بين الأحماض الأمينية. بالإضافة إلى ذلك إذا احتاجت مشتقات الأحماض الأمينية إلى خطوة استخلاص فإن بعض الأحماض الأمينية يمكن فقدها جزئيا. وهذا يؤدى إلى تغيير فى تركيب محتوى الأحماض الأمينية وبالتالى الحصول على نتائج غير صحيحة.

المشـــكلة الثانيـــة

تتمثل فى المجاميع الفعالة الأخرى الموجودة فى السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية فتكون الاستجابة قليلة لأحماض السيستئين، الليسين والهيدروكسى ليسين. أيضا يمكن للحمض الأمينى الواحد أن يعطى أكثر من Peak بدلا من Peak واحد بسبب تكون مشتقات مختلفة.

المشـــكلة الثالثـــة

تتمثل فى العينة نفسها Matrix of the sample. فمن النادر ما توجد عينة تحتوى فقط على أحماض أمينية ماعدا المخلوط القياسى للأحماض الأمينية. وقد تتداخل مكونات العينة مع الجواهر المستخدمة لتقدير مشتقات الأحماض الأمينية، وبالتالى نحصل على نتائج غير دقيقة.

سابعا: آلية فصل الأحماض الأمينية باستخدام المبادلات الآيونية

ان استخدام المبادل الكاتيونى Cation exchanger (طور ثابت) مع تغيير فى درجة حموضة pH المحلول المنظم (طور متحرك) فإنه يمكن فصل مدى واسع من الأحماض الأمينية، وهذه هى الفكرة الأساسية التى يعتمد عليها جهاز تحليل الأحماض الأمينية.

وفيما يلى توضيح أكثر لكروماتوجرافيا التبادل الأيونى:-

كروماتوجرافي التبادل الآيوني Ion-exchange chromatography

يعتمد الأساس فى هذا النوع الكروماتوجرافى على الانجذاب Attraction ما بين الشحنات المتضادة فى الجزيئات، حيث تحتوى العديد من المواد الحيوية مثل الأحماض الأمينية والبروتينات على مجاميع قابلة للتأين Ionizable.

وفى الحقيقة أنها تحمل محصلة شحنات Net charge إما موجبة أو سالبة، وتستخدم فى فصل مخاليط هذه المركبات. وتعتمد محصلة الشحنات لهذه المركبات على درجة حموضة محلول الوسط pH وكذلك على نقطة التعادل الكهربى للمركب. ويوجد نوعان من المبادلات الآيونية:

مبادل كاتيوني Cation ومبادل انيوني Anion.

تحمل المبادلات الكاتيونية مجاميع محملة بشحنات سالبة، وبالتالى تتجذب الى الجزيئات المحملة بشحنة موجبة. ويطلق فى بعض الأحيان على هذه المبادلات اسم المواد المبادلة للأيونات الحمضية Acidic ion exchange mate-rials، حيث أن الشحنات السالبة لها تنتج من تأين المجموعات الحمضية. تنجذب المبادلات الآنيونية التى تحتوى على شحنات موجبة إلى الجزيئات المحملة بشحنة سالبة. ويستخدم اصطلاح المواد المبادلة للآيونات القاعدية Basic ion exchang materials حيث أن الشحنات الموجبة ناتجة من تأين المجموعات القاعدية.

نوع المبادل	المجاميع الفعالة	صفة التأين للمبادل	المبادل
مبادل أيونى حمضى	حامضية	سالب	كاتيونى
مبادل أيونى قاعدى	قاعدية	موجب	انيونى

توضع المبادلات الآيونية فى أعمدة لفصل مخاليط آيونية. وفى حالة وجود طور متحرك يحتوى على آيونات العينة الذى يمر خلال عمود يحتوى على مبادل آيونى فيحدث توزيع تنافسى للآيونات ما بين المبادل الآيونى والطور المتحرك ويعتمد معدل تحرك الأيونات خلال العمود على تآلفها النسبى Relative affinity، ويعتمد وقت الظهور R_t فى التحاليل التى تعتمد على المبادل الأيونى على عدة عوامل تشمل:-

١- حجم ونوع الشحنة فى آيونات العينة.

٢- درجة حموضة pH الطور المتحرك.

٣- التركيز الكلى ونوع الآيونات فى الطور المتحرك.

٤- وجود مذيبات عضوية مثل الميثانول فى الطور المتحرك.

٥- درجة حرارة العمود (درجة حرارة الأطوار الثابتة والمتحركة).

٦- معدل سريان الطور المتحرك.

والجدير بالذكر أن خاصيتى الأدمصاص والتوزيع تلعب دورا جزيئا Some Part فى الفصل باستخدام أعمدة المبادلات الآيونية. ولهذا فمن الصعب التنبؤ بسلوك أعمدة المتبادلات الآيونية فى بعض التحليلات، على العكس من الكروماتوجرافى السائل.

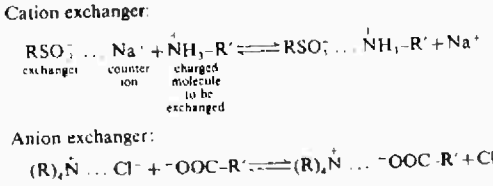
وتتم آلية التبادل الآيونى عن طريق خمس نقاط واضحة وهى:-

١- الانتشار الآيونى إلى سطح المتبادل. وتحدث هذه العملية بسرعة فى المحاليل المتجانسة.

٢- الانتشار الآيونى خلال تركيب جسم الـ Matrix المبادل إلى مواقع التبادل Exchange sit. وتعتمد هذه الخطوة على مدى الروابط العرضية

Cross linkage للمبادل وتركيز المحلول وهذه العملية هى أساس التحكم فى مدى عملية التبادل الآيونى الكاملة بذاتها.

٣- تبادل الآيونات عند موقع التبادل، تحدث هذه العملية فى الحال Instan-taneously ويتم خلالها الإتزان.



٤ - انتشار الأيون الذى تم مبادلته Exchanged خلال المتبادل إلى السطح.

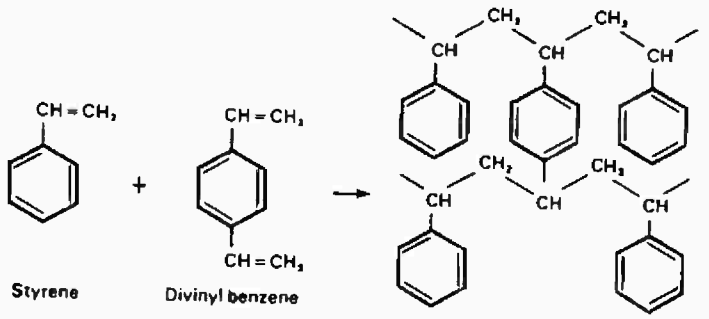
٥ - الذوبان الاختيارى Selective desorption بواسطة المذيب ثم انتشاره الى المحلول الخارجى. وتعتمد عملية الذوبان الاختيارى للجزىء المرتبط على التغيرات فى درجة حموضة الوسط والتركيز الآيونى أو بواسطة تآلف الاستخلاص Affinity elution.

٧-١- تحضير مواد التبادل الآيوني

توجد عدة مواد مبادلة للأيونات Ion-Exchanger تجاريا تستخدم بنجاح فى فصل المواد الحيوية. وتحضر هذه المواد من الأستيرين مع ثنائى فينايل البنزين. ومركب عديد الأستيرين هو مركب عديد البلمرة، جزيئاته مرتبة فى خط مستقيم Linear polymer ويذوب فى العديد من المذيبات ويتكون نتيجة لتكثف الأستيرين مع ثنائى فينايل البنزين، جزيئات لها روابط عرضية هى التى تجعل الراتنج غير ذائب.

وتعتمد درجة تكوين الروابط العرضية Cross linkage على النسب المختلفة من ثنائى فينايل بنزين والأستيرين فاذا كانت نسبة المكون الأول أعلى من الأستيرين فانه يعطى مركب له روابط عرضية عالية.

والراتنجات ذات الروابط العرضية القليلة تسمح بنفاذ Permeable الجزيئات ذات الوزن الجزيىء الكبير عن الراتنجات ذات الروابط العرضية الكثيرة. وعند اجراء السلفنة Sulphonation للروابط العرضية لعديد الأستيرين فإنه يعطى راتنج مسلفن Sulphonated polystyrene مثل Dowex 50 الذى هو متبادل حمضى قوى حيث تتأين مجموعة السلفونيك ($-SO_3H$) على مدى واسع من درجة الحموضة pH ماعدا درجة الحموضة المنخفضة جداً. ويحضر المبادل القاعدى القوى عن طريق تفاعل الروابط العرضية مع كلوروميثايل إيثر ثم تفاعل مجاميع الكلورو مع أمينات ثلاثية. والمجموعات- $CH_2-N^+-(CH_3)_3$ Cl^- تتأين على درجات حموضة واسعة ماعدا درجة حموضة وسط عالية. وتمتاز جميع المواد المبادلة بأن لها سعة تبادلية كلية Total exchange capacity محددة، والتى تعرف بأنها عدد ملليمكافئات الآيونات القابلة للتبادل لكل جرام من المبادل أو لكل وحدة حجم من الراتنج الممتزج بالماء Hydrated resin وعلى ذلك فالسعة التبادلية للراتنج Bio- rad. AG-x4 تساوى ١,٢ ملليمكافىء لكل سم٣ وللمبادل DEAE- sephadex A2 له سعة تبادلية تساوى ٠,٥ ملليمكافىء لكل سم ٠,٣ وفى بعض الأحيان يستخدم اصطلاح السعة المتاحة Avaliable capacity للدلالة على السعة المتاحة لمركب معين مثل الهيموجلوبين، فالراتنج DEAE-sephadex A25 له سعة متاحة للهيموجلوبين تقدر بـ ٠,٠٧ جم/ سم٣ وتدل السعات التبادلية على درجة الاستبدال للراتنج، ومن ثم تعطى وسيلة ارشادية على مدى مجال الاستخدام. ومن ذلك يتضح أن الراتنجات تختلف فيما بينهما تبعا:



Co- polymerization of styrene and divinylbenzene.

١- حجم الجسيم Matrix

٢- درجة الروابط العرضية.

٣- درجة السلفنة.

يعبأ العمود بجزيئات صلبة من مادة سلفونات عديدة الأستيرين Sulpho-nate poly styrene سبق اتزانها Equilibrated مع محلول صودا كاوية. وفى هذه الحالة نجد أن مجموعات حمض السلفونيك تكون محملة كاملا بكاتيون الصوديوم (Na^+). وهذه الصورة من الراتنج تعرف باسم الصورة الصوديومية Sodium form. ويمكن تحضير الراتنج فى الصورة الهيدروجينية Hydrogen form عند غسيله بحمض. وتحدث عملية التبادل للأحماض الأمينية كما فى المعادلات التالية:

$$\text{Matrix-SO}^-_3\text{Na}^+ + \text{H}_3\text{N}^+\text{-CHR-COOH}$$
$$\uparrow\downarrow$$
$$\text{Matrix-SO}^-_3\text{H}_3\text{N}^+\text{-CHR-COOH} + \text{Na}^+$$

ومن ذلك يتضح أن فصل الأحماض الأمينية يعتمد بصفة عامة على:

١- إختلاف شحنات الأحماض الأمينية والذى يعتمد على قيم ثوابت الانقسام (pK) للسلاسل الجانبية (R).

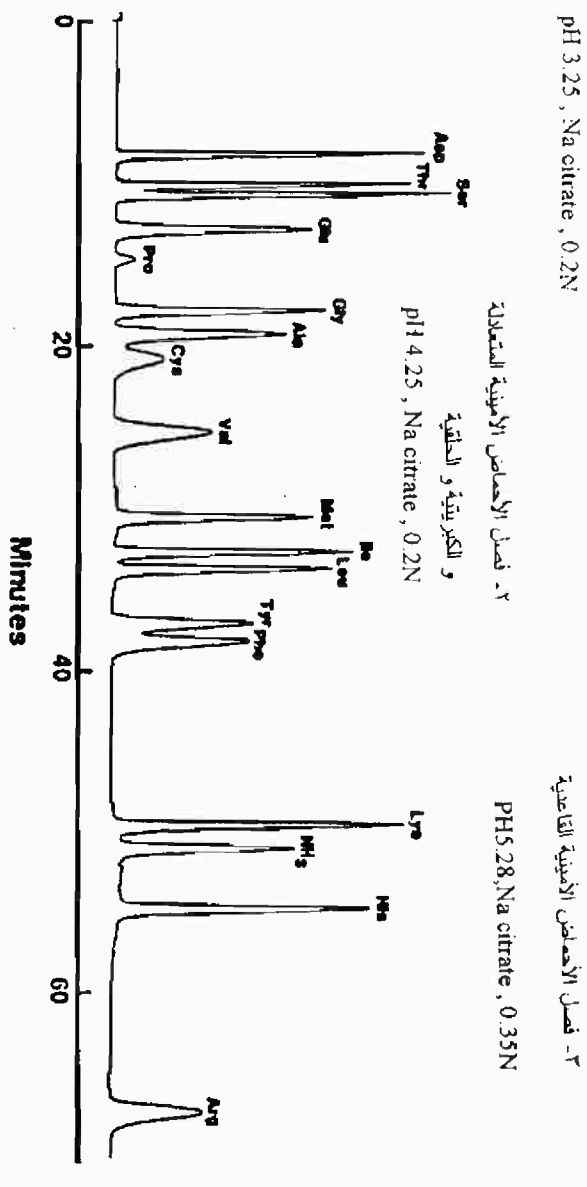
٢- تفاعل السلاسل الجانبية الكارهة للماء الخاصة بالمبادل الآيونى عديد الأستيرين مع الأحماض الأمينية. يضاف محلول حمضى (pH=3.0) من خليط الأحماض الأمينية إلى الراتنج فى الصورة الصوديومية. وعند درجة الحموضة هذه فإن جميع الأحماض الأمينية تحمل شحنة موجبة، أى لا يحدث تبادل آيونى أو ارتباط، فى حين تميل الأحماض الأمينية الكاتيونية Cation amino acids إلى أن تحل محل بعض أيونات

الصوديوم الموجودة فى جزيئات الراتنج. وأن كمية الإحلال Displace-ment تختلف بدرجة قليلة Slightly بين الأحماض الأمينية المختلفة نظراً للاختلافات فى درجة التأيين.

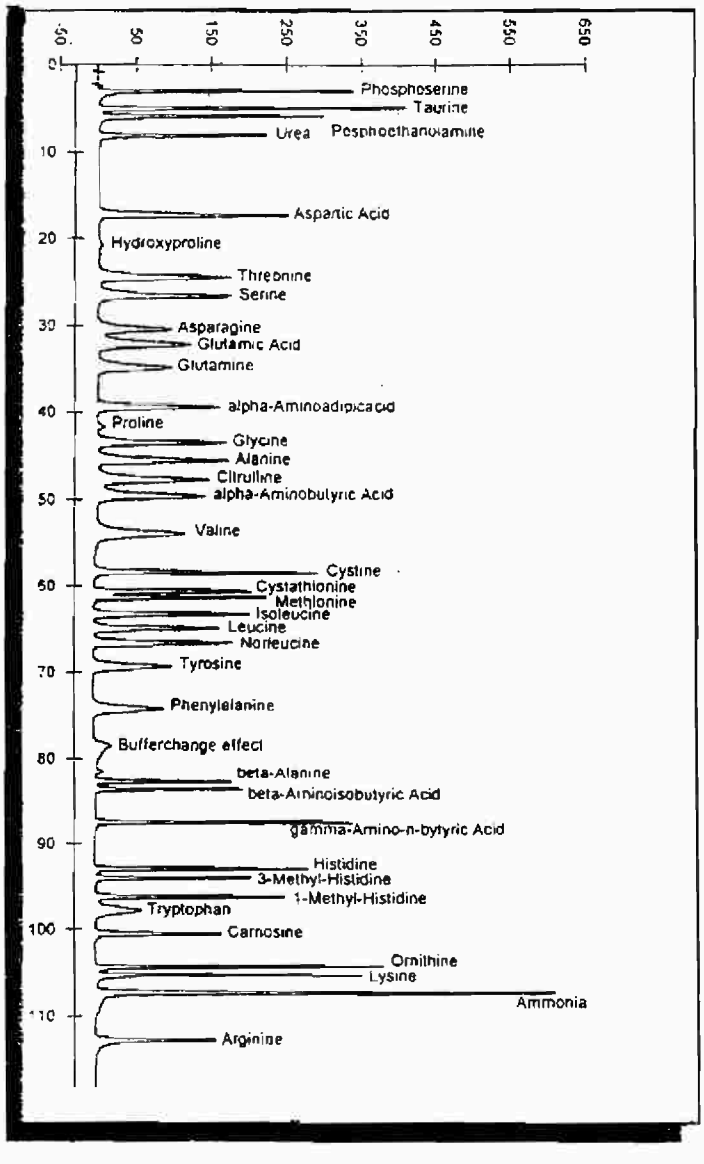
فعند درجة حموضة ٣ فإن أغلب الأحماض الأمينية القاعدية (ليسين- أرجنين- هستدين) ترتبط بقوة مع الراتنج بواسطة قوى الكتروستاتيكية، وتستخلص عند درجة حموضة ٩-١١. بينما أغلب الأحماض الأمينية الحمضية (جلوتاميك- أسبارتيك) ترتبط بقوة ضعيفة فيحدث احلال لها أولاً ثم يتبعها الأحماض الأمينية المتعادلة مثل الجليسين والفالين.

وحيث أن درجة حموضة محلول الإحلال Eluting solution ترتفع تدريجياً وكذلك تركيز كلوريد الصوديوم، فان الأحماض الأمينية تتحرك إلى أسفل العمود بمعدلات مختلفة بحيث تكون فى المقدمة الأحماض الأمينية الحمضية ثم المتعادلة ثم القاعدية. ويمكن جمعها على هيئة أجزاء صغيرة كثيرة Many small fractions والتى يجرى تقديرها كمياً بالتفاعل مع النهيدرين. والشكل التالى (صفحتى ١١١، ١١٢) يبين تتابع فصل الأحماض الأمينية.

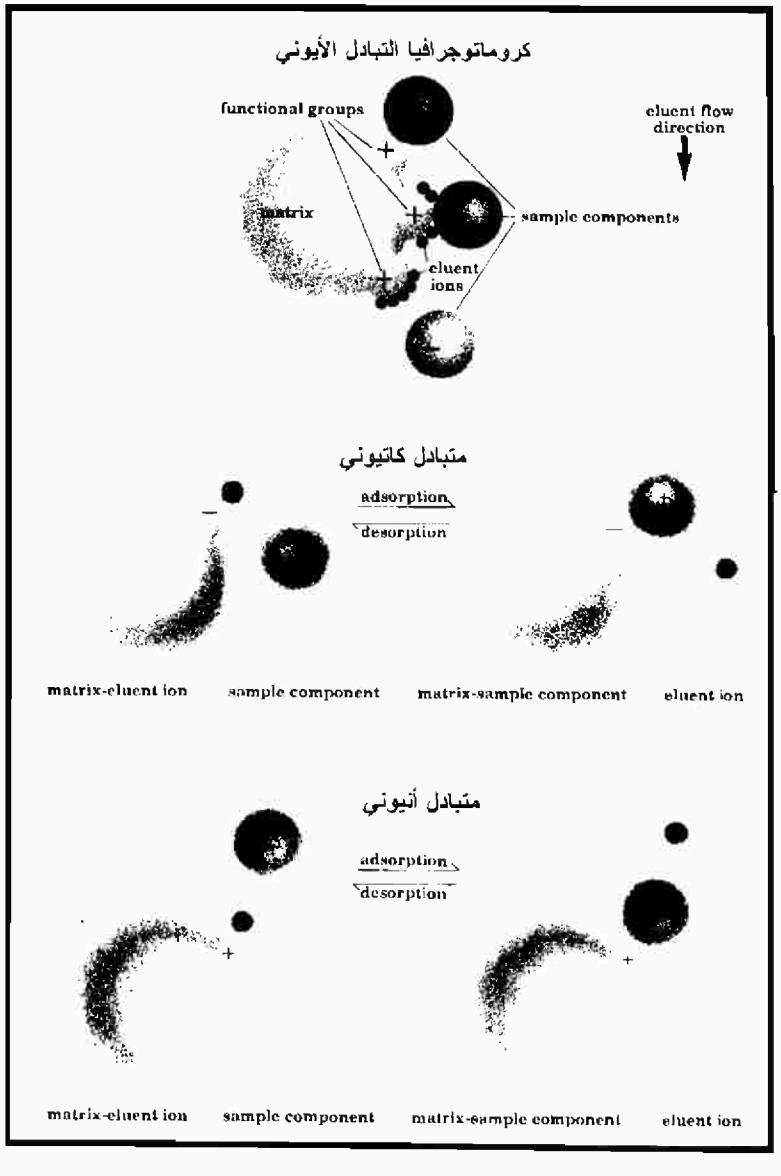
من المعروف أن بعض الأحماض الأمينية تحمل شحنة سالبة (حامضية) والبعض الآخر يحمل شحنة موجبة (قاعدية) وأن درجة حموضة الوسط تلعب دورا هاما فى اختلاف الشحنات على جزيئات الأحماض الأمينية- وفى حالة فصل الأحماض الأمينية بواسطة التبادل الأيونى يحدث ادمصاص عكسى Re-versible adsorption على جسم صلب Matrix مشحون (المتبادل الأيونى Ion exchanger) وتوجد بين الأحماض الأمينية والجسم الصلب اختلافات فى قوة الإدمصاص حيث تستخلص Elute بعض الأحماض الأمينية بسرعة والبعض الآخر ببطء معتمدة على عدد الشحنات المتاحة فى الأحماض الأمينية والجسم المختلف فى نوع الشحنة.



كروماتوجرام يبين تتابع فصل الأحماض الأمينية
الناتجة من التحليل المائى للبروتينات



الكروماتوجرام التالى يبين تتابع فصل الأحماض الأمينية وبعض المركبات الأمينية الموجودة عادة فى السوائل الحيوية بإستخدام محاليل منظمة سترات الليثيوم ذات درجات حموضة مختلفة.


كروماتوجرافيا التبادل الأيوني
functional groups
eluent flow direction
matrix
sample components
eluent ions
متبادل كاتيوني
adsorption
desorption
matrix-eluent ion
sample component
matrix-sample component
eluent ion
متبادل أنيوني
adsorption
desorption
matrix-eluent ion
sample component
matrix-sample component
eluent ion

وفى حالة الإدمصاص العكسى Desorption فإن أيونات الطور المتحرك تتنافس مع الأحماض الأمينية فى العينة المدمصة على الجسم الصلب المخالف فى نوع الشحنة أو بمعنى آخر إن مكونات العينة المرتبطة على الجسم الصلب تتبادل مع أيونات الطور المتحرك الذى له نفس نوع الشحنة- تتم عملية الإدمصاص العكسى بالإستخلاص من نوع ايزوكراتيك Isocratic أى يستخدم طور متحرك ذو تركيب ثابت أثناء التحليل أو بطريقة أخرى أكثر شيوعا وهى الإستخلاص المتدرج Gradient elution أى يتغير تركيب الطور المتحرك أثناء الفصل وهذه الطريقة لا غنى عنها Indispensable لفصل العينات الحيوية المعقدة.

والجدير بالذكر إن معظم المتبادلات الأيونيه يمكن إستخدامها مرة أخرى Reusable بعملية الإسترجاع Regeneration أى التخلص من الأيونات المرتبطة أى يجرى استبدالها لإستعادة Restore الظروف لفصل آخر. وتجرى عملية الإسترجاع بواسطة محاليل منظمة ذات تركيز عالى ويلى عملية الإسترجاع اتزان للعمود Column equilibrium بإمرار المحلول المنظم الأول خلال العمود المسترجع.

ثامنا: جهاز تحليل الأحماض الأمينية Amino acid analyzer

تقدر الأحماض الأمينية وصفياً وكمياً باستخدام عمود يحتوى على راتنج التبادل الآيونى ويمرر خلاله الطور المتحرك حاملاً معه الأحماض الأمينية المفصولة كل على حدة ثم يتفاعل مع النهيدرين ويتكون معقد لونى. والجهاز يعتمد أساساً على ضخ Pumped محاليل منظمة تختلف فى درجة حموضتها أو قوتها الآيونية Ionic strength خلال عمود الراتنج Resin column المزود بترموستات لضبط درجة حرارته. وقد حدث تطور فى الجهاز باستخدام راتنجات