الرحلان الكهربائي Electrophoresis

تعريف الرحلان الكهربائي Description of Electrophoresis

-الفصل بالرحلان الكهربائي : هو طريقة فصل تعتمد على فصل الجزيئات المشحونة بالاعتماد على اختلاف سرعة انتقالها بتأثير حقل كهربائي مطبق.

- لقد تم تطوير طريقة فصل للجزيئات العملاقة من قبل العالم السويدي Arne Teselius في عام 1930 حين فصل بروتينات المصل بتقنية الرحلان الكهربائي الحدودي frontier electrophoresis.

- يستخدم الرحلان الكهربائي بكثرة لفصل الحموض الأمينية, البروتينات, الببتيدات, الحموض النووية, النكليوتيدات والكاتيونات والأنيونات العضوية واللاعضوية.

- من حيث المبدأ تتجه الكاتيونات باتجاه الكاثود وتتجه الأنيونات باتجاه الآنود.

- كلما زادت شحنة الجزيئة وقل حجمها – أي كلما زادت نسبة الشحنة إلى الحجم- كلما هاجرت الجزيئة بسرعة أكبر من سرعة هجرة الجزيئة ذات الحجم الكبير والشحنة الصغيرة وباختلاف هذه السرعات تنفصل الجزيئات عن بعضها .

الرحلان الكهربائي بالمناطق Zone Electrophoresis

-هناك عدة أنواع للرحلان الكهربائي غير أن أكثرها استخداماً هو الرحلان الكهربائي بالمناطق Zone Electrophoresis.

- في الرحلان الكهربائي بالمناطق يتم حامل العينة على حامل supporter معين وحسب الحامل يكون هناك عدة أنواع للرحلان الكهربائي بالمناطق.

- أكثر الحوامل استخداماً: النشاء starch gels وكذلك الورق paper والبولي أكريل أميد polyacrylamide gels.

- لقد كان الرحلان الكهربائي بالمناطق على النشاء هو الأكثر استخداماً غير أن استخدام البولي أكريل أميد قد حل محله حالياً.

- في الرحلان الكهربائي بالمناطق تجهز عجينة من الحامل بشكل صفيحة وتوضع العينة بشكل عصابة ضيقة أوبقعة في منتصف المسافة بين نهايتي الصفيحة وكذلك الشواهد. وتغطس الصفيحة في محلول ناقل للتيار غالباً مايكون محلول وقاء.

-عندما يمر التيار الكهربائي تهاجر الجزيئات باتجاه القطب المعاكس لشحنتها بسرعات تختلف حسب حجم وشحنة الجزيئات مما يؤدي لفصلها.

- تكون نتائج الفصل بشكل سلسلة من العصابات أو البقع المنفصلة.

- يتم كشف العصابات أو البقع عيانياً إذا كانت ملونة وإن لم تكن ملونة ترذ الصفيحة بكاشف كيميائي يشكل معقداً ملوناً مع المادة المفصولة وإن لم يكن ذلك ممكناً وكانت البقع متألقة يفحص تألقها بالأشعة فوق البنفسجية.

- غالباً مايستخدم الرحلان الكهربائي العادي بالمناطق في التحليل الكيفي وفي حال أردنا استخدامه في التحليل الكمي يجب استخدام جهاز قارىء الصفائح densitometer الذي يقيس كثافة لون العصابة الذي يكون متناسباً مع تركيز المادة المفصولة. غير أن الرحلان الكهربائي الشعري هو الأكثر استخداماً في التحليل الكمي.

- يستخدم الرحلان الكهربائي بالمناطق في الكيمياء الحيوية والكيمياء الحيوية السريرية

على نطاق واسع في فصل البروتينات والحموض الأمينية.

-لدراسة فصل الحموض الأمينية بالرحلان الكهربائي بالمناطق نجد أن هذه المركبات يمكن أن تحمل شحنة موجبة للوظيفة الأمينية أو شحنة سالبة للوظيفة الحمضية وهذا يعتمد على pH محلول الوقاء المستخدم.

- في pH معينة تصبح شحنة الحمض الأميني صفر فيشكل أيون ثنائي الشحنة zwitterion وهذه ال pH هي pH نقطة التعادل الكهربائي isoelectric point pH (pH_i). في ال pH_i لايملك الحمض الأميني قدرة على الهجرة ضمن الحقل المطبق حيث تكون سرعته مساوية للصفر.

العوامل المؤثرة على الفصل بالرحلان الكهربائي:

1- شدة الحقل المطبق

2- شحنة الجزيئة

3- حجم الجزيئة 4- لزوجة الوسط

5- pH الوسط

-تؤثر العوامل الأربعة السابقة في سرعة الرحلان أما العامل الخامس (pH الوسط) فيؤثر في جهة الرحلان فقط.

الرحلان الكهربائي الشعري Capillary Electrophoresis (CE)

-حتى بداية الثمانينات لم يتم إجراء الرحلان الكهربائي في عمود. غير أن العلماء اكتشفوا في مطلع الثمانينات سهولة إجراء الرحلان الكهربائي ضمن عمود شعري مدمج مع السيليكا لفصل الكميات الزهيدة وسميت الطريقة بالرحلان الكهربائي الشعري.

-تكون حركة الجزيئة في الرحلان الكهربائي الشعري محصلة لنوعين من الحركة:

- الحركة بالرحلان Electrophoretic mobility (μ_{ep}): هي مقياس لقدرة الجزيئة على الحركة في وسط ناقل بتأثير الحقل المطبق.

- تيار الحلول الداخلي Electroosmotic flow : هو حركة السائل الناقل بتأثير الحقل المطبق

جهاز الرحلان الكهربائي الشعري
Instrumentation for capillary electrophoresis (CE)

- يتألف جهاز الرحلان الكهربائي الشعري من عمود شعري مدمج مع السيليكا يبلغ طوله 40-100 سم أما قطره فهو 10-100 ميكروميتر تكون نهايتي العمود مغموستين ضمن وعائين يحويان محلول الوقاء وكذلك يكون العمود مملوء أيضاً بمحلول الوقاء.

-يتم إدخال العينة من إحدى نهايتي العمود في حين يتصل المتحري في النهاية الثانية

- يطبق على العمود حقل كهربائي من رتبة 5-30 كيلو فولط يطبق من خلال الكترودين مغموسين في محلول الوقاء.

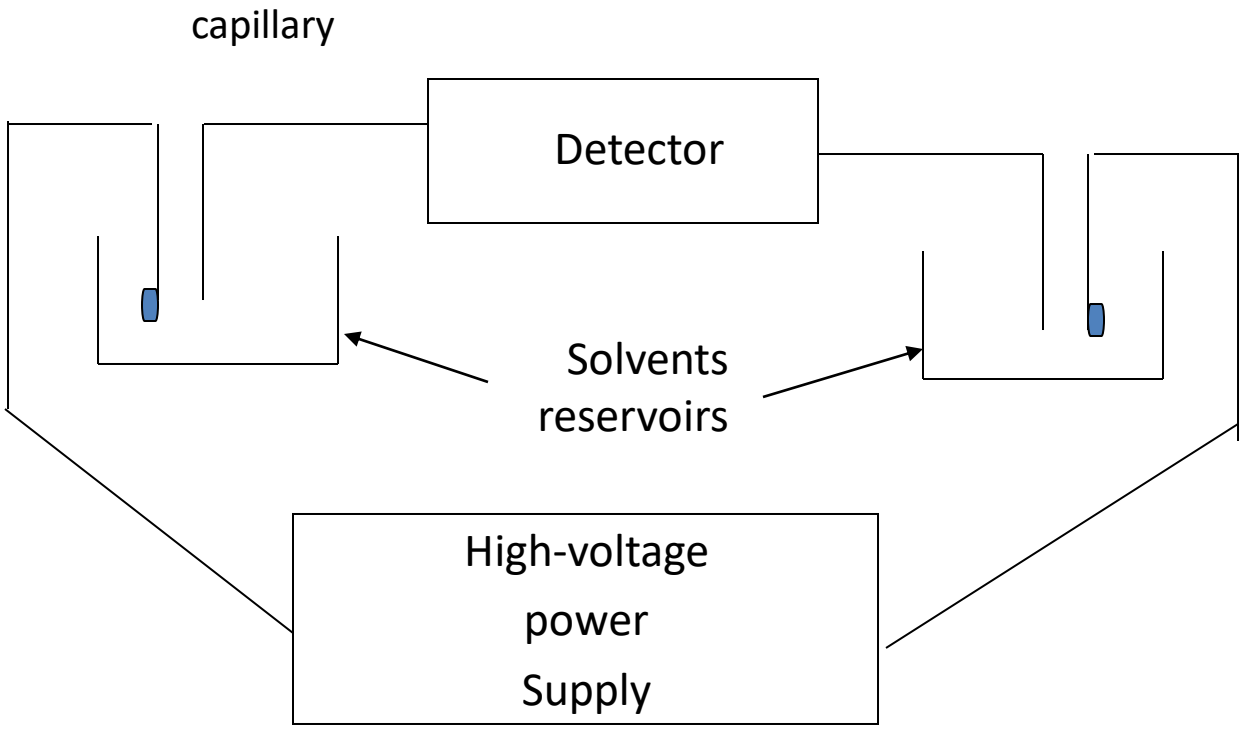
- أهم المتحريات المستخدمة في جهاز الرحلان الكهربائي الشعري:

1- الامتصاص في مجال ال UV 2- التألق 3- مقياس الأمبير

4- مقياس الناقلية الكهربائية

يظهر المخطط التالي شكلاً مبسطاً لجهاز الرحلان الكهربائي الشعري.

Schematic of CE



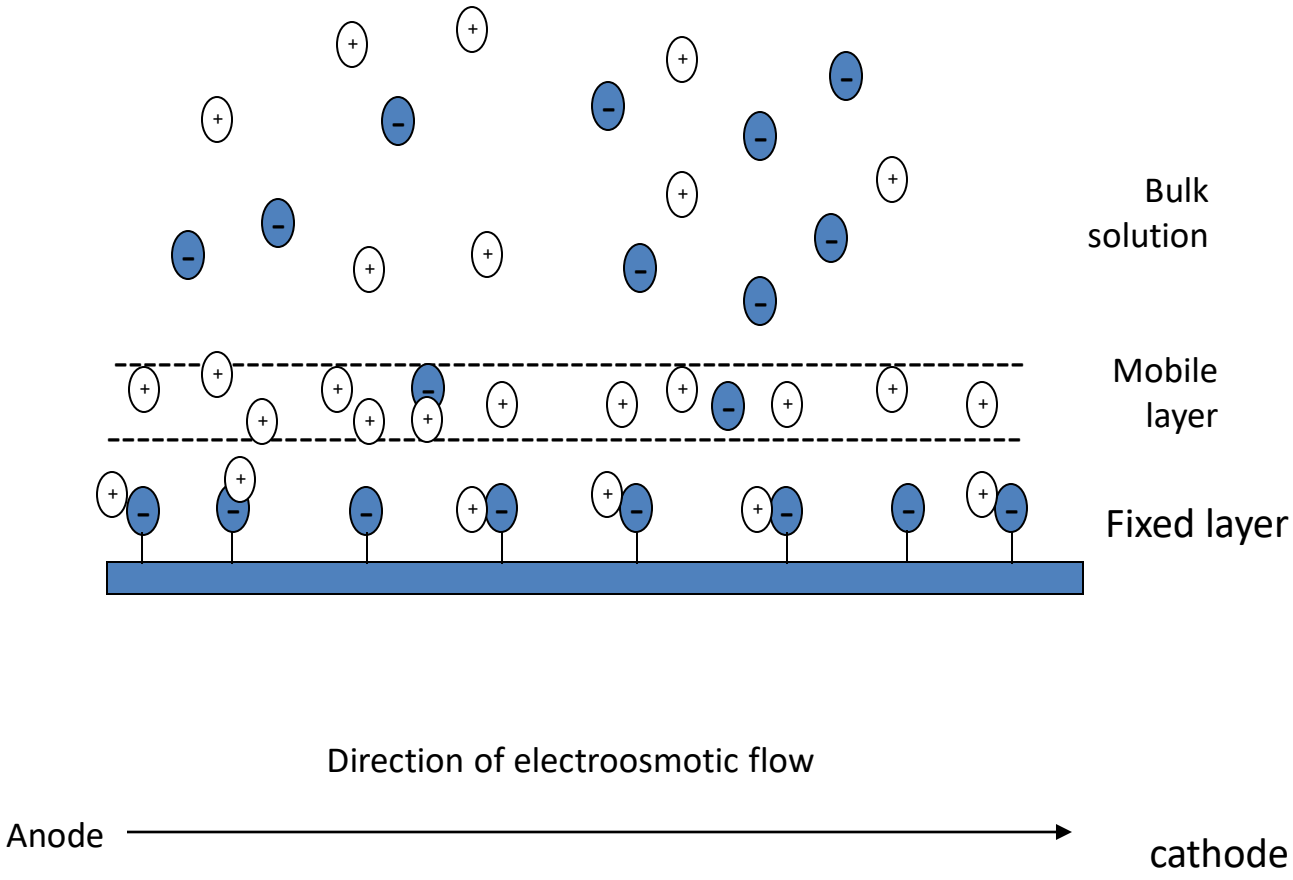
هذا وتكون نتائج الفصل بشكل مخطط بياني يدعى مخطط الرحلان الكهربائيelectropherogram يكون مكوناً من مجموعة من القمم تتحدد مواقعها بزمن الهجرة migration time ويتناسب ارتفاعها مع تركيز المادة المفصولة

تيار الحلول الداخلي The Electroosmotic Flow

-ينشأ تيار الحلول الداخلي لأن الجدران الداخلية للعمود الشعري تكون مشحونة. حيث أن الجدار الداخلي للعمود يحمل عدداً كبيراً من مجموعات السيلانول.(Si-OH)

- تتحول مجموعات السيلانول في درجات pH حوالي 2 فما فوق إلى مجموعات اسيلانات المشحونة سلباً.($Si-O^-$)

- تنجذب كاتيونات محلول الوقاء القريبة من جدار العمود باتجاه السيلانات فترتبط بها بقوة مشكلة طبقة داخلية ثابتة في حين يكون ارتباط الكاتيونات البعيدة مع السيلانات ضعيفاً فتشكل طبقة خارجية متحركة. تشكل الطبقتان معاً الطبقة المضاعفة أو طبقات هلمولتز Helmoltze layers. تتجه الكاتيونات في الطبقة الخارجية باتجاه الكاثود ولأنها منحلة في الوقاء تسحب معها كامل المحلول باتجاه الكاثود.


Bulk solution
Mobile layer
Fixed layer
Direction of electroosmotic flow
Anode
cathode

الدراسة النظرية للعوامل المؤثرة على الرحلان الكهربائي
Theory of Capillary electrophoresis

-تدعى السرعة التي تتحرك بها الجزيئة المشحونة بتأثير الحقل الكهربائي بسرعة رحلان االمادة, ν_{ep} electrophoretic velocity, وتحسب من العلاقة التالية:

$$\nu_{ep} = \mu_{ep} E$$

حيث μ_{ep} هي حركة الجزيئة بالرحلان أي بتأثير الحقل المطبق في حين تمثل E شدة الحقل المطبق.

-غير أن الحركة بالرحلان تعطى بالعلاقة التالية:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

وبالتالي سرعة هجرة الجزيئة تعطى بالغلاقة

$$v_{ep} = \frac{q \times E}{6\pi\eta r}$$

- حيث تمثل q شحنة الجزيئة وتمثل η لزوجة الوقاء وتمثل r نصف قطر الجزيئة.

الرحلان الكهربائي الشعري بالمذيلات
Micellar Capillary Electrophoresis

- لقد بقي استخدام تقنية الرحلان الكهربائي الشعري محدوداً بسبب الاعتقاد بعدم قدرته على فصل المركبات غير المشحونة. غير أن الرحلان الكهربائي بالمذيلات تغلب على هذا الاعتقاد وذلك بإضافة عامل فعال على السطح إلى محلول الوقاء مثل دوديسيل سلفات الصوديوم sodium dodecylsulfate (SDS).

-يملك ال SDS ذيلاً كارهاً للماء ورأساً محباً للماء مشحوناً بشحنة سالبة

- عندما يكون تركيز ال SDS كافياً في محلول الوقاء تتشكل مذيلة من تجمع 40 – 60 جزيئة من ال SDS بحيث تتجه فيها الرؤوس نحو الخارج في حين تتوضع الذيول في الداخل فتكون شحنة المذيلة سالبة لذلك تتجه باتجاه الآنود بسرعة أقل من سرعة تيار الحلول الداخلي.

المواد العضوية غير القابلة للشحن تنحل بقوة في الجزء الكاره للماء من المذيلة وترحل معها باتجاه الآنود بسرعة أقل من سرعة تيار الحلول الداخلي

استخدامات الرحلان الكهربائي الشعري
Applications of capillary electrophoresis

يستخدم الرحلان الكهربائي الشعري في التحاليل التالية:

1- في فصل المركبات الحيوية كالبروتينات والحموض الأمينية والنووية والهرمونات والكاتيكول أمينات...الخ

2- في فصل العديد من المركبات الدوائية كالفيتامينات

3- في فصل الإيزوميرات

4- في فصل مركبات الحاوية ذرة كيرال