمن بروتينات السيرم (serum proteins)

الهيموغلوبين (hemoglobins) والى غير ذلك من العوامل التي تؤثر على عملية الفصل الكهربائي : درجة التأين . تكوين المعقد وتركيز الالكتروليت وغيرها .

ان المذيب المستعمل في طريقة الانتقال الكهربائي غالباً مايكون محلول منظم يختار اعتماداً على التوازن الظاهر بواسطة الحوامض والقواعد الضعيفة واحسن مثال هو حامض الخليك :

$$CH_3COOH + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + CH_3COO^-$$

ان قيمة pK لهذا التفاعل تساوي 4.76 فعندما تكون قيمة الاس الهيدروجيني (pH) 4.76 تكون 50 % من الحامض غير متأينة بشكل CHCOOH و 50 % بشكل OAC^- واذا انخفضت قيمة الـ pH الى اقل من هذا المقدار المقدار تقل نسبة تأين الحامض تبعاً لذلك . وعندما تصبح قيمة الـ pH حوالي 2 يمكن الافتراض بان الحامض غير متأين كلياً وانه بشكل جزيئي لذلك لاتنزح الايونات (migration of ions) تحت تأثير الجهد المتدرج . وعلى العكس عندما يزيد مقدار الـ pH عن 4.76 فان النسبة المئوية للتأين تزداد حتى تصل 100 عندما تصبح الـ pH حوالي 8 . وهكذا فان مقدار سرعة النزوح يتوقف على قيم pH المحلول . فكلما ارتفع مقدار الـ pH كما ازداد تأين الحامض وازداد نزوح (انتقال) الايونات .

ان اهم المركبات المستخدمة لاغراض التحليل بهذه الطريقة هي البروتينات والحوامض الامينية مثال :

$$H_3N - \underset{\displaystyle R_1}{\underset{|}{CH}} - COOH \underset{H^+}{\overset{OH^-}{\rightleftharpoons}} H_3N^+ - \underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}} - COO^-$$

$$\underset{H^+}{\overset{OH^-}{\rightleftharpoons}} H_2N - \underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}} - COO^-$$

يلاحظ في المثال ان تحليل الحامض الاميني له علاقة مباشرة بالاس الهيدروجيني

فاذا قلت قيمة pH يتكون ايون موجب وبذلك ينتقل المركب باتجاه القطب السالب وعندما يصل الـ pH الى مقدار معين لايحدث تحلل وتسمى هذه النقطة بنقطة تساوي الجهد الكهربائي (isoelectric point) . اما اذا ارتفع الـ pH يتكون ايون سالب

وبذلك ينتقل المركب باتجاه القطب الموجب . وهنا يتبين الدور المهم الذي يؤديه المحلول المنظم ويفضل استعمال محلول منظم عضوي وذلك لسرعة تبخره بالتسخين حيث يمكن طرده تماماً من الورقة .

عندما تتكون المعقدات بين المذاب ومكونه من المذيب (المحلول المنظم) يصبح بالامكان تكوين ايونات من الجزيئات اوتغيير اشارة الايون من الموجب الى السالب . وافضل مثال للنوع الاول الكاربوهيدرات التي لاتتأين بسهولة ولكنها تكون معقدات ايونية مع ايون البورات في محلول قاعدي . لذلك يمكن فصلها بطريقة الانتقال الكهربائي . اما المعقدات السالبة فيمكن تكونها مع عدد كبير من الحوامض الاوكسجينية غير العضوية .

ان بعض المعقدات تتكون نتيجة تغيير في اشارة الايون . كما في تكوين المعقد بين الايون الفلزي وايون الكلوريد . فعندما يكون تركيز ايون الكلوريد منخفض يبقى الايون الفلزي موجب . وعندما يزداد تركيز ايون الكلوريد الى حد يتكون معقد الكلور الانيوني فان اشارة شحنة المعقد المتكون تتوقف على تركيز ايون الكلوريد الذي هو ليكاند (ligand) وعلى درجة استقرار المعقد المتكون . ان تكوين المعقدات هو اساس عملية الفصل . وهذا مماثل الى استخدام طريقة التبادل الايوني لفصل الايونات الفلزية والتي تستند على الفرق في درجة استقرار المعقدات المتكونة .

ان وجود الالكتروليت اساسي جداً في طريقة الانتقال الكهربائي اذ انه بالاضافة الى عمله كمنظم وعامل معقد فهو ضروري جداً لنقل التيار الكهربائي . ومن جهة اخرى فان تركيز الالكتروليت العالي يمكن ان يكون غير مفيد لان حركة الايونات (ionic mobility) تتناسب عكسيا مع الجذر التربيعي للشدة الايونية (ionic strength) اذ انه كلما زادت الشدة الايونية يقل تنقل الايونات .