خامسا: تقدير الأحماض الأمينية في الطعام والأعلاف

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

تشمل هذه الطرق ما يلى:

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.

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

يوجد نوعان من الطرق الكيميائية للكشف عن الأحماض الأمينية وهما: الطرق اللونية وطرق الوميض (الفلورة).

أولاً: الطـــرق اللونيـــة:

تشمل هذه الطرق تفاعل الجوهر الكشاف باولى Diazotized sulphanilic acid (Pauly) مع الهستدين، التيروزين ويعطى ناتج ذو لون أحمر ويحدث هذا التفاعل أيضــا مع المركبات الفينوليـــة الأخرى– يتفاعل الجوهر الكشاف ايرليش P-amino benzaldehyde (Ehrlich) فى حمض HC1 مع التريتوفان وبعض الأندولات الأخرى ويعطى لون أزرق محمر، بينما يعطى هذا التفاعل لون أصفر مع الأمينات العطرية ومركبات اليوريا Ureides ولهذا يجب التخلص اولا من اليوريا الموجودة فى أغلب السوائل الحيوية.

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

obeikandl.com

يبين الجدول التالى الجواهر الكشافة المتخصصة فى التعرف على أحماض أمينية معينة.

الجوهر الكشاف	التركيب وظروف التفاعل	الأحماض الأمينية	اللون الناتج	ملاحظات
إيزاتين Isatin	٢ جم إيزاتين/ لتر اسيتون- التسخين على درجة ١٠٠° م لمدة ٢- ٣ دقيقة	برولين	أزرق غامق	غير متخصص- أساسى للكشف عن البرولين
		هيدروكسى برولين	أزرق/ أخضر	
		أسبارتيك	أزرق خفيف	
		جلوتاميك	بنى خفيف	
		آلانين	رمادى/ أزرق	
		فينايل آلانين	أزرق	
		تيروزين	أزرق/ رمادى	
		بيتا آلانين	أزرق فاتح	
		جلوتامين	أحمر فاتح	
إيرليش Ehrlich	١٠٠ جم بارا ثنائى ميثايل امينو بنزالدهيد/ لتر حمض HC1 مركز- يخلط حجم واحد منه مع ٤ حجوم أسيتون- يتم التفاعل فى خلال ٢٠ دقيقة.	تربتوفان	قرنفلى/ أحمر	
		سيترولين	أصفر	يتفاعل مع بعض الاندولات والامينات العطرية

(تابع) جدول الجواهر الكشافة المتخصصة فى التعرف على أحماض أمينية معينة.

باولى Pauly	٩ جم حمض سلفانيليك/ لتر حمض HCl مركز- يخلط حجم واحد منه مع ١٠ حجوم ماء، حجم واحد من نيتريت صوديوم (٥٠ جم/ لتر)، حجم واحد من كربونات صوديوم (١٠٠ جم/ لتر)	هستدين تيروزين	أحمر برتقالى فاتح	يتفاعل مع بعض الايميدازولينات والمركبات الفينولية وأملاح الأمونيوم
ثنائى الأسيتيل Diacetyl	١٠٠ جم ألفا نافثول/ لتر صودا كاوية (٨٠ جم/ لتر) + حجم مساو من ثنائى الأسيتيل (١ مل/ لتر ماء) يخلط قبل الاستخدام- يسخن على درجة ١٠٠°م لمدة ٢- ٣ دقائق.	ارجنين	بنفسجى/ أحمر	
نيتروبروسيد السيانيد Cyanide nitro prusside	تحضر المحاليل التالية بمعدل (١٠٠ جم/ لتر) صودا كاوية- نيتروبروسيد الصوديوم- حديدى سيانيد البوتاسيوم. يخلط حجم واحد من كل محلول سبق تحضيره بعد تخفيفه ٣ مرات بالماء وتترك لمدة ٣٠ دقيقة قبل الاستخدام - لا يحتاج التفاعل لتسخين.	سستئين سستئين هوموسستئين هوموسستئين	بنفسجى بنفسجى بنفسجى بنفسجى	تختفى الألوان بعد حوالى ٣٠ دقيقة

ثانيا: الطرق الفلورية

تفوق هذه الطرق فى حساسيتها وتخصصها على الطرق اللونية وفيما يلى الطرق الفلورية التى تستخدم فى التقديرات الكمية للأحماض الأمينية العطرية: تيروزين والفينايل آلانين

١- التيروزيـــــن

يتفاعل جوهر ١- نيتروزو ٢- نافثول 1- Nitrozo-2- naphthol مع التيروزين فى وجود نيتريت الصوديوم ليعطى مركب أحمر غير ثابت والذى يتحول بالتسخين فى وجود حمض النيتريك ليعطى مركب فلورى أصفر ثابت. وبعد التخلص من زيادة الجوهر الكشاف نيتروزونافثول يقدر المركب المفلور عند طول موجة ٥٧٠ نانومتر. وفيما يلى خطوات إجراء هذا التفاعل:

الجواهـــر الكشـــافة

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.

الطريقـــة:

١- يخلط ١٠ ميكرولتر من العينة مع ٢٠٠ ميكرولتر من الجوهر الكشاف نيتروزونافثول ويسخن على درجة ٣٣°م لمدة ٢٠ دقيقة.

٢- يضاف ١ مل ماء و ٣ مل ثنائى كلوريد الإيثيلين ويخلط ثم يجرى طرد مركزى.

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

٤- تقدر الفلورة فى خلال ٣٠ دقيقة عند طول موجة ٥٧٠ نانومتر بعد التهيج عند طول موجة ٤٦٠ نانومتر.

٢- الفينسايل آلانين

يتفاعل الفينايل آلانين مع النهيدرين فى وجود ببتيد ثنائى (عادة جليسيل- ليوسين أوليوسيل- آلانين) 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- آلانين (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).

obeikandl.com

الطريقـــة :

١- يسخن ٢٠ ميكرولتر عينة + ٢٠ ميكرولتر محلول منظم سكسينات+ ٨٠ ميكرولتر ننهيدرين + ٤٠ ميكرولتر محلول ببتيد ثنائى 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 الكروماتوجرافى الغازى GLC- التحليل الكروماتوجرافى السائلى.

وقـد تم التـعـرض الى هذه الطرق التـحليليـة فى كـتـاب «التـحليل الكروماتوجرافى» لنفس المؤلف. وفى هذا الجزء تم اضافة الادمصاص الآيونى وهى من الطرق الشائعة لتحليل الأحماض الأمينية. وفيما يلى أهم الطرق المستخدمة فى تحليل الأحماض الأمينية.

٥-٢- التقدير الكمي باستخدام التحليل الكروماتوجرافي الغازي

Gas-liquid chromatography

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

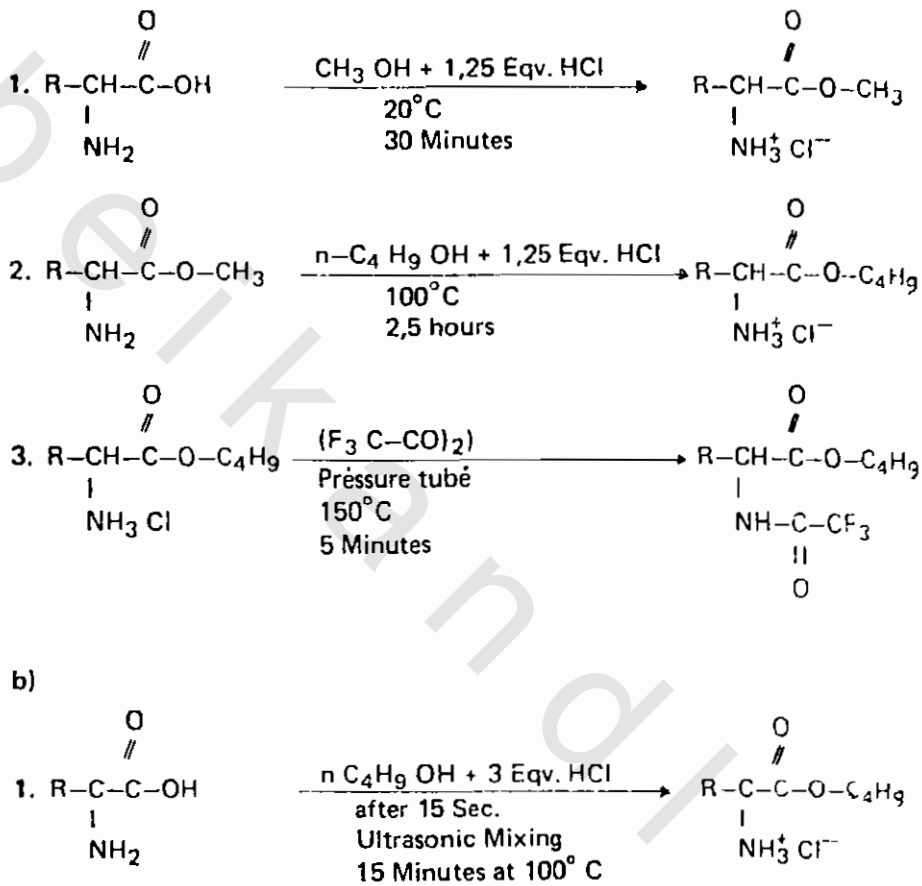
وقتا طويلا للحصول عليها. والصعوبات فى الفصل لا ترجع فقط الى اختيار الطريقة لتكوين مشتقات بل ترجع أيضا الى اختيار الطور الثابت القادر على فصل مشتقات الأحماض الأمينية ذات التركيب الكيميائى المتشعب Diverse group of compounds . وأيضا من ضمن المشاكل فى فصل الأحماض الأمينية هو اختيار الكاشف Detector المناسب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

وفيما يلى مشتقات الأحماض الأمينية المناسبة للفصل الكروماتوجرافى الغازى.

المشتق	الرمز
N-TMS-TMS-ester	TMS-NCHR-COO-TMS
N-TMS-n-butyl ester	TMS-NH-CHR-$COOC_4H_9$
TFA-n-butyl ester	CF_3-CO-NH-CHR-$COOC_4H_9$
HFB-n-propl ester	C_3F_7-CO-NH-CHR-$COOC_3H_7$

وتمتاز طريقة تكوين المشتقات TMS بسهولة اجراء الطريقة، حيث يضاف المركب Bistrimethyl sily1 (trifluoro acetamide) فى الأسيتو نتريل والتسخين لمدة ساعتين على درجة ١٥٠° م فى ظروف جافة فى أنبوبة مغلقة Sealed tube . ومن الطرق الشائعة هو تكوين استرات البيوتايل للحمض الأمينى ويعقبه TMS . أو مشتقات ثلاثى فلوروأسيتيل TEA أو سباعى فلورو بيوتايل HFB لمجموعة الأمين بالتفاعل مع TAF أو HFA فى ثنائى كلوريد الميثلين على التوالى لمدة ٥ دقائق على درجة ١٥٠°م. واستخدمت بكثرة المشتقات n-HFB propylesters فى معرفة نوعية الأحماض الأمينية فى الأجهزة التى

Esterification and Trifluoroacetylation of Amino Acids



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

والجدول التالى يبين الجواهر المختلفة المستخدمة لتكوين مشتقات الأحماض الأمينية.

الجواهر الكشافة لأسئلة 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 فى منطقة الـ UV (٢٥٠ – ٢٨٠ nm)، وأن التربتوفان 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 الأحماص الأمينية والكشف عنها بواسطة HPLC. وتوجد ثلاثة أنواع أساسية من الكواشف للكشف عن الأحماض الأمينية وهى كاشف الأشعة فوق البنفسجية والضوء المرئى (V,UV) وكاشف الفلورة والكاشف الكهروكيميائى electrochemical.

والكواشف التى تعتمد على الامتصاص والفلورة هى الشائعة والأكثر شيوعا هو الكاشف UV.

المشتقات التي تستخدم في طريقة Post column

٥-٣-١- النهيدرين Ninhydrin (Nin)

وهو من الجواهر الكشافة الهامة والتى تكون كروموفور بنفسجى Purple chromophore مع الأحماض الأمينية الأولية ويعطى كروموفور أصفر مع الأحماض الأمينية الثانية Secondary وهى البرولين والهيدروكسى برولين.

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

والتفاعل يشمل الخطوات التالية:-

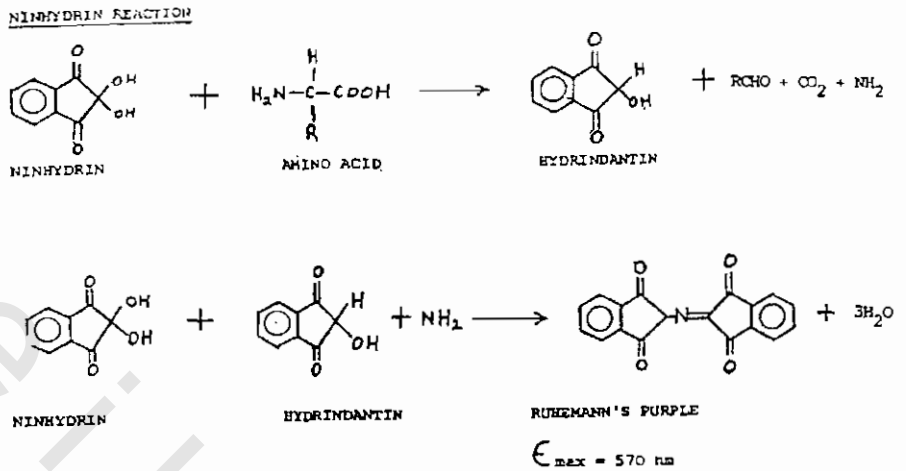
١- أكسدة مصحوبة بفقد مجموعة الكربوكسيل للحمض الأمينى وانتاج ننهيدرين مختزل وأمونيا وثانى اكسيد كربون.

٢- يتفاعل النهيدرين المختزل مع النهيدرين والأمونيا الناتجة.

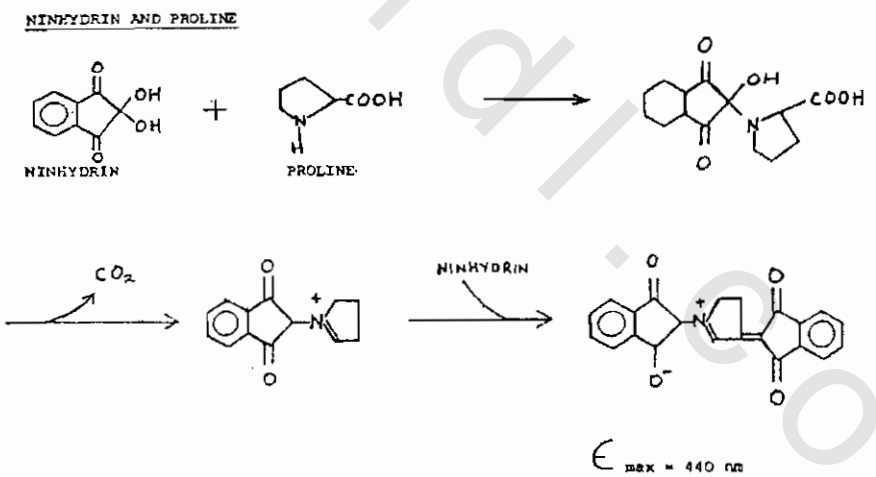
٣- يتكون معقد لونى أزرق.

obeikandl.com

اولا: تفاعل النينهيدرين مع الأحماض الأمينية الأولى



ثانيا: تفاعل النينهيدرين مع الأحماض الأمينية الثنائية



يتفاعل الحمض الأميني مع النهيدرين (Triketo hydrindene hydrate) بالتسخين في وسط حمضي (درجة حموضة "pH" ٣- ٤) وينتج امونيا وثاني أكسيد كربون ومعقد ذو لون بنفسجي. وعادة يتكون جوهر كشاف النهيدرين من نهيدرين (٢,٥ جم) و 2,4,6-collodine (٣٧ مل) وايثانول (١٧٥٠ مل) وحمض خليك ثلجي (٣٧ مل). وبصفة عامة يتكون الجوهر الكشاف النهيدرين 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 النهيدرين.**

٤ - **مادة مختزلة:** ثلاثي كلوريد التيتانيوم أو كلوريد القصديروز أو هيدرنداتين.

ويستخدم هذا التفاعل في التقدير الكمي للأحماض الأمينية. تعطي الأمينات والأحماض الأمينية غير الألفا تفاعل لوني مع النهيدرين بدون إنتاج CO_2، وعلى ذلك تتفاعل الأحماض الأمينية بيتا، جاما، دلتا، ايبسيلون والببتيدات 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:

الحمض الأمينى	لون المعقد
هستيدين	بنى
فينايل آلانين	بنى/ رمادى
جليسين	أزرق
جلوتاميك	أزرق واضح
ليسين	رمادى/ أزرق
تيروزين	رمادى
برولين	برتقالى
هيدروكسى برولين	برتقالى
أسبارتيك	برتقالى/ أصفر

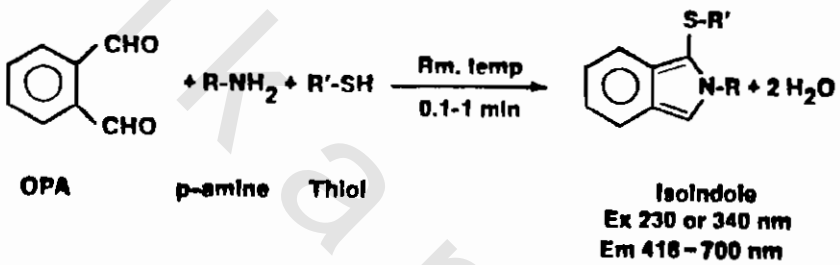
٥-٣-٢-أورثو فيثالدهيد Ortho- phthaldehyde (OPA)

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-2-nol) 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 بالننهيدرين. 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 أولا التفاعل مع مادة مؤكسدة مناسبة مثل كلورامين- ت (Sodium N-chloro- P-toluene-sulfon amide)

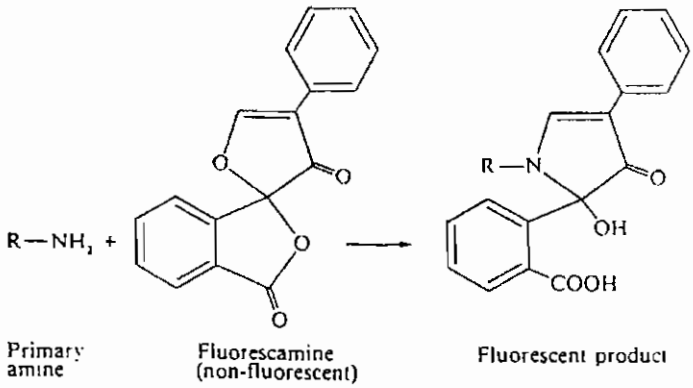
Chloramin T أو هيبوكلوريت الصوديوم لتحويلها إلى مركبات يمكن أن تتفاعل مع الجوهر الكشاف. كذلك فإنه يلزم أكسدة السستئين والسستين لأن مجموعة الثيول تتفاعل مع الأمين فى هذا الجوهر الكشاف، لذلك فان السستئين يدخل منافساً لاحتوائه على الثيول فى خلال التفاعل.

والجوهر الكشاف المائى ثابت على درجة حرارة الغرفة ويحدث التفاعل بسرعة بدون حرارة، وهذه الطريقة حساسة وهى تعادل أكثر من ١٠ مرات فى الحساسية بالمقارنة بالتفاعل مع النهيدرين.



٥-٣-٣- فلوروسكامين Fluoro scamine

تتفاعل جميع الأمينات الأولية مع فلوروسكامين فى وسط قلوى (درجة حموضة "pH" ٩- ١١) لتكوين مركب مفلور (أقصى طول موجة تهيج ٣٩٠ nm وأقصى طول موجة انبعاث ٤٧٥ nm) والمادة المفلورة غير ثابتة فى الوسط المائى، ولذلك يجب أن يحضر الجوهر الكشاف فى الأسيتون. لا تتفاعل الأمينات الثنائية والبرولين والهيدروكسى برولين مع الجوهر الكشاف إلا فى حالة تحولها 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 النهيدرين.



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

يتفاعل هذا الجوهر الكشاف فى محلول قلوى (درجة حموضة ٩,٥) مع مجموعة أمين حرة أو حمض أميني أو ببتيد ليتكون مشتق ثنائى نيتروفينايل (DNP) أصفر اللون. ولا يستخدم هذا التفاعل فى تقدير الأحماض الأمينية كميا لأن أقصى امتصاص لمشتقات ثنائى نيتروفينايل تختلف باختلاف نوعية الحمض الأمينى، ولذلك تستخدم فقط فى التحليل الوصفى عن طريق مقارنة R_f للأحماض الأمينية القياسية مع الأحماض الأمينية بالعينة بعد فصلها بواسطة التحليل الكروماتوجرافى الورقى وذو الطبقة الرقيقة.

تفاعل فلورو ثنائي نيتروبنزين FDNB

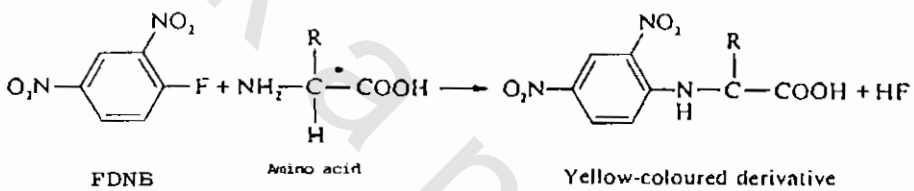
الجوهر الكشاف: محلول FDNB (٠,٢٥ مل) وكحول إيثايل مطلق (٤,٧٥ مل).

الطريقة: وزن العينة (٢ مجم) + ماء مقطر (٠,٢ مل) + محلول بيكربونات صوديوم (٤٢ جم/ لتر– ٠,٠٥ مل) + الجوهر الكشاف (٠,٤ مل).

بعد الرج يترك التفاعل لمدة ساعة. ويجب أن يظل الوسط قاعدى (pH = ٨– ٩) وذلك بإضافة محلول بيكربونات الصوديوم.

يضاف ماء مقطر (١ مل) ومحلول بيكربونات صوديوم (٤٢ جم/ لتر– ٠,٠٥ مل).

يستخلص المستحلب ثلاث مرات بحجوم متساوية بالإثير للتخلص من الجوهر الكشاف الزائد. يضبط درجة حموضة وسط التفاعل (pH = ٩) باستخدام HC1 (٦ مول/ لتر) ثم يستخلص المشتق من المحلول بالاثير ٣ مرات، ٢ مل كل مرة. تجمع المستخلصات وتبخر للجفاف ثم يذاب المتبقى فى ٠,٥ مل أسيتون ويستخدم للفصل بالطرق الكروماتوجرافية.



فيما يلي الجواهر شائعة الاستخدام في طريقة Pre-column

١- **أورثوفيثالدهيد** OPA

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

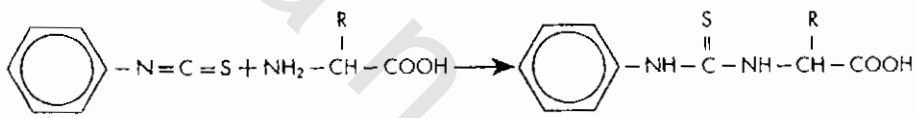
٥-٣-٥- فينايل أيزوثيوسيانات Pheny Iso Thio Cyanate (PITC)

يطلق على هذا الجوهر الكشاف جوهر Edman إدمان والذى يستخدم فى معرفة تتابع الأحماض الأمينية فى الببتيدات والبروتينات. ويعطى عند تفاعله مع الأحماض الأمينية فى الببتيدات والبروتينات والأحماض الأمينية الحرة

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

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

يجرى الكشف فى منطقة الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجى ٢٤٥ نانوميتر وحساسيته أفضل من التفاعل مع النهيدرين.



٥-٢-٦- فينايل ثيوهيدانتوين Phenyl Thio Hydantoin (PTH)

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

٥-٣-٧- فلورينيل ميثوكسي كاربونيل كلوريد

Fluorenyl Methoxy Carbonyl Chloride (FMCC)

يستخدم هذا التفاعل فى 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 فى التفاعل. ويتم الكشف بواسطة الفلورة (تهيج عند طول موجى ٢٦٠ نانوميتر وانبعاث عند ٣٠٥ نانوميتر) وتصل الحساسية الى ٢٠ فيكومول 20 fmol.

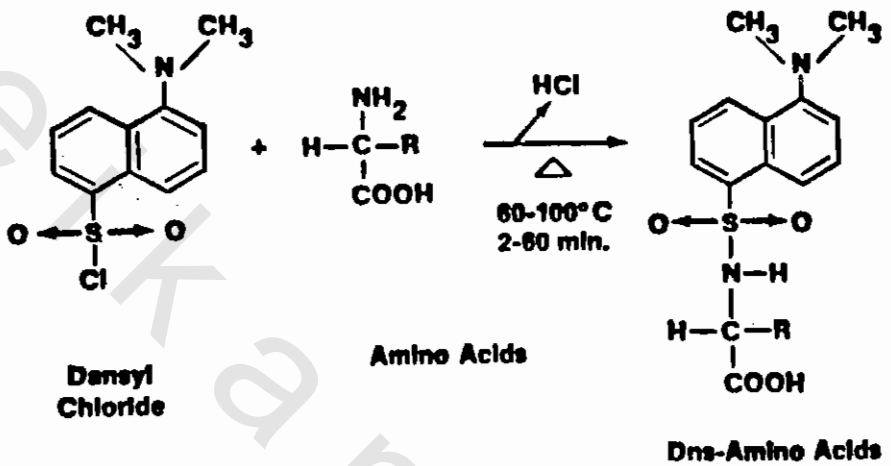
٥-٣-٨- دانسيل كلوريد (DANS-CI) Dansyl chloride

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

وفيما يلى خطوات تفاعل كلوريد الدانسيل:

١- يخلط فى أنابيب صغيرة ما يلى: ١٠ ميكرولتر حمض أمينى (واحد ملليمول/ لتر)، ١٠ ميكرولتر محلول كربونات صوديوم (٠,٤ مول/ لتر)، ٢٠ ميكرولتر محلول كلوريد الدانسيل (٢٥ مجم/ لتر أسيتون).

٢- تغطى 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 الامينيه وكذلك مع مجموعة الأمين الطرفية للببتيدات فى الوسط القلوى.

obeikandl.com

٣- تؤخذ كمية من مخلوط التفاعل (٥ ميكرولتر) وتفصل بواسطة التحليل الكروماتوجرافى ذو الطبقة الرقيقة TLC باستخدام طور متحرك: كلوروفورم- كحول أمايل رباعى- حمض خليك ثلجى (٧٠: ٣٠: ٣٠).

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

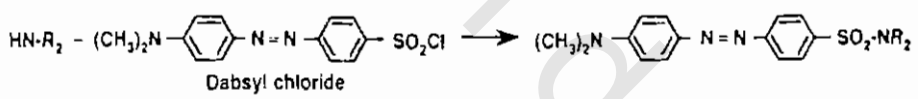
ومن أهم عيوب هذه الطريقة هو بطء التفاعل بين الجوهر الكشاف والحمض الأمينى.

٥-٣-٩- كلوريد الدابسيل Dabsyl chloride (DABS-CI)

Dimethylaminoazobenzenesulfonyl chloride

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

يكشف عن مشتقات الدابسيل فى المنطقة المرئية من الضوء وحساسيتها حوالى ١ بيكومول 1 p mol.



Dabsyl chloride

توجد طريقتان أساسيتان تعتمدان على مكان تكوين المشتقات، أى 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 التى تعتمد على تكوين المشتقات قبل استخدام العمود باسم Pre-column

والمشتقات الشائعة هى OPA, FMOC, PITC

وتسمى الطرق التى تعتمد على تكوين المشتقات بعد استخدام العمود باسم Post-column

والمشتقات الشائعة هى النهيدرين و OPA وفلورسكامين.

يمتاز الفصل باستخدام طريقة Pre-column مقارنة بطريقة Post-column بالحساسية العالية، وقت التحليل قصير، ولا توجد اى صعوبات بالنسبة لكمية العينة المراد تحليلها (الطعام أو مواد العلف).

وأهم عيوبها هى:-

١- تكشف فقط عن الأحماض الأمينية الأولى Primary.
٢- صعوبة تكوين المشتقات.
٣- تداخل الكشاف أو النواتج الثانوية مع التقدير الكمى.
٤- عدم ثبات المشتقات المزدوجة Double derivatives.
٥ - تحضير المشتق لا يكون كميا دائما.

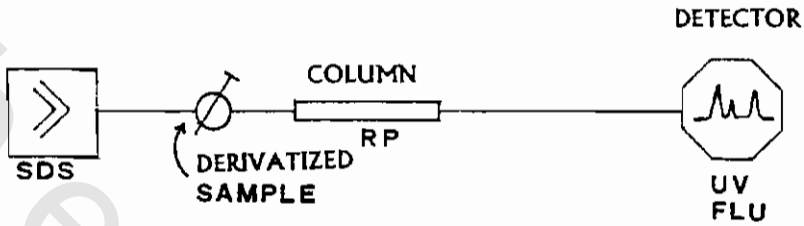
ومن جهة أخرى فان تقدير الأحماض الأمينية بطريقة Post لها عيوب وهى:-

١- وقت التحليل طويل.
٢ - حساسيتها أقل.

obeikandl.com

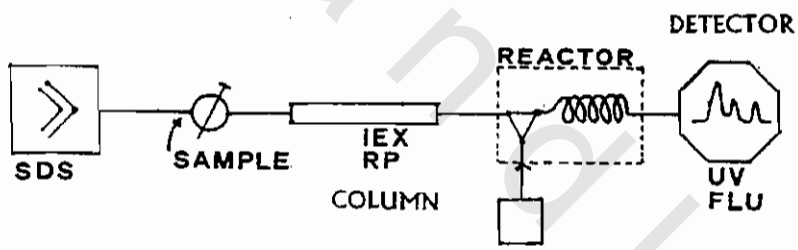
DERIVATIZATION PROCEDURES: طرق إجراء المشتقات

PRE-COLUMN



REVERSED PHASE - RP DANSYL
- RP OPA
- RP PTH

POST-COLUMN



ION-EXCHANGE - IEX NINHYDRIN
ION-EXCHANGE - IEX OPA
REVERSED PHASE - RP OPA

obeikandl.com

مقارنة بين الطرق الشائعة لتقدير الأحماض الامينية بواسطة HPLC

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