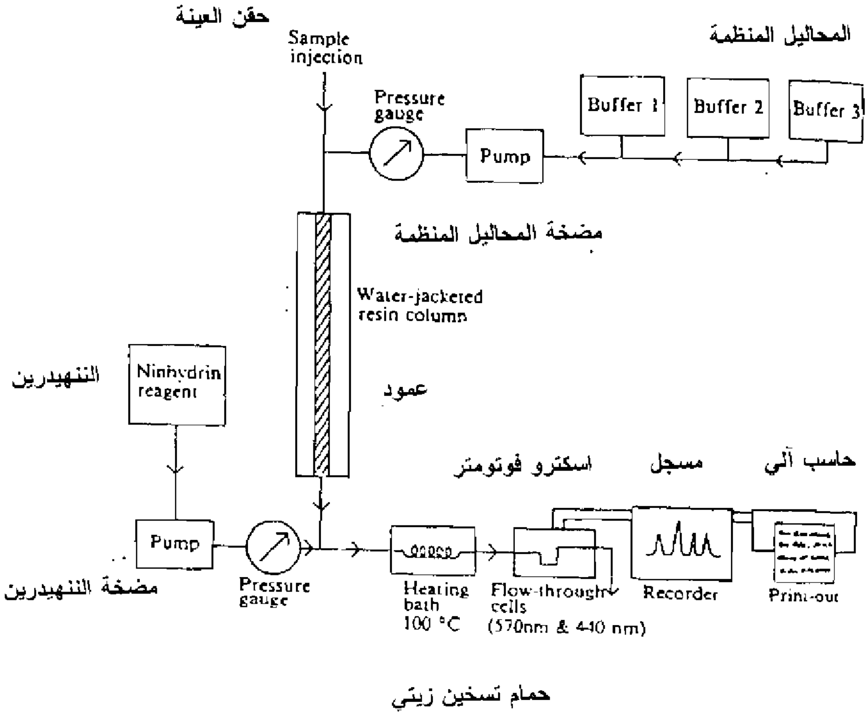
وفى حالة الإدمصاص العكسى Desorption فإن أيونات الطور المتحرك تتنافس مع الأحماض الأمينية فى العينة المدمصة على الجسم الصلب المخالف فى نوع الشحنة أو بمعنى آخر إن مكونات العينة المرتبطة على الجسم الصلب تتبادل مع أيونات الطور المتحرك الذى له نفس نوع الشحنة- تتم عملية الإدمصاص العكسى بالإستخلاص من نوع ايزوكراتيك 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 النينهيدرين 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



رسم تخطيطى لجهاز تحليل الأحماض الأمينية بإستخدام النـنهيدرين للتقدير الكمى

ذات نوعية عالية ونظام للحقن الآلى، مع أنظمة للكشف ذات حساسية عالية. وهذا أدى إلى تقليل وقت التحليل من أيام إلى ساعات. بالإضافة إلى تقديرها كمياً حتى وإن كان تركيز الأحماض الأمينية أقل من ١٠$^{-٩}$ مولر.

الشكل التخطيطى التالى يبين أجزاء جهاز تحليل الأحماض الأمينية وهى:-

١- محاليل منظمة ذات درجة حموضة مختلفة عادة يستخدم ثلاث محاليل منظمة ١، ٢، ٣ لها درجة حموضة ٣,٢٥، ٤,٢٥، ٥,٢٨ على التوالى وتعمل كطور متحرك لإحلال الأحماض الأمينية.

٢- مضخة لدفع المحاليل المنظمة داخل العمود Buffer pump.

٣- وسيلة لحقن العينة Sample injection.

٤- عمود راتنج وبه وسيلة لضبط وثبات درجة حرارة الفصل Resin column.

٥- مضخة لدفع الجوهر الكشاف ننهيدرين Ninhydrin pump.

٦- حمام زيتى Reaction coil.

٧- خلية لتقدير الكثافه اللونية للمحلول Flow cell عند الطولين الموجين ٥٧٠ و٤٤٠ نانوميتر.

٨- مسجل أو حاسب آلى Computer.

يتم الفصل داخل عمود يحتوى على مبادل كاتيونى قوى مثل (Sulphonated polystyrene resin) والذى له طبيعة تبادل أنيونى قوى ($-SO^{-}_{3}$)، وعند درجة الحموضة المنخفضة تحمل جميع الأحماض الأمينية شحنة موجبة وتنجذب إلى المجاميع السلفونية المحملة بالشحنة السالبة.

عند رفع درجة حموضة المحلول المنظم (الطور المتحرك) الذى يمر خلال العمود فإنه يحل Elute الأحماض الأمينية بمعدلات مختلفة حيث تنفصل الأحماض الأمينية بالتتابع على أساس قيم الـ PI لكل واحد منها. فعند درجة pH

٢,٥ (درجة حموضة الوسط التى يبدأ عندها الفصل) نجد أن الأحماض الأمينية التى تحتوى على مجموعة حامضية (COOH-) زائدة فى سلاسلها الجانبية لها تآلف قليل جداً مع المبادل وبالتالى هى أول الأحماض التى تخرج من العمود. عند نفس درجة حموضة الوسط المنخفضة (٢,٥) نجد أن الأحماض الأمينية التى تحتوى فى سلاسلها الجانبية مجموعات قابلة للتأين والتى تحمل شحنة موجبة مثل الليسين والهستدين ترتبط بقوة مع المبادل وتستخلص فقط من العمود عندما ترتفع درجة حموضة الوسط بدرجة كبيرة حيث تنخفض شحناتها الموجبة. يمتزج المحلول الخارج من العمود النيهيدرين (الجوهر الكشاف) ويسخن الخليط Effluent (محلول الحمض الأمينى المفصول ومحلول النيهيدرين) على درجة ١٠٥°م حيث يظهر لون تقاس شدته عند الطولين الموجبين ٥٧٠ و٤٤٠ نانوميتر.

ملخص لطريقة الفصل

١- يحقن خليط قياسى من الأحماض الأمينية وبعد إنتهاء التحليل يظهر تقرير يبين عدد الأحماض الأمينية القياسية R_t لكل حمض أمينى ومساحات الـ peaks المقابلة للأحماض الأمينية.

٢- يزود الحاسب الآلى بالـ R_t لكل حامض امينى قياسى وتركيزه.

٣- يحسب آليا معامل الاستجابة Response factor

بقسمة التركيز ÷ المساحة لكل حامض أمينى

$$\text{Amount / area} = \text{RF}$$

تحقن العينة – يقوم الحاسب الآلى اوتوماتيكيا بكتابة تقرير يبين فيه اسم الحمض الأمينى (من المعلومات السابق تغذيته بها)، الـ R_t، التركيز بالـ nM حيث تضرب المساحة فى معامل الاستجابة لكل حمض أمينى.

٤- يحول تركيز الحمض الأميني من nM الى ng بالضرب في الوزن الجزيء للحمض الأميني.

٥- يحسب تركيز الحمض الأميني على أساس mg ٪ أو أى نوع آخر للدلالة على التركيز. يجب الأخذ فى الاعتبار أى تخفيف أجرى أثناء التحليل.

٨-١ ملاحظات عامة عن فصل الأحماض الأمينية

العمود Column

من المعروف أن قاعدة الـ Peak تتناسب طردياً مع الجذر التربيعي لطول العمود، فإن الأعمدة المستخدمة المصنوعة من الصلب غير القابل للصدأ والتى طولها ٢٠ سم ومعبدأة بمبادل كاتيونى قوى تعطى Peaks ذات قواعد ضيقة، وقيم عالية لارتفاع الـ Peak، أى تفصل بوضوح الأحماض الأمينية ذات التركيب الكيميائى المتقارب.

المحاليل المنظمة Buffers

يجب إمرار تيار من النيتروجين لمنع وجود فقاقيع فى المحاليل المنظمة أثناء سريانها، ويجب أن يكون التركيب ودرجة حموضة الوسط مضبوطة إلى ٠,٠١ مول/ لتر و ٠,٠١ وحدة pH. وفى حالة الأجهزة التى يستخدم فيها عمود واحد Single column فإن تتابع الفصل يعتمد على سلسلة من المحاليل المنظمة والتى ترتفع فيها درجة حموضة الوسط عن درجة حموضة محلول البداية (٢,٣). وتستخدم سترات صوديوم أو سترات الليثيوم مصحوبة بمنظف صناعى (Brij 35) ومادة مضادة للأكسدة (Thiodiglycol) ومادة حافظة (حامض الكابريليك) ويستخدم الاحلال المرحلى Stepwise elution وفيها تدفع المحاليل المنظمة خلال العمود لفترات مختلفة بالاعتماد على نوعية الأحماض الأمينية

المراد فصلها. والمحاليل المنظمة المستخدمة لها درجات pH ٣,٢٥، ٤,٢٥، ٥,٢٨، ١٠ سواء بتركيزات مولارية ثابتة أو متغيرة لفصل الأحماض الأمينية الحمضية والمتعادله والقاعديه.

درجة الحرارة Temperature

يجب أن تكون درجة حرارة المبادل داخل العمود ثابتة حتى يمكن التغلب على التغيرات فى درجة الـ pH للمحاليل المنظمة وأيضا تأين الأحماض الأمينية. وبصفة عامة فإن زيادة درجة الحرارة تؤدى إلى سرعة الاحلال وإلى تغير نسبى فى موضع الحمضى الأمينى الذى يجرى احلاله وبالتالى يؤدى الى صعوبة تفسير النتائج. وعادة درجة الحرارة المختارة هى ٦٠°م ومع ذلك فان درجات الحرارة الأقل من ذلك تكون مطلوبة فى بعض الأحيان لفصل الأحماض الأمينية المتقاربة فى التركيب الكيميائى.

معدل السريان Column flow rate

يتطلب الفصل الناجح والحصول على نتائج متطابقة بتكرار التقدير أن يكون معدل سريان المحلول المنظم ثابتاً باستخدام ضغط ثابت أو مضخة دفع ثابتة. ويصمم هذا النوع من المضخات بأن تدفع المحاليل المنظمة بمعدل ثابت. ويعتمد اختيار معدل السريان على أساس نوع المبادل الكاتيونى وأبعاد العمود.

تحضير العينة Sample preparation

يختلف حجم العينة المحقون داخل العمود على حسب أنواع الأجهزة المتوافرة تجارياً. ففى حالة الأجهزة القديمة يتطلب حجم كبير من العينة (١ مل) نظراً لحساسيتها القليلة. وفى حالة الأجهزة الحديثة تحقن حجوم قليلة، عادة ٥٠ ميكرولتر أو أقل. ويجب معرفة أن تحضير العينة المضبوط يؤدى إلى الحصول

على نتائج متطابقة وهذا يعتمد على طبيعة العينة ومكوناتها. ويجب أن يكون محلول العينة المحقون نظيفا خال من البروتينات والجزيئات الأخرى الكبيرة. وفى حالة الفشل للوصول إلى هذه المتطلبات فإنه يؤدى إلى إنسداد الفلتر Frit الموجود أعلى عمود المبادل الكاتيونى، وبالتالى يصبح من الضرورى التخلص من المبادل وتنظيف وإعادة تعبئة العمود مرة أخرى، وهى خطوات شاقة. وبصفة عامة فإن العينات السائلة Liquid يلزم لها فقط عملية ترشيح أو طرد مركزى ولإزالة البروتينات Deproteinization فإنه يلزم ترسيبها بواسطة حمض البكريك أو حمض سلفوساليسيليك أو باستخدام (الفرز الغشائى) Dialysis أو الترشيح الفوقى. وفى حالة العينات الصلبة Solid مثل الأنسجة النباتية أو الحيوانية أو الأطعمة فإنه يتطلب التجانس فى الاستخلاص والتخلص من البروتينات. وفى حالة الببتيدات والبروتينات فانه يلزم إجراء التحليل المائى.

أولا: للحصول على الأحماض الأمينية الحرة.

يجب عند حقن العينة أن تكون مذابة فى محلول منظم ذو درجة حموضة ٢,٢ قبل بدأ فصل الأحماض الأمينية، وبعد عملية فصل واحلال جميع الأحماض الأمينية فإنه يلزم إجراء عملية إسترجاع Regeneration للمبادل الكاتيونى قبل حقن العينة التالية بإمرار محلول صودا كاوية ذو درجة حموضة ١٠. وفى الأجهزة الحديثة فإنه يتم الحقن آليا بعد تمام تحليل العينة السابقة وضخ المحلول المنظم من البداية للعينة التالية.

الكشف Detection

تعمل المضخة الثانية بالجهاز على ضخ معدل ثابت من الجوهر الكشاف ليقابل المحلول الخارج من العمود، وعند تمام التفاعل فانه تقاس الكثافة اللونية باستخدام خلية Flow cell بواسطة جهاز تقدير الألوان أو قياس الفلورة -Fluo

rimeter. وعادة يستخدم الجوهر الكشاف النـنهيدرين بعد أن يمر على ملف يسخن فى حمام زيتى على درجة ١٠٠°م. ويتعين الامتصاص على طولين موجيين ٥٧٠ و ٤٤٠ نانوميتر للأحماض الأمينية والأيمينية على التوالى. يذاب النـنهيدرين فى ايثيلين جليكول (خال من البيروكسيدات) وأحادى ميثايل إيثر (ميثايل سيليلوسولف Methyl cellulosolve) باستخدام محلول منظم الخلات عند درجة حموضة ٥,٥. ويمرر تيار من النيتروجين أثناء تحضير الجوهر الكشاف للتخلص من الهواء، وتضاف كمية قليلة من مادة مختزلة مثل كلوريد القصيدروز أو كلوريد التيتانوس Titanious chloride بحيث تكفى لتكوين كمية معينة من النـنهيدرين المختزل. ويكون لون الجوهر الكشاف ذو لون أصفر فاتح، ويجب تخزينه فى زجاجة بنية وتحت ضغط من النيتروجين نظرا لأن النـنهيدرين حساس للضوء والأكسجين.

يحتاج تفاعل النـنهيدرين إلى حرارة ولذلك يمر خليط المحلول الخارج من العمود وجوهر النـنهيدرين خلال ملف Reaction Coil من التفلون ذو قطر صغير (١ مم) ويظل على درجة حرارة ١٠٠°م فى حمام زيتى. ويجب التأكد من أن السريان غير معاق، حيث أن الحرارة الزائدة تؤدى الى ترسيب النـنهيدرين فى الملف ذو القطر الضيق مما يؤدى إلى اغلاق الجهاز تماما Stoppage.

وهناك بعض الأجهزة الحديثة تعتمد على استخدام تفاعل الفيثالدهيد، وهو يشابه تقريباً تفاعل النـنهيدرين فى كثير من الأحوال. فمثلا الجوهر الكشاف الفيثالدهيد ثابت وهو يذوب فى الماء وبالتالى يمكن الاستغناء عن الكيماويات السامة مثل التى تستخدم فى تحضير النـنهيدرين، كما لا يحتاج الأمر إلى التخزين فى جو من النيتروجين. ونظراً لأن تفاعل الفيثالدهيد يحدث بسرعة عند درجة حرارة الغرفة فإن الأمر لا يحتاج إلى التسخين على درجة ١٠٠°م فى الحمام الزيتى وبالتالى يمكن التغلب على المشاكل المتعلقة بهذه النقطة. ونظراً

لزيادة الحساسية باستخدام تفاعل الفيثالدهيد، فإنه يمكن الكشف عن تركيزات من الأحماض الأمينية تصل إلى البيكومول picomol (١٠^-١٢^).

٨-٢- تقدير الأحماض الأمينية كميا Quantitation

تختلف كثافة اللون أو الفلورة الناتجة من مول واحد من الحمض الأمينى اختلافا قليلا جداً تبعاً لنوعية الأحماض الأمينية. ولهذا ينتج عن حقن مخلوط من الأحماض الأمينية الذى يحتوى على تركيزات متساوية من كل حمض أمينى (٢٠٠ نانومول/ مل) مساحات متساوية من الـ Peaks.

يجب استخدام مادة قياسية داخلية Internal standard لكل عملية تحليل، وهذه المادة هى عبارة عن حمض أمينى غير موجود فى العينة التى يجرى تحليلها. فمثلا عند تحليل عينة بلازما الدم يستخدم نورليوليسين أو ألفا أمينو بيتا جوانيدينو حمض البيوتيريك كمواد قياسية داخلية ويجب أن تضاف بتركيز معلوم إلى العينة قبل تجهيزها وتحليلها. وعند معرفة كمية المادة القياسية فإنه يمكن معرفة تركيز الأحماض الأمينية فى العينة عن طريق معرفة مساحات الـ peaks للمادة القياسية والعينة. وفى هذه الطريقة يمكن التغلب على المشاكل التى تنشأ من فقد كمية من العينة أثناء التحضير. وكذلك اختلاف الكثافة اللونية للمحاليل المحضرة مثل النهيدرين وكذلك التغيرات فى ظروف التحليل.

ويمكن حقن خليط من الأحماض الأمينية معلوم تركيز كل حمض أمينى كل على حدة (External standard) ومنه يمكن حساب كمية أى حمض أمينى فى العينة من الحسابات التالية:-

أولاً: استخدام محلول خليط الأحماض الأمينية القياسية

عند حقن كمية معلومة من هذا الخليط فإنه يمكن استنتاج حسابياً معامل الاستجابة Response factor (RF) لكل حمض أمينى بمعرفة تركيز الحمض ومساحة الـ peak الخاص به.

معامل الاستجابة (RF) = التركيز ÷ مساحة الـ peak

ثانيا: يعرف تركيز الحامض الأميني بعد حقن العينة من المعادله التالية:-

التركيز = مساحة الـ peak x معامل الاستجابة .