

خامسا: تقدير الأحماض الأمينية في الطعام والأعلاف

أولا: الطرق الوصفية ونصف الكمية Qualitative & semiquantitative لتقدير الأحماض الأمينية:

تشمل هذه الطرق ما يلي:

أ - الكروماتوجرافى الورقى Paper chromatography

ب - كروماتوجرافى الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography

ج - طرق الهجرة فى المجال الكهربى Electrophoretic technique

د - طرق كيميائية بتكوين مشتقات للأحماض الأمينية.

١-٥- طرق الكشف عن الأحماض الأمينية (اللونية-الفلورة)

يوجد نوعان من الطرق الكيميائية للكشف عن الأحماض الأمينية وهما:

الطرق اللونية وطرق الوميض (الفلورة).

أولاً: الطرق اللونية:

تشمل هذه الطرق تفاعل الجواهر الكشاف باولى Diazotized sulphanilic acid (Pauly) مع الهستدين، التيروزين ويعطى ناتج ذو لون أحمر ويحدث هذا التفاعل أيضا مع المركبات الفينولية الأخرى- يتفاعل الجواهر الكشاف إيرليش P-amino benzaldehyde (Ehrlich) فى حمض HCl مع التريتوفان وبعض الأندولات الأخرى ويعطى لون أزرق محمر، بينما يعطى هذا التفاعل لون أصفر مع الأمينات العطرية ومركبات اليوريا Ureides ولهذا يجب التخلص اولاً من اليوريا الموجودة فى أغلب السوائل الحيوية.

ترجع أهمية الجواهر الكشافة سالفه الذكر فى تحديد أماكن الأحماض الأمينية المفصولة بواسطة طرق التحليل الكهربى وكذلك التحليل ذو الطبقة الرقيقة TLC.

يبين الجدول التالي الجواهر الكشافة المتخصصة في التعرف على أحماض أمينية معينة.

| ملاحظات | اللون الناتج | الأحماض الأمينية | التكوين وظروف التفاعل | الجواهر الكشافة |
|---|---|--|---|-------------------|
| غير متخصص - أساسي للكشف عن البرولين | أزرق غامق أزرق/ أخضر أزرق خفيف بني خفيف رمادي/ أزرق أزرق | برولين هيدروكسي برولين أسبارتيك جلوتاميك ألانين فينيل ألانين ثيروزين بيتا ألانين جلوتامين ترتوفان سيترولين | ٢ جم إيزاتين/ لتر أسيتون - التسخين على درجة ١٠٠ م لمدة ٢-٣ دقيقة | إيزاتين Isatin |
| يتفاعل مع بعض الاندولات والامينات العطرية | أزرق فاتح أحمر فاتح قرنفي/ أحمر أصفر | | ١٠٠ جم بارا ثنائي ميثايل امينو بنزالدهيد/ لتر حمض HCl مركز - يخلط حجم واحد منه مع ٤ حجوم أسيتون - يتم التفاعل في خلال ٢٠ دقيقة. | Ehrlich |

(تابع) جدول الجواهر الكشفية المتخصصة في التعرف على أحماض أمينية معينة.

| | | | | |
|---|--------------------------------------|--|--|--|
| يتفاعل مع بعض الإيميدازولينات والمركبات القبولية وأملاح الأمونيوم | أحمر برتقالي فاتح | هستدين ثيروزين | ٩ جم حمض ستانيليك/ لتر حمض HCl مركز- يخلط حجم واحد منه مع ١٠ حجم ماء، حجم واحد من نيتريت صوديوم (٥٠ جم/ لتر)، حجم واحد من كربونات صوديوم (١٠٠ جم/ لتر) ١٠٠ جم أنفا نافثول/ لتر صودا كاوية (٨٠ جم/ لتر) + حجم مساو من ثنائي الأستيل (١ مل/ لتر ماء) يخلط قبل الاستخدام- يسخن على درجة ١٠٠ م° لمدة ٢-٣ دقائق. | Pauly ثنائي الأستيل Diacetyl |
| تختفي الألوان بعد حرالي ٣٠ دقيقة | بنفسجي بنفسجي بنفسجي بنفسجي | سستين سستين هوموسستين هوموسستين | تخضّر المحاليل التالية بمعدل (١٠٠ جم/ لتر) صودا كاوية- نيتروبروسيد الصوديوم- حديدي سيانيد البوتاسيوم. يخلط حجم واحد من كل محلول سبق تخضيره بعد تخفيفه ٣ مرات بالماء وتترك لمدة ٣٠ دقيقة قبل الاستخدام - لا يحتاج التفاعل لتسخين. | نيتروبروسيد السيانيد Cyanide nitro prusside |

ثانياً: الطرق الفلورية

تفوق هذه الطرق في حساسيتها وتخصصها على الطرق اللونية وفيما يلي الطرق الفلورية التي تستخدم في التقديرات الكمية للأحماض الأمينية العطرية: تيروسين والفينايل ألانين

١- التيروسين

يتفاعل جوهر ١- نيتروزو ٢- نافثول Nitrozo-2- naphthol 1- مع التيروسين في وجود نيتريت الصوديوم ليعطي مركب أحمر غير ثابت والذي يتحول بالتسخين في وجود حمض النيتريك ليعطي مركب فلوري أصفر ثابت. وبعد التخلص من زيادة الجوهر الكشاف نيتروزونافثول يقدر المركب المفلور عند طول موجة ٥٧٠ نانومتر. وفيما يلي خطوات إجراء هذا التفاعل:

الجواهر الكشافة

- ١-١- نيتروزو - ٢- نافثول (٢ جم/ لتر إيثانول ٩٥%) ٢ حجم.
 - ٢- حمض نيتريك (٣ مول/ لتر) ٣ حجم.
 - ٣- نيتريت صوديوم (٠,١ مول/ لتر) ٣ حجم.
- تخلط هذه المكونات قبل الاستخدام مباشرة.

الطريقة:

- ١- يخلط ١٠ ميكرو لتر من العينة مع ٢٠٠ ميكرو لتر من الجوهر الكشاف نيتروزونافثول ويسخن على درجة ٣٣°م لمدة ٢٠ دقيقة.
- ٢- يضاف ١ مل ماء و ٣ مل ثنائي كلوريد الإيثيلين ويخلط ثم يجرى طرد مركزي.

٣- تزال الطبقة المائية العلوية ثم يترك ليحدث التفاعل على درجة حرارة الغرفة لمدة ٤٠ دقيقة.

٤- تقدر الفلورة في خلال ٣٠ دقيقة عند طول موجة ٥٧٠ نانومتر بعد التهييج عند طول موجة ٤٦٠ نانومتر.

٢- الفينيسايل ألانين

يتفاعل الفينيسايل ألانين مع الننهيدرين في وجود ببتيدي ثنائي (عادة جليسيل-ليوسين أوليوسيل-ألانين) ليعطى مركب مفلور. ويمكن اسراع وتثبيت الفلورة باضافة محلول نحاس قلوى لضبط درجة حموضة الوسط (pH) الى ٥,٨ ويقدر المركب المفلور عند طول موجة انبعاث ٥١٥ نانومتر بعد الإثارة على طول موجة ٣٦٥ نانومتر.

الجواهر الكشافة

١- محلول منظم سكسينات Succinate buffer (٠,٣ مول/ لتر) ذو درجة حموضة (pH) ٥,٨.

٢- ننهيدرين (٣٠ ملليمول/ لتر).

٣- ليوسيل-ألانين (٥ ملليمول/ لتر) أو جليسيل-ليوسين.

٤- جوهر النحاس:

كربونات صوديوم (١,٦ جم/ لتر) - طرطرات صوديوم وبوتاسيوم (٦٥ جم/

لتر) - كبريتات نحاس (٦٠ مجم/ لتر).

الطريقة:

١- يسخن ٢٠ ميكرو لتر عينة + ٢٠ ميكرو لتر محلول منظم سكسينات + ٨٠ ميكرو لتر ننهيدررين + ٤٠ ميكرو لتر محلول بيتيد ثنائي على درجة ٦٠° م لمدة ٢ ساعة ثم يبرد الى درجة ٢٠° م.

٢- يضاف ٢ مل من جوهر النحاس- تقدر الفلورة عند طول موجة انبعاث ٥١٥ نانومتر وإثارة على طول موجة ٣٦٥ نانومتر.

ثانياً: الطرق الكمية Quantitative

وتشمل الطرق التالية:

التحليل الكروماتوجرافي الغازي GLC- التحليل الكروماتوجرافي السائلي.

وقد تم التعرض الى هذه الطرق التحليلية في كتاب «التحليل الكروماتوجرافي» لنفس المؤلف. وفي هذا الجزء تم اضافة الادمصاص الأيوني وهي من الطرق الشائعة لتحليل الأحماض الأمينية. وفيما يلي أهم الطرق المستخدمة في تحليل الأحماض الأمينية.

٥-٢- التقدير الكمي باستخدام التحليل الكروماتوجرافي الغازي

Gas-liquid chromatography

توجد صعوبات عند تحليل الأحماض الأمينية بواسطة الـ GLC حيث أن الأحماض الأمينية عبارة عن مركبات كيميائية غير متجانسة وليست متطايرة بالقدر الكافي. ويلزم تحويلها الى مشتقات متطايرة وقد تتكون مشتقات مختلفة بالنسبة للحمض الأميني الواحد (أحادية وثنائية المشتقات) وبالتبعية لا تعطى مقدار كمي لكل حمض أميني بالإضافة الى صعوبة تكوين هذه المشتقات وتأخذ

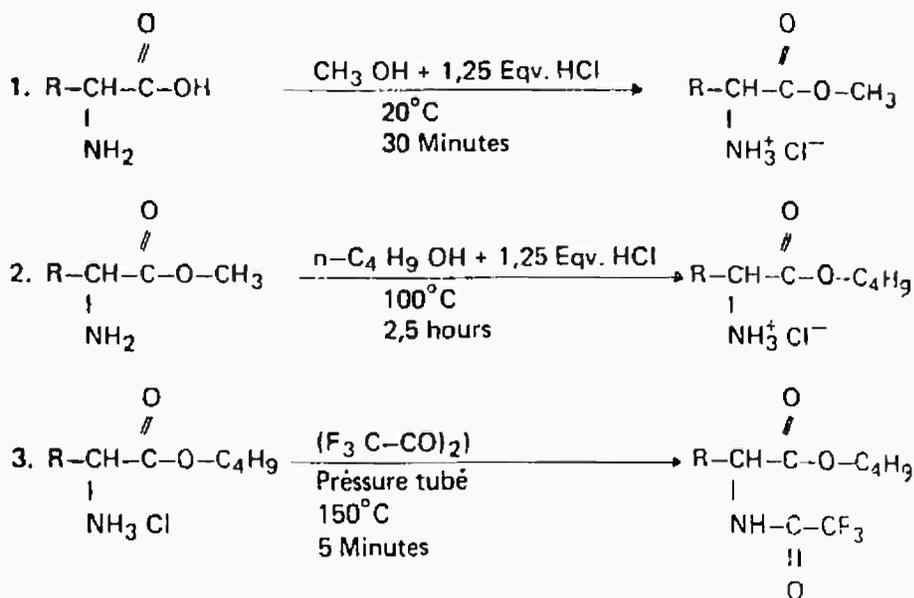
وقتنا طويلا للحصول عليها. والصعوبات في الفصل لا ترجع فقط الى اختيار الطريقة لتكوين مشتقات بل ترجع أيضا الى اختيار الطور الثابت القادر على فصل مشتقات الأحماض الأمينية ذات التركيب الكيميائي المتشعب Diverse group of compounds. وأيضا من ضمن المشاكل في فصل الأحماض الأمينية هو اختيار الكاشف Detector المناسب حيث عادة ما يستخدم كاشف (FID) الغير متخصص.

وفيما يلي مشتقات الأحماض الأمينية المناسبة للفصل الكروماتوجرافي الغازي.

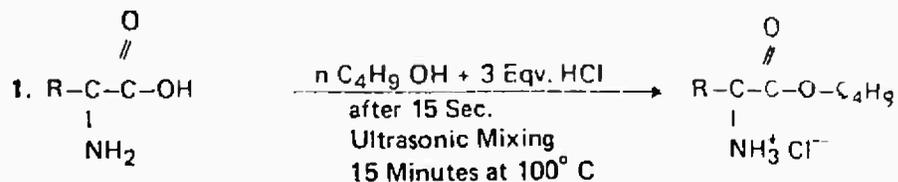
| الرمز | المشتق |
|---|---------------------|
| TMS-NCHR-COO-TMS | N-TMS-TMS-ester |
| TMS-NH-CHR-COOC ₄ H ₉ | N-TMS-n-butyl ester |
| CF ₃ -CO-NH-CHR-COOC ₄ H ₉ | TFA-n-butyl ester |
| C ₃ F ₇ -CO-NH-CHR-COOC ₃ H ₇ | HFB-n-propyl ester |

وتمتاز طريقة تكوين المشتقات TMS بسهولة اجراء الطريقة، حيث يضاف المركب Bistrimethyl silyl (trifluoro acetamide) في الأسيتونتريل والتسخين لمدة ساعتين على درجة ١٥٠° م في ظروف جافة في أنبوبة مغلقة Sealed tube. ومن الطرق الشائعة هو تكوين استرات البيوتائل للحمض الأميني ويعقبه TMS. أو مشتقات ثلاثي فلوروأستيل TEA أو سباعي فلورو بيوتائل HFB لمجموعة الأمين بالتفاعل مع TAF أو HFA في ثنائي كلوريد الميثيلين على التوالي لمدة ٥ دقائق على درجة ١٥٠° م. واستخدمت بكثرة المشتقات n-HFB propylesters في معرفة نوعية الأحماض الأمينية في الأجهزة التي

Esterification and Trifluoroacetylation of Amino Acids



b)



تستخدم أعمدة شعرية وكاشف electron capture وكذلك حالة تحويل الأحماض الأمينية الى مركبات متطايرة كحولية في وسط حمضي لتكوين استر ويعقب ذلك اجراء أسئلة لمجموعة الأمين باستخدام عديد من أندريدات الأحماض (أنظر صفحة ٥٣).

والجدول التالي يبين الجواهر المختلفة المستخدمة لتكوين مشتقات الأحماض الأمينية.

| الجواهر الكشافة لأستلة الأمين | الجواهر الكشافة لتكوين استر |
|--|-------------------------------------|
| N-methyl-N-(tert-butyl dimethyl silyl) trifluoroacetamide- | 3N HCl/iso - propanol or isobutanol |
| - Pentafluoropropionic anhydride | 3N HCl/Normal butanol |
| - Trifluoroacetic anhydride | 3N HCl/Normal propanol |
| -Heptafluorobutyric anhydride | 3N HCl/Methanol |
| | 3N HCl/Iso amyl alcohol |

٥-٣- مشتقات الأحماض الأمينية للفصل الكروماتوجرافي السائلي HPLC

يلاحظ أن الأحماض الأمينية العطرية تمتص الأشعة في منطقة الـ UV (٢٥٠ - ٢٨٠ nm)، وأن التريبتوفان له خواص الفلورة (تهيج عند ٢٩٥ nm وانبعاث عند ٣٤٥ nm) إلا أن غالبية الأحماض الأمينية ليس لها امتصاص أو فلورة أو لها تفاعلات كيميائية مميزة. بالإضافة إلى ذلك، فإنها غير متطايرة بدرجة كافية لتحليلها بواسطة GC، ولذلك لابد من عمل مشتقات لتحقيق هدفين:-

- ١- سهولة الكشف عنها (إدخال كروموفور أو فلوروفور).
- ٢- تحويل الأحماض الأمينية الى مشتقات متطايرة.

تكوين مشتقات سهل الكشف عنها

تستخدم هذه الطريقة بصفة أساسية عند فصل الأحماض الأمينية والكشف عنها بواسطة HPLC. وتوجد ثلاثة أنواع أساسية من الكواشف للكشف عن الأحماض الأمينية وهي كاشف الأشعة فوق البنفسجية والضوء المرئي (V,UV) وكاشف الفلورة والكاشف الكهروكيميائي electrochemical.

والكواشف التي تعتمد على الامتصاص والفلورة هي الشائعة والأكثر شيوعا هو الكاشف UV.

المشتقات التي تستخدم في طريقة Post column

١-٣-٥- الننهيدرين (Nin) Ninhydrin

وهو من الجواهر الكشافة الهامة والتي تكون كروموفور بنفسجي Purple chromophore مع الأحماض الأمينية الأولية ويعطى كروموفور أصفر مع الأحماض الأمينية الثانية Secondary وهي البرولين والهيدروكسي برولين.

ويحدث الامتصاص للكروموفورات عند أطوال موجية ٥٧٠ نانومتر (أولية) و٤٤٠ نانومتر (ثانية). وتصل حساسية هذا التفاعل إلى ١٠ بيكومول لأي حمض أميني وهو مناسب في التحليلات الروتينية.

والتفاعل يشمل الخطوات التالية:-

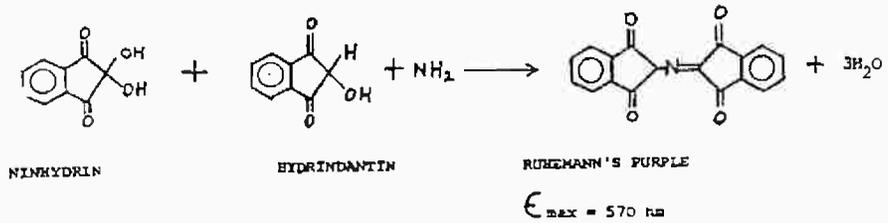
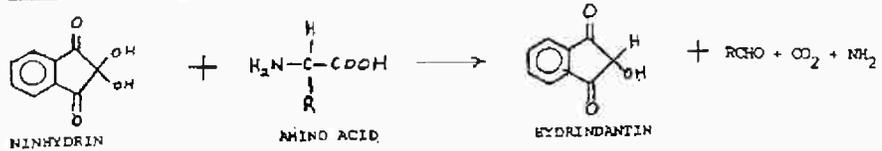
١- أكسدة مصحوبة بفقد مجموعة الكربوكسيل للحمض الأميني وإنتاج ننهيدرين مختزل وأمونيا وثاني أكسيد كربون.

٢- يتفاعل الننهيدرين المختزل مع الننهيدرين والأمونيا الناتجة.

٣- يتكون معقد لوني أزرق.

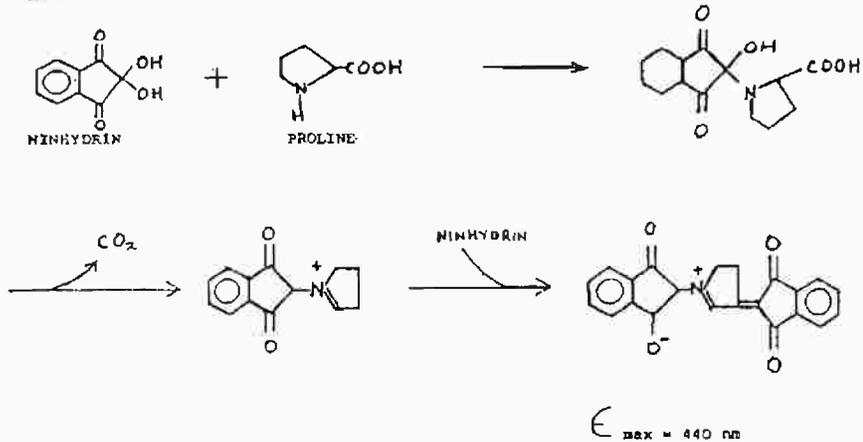
أولاً: تفاعل النيهيدرين مع الأحماض الأمينية الأولى

NINHYDRIN REACTION



ثانياً: تفاعل النيهيدرين مع الأحماض الأمينية الثنائية

NINHYDRIN AND PROLINE



يتفاعل الحمض الأميني مع الننهيدرين (Triketo hydrindene hydrate) بالتسخين في وسط حمضي (درجة حموضة "pH 3-4") وينتج امونيا وثاني أكسيد كربون ومعقد ذو لون بنفسجي. وعادة يتكون جوهر كشاف الننهيدرين من ننهيدرين (٢,٥ جم) و 2,4,6-collodine (٣٧ مل) وايثانول (١٧٥٠ مل) وحمض خليك ثلجي (٣٧ مل). وبصفة عامة يتكون الجوهر الكشاف الننهيدرين مما يلي:

- ١- المذيب: إيثلين جليكول أو ثنائي ميثايل سلفوكسيد أو ميثايل سيللوسولف.
- ٢- المحلول المنظم: خلات الصوديوم أو البوتاسيوم تختلف في درجة الحموضة والتركيز.
- ٣- مسحوق الننهيدرين.
- ٤- مادة مختزلة: ثلاثي كلوريد التيتانيوم أو كلوريد القصديروز أو هيدرنديتين.

ويستخدم هذا التفاعل في التقدير الكمي للأحماض الأمينية. تعطى الأمينات والأحماض الأمينية غير الألفا تفاعل لوني مع الننهيدرين بدون إنتاج CO_2 ، وعلى ذلك تتفاعل الأحماض الأمينية بيتا، جاما، دلتا، ايبسيلون والبيتيدات ببطء بالمقارنة مع الأحماض الأمينية الألفا وتعطي معقد ذو لون أزرق، بينما تتفاعل الأحماض الإيمينو ويتكون معقد ذو لون أصفر يمكن تقديره عند طول موجة ٤٤٠ نانومتر.

والجدول التالي يبين لون المعقد الناتج مع الأحماض الأمينية المختلفة:

| لون المعقد | الحمض الأميني |
|----------------|-----------------|
| بنى | هستيدين |
| بنى / رمادى | فينايل ألانين |
| أزرق | جليسين |
| أزرق واضح | جلوتاميك |
| رمادى / أزرق | ليسين |
| رمادى | تيروزين |
| برتقالى | برولين |
| برتقالى | هيدروكسى برولين |
| برتقالى / أصفر | أسبارتيك |

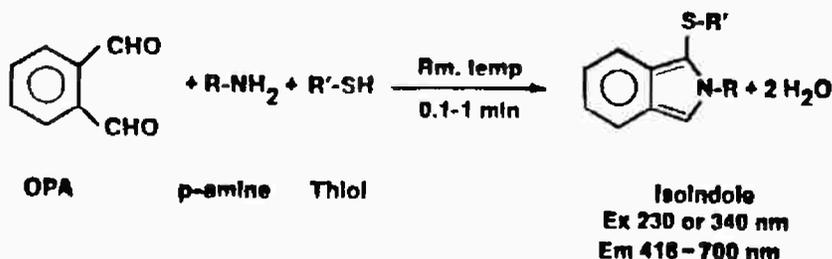
٥-٣-٢- أورثو فيثالدهيد (OPA) Ortho-phthaldehyde

وهو الجوهر الكشاف الثانى الشائع الإستخدام. ويمكن استخدامه فى كل الطريقتين Pre-colum و Post-colum، وفيه تتفاعل مجموعة الثيول Thiol مع الأحماض الأمينية الأولية فى وجود مادة مختزلة قوية (mercapto etha- nol 2-) على درجة حموضة (pH) ٩-١١ وتعطى مركب مفلور (أقصى طول موجة تهيج ٣٤٠ nm وأقصى طول موجة انبعاث ٤٥٥ nm) ولهذا فإنه يعتبر مناسب جداً فى الفصل فى الـ post-column.

بالإضافة إلى ذلك، فهو أكثر حساسية بالمقارنة بالنهيدرين. ووجد نظرياً أن حساسيته تساوى ١٠٠ مرة ولكن من الناحية العملية Practical يحدث انخفاض فى الحساسية. ومن أهم عيوب هذا الجوهر الكشاف أنه لا يتفاعل مع البرولين والهيدروكسى برولين ولاجراء التفاعل يلزم أولاً التفاعل مع مادة مؤكسدة مناسبة مثل كلورامين- ت (Sodium N-chloro- P-toluene-sulfon amide)

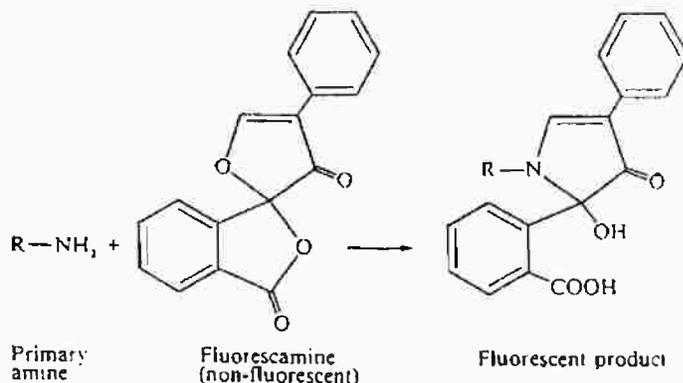
Chloramin T أو هيبوكلوريت الصوديوم لتحويلها إلى مركبات يمكن أن تتفاعل مع الجوهر الكشاف. كذلك فإنه يلزم أكسدة السستئين والسستين لأن مجموعة الثيول تتفاعل مع الأمين في هذا الجوهر الكشاف، لذلك فإن السستئين يدخل منافساً لاحتوائه على الثيول في خلال التفاعل.

والجوهر الكشاف المائي ثابت على درجة حرارة الغرفة ويحدث التفاعل بسرعة بدون حرارة، وهذه الطريقة حساسة وهي تعادل أكثر من ١٠ مرات في الحساسية بالمقارنة بالتفاعل مع الننهيدرين.



Fluoro scamine ٥-٣-٣-فلوروسكامين

تتفاعل جميع الأمينات الأولية مع فلوروسكامين في وسط قلوي (درجة حموضة "pH" ٩-١١) لتكوين مركب مفلور (أقصى طول موجة تهيج ٣٩٠ nm وأقصى طول موجة انبعاث ٤٧٥ nm) والمادة المفلورة غير ثابتة في الوسط المائي، ولذلك يجب أن يحضر الجوهر الكشاف في الأسيتون. لا تتفاعل الأمينات الثنائية والبرولين والهيدروكسي برولين مع الجوهر الكشاف إلا في حالة تحويلها إلى أمينات أولية بالتفاعل مع N-Chloro-succinimide. ويمتاز هذا التفاعل بأنه يحدث بسرعة مع الأحماض الأمينية على درجة حرارة الغرفة ولكن حساسيته ليست أعلى من الننهيدرين.



٤-٣-٥ فلوروثنائي نيتروبنزين (FDNB) Fluoro- 2,4- dinitrobenzene

يتفاعل هذا الجوهـر الكشـاف في محلول قلوي (درجة حموضة ٩,٥) مع مجموعة أمين حرة أو حمض أميني أو ببـتيد ليتكوـن مشتق ثنائي نيتروفيـنايل (DNP) أصفر اللون. ولا يستخدم هذا التفاعل في تقدير الأحماض الأمينية كـميا لأن أقصى امتصاص لمشتقات ثنائي نيتروفيـنايل تختلف باختلاف نوعية الحمض الأميني، ولذلك تستخدم فقط في التحليل الوصفي عن طريق مقارنة R_f للأحماض الأمينية القياسية مع الأحماض الأمينية بالعينة بعد فصلها بواسطة التحليل الكروماتوجرافي الورقي وذو الطبقة الرقيقة.

تفاعل فلوروثنائي نيتروبنزين FDNB

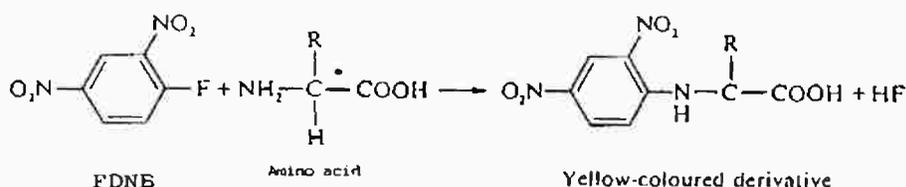
الجوهـر الكشـاف: محلول FDNB (٠,٢٥ مل) وكحول إيثايل مطلق (٤,٧٥ مل).

الطريقة: وزن العينة (٢ مجم) + ماء مقطر (٠,٢ مل) + محلول بيكرونات صوديوم (٤٢ جم / لتر - ٠,٠٥ مل) + الجوهـر الكشـاف (٠,٤ مل).

بعد الرج يترك التفاعل لمدة ساعة. ويجب أن يظل الوسط قاعدي (pH = 8-9) وذلك بإضافة محلول بيكربونات الصوديوم.

يضاف ماء مقطر (1 مل) ومحلول بيكربونات صوديوم (42 جم / لتر-0.05 مل).

يستخلص المستحلب ثلاث مرات بحجوم متساوية بالإثير للتخلص من الجواهر الكشاف الزائد. يضبط درجة حموضة وسط التفاعل (pH = 9) باستخدام HCl (6 مول / لتر) ثم يستخلص المشتق من المحلول بالاثير 3 مرات، 2 مل كل مرة. تجمع المستخلصات وتبخر للجفاف ثم يذاب المتبقى في 0.5 مل أسيتون ويستخدم للفصل بالطرق الكروماتوجرافية.



فيما يلي الجواهر شائعة الاستخدام في طريقة Pre-column

1- أورثو فيثالدهيد OPA

سبق أن تحدثنا عنه في نظام Post-column وعيوب استخدامه.

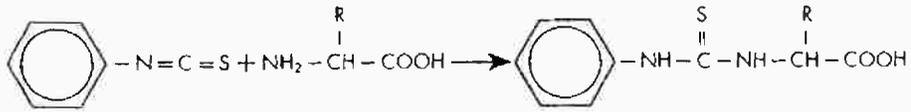
5-3-5- فينيل أيزوثيوسيانات (PITC) Pheny Iso Thio Cyanate

يطلق على هذا الجواهر الكشاف جواهر Edman إدمان والذي يستخدم في معرفة تتابع الأحماض الأمينية في الببتيدات والبروتينات. ويعطى عند تفاعله مع الأحماض الأمينية في الببتيدات والبروتينات والأحماض الأمينية الحرة

مشتقات تسمى Phenyl Thio Carbamyl (PTC) ومن أهم عيوب هذا الجواهر:-

- ١- احتمال تكوين مشتقات مختلفة مع الليسين.
- ٢- حساسيته منخفضة مع السستين.
- ٣- حساس للماء والأملاح.
- ٤ - يتأثر التفاعل بالمواد المصاحبة مع العينة (أمونيا- سكرات).
- ٥- لا بد من خطوة الاستخلاص.
- ٦- تحتاج لوقت طويل لإجراء المشتق مع مهارة في العمل.

يجرى الكشف في منطقة الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي ٢٤٥ نانوميتر وحساسيته أفضل من التفاعل مع الننهيدرين.



Phenylisothiocyanate

Thiourea derivative

٥-٣-٦- فينايل ثيوهيدانتوين (PTH) Phenyl Thio Hydantoin

وهذا التفاعل له نفس العيوب كما في حالة تكوين مشتقات PITC بالإضافة إلى عدم ثبات مشتقات الثريونين والسيرين. ويتم الكشف عن هذه المشتقات في منطقة الأشعة فوق البنفسجية. يمكن تحويل مشتقات فينايل ثيوكاربيل للأحماض الأمينية إلى التركيب الحلقى فينايل ثيوهيدانتوين. وحساسية هذا التفاعل أقل بمقدار ٥ مرات عن الننهيدرين.

٥-٣-٧- فلورينيل ميثوكسي كاربونيل كلوريد

Fluorenyl Methoxy Carbonyl Chloride (FMCC)

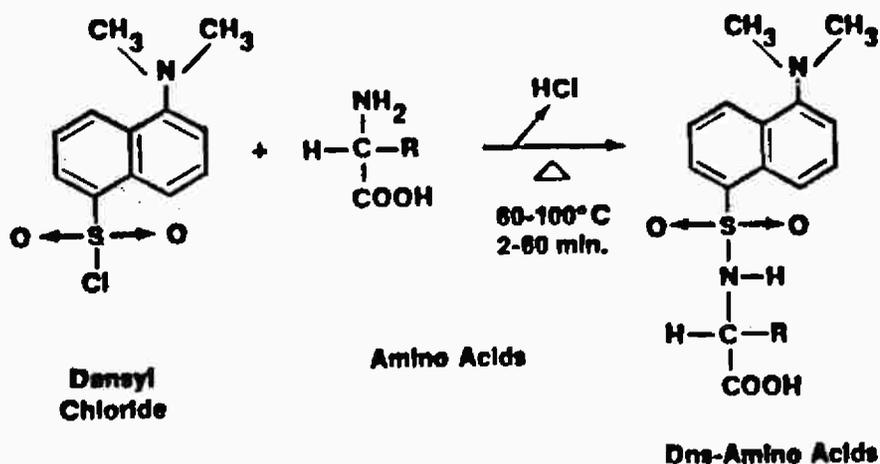
يستخدم هذا التفاعل في حماية مجاميع الأمين عند تخليق الببتيدات. ومن أهم عيوب هذه الطريقة هو عدم دقة تقدير الهستدين نظراً لعدم ثبات مشتق FMCC-His وتكوين مشتقات مختلفة، كما يحتاج الأمر إلى خطوة استخلاص للتخلص من كمية الجوهر الكشاف الزائدة غير الداخلة في التفاعل. ويتم الكشف بواسطة الفلورة (تهيج عند طول موجي ٢٦٠ نانوميتر وانبعث عند ٣٠٥ نانوميتر) وتصل الحساسية إلى ٢٠ فيكومول 20 fmol.

٥-٣-٨- دانسيل كلوريد (DANS-Cl) Dansyl chloride

Dimethylaminonaphthalene 5-sulfonyl chloride يتفاعل كلوريد الدانسيل مع مجاميع الأمين الحرة في وسط قلوي (pH ٩,٥ - ١٠,٥) لتكوين مشتقات لها خواص فلورة قوية (انظر المعادلات). تكشف هذه الطريقة عن كميات قليلة جداً من الأحماض الأمينية تصل إلى أقل من واحد نانومول من الحمض الأميني. ويلاحظ أن مشتقات الدانسيل للأحماض الأمينية تقاوم بدرجة كبيرة جدا التحليل المائي، لذلك تستخدم في تحديد أماكن الأحماض الأمينية بعد فصلها بالطرق الكروماتوجرافية باستخدام لمبة الأشعة فوق البنفسجية.

وفيما يلي خطوات تفاعل كلوريد الدانسيل:

- ١- يخلط في أنابيب صغيرة ما يلي: ١٠ ميكرو لتر حمض أميني (واحد ملليمول/ لتر)، ١٠ ميكرو لتر محلول كربونات صوديوم (٠,٤ مول/ لتر)، ٢٠ ميكرو لتر محلول كلوريد الدانسيل (٢٥ مجم/ لتر أسيتون).
- ٢- تغطي الأنابيب وتحضن على درجة ٣٧° م لمدة ساعة.



تفاعل كلوريد الدانسيل مع المركبات المحتوية على مجموعة أمين حرة يعطى هذا التفاعل مشتقات مفلوره مع الأحماض الامينية وكذلك مع مجموعة الأمين الطرفية للبيبتيدات في الوسط القلوي.

٣- تؤخذ كمية من مخلوط التفاعل (٥ ميكرو لتر) وتفصل بواسطة التحليل الكروماتوجرافي ذو الطبقة الرقيقة TLC باستخدام طور متحرك: كلوروفورم- كحول أمايل رباعي- حمض خليك ثلجي (٣٠ : ٣٠ : ٧٠).

٤- يكشف عن أماكن الأحماض الأمينية المفصولة باستخدام لمبة الأشعة فوق البنفسجية.

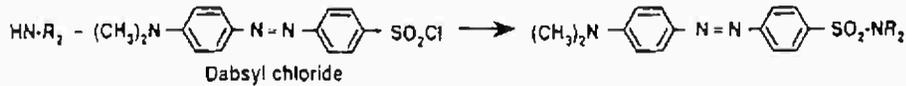
ومن أهم عيوب هذه الطريقة هو بطء التفاعل بين الجوهر الكشاف والحمض الأميني.

٥-٣-٩- كلوريد الدابسيل (Dabsyl chloride (DABS-Cl

Dimethylaminoazobenzenesulfonyl chloride

هذه الطريقة لها نفس العيوب السابق ذكرها وهي غير شائعة الاستخدام.

يكشف عن مشتقات الدابسيل في المنطقة المرئية من الضوء وحساسيتها حوالي ١ بيكومول 1 p mol .



توجد طريقتان أساسيتان تعتمدان على مكان تكوين المشتقات، أي تكوين المشتقات قبل فصل الأحماض الأمينية عن بعضها البعض باستخدام العمود أو تكوين المشتقات للكشف عن الأحماض الأمينية بعد فصلها بواسطة العمود (انظر صفحة ٦٦) لذلك:

تسمى الطرق التي تعتمد على تكوين المشتقات قبل استخدام العمود باسم

Pre-column

والمشتقات الشائعة هي OPA, FMOC, PITC

وتسمى الطرق التي تعتمد على تكوين المشتقات بعد استخدام العمود باسم

Post-column

والمشتقات الشائعة هي الننهيدرين و OPA وفلورسكامين .

يمتاز الفصل باستخدام طريقة Pre-column مقارنة بطريقة Post-column

بالحساسية العالية، وقت التحليل قصير، ولا توجد أى صعوبات بالنسبة لكمية العينة المراد تحليلها (الطعام أو مواد العلف) .

وأهم عيوبها هي :-

١ - تكشف فقط عن الأحماض الأمينية الأولى Primary .

٢ - صعوبة تكوين المشتقات .

٣ - تداخل الكشاف أو النواتج الثانوية مع التقدير الكمي .

٤ - عدم ثبات المشتقات المزدوجة Double derivatives .

٥ - تحضير المشتق لا يكون كمياً دائماً .

ومن جهة أخرى فان تقدير الأحماض الأمينية بطريقة Post لها عيوب

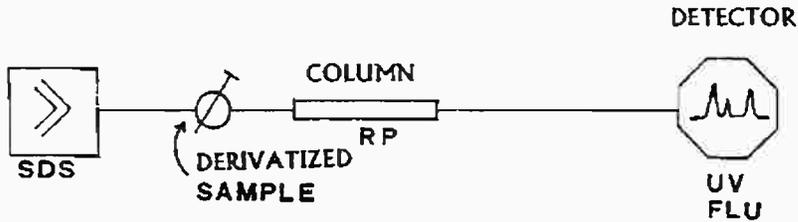
وهي :-

١ - وقت التحليل طويل .

٢ - حساسيتها أقل .

طرق إجراء المشتقات: DERIVATIZATION PROCEDURES:

PRE-COLUMN

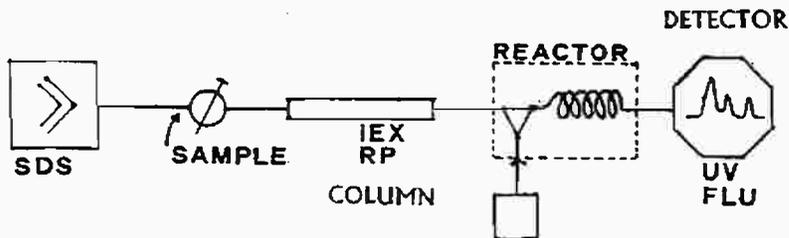


REVERSED PHASE - RP DANSYL

- RP OPA

- RP PTH

POST-COLUMN



ION-EXCHANGE - IEX NINHYDRIN

ION-EXCHANGE - IEX OPA

REVERSED PHASE - RP OPA

مقارنة بين الطرق الشائعة لتقدير الأحماض الامينية بواسطة HPLC

| Post-Column | | Pre-Column | | وجه المقارنة |
|--------------|--------------|---------------------------------------|--------------------------|--|
| Ninhydrin | OPA/Na OCL | Dansyl | OPA | |
| جيد ٨٠-٣٠ | جيد ٨٠-٣٠ | * | * | الدقة وقت التحليل (دقيقة) الحساسية (p-mol) كفاءة الفصل تقدير الأحماض الامينية الثانية صعوبات أخرى |
| ١٠٠ | ٥٠ | ٦٠-٢٠ ١٠-١ | ٦٠-٥ ١٠-١ | |
| جيد | جيد | ** | ** | |
| نعم | نعم | نعم | لا | |
| -- | -- | تكون مشتقات عديدة للحمض الاميني | تكون مشتقات غير ثابتة | |