

تحديد الحموض الأمينية (سيرين وغلايسين) بالتحليل الكروماتوغرافي السائل عالي الأداء المزود بكاشف الفلورة عن طريق تشكيل مشتقات ايزندولية

الدكتور حسان صديق*

رنا قازان**

(تاريخ الإيداع 24 / 12 / 2013. قُبِلَ للنشر في 30 / 1 / 2014)

□ ملخص □

درسنا العوامل المؤثرة في تفاعل الاشتقاق لسيرين (Ser) وغلايسين (Gly) بمزيج من كاشفي الاشتقاق أورثو فتال ألدهيد (OPA) و3 مركبتو بروبيونيك أسيد (3-MPA) لتشكيل مشتقات ايزندولية، حددنا الزمن اللازم والأمثل لتفاعل الاشتقاق وهو خمس دقائق، يتم التفاعل في وسط من وافي البورات (0.4 M, pH = 10)، بنسبة ارتباط OPA:3-MPA توافق 1:3 ونسبة ارتباط OPA:Amino acid توافق 1:2، حددنا الزمن الأمثل لقياس المركب المشتق من 0.1 - 20 min.

وبعد دراسة كافة هذه العوامل قمنا بتحديد المشتق الايزندولي للسيرين والمشتق الايزندولي للغلايسين بالتحليل الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء بالاعتماد على كاشف الفلورة من أجل التحديد الكمي لـ Ser, Gly، باستخدام العمود Agilent Zorbax Exclipse RP C18، وقياس الفلورة عند ($\lambda_{Em} = 450 \text{ nm}$ ، $\lambda_{Ex} = 340 \text{ nm}$). حصلنا على مجال قياس خطي $0.5 - 25 \mu\text{M}$ لـ Ser، و $1 - 25 \mu\text{M}$ لـ Gly، وحساسية ودقة عاليتين، وبتبين ذلك من القيمة المنخفضة للانحراف المعياري النسبي المئوي RSD% الذي لم يتجاوز قيمته لأصغر تركيز محدد ($\pm 3.25\%$ بالنسبة لـ Ser و $\pm 3.07\%$ بالنسبة لـ Gly)، وبتنتائج صحيحة ودقيقة من خلال المردود النسبي المئوي (102.0 - 103.0) % بالنسبة لـ Ser و (94.0 - 95.8) % بالنسبة لـ Gly. بلغ حد الكشف للسيرين 36.82 nM وحد التحديد الكمي 111.59 nM وحد الكشف للغلايسين 22.12 nM وحد التحديد الكمي 67.02 nM.

الكلمات المفتاحية: سيرين، غلايسين، أورثو فتال ألدهيد، 3 مركبتو بروبيونيك أسيد، مشتق ايزندولي.

* أستاذ مساعد - قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة حلب - حلب - سورية.

** طالبة دراسات عليا (دكتوراه) - قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة حلب - حلب - سورية.

Determining Amino Acids (Serine and Glycine) HPLC Utilising a Fluorescence Detection by forming Isoindole Derivative

Dr. Hassan Seddik*
Rana Kazan**

(Received 24 / 12 / 2013. Accepted 30 / 1 / 2014)

□ ABSTRACT □

We studied the Necessary Factors effect on Derivatization reaction for Serine and Glycine, The method involves the derivatization of Serine and Glycine with a mixture of O-Phthaldialdehyde/3-Mercaptopropionic acid reagents to form isoindole derivative. The optimum time reaction was 5 min, in borate buffer (pH=10,0.4M), at molar ratio 3-MPA:OPA/1:3 and OPA:Amino acid/ 1:2, The optimum time for measurement was 0.1-20min.

After the Derivatization step we determine isoindole derivatives with High Performance Liquid Chromatography utilizing a fluorescence (FL) detector for reliable quantitative determination of (Ser and Gly). The chromatographic separation was achieved on a reversed-phase Agilent Zorbax Exclipse RP18 (C18). The FL detector was set at excitation wavelength (λ_{Ex}) of 340 nm and emission wavelength (λ_{Em}) of 450 nm.

This method was validated with respect to linearity, 0.5 – 25 μ M for Ser, and 1 – 25 μ M for Gly, highly sensitive, accuracy and precision with RSD% was not more than 3.25%, 3.07% for Ser and Gly respectively. And recovery% was (102.0-103.0)% for Ser, (94.0-95.8)% for Gly. The calculated detection limit was very low (36.82, 22.12) nM for Ser and Gly, and with very low LOQ (111.59, 67.02) nM for Ser and Gly^{respectively}.

Keywords: Serine, Glycine, O-Phthaldialdehyde, 3-Mercaptopropionic acid and Isoindole Derivative.

* Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Aleppo University, Aleppo, Syria.

** Ph.D. Student, Department of Chemistry, Faculty of Science, Aleppo University, Aleppo, Syria.

مقدمة:

يعدّ كلٌّ من السيرين Serine (Ser) والغلايسين Glycine (Gly) من الحموض الأمينية غير الأساسية Nonessential وهي التي يقوم الجسم السليم بتصنيعها بكميات كافية، ولا تستلزم حضورها في الغذاء، إلا أنه وفي بعض الأحيان يتوجب أخذ كمّات للأحماض غير الأساسية لضمان توفر الكمية المثلى في الجسم.

يعد غلايسين ($C_2H_5NO_2$) من أصغر الحموض الأمينية على الإطلاق حيث يبلغ وزنه الجزيئي g/mol 75.07 أما سيرين ($C_3H_7NO_3$) فوزنه الجزيئي g/mol 105.09 .

للحموض الأمينية أهمية بالغة كونها تدخل في تركيب البروتينات داخل الأجسام الحية، فهي:

- ✓ تدخل في تركيب الأجسام المضادة لمكافحة غزو البكتيريا والفيروسات أي في آلية الدفاع المناعي.
- ✓ تشكل جزءاً أساسياً من نظام الهرمونات فعلى سبيل المثال تدخل في تشكيل هرمون الأنسولين المسؤول عن سكر الدم.

✓ لها دور هام في عمليات التقلص العضلي.

✓ تدخل في تركيب الأنزيمات ولها دور فعال في عمليات الاستقلاب والتفاعلات الحاصلة داخل الجسم.

✓ تدخل في بناء الكيراتين الذي يدخل في تركيب كل من الجلد والشعر والأظافر والريش.

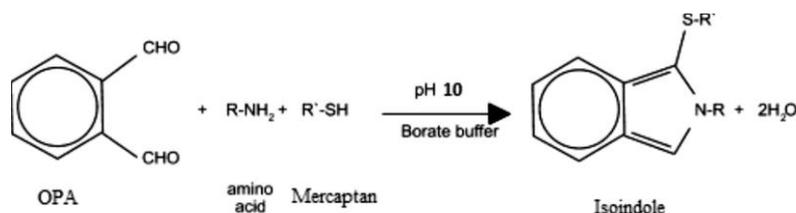
✓ تقوم بدور رئيس بحمل الأوكسجين إلى أنحاء الجسم المختلفة حيث تسهم في تركيب خضاب الدم.

✓ تدخل في بناء البروتينات النووية DNA, RNA [2,1].

حددت الحموض الأمينية ومنها السيرين والغلايسين بطرق عديدة كالرحلان الكهربائي [3-4]، وبالتحليل الكروماتوغرافي الغازي [5-6]، وبالتحليل الكروماتوغرافي السائل عالي الأداء المزود بـ: كاشف الطيف مافوق البنفسجي [7]، أو كاشف المصفوفة الضوئية [8]، أو كاشف الفلورة [9]، أو كاشف الكروماتوغرافي [10]، أو كاشف مقياس الكتلة [11].

بما أن الحمض الأميني لا يمتلك خاصية امتصاص الضوء في المجالين المرئي ومافوق البنفسجي كما أنه مركب غير متفلور، فإننا لانستطيع تحديده بشكل مباشر، لذلك نلجأ إلى خطوة هامة وهي عملية الاشتقاق حيث يتفاعل الحمض الأميني مع كاشف الاشتقاق (Derivatization Reagent) ليتشكل لدينا مركب مشتق يمكن قياسه وتحليله بعدها بالتحليل الكروماتوغرافي السائل.

من أشهر المركبات التي تستعمل في تفاعلات الاشتقاق للحمض الأميني: الننهدين [12]، 9- فلورينيل مثيل كلوروفورمات [13]، دانزيل كلوريد [14]، أورتو فتال ألدهيد [15-16] ويتميز هذا الأخير بأنه على الرغم من أنه مركب غير متفلور ولكنه يتفاعل مع الحمض الأميني بسرعة وبدرجة حرارة الغرفة ليعطي مشتق ايزندولي (Isoindole Derivative) له فلورة عالية. ولكن هذا المركب المشتق غير ثابت فهو يتفكك خلال فترة زمنية قصيرة لا تسمح بقياسه، يتم تقادي هذه المشكلة بإضافة مركب يحتوي على زمرة المركبتين (-SH) للحصول على مشتق ايزندولي ثابت يمكن قياسه وتحليله. ووفقاً لتغيير نوع المركبتين سنحصل على مركب مشتق ذي انتقائية وثباتية مختلفة. من هذه المركبات الحاوية على زمرة المركبتين والتي تدخل في تفاعل الاشتقاق: 2 مركبتو ايتانول [9,17]، ايتانثيول [18]، 3 مركبتو بروبيونيك أسيد [8-19].



شكل (1) تفاعل الاشتقاق للحمض الأميني مع أورتو فتال ألدهيد وتشكل المشتق الايزندولي

أهمية البحث وأهدافه:

دراسة الشروط المثلى المؤثرة على تشكيل مشتق إيزندولي بين الحمض الأميني (سيرين وغلايسين) مع أورتو فتال ألدهيد بوجود مركب مساعد هو 3 مركبتو بربيونيك أسيد، للحصول على مشتق ايزندولي ثابت يمكن قياس فلورته، ثم استخدام هذه المشتقات في تحديد الحموض الأمينية السابقة بالتحليل الكروماتوغرافي السائل، واختيار شروط فصل مناسبة تمكننا من الوصول إلى طريقة تحليلية سهلة وسريعة وذات دقة وحساسية عالية.

طرائق البحث ومواده:

1- الأجهزة:

استخدمنا في هذا البحث جهاز تحليل HPLC مزود بنظام تدرج لأربعة محلات (Gradient) ومضخة ثنائية وفرن لتسخين العمود وكاشف فلورة FLD، صنع شركة Agilent الألمانية، نموذج (1200 series)، يعمل هذا الكاشف ما بين الطول الموجي 220 - 380 nm لطيف الإثارة، و 300 - 800 nm لطيف الإصدار، كما استخدمنا العمود XDB-C18 ماركة Agilent Zorbax Exclipse أبعاده (5 µm, 250 mm x 4.6 mm i.d.)، حجم الحقنة 20 µL، كما أن جهاز التحليل الكروماتوغرافي السائل مزود بحاسوب يعمل بنظام Chemstation لضبط البيانات ومعالجتها. وميزان تحليلي لوزن العينات من شركة Shimadzu اليابانية، نموذج AX200 حساسيته 0.1mg، وجهاز pH من شركة Radiometer Analytical، نموذج ION Check10. استخدمنا ماصات آلية شركة Biohit proline متغيرة الحجم، ومرشحات ميكرونية 0.45µm صنع (Whatman, Hillsboro, OR).

2- المواد والمذيبات المستخدمة:

تتصف جميع المواد المستخدمة بأنها من النوع التحليلي العالي النقاوة، حموض أمينية (سيرين DL-Ser، غلايسين Gly، ونورفالين Nor) النقاوة $\leq 99\%$ من شركة Sigma-Aldrich، محلات الطور المتحرك خاصة بـ HPLC كالميتانول وأسيونتريل وتتراهيدروفوران وماء HPLC من شركة Merck، خلات الصوديوم ثلاثية الماء وبورات الصوديوم وكربونات الصوديوم وفوسفات الصوديوم وهيدروكسيد الصوديوم وحمض الخل الثلجي وحمض كلور الماء من شركة Scharlau الأسبانية، أورتو فتال ألدهيد OPA (98%) و 3 مركبتو بربيونيك أسيد 3-MPA (99%) من شركة ALFA AeSar (Karlsruhe) الألمانية، ماء ثنائي التقطير ومنزوع الشوارد ناقلية $> 1 \mu\text{s.cm}^{-1}$

3 - تحضير المحاليل العيارية الرئيسية:**3-3-1- تحضير المحلول الرئيس لواقى بوراتي بتركيز 1 M:**

يحضر من بورات الصوديوم $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ في ماء منزوع الشوارد في دورق عياري سعة 1000 mL، ثم يحضر من محلول البورات الرئيس سلسلة من محاليل البورات الواقية بتركيز مختلفة (0.8 - 0.1) M، وتضبط pH المحلول باستخدام محلول (0.5 M) NaOH عند $\text{pH} = 10$ ليكون الحجم النهائي لكل محلول 100 mL. كما حضرنا من محلول البورات الرئيس محلول بورات تركيزه 0.4 M في دورق عياري سعة 1000 mL وحضرنا منه سلسلة من المحاليل في دورق عيارية سعة 100 mL حيث قيمة pH (9.5 - 12).

3-3-2- تحضير محلول واقى كربوناتى بتركيز 0.4 M:

يحضر من كربونات الصوديوم Na_2CO_3 في ماء منزوع الشوارد في دورق عياري سعة 1000 mL، ويضبط pH باستخدام محلول (0.5 M) NaOH لتحضير سلسلة من المحاليل حيث pH (9.5 - 12) ليكون الحجم النهائي لكل محلول 100 mL.

3-3-3- تحضير محلول واقى فوسفاتي بتركيز 0.4 M:

يحضر من فوسفات ثنائية الصوديوم $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ في ماء منزوع الشوارد في دورق عياري سعة 1000 mL، يضبط pH باستخدام محلول (0.5 M) NaOH لتحضير سلسلة من المحاليل حيث pH (9.5 - 12) ليكون الحجم النهائي لكل محلول 100 mL.

3-3-4- تحضير محلول واقى خلالي بتركيز 100 mM:

يحضر من خلالات الصوديوم $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ في ماء منزوع الشوارد في دورق عياري سعة 1000 mL، ويضبط pH باستخدام حمض الخل 2% عند $\text{pH} = 7.6$ ، ويحضر منه محلول خلالات واق بتركيز 20 mM في دورق عياري سعة 500 mL بحيث يكون أيضاً قيمة $\text{pH} = 7.6$.

3-3-5- تحضير المحلول العياري الرئيسي لمزيج من سيرين وغلایسین بتركيز $(1 \times 10^{-3} \text{ M})$:

يحضر بإذابة 10.62 mg من سيرين ($M_w = 105.09 \text{ g/mol}$)، و 7.58 mg من غلایسین ($M_w = 75.07 \text{ g/mol}$)، في دورق عياري 100 mL بحمض كلور الماء 0.1 M. وبعدها نحضر من المحلول العياري الرئيسي سلسلة من المحاليل العيارية بتركيز مختلفة ($0.5 - 25 \mu\text{M}$).

3-3-6- تحضير محلول OPA بتركيز $(1 \times 10^{-3} \text{ M})$:

يوزن 13.67 mg من أورثو فتال ألدهيد $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$ ($M_w = 134 \text{ g/mol}$) في دورق عياري سعة 100 mL، ويحل في 5 mL من الميثانول، ويكمل الحجم حتى الإشارة العيارية بواقى البورات. يحضر أسبوعياً ويخزن في البراد بدرجة 4°C .

3-3-7- تحضير محلول 3-MPA بتركيز $(1 \times 10^{-3} \text{ M})$:

يؤخذ 10.71 mL من 3 مركبتو بريونيوك أسيد ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) ($M_w = 106 \text{ g/mol}$) في دورق عياري سعة 100 mL، ويتم الحجم بالميتانول حتى الإشارة العيارية. يحضر أسبوعياً ويخزن في البراد بدرجة 4°C .

3-3-8- تحضير محلول كاشف الاشتقاق (D.R.):

يحضر كاشف الاشتقاق Derivatisation reagent (D.R.) يومياً بمزج 3-MPA:OPA بنسبة 1:3، يضاف إلى المحلول العياري للحمض الأميني أو لمحلول العينة، نسبة من محلول كاشف الاشتقاق (D.R.) توافق النسبة 1:2

ملاحظة: ترشح جميع المحاليل السابقة بعد تحضيرها بمرشحات ميكرونية 0.45µm.

4. طريقة العمل:**4-1- تحضير مزيج من سيرين وغلایسین بشكليهما النقي:**

نحضر انطلافاً من المحلول الأم (1x10⁻³M) الذي يحتوي على مزيج من الحمضين الأمينين سيرين وغلایسین سلسلة من المحاليل العيارية بتركيز مختلفة كما في الجدولين (3-4)، وبعدها نأخذ 2 mL من المحلول العياري للمزيج مع 1 mL من كاشف الاشتقاق في دورق عياري سعة 10 mL ونضيف 3 mL من وافي البورات (0.4 M , pH = 10) ، ونكمل الحجم حتى الإشارة العيارية بماء HPLC، يترك المزيج بعدها 5 دقائق وهي كافية لحدوث تفاعل الاشتقاق بدرجة حرارة الغرفة، ويحقن 20 µL منه في جهاز HPLC.

4-2 - الشروط الكروماتوغرافية المعتمدة:

تم تحديد مشتق سيرين ومشتق غلایسین في جهاز الفصل الكروماتوغرافي السائل وفقاً للشروط الكروماتوغرافية التي توصلنا إليها من خلال دراستنا، استخدمنا مزيج من الأطوار المتحركة: يتألف الطور A من مزيج من: وافي خلات الصوديوم تركيزه 20 mM (تم ضبط pH عند 7.6 بواسطة حمض الخل 2%) + 3% حجماً تتراهيدروفوران. والطور B فيتكون من مزيج من: ميثانول + أسيتو نتريل + وافي خلات الصوديوم تركيزه 100 mM (تم ضبط pH للوافي عند 7.6 بواسطة حمض الخل 2%). بنسب حجمية 2:2:1، وكانت نسبة التدفق للطور المتحرك 1.5 mL.min⁻¹. تضبط درجة حرارة العمود عند 32°C. يتم قياس شدة إصدار الفلورة للمركب الناتج عند طول موجة الإثارة الأعظمية λ_{Ex} = 340 nm ، وطول موجة الإصدار الأعظمية λ_{Em} = 450 nm.

النتائج والمناقشة:

تمت دراسة العوامل المؤثرة في تشكل مشتق الإيزندول لسيرين وغلایسین مع كلٍ من OPA و 3-MPA بهدف التوصل للشروط المثلى لتشكل هذا المشتق، واختير وافي البورات (0.4 M ، pH = 10) في تفاعل الاشتقاق لأنه الأفضل مقارنةً مع المحاليل الواقية الأخرى (وافي كربونات ووافي فوسفاتي).

وحددنا النسبة المولية للارتباط بين OPA: 3-MPA وكانت موافقة لـ (1:3)

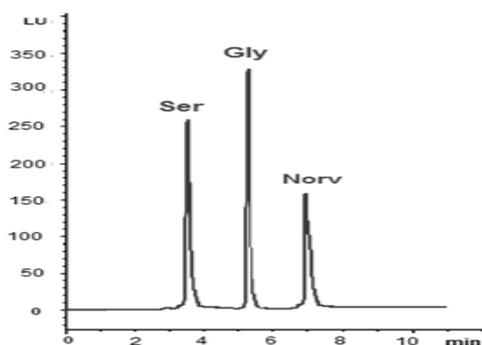
كما حددنا النسبة المولية للارتباط بين OPA: Amino Acid وكانت موافقة لـ (1:2)

وتم تحديد الزمن اللازم لحدوث تفاعل الاشتقاق وهو خمس دقائق وهو قصير بالمقارنة مع الزمن اللازم لحدوث تفاعل الاشتقاق عند استخدام كواشف اشتقاق أخرى، فعلى سبيل المثال يكون الزمن اللازم للتفاعل 20 min عند الاشتقاق بمركب 9 فلورنيل ميثيلوكسي كاربونيل [20]، أو عند الاشتقاق بمركب فينيل ايزوثيوسيانات [21].

وتبين من خلال دراستنا أن الزمن الأمثل لإجراء القياس هو بين 1-20 min.

يوضح الشكل (2) كروماتوغرام مشتق سيرين ومشتق غلایسین بشكليهما النقي، بوجود نورفالين (Nor)

Norvaline كعياري داخلي تركيزه 10 µM وذلك عند استخدام العمود C18 وقياس شدة إصدار الفلورة.



شكل (2) كروماتوغرام مشتق سيرين ومشتق غلايسين بوجود نورفالن كعيار داخلي باستخدام

واقي بورات (PH = 10, 0.4 M), $C_{Ser} = C_{Gly} = 10 \mu M$, $\lambda_{Em} = 450 \text{ nm}$

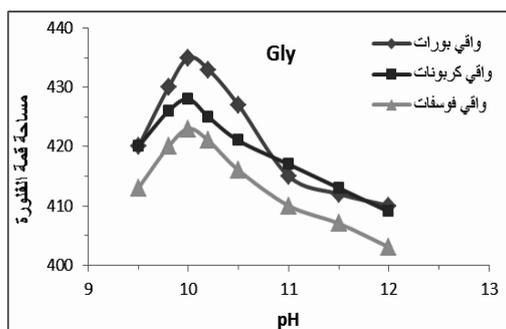
$t_{R(Ser)} = 3.72 \text{ min}$, $t_{R(Gly)} = 5.20 \text{ min}$, $t_{R(Nor)} = 7.11 \text{ min}$

1- دراسة مقارنة تأثير كلٍ من (واقي البورات 0.4 M، واقي الكربونات 0.4 M، واقي الفوسفات 0.4 M):

درسنا تأثير نوع المحلول الواقي المستخدم ذو التركيز 0.4 M (واقي بورات وواقي كربونات وواقي فوسفات)

حيث تم تحضير سلسلة من المحاليل الواقية ضمن مجال pH 9.5 - 12 وبعد تشكيل مشتق الإيزندول لسيرين ومشتق الإيزندول لغلايسين تركيز كلٍ منهما $10 \mu M$ مع OPA و 3-MPA، تم القياس عند $\lambda_{Ex} = 330 \text{ nm}$ و $\lambda_{Em} = 450 \text{ nm}$ ، رسمنا تغيرات مساحة قمة الفلورة بدلالة قيمة pH المحلول الواقي، فتبين أن واقي البورات هو

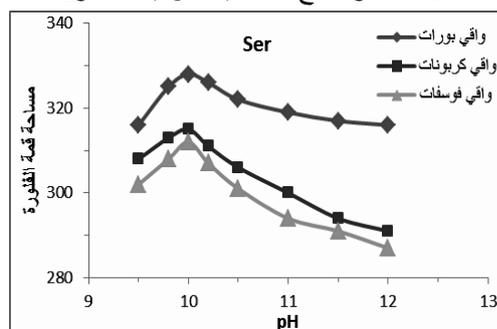
الواقي الأفضل بالمقارنة مع المحاليل الواقية الأخرى.



شكل (4) مقارنة تأثير pH الوسط على مساحة قمة الفلورة

لمشتق غلايسين تركيزه $10 \mu M$, $\lambda_{Ex/Em} = 340/450 \text{ nm}$

في وسط كلٍ من واقي بورات/كربونات/فوسفات 0.4 M



شكل (3) مقارنة تأثير pH الوسط على مساحة قمة الفلورة

لمشتق سيرين تركيزه $10 \mu M$, $\lambda_{Ex/Em} = 340/450 \text{ nm}$

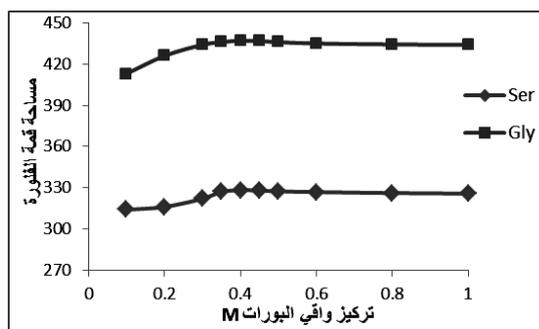
في وسط كلٍ من واقي بورات/كربونات/فوسفات 0.4 M

2- دراسة تأثير تركيز واقي البورات عند pH = 10:

تمت دراسة تأثير تركيز المحلول الواقي المستخدم وهو واقي البورات حيث تم تحضير سلسلة من المحاليل

الواقية ضمن مجال للتركيز 0.1 - 1 M عند pH = 10، وتم تشكيل مشتق الإيزندول بين كلٍ من سيرين وغلايسين بتركيز $10 \mu M$ مع OPA و 3-MPA، قيست شدة إصدار الفلورة عند $\lambda_{Em} = 450 \text{ nm}$ ، اعتمدنا التركيز 0.4 M

كقيمة مفضلة ويتضح ذلك من الشكل (5).

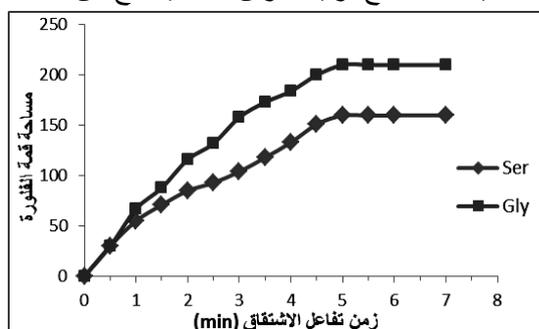


شكل (5) تأثير تركيز وافي البورات على مساحة قمة الفلورة لمشتق سيرين ومشتق غلايسين بتركيز

$$\lambda_{Ex/Em} = 340/450 \text{ nm} \text{ و } \text{pH} = 10 \text{ وذلك عند } 10 \mu\text{M}$$

3- دراسة تأثير الزمن اللازم لتفاعل الاشتقاق:

درسنا زمن التفاعل اللازم لتشكيل مشتق الإيزندول بين كلٍ من Ser و Gly مع كاشف الاشتقاق OPA بوجود 3-MPA، وكان تركيز Ser و Gly في المركب المتمثل $5 \mu\text{M}$ ، باستخدام وافي البورات ($\text{pH} = 10$ ، 0.4 M) عند $\lambda_{Em} = 450 \text{ nm}$ و $\lambda_{Ex} = 340 \text{ nm}$ ، ولاحظنا أن مساحة قمة الفلورة لمشتق Ser ومشتق Gly تزداد مع زيادة الزمن حتى 5 min حيث تبقى هذه القيمة ثابتة مع ازدياد الزمن، كما يتضح من الشكل (6).



شكل (6) تأثير زمن تفاعل الاشتقاق على مساحة قمة الفلورة لمشتقي سيرين وغلايسين بتركيز

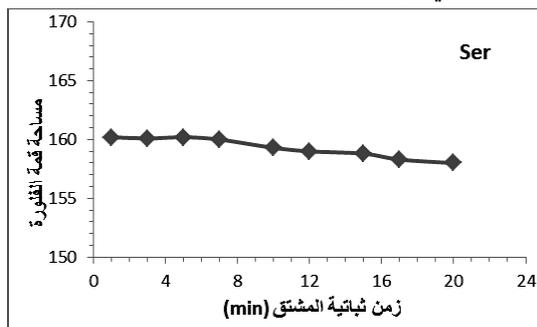
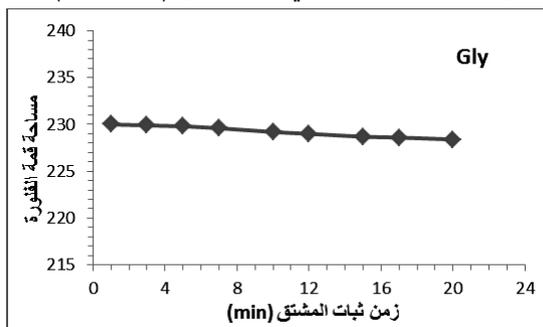
$$\lambda_{Ex/Em} = 340/450 \text{ nm} (\text{pH} = 10.0.4 \text{ M}) \text{ باستخدام وافي البورات } 5 \mu\text{M}$$

4- دراسة ثباتية مشتق الإيزندول مع الزمن في درجة حرارة الغرفة ($25 \pm 2^\circ\text{C}$):

بعد أن اعتمدنا زمن التفاعل الأمثل لتشكيل مشتق الإيزندول بين الحمض الأميني مع OPA و 3-MPA وهو خمس دقائق، درسنا زمن ثباتية مشتق الإيزندول، وتركيز الحمض الأميني $5 \mu\text{M}$ خلال فترات زمنية متفاوتة من دقيقة واحدة إلى أربع ساعات.

لاحظنا من قياس قمم الفلورة الناتجة عند ($\lambda_{Em} = 450 \text{ nm}$)، أن مساحة قمة الفلورة لمشتق سيرين تبقى ثابتة في الدقائق الخمس الأولى لتتخفض بعدها بنسبة ضئيلة جداً (تتخفض المساحة بمقدار % 0.56 بعد مرور عشر دقائق من الزمن، وتزداد نسبة الانخفاض قليلاً لتبلغ % 1.37 عند زمن 20 min)، وبعدها تزداد نسبة انخفاض المساحة بشكل ملحوظ مع مرور الزمن. أما بالنسبة لمشتق غلايسين فإن مساحة الفلورة تبقى تقريباً ثابتة خلال العشرين دقيقة الأولى، حيث تتخفض المساحة بنسبة ضئيلة جداً (تتخفض بمقدار % 0.35 بعد مرور عشر دقائق من الزمن، وتزداد نسبة الانخفاض قليلاً لتبلغ % 0.69 عند زمن 20 min)، وبعدها تزداد نسبة انخفاض المساحة بشكل ملحوظ مع مرور الزمن خلال أربع ساعات.

وبالتالي فإن المركب المشتق المتشكل يبقى ثابتاً خلال فترة التحليل والقياس التي لا تتجاوز (7.2 min).



شكل (8) تأثير زمن ثباتية مشتق غلايسين تركيزه $5 \mu\text{M}$ على مساحة قمة الفلورة خلال عشرين دقيقة باستخدام واقي البورات

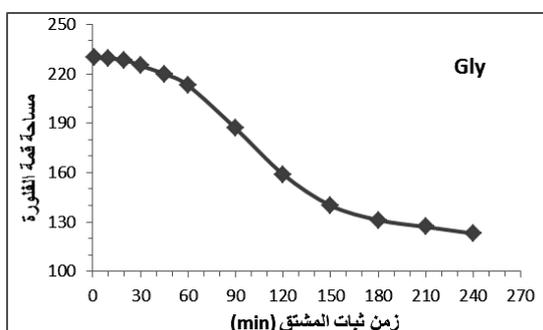
$$\lambda_{\text{Ex/Em}} = 340/450 \text{ nm (pH = 10, 0.4 M)}$$

شكل (7) تأثير زمن ثباتية مشتق سيرين تركيزه $5 \mu\text{M}$ على مساحة قمة الفلورة خلال عشرين دقيقة باستخدام واقي البورات

$$\lambda_{\text{Ex/Em}} = 340/450 \text{ nm (pH = 10, 0.4 M)}$$

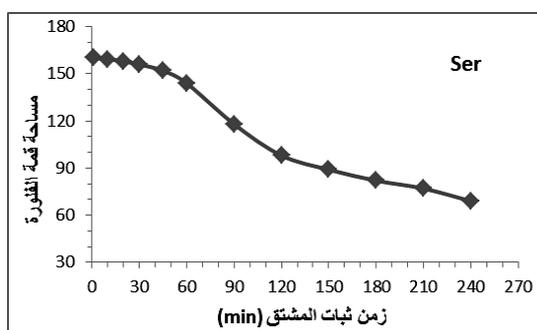
وباستمرار مراقبة شدة الفلورة خلال مدة زمنية تبلغ أربع ساعات تبين أنه يحصل تناقص لمساحة قمة الفلورة

بشكل واضح ويتضح ذلك من الشكلين (9-10).



شكل (10) تأثير زمن ثباتية مشتق غلايسين تركيزه $5 \mu\text{M}$ على مساحة قمة الفلورة خلال أربع ساعات باستخدام واقي البورات

$$\lambda_{\text{Ex/Em}} = 340/450 \text{ nm (pH = 10, 0.4 M)}$$



شكل (9) تأثير زمن ثباتية مشتق سيرين تركيزه $5 \mu\text{M}$ على مساحة قمة الفلورة خلال أربع ساعات باستخدام واقي البورات

$$\lambda_{\text{Ex/Em}} = 340/450 \text{ nm (pH = 10, 0.4 M)}$$

5- تحديد نسب الارتباط المولية:

من أجل تحديد نسبة الارتباط في مشتق الإيزندول المتشكل بين الحمض الأميني Amino acid وكاشفي الاشتقاق Derivatisation reagents (D.R.) وهما OPA و 3-MPA ، طبقنا كلاً من طريقي النسبة الجزيئية والتغير المستمر لتحديد نسبة الارتباط مع مراعاة الشروط المثلى السابقة الذكر.

درسنا أولاً نسبة الارتباط بين كاشفي الاشتقاق OPA و 3-MPA بوجود كمية ثابتة من الحمض الأميني ضمن مشتق الإيزندول، ثم درسنا ثانياً نسبة الارتباط بين الحمض الأميني مع كاشف الاشتقاق OPA ضمن مشتق الإيزندول.

1-5- دراسة نسبة الارتباط بين كاشفي الاشتقاق أورتو فتال ألدهيد و 3 مركبتو بروبيونيك أسيد في مشتق

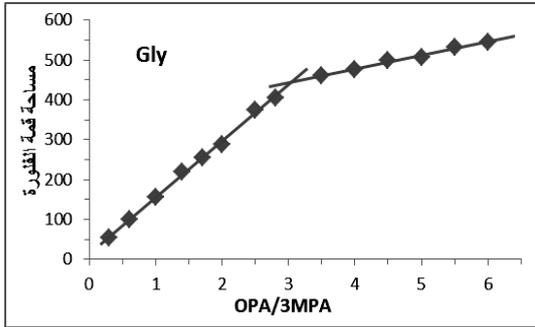
الإيزندول:

1-1-1- طريقة النسب الجزئية:

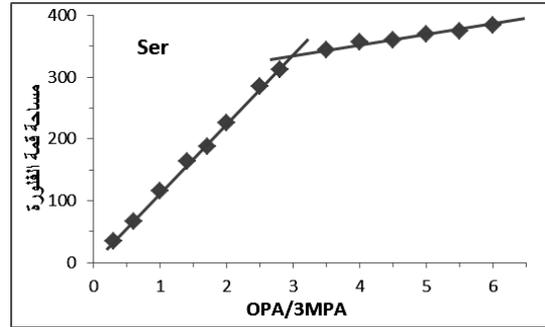
حضرنا في الشروط المثلى المعتمدة سلسلة من محاليل OPA - 3-MPA، يتغير فيها تركيز OPA من $10 \mu\text{M}$ وحتى $60 \mu\text{M}$ بوجود تركيز ثابت من 3-MPA في كل محلول يساوي $10 \mu\text{M}$ ، وتركيز الحمض الأميني Ser أو Gly في كل محلول ثابت $10 \mu\text{M}$.

سجلنا قياس الفلورة لتلك المحاليل عند $\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}$ ، $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$ وباستخدام محلول مقارن محضر بالطريقة نفسها عدا الحمض الأميني.

برسم تغيرات مساحة قمة الفلورة لمحاليل المشتقات المتشكلة بدلالة النسبة الجزئية ل OPA إلى 3-MPA، نلاحظ من الرسم البياني الناتج وجود انكسار وحيد وأن نقطة تقاطع الخطين المستقيمين تقع عند نسبة جزئية تساوي 3، مما يشير إلى أن نسبة الارتباط في المركب المتشكل OPA : 3-MPA وفقاً لهذه الطريقة هي 3 : 1.



شكل (12) حساب نسبة الارتباط بين OPA و 3-MPA
لمشتق غلايسين بطريقة النسب الجزئية حيث تركيز
3-MPA ثابت في كل محلول ويساوي $10 \mu\text{M}$

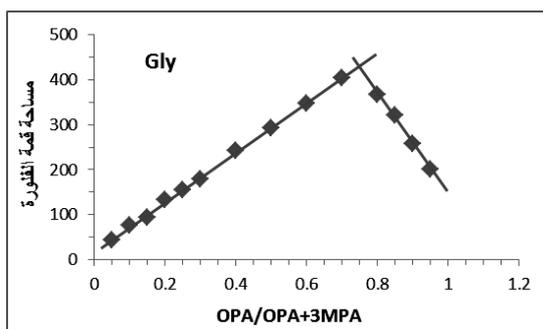


شكل (11) حساب نسبة الارتباط بين OPA و 3-MPA
لمشتق سيرين بطريقة النسب الجزئية حيث تركيز
3-MPA ثابت في كل محلول ويساوي $10 \mu\text{M}$

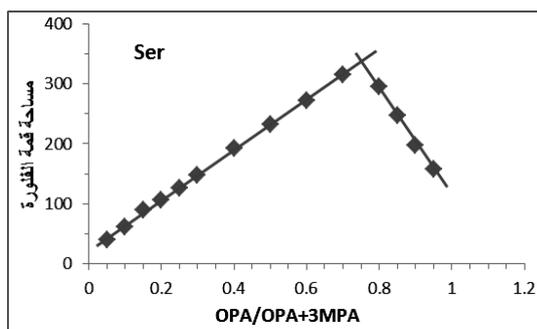
1-1-2- طريقة التغير المستمر:

حضرنا في الشروط المثلى المعتمدة سلسلة من محاليل OPA - 3-MPA، يتغير فيها تركيز ال OPA و 3-MPA من $0.5 \mu\text{M}$ إلى $9.5 \mu\text{M}$ ، بحيث يبقى مجموع تركيزهما في كل محلول ثابتاً ويساوي $10 \mu\text{M}$. ويكون تركيز الحمض الأميني (سيرين أو غلايسين) في كل محلول ثابت ويساوي $10 \mu\text{M}$.

سجلنا قياس الفلورة لتلك المحاليل عند $\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}$ ، $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$ وباستخدام محلول مقارن محضر بالطريقة نفسها عدا الحمض الأميني. برسم تغيرات مساحة قمة الفلورة لمحاليل المركبات المتشكلة بدلالة الكسر المولي ل OPA، نلاحظ من الرسم البياني الناتج وجود انكسار وحيد وأن نقطة تقاطع الخطين المستقيمين تقع عند الكسر المولي 0.75، مما يشير إلى أن نسبة الارتباط في المركب المتشكل OPA : 3-MPA وفقاً لهذه الطريقة أيضاً هي 3 : 1.



شكل (14) حساب نسبة الارتباط بين OPA و 3-MPA
لمشتق غلايسين بطريقة التغير المستمر حيث مجموع تركيز
OPA مع 3-MPA في المحلول ثابت ويساوي $10 \mu\text{M}$

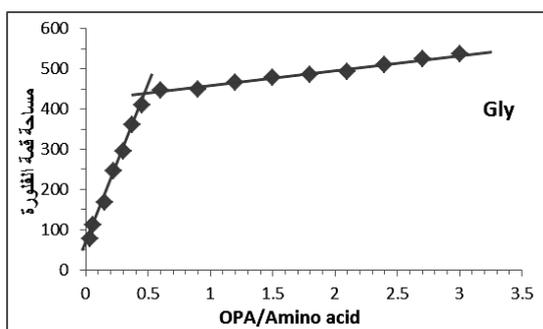


شكل (13) حساب نسبة الارتباط بين OPA و 3-MPA
لمشتق سيرين بطريقة التغير المستمر حيث مجموع تركيز
OPA مع 3-MPA في المحلول ثابت ويساوي $10 \mu\text{M}$

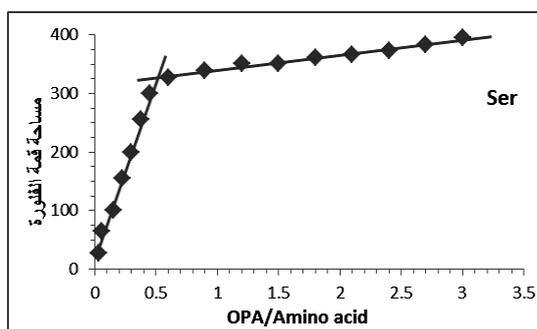
5-2-2- دراسة نسبة الارتباط في مشتق الإيزندول بين الحمض الأميني وكاشف الاشتقاق أورثو فتال ألدهيد:

5-2-1- طريقة النسب الجزيئية:

حضرنا في الشروط المثلى المعتمدة سلسلة من محاليل OPA - Amino acid، يتغير فيها تركيز OPA من $0.3 \mu\text{M}$ وحتى $30 \mu\text{M}$ وبالتالي يتغير تركيز 3-MPA من $0.1 \mu\text{M}$ وحتى $10 \mu\text{M}$ بحيث تتحقق النسبة بين (Ser, Gly) وهي (3-MPA:OPA) (1:3) ويوجد تركيز ثابت من الحمض الأميني ($10 \mu\text{M}$). سجلنا قياس الفلورة عند $\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}$ ، $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$ وباستخدام محلول مقارن محضر بالطريقة نفسها عدا الحمض الأميني. برسم تغيرات مساحة قمة الفلورة لمحاليل المركبات المشكلة بدلالة النسبة الجزيئية لـ OPA إلى الحمض الأميني، لاحظنا وجود انكسار وحيد وأن نقطة تقاطع الخطين المستقيمين تقع عند نسبة جزيئية تساوي 0.5، مما يشير إلى أن نسبة الارتباط في المعقد المتشكل OPA : Amino acid هي 2 : 1.



شكل (16) حساب نسبة الارتباط بين غلايسين و OPA
بطريقة النسب الجزيئية حيث تركيز غلايسين ثابت في كل
محلول ويساوي $10 \mu\text{M}$

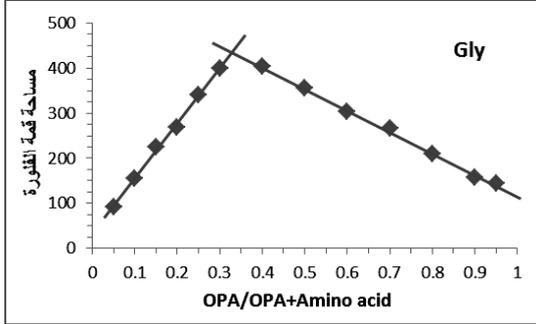


شكل (15) حساب نسبة الارتباط بين سيرين و OPA
بطريقة النسب الجزيئية حيث تركيز سيرين ثابت في كل
محلول ويساوي $10 \mu\text{M}$

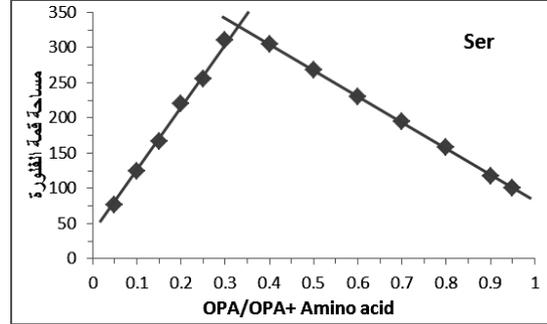
5-2-2- طريقة التغير المستمر:

حضرنا في الشروط المثلى المعتمدة سلسلة من محاليل OPA - Amino acid، يتغير فيها تركيز OPA والحمض الأميني من $0.5 \mu\text{M}$ إلى $9.5 \mu\text{M}$ ، بحيث يبقى مجموع تركيزهما في كل محلول ثابتاً ويساوي $10 \mu\text{M}$. وكما يتغير تركيز 3-MPA تبعاً للنسبة (3-MPA:OPA) وهي (1:3) من $0.166 \mu\text{M}$ إلى $3.16 \mu\text{M}$. سجلنا قياس الفلورة لتلك المحاليل عند $\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}$ ، $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$ وباستخدام محلول مقارن محضر بالطريقة

نفسها عدا الحمض الأميني. نرسم تغيرات مساحة قمة الفلورة لمحاليل المركبات المتشكلة بدلالة الكسر المولي لـ OPA، فنلاحظ من الرسم البياني الناتج وجود انكسار وحيد وأن نقطة تقاطع الخطين المستقيمين تقع عند الكسر المولي 0.33، مما يشير إلى أن نسبة الارتباط في المركب المتشكل OPA: Amino acid وفقاً لهذه الطريقة أيضاً هي 2 : 1.



شكل (18) حساب نسبة الارتباط بين غلايسين وكاشف الاشتقاق OPA بطريقة التغير المستمر حيث مجموع تركيز OPA مع Gly في المحلول ثابت ويساوي 10 µM

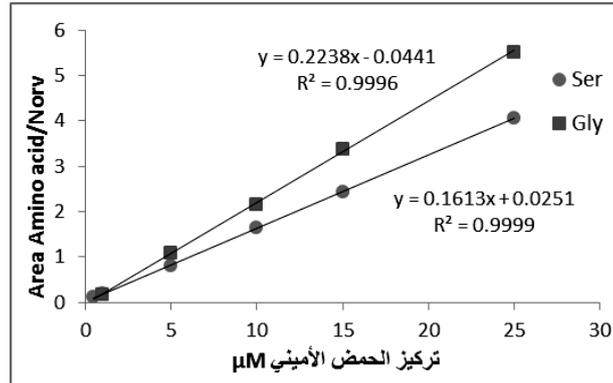


شكل (17) حساب نسبة الارتباط بين سيرين وكاشف الاشتقاق OPA بطريقة التغير المستمر حيث مجموع تركيز OPA مع Ser في المحلول ثابت ويساوي 10 µM

6- استخدام المشتق الإيزندولي المتشكل لكل من الحموض الأمينية المدروسة في التحديد الكمي للسيرين

والغلايسين:

طبقتنا الشروط المثلى التي توصلنا إليها من أجل تشكيل مشتق الإيزندول لـ Ser, Gly لإجراء التحديد الكمي وإيجاد المجال الخطي، وقد وجدنا أن العلاقة ما بين المساحة النسبية لمشتق الحمض الأميني إلى مشتق نورفالين وتركيز الحمض الأميني طردية خطية ضمن المجال المحدد لكل حمض أميني، وذلك وفقاً لمعادلة المنحني: $A = mC + b$ وبتطبيق طريقة أصغر المربعات المبرمجة حاسوبياً وفقاً لبرنامج Excel، كما هو مبين من الشكل (19).



شكل (19) المنحني المعياري لتحديد مشتق الإيزندول لسيرين وغلايسين بوجود العياري الداخلي نورفالين

يوضح الجدول (1) الشروط المثلى المعتمدة لتشكيل مشتق الإيزندول لـ Gly, Ser وذلك من أجل تحديد تراكيز مختلفة من الحمض الأميني باستخدام طريقة المنحني المعياري.

جدول (1) الشروط المثلى لتشكيل مشتق الحمض الأميني

العوامل المؤثرة	القيم المثلى
أولاً: الشروط المثلى لتفاعل اشتقاق الحمض الأميني	
وسط التفاعل	واقي بورات 0.4 M , pH = 10
زمن التفاعل	5 min
درجة الحرارة	25 ± 2 °C
الزمن الأمثل للقياس	0.1 - 20 min
ثانياً: الشروط المثلى للفصل الكروماتوغرافي للسائل	
العمود المستخدم	XDB-C18
أبعاد العمود المستخدم	5 µm , 250 mm x 4.6 mm i.d.
درجة حرارة العمود	32 °C
الطور المتحرك المستخدم وفق تدرج المحلات	94% من الطور A : (20 mM واقي خلات + نترات هيدرو فوران) بنسب (3:97, v/v)
	6% من الطور B : (100 mM واقي خلات + أسيتونتريل + ميتانول بنسب (2:2:1, v/v/v))
	الزمن (min) الطور A الطور B
	0 94% 6%
	5.5 70% 30%
pH واقي أسيتات الصوديوم المستعمل في الطور المتحرك	7.6
سرعة تدفق الطور المتحرك mL.min ⁻¹	1.5
طول الموجة الإثارة الأعظمي λ _{ex} , nm	340
طول الموجة الإصدار الأعظمي λ _{em} , nm	450
زمن احتفاظ سيرين min	3.72 ± 0.08
زمن احتفاظ غلايسين min	5.20 ± 0.07

نعرض في الجداول التالية المجال الخطي للتركيز و قيم معامل الارتباط R^2 بين النقاط والتقاطع مع محور المساحة b والميل m للمعطيات العيارية للمركب المشتق لكل حمض أميني مدروس على حدى، كما حسبنا حد الكشف النوعي LOD وحد التحديد الكمي LOQ بالاعتماد على العلاقتين:

$$LOD = 3.3 SD / m \quad , \quad LOQ = 10 SD / m$$

حيث SD هو الانحراف المعياري لنقطة تقاطع الخط العياري مع محور المساحة و m هي ميل المنحني العياري

[22].

جدول (2) العوامل الكمية من أجل تحديد مشتق الحمض الأميني

العامل الكمي	سيرين	غلایسین
المجال الخطي (μM)	25 – 0.5	25 – 1
معادلة المنحني بوجود العياري الداخلي نورفالين	$Y = 0.1613 x + 0.0251$	$Y = 0.2238 x - 0.0441$
معامل الارتباط (R^2)	0.9999	0.9996
الانحراف المعياري لنقطة التقاطع مع محور المساحة (SD)	0.0018	0.0015
LOD (nM)	36.82	22.12
LOQ (nM)	111.59	67.02

ولتحديد دقة هذه الطريقة حسبنا الانحراف المعياري SD والانحراف المعياري النسبي المئوي RSD% والخطأ المعياري وحد الثقة عند النسبة 95% لتراكيز مختلفة محددة على المنحني العياري، كما هو موضح في الجدول (3)، يوضح هذا الجدول أن النتائج التي توصلنا إليها تميزت بحساسية ودقة عاليتين وتبين ذلك من القيمة المنخفضة للانحراف المعياري النسبي المئوي RSD% الذي لم تتجاوز قيمته $\pm 3.25\%$ لأصغر تركيز محدد بالنسبة لـ Ser و $\pm 3.07\%$ لأصغر تركيز محدد بالنسبة لـ Gly وتميزت أيضاً بنتائج صحيحة ودقيقة من خلال المردود النسبي الذي تراوح بين (102.0–103.0)% لسيرين و (94.0–95.8)% لغلایسین.

جدول (3) تقدير دقة وصحة طريقة التحليل لتحديد سيرين

Rec%	$\bar{x} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$ μM	RSD%	SD	التركيز المحدد* μM	التركيز المأخوذ μM
102.0	0.51 ± 0.0206	3.25	0.0166	0.51	0.5
103.0	1.03 ± 0.0388	3.04	0.0313	1.03	1
101.4	5.07 ± 0.1781	2.83	0.1435	5.07	5
102.8	10.28 ± 0.3203	2.51	0.2580	10.28	10
103.6	15.54 ± 0.4958	2.57	0.3994	15.54	15
103.0	25.75 ± 0.7129	2.23	0.5742	25.75	25

* متوسط خمس تجارب

جدول (4) تقدير دقة وصحة طريقة التحليل لتحديد غلايسين

Rec%	$\bar{x} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$ μM	RSD%	SD	التركيز المحدد* μM	التركيز المأخوذ μM
94.0	0.94 ± 0.0346	3.07	0.0279	0.94	1
94.4	4.72 ± 0.1682	2.87	0.1355	4.72	5
95.0	9.50 ± 0.3232	2.74	0.2603	9.50	10
95.2	14.28 ± 0.4644	2.62	0.3741	14.28	15
95.8	23.95 ± 0.7225	2.43	0.5820	23.95	25

* متوسط خمس تجارب

الاستنتاجات والتوصيات:

1. تحديد كافة العوامل المؤثرة في تشكيل المشتق الإيزندولي للسيرين والمشتق الإيزندولي للغلايسين، وذلك بتفاعل الحمض الأميني مع OPA، واخترنا إضافة 3-MPA لتفاعل الاشتقاق كي نحصل على مشتق إيزندولي ثابت.
2. درسنا ولأول مرة نسبة الارتباط في المشتق المتشكل بين (OPA : 3-MPA) وكانت موافقة للنسبة 1:3 وبين (OPA : Amino Acid) وهي موافقة للنسبة 1:2.
3. درسنا المدة الزمنية الكافية لحدوث التفاعل وهي 5 دقائق وهي فترة زمنية قصيرة مقارنة مع الفترة الزمنية عند استخدام كواشف اشتقاق أخرى لذلك اخترنا أورتو فتال ألدهيد لعملية الاشتقاق.
4. درسنا ولأول مرة الزمن الأمثل لإجراء قياس الفلورة للمركب المشتق 1 - 20 min ولاحظنا تفكك هذا المركب المشتق بعد هذا الزمن بشكل واضح.
5. حددنا الواقي الأنسب لتفاعل الاشتقاق وهو وافي البورات وذلك بعد المقارنة بين (واقي البورات وواقي الكربونات وواقي الفوسفات).
6. توصلنا إلى طريقة تحليلية بسيطة وسريعة وذلك بعد تحديد الشروط المثلى لتشكيل المشتق الإيزندولي لحمض Ser وحمض Gly بوجود عياري داخلي من Nor، وتوصلنا إلى أزمنة احتفاظ قصيرة لهذه المشتقات.
7. تميزت الطريقة بحساسية عالية حيث كان حد الكشف من رتبة النانومول 36.82 nM للسيرين و 22.12 nM للغلايسين، وبدقة عالية حيث أن RSD% لم يتجاوز $\pm 3.25\%$ لأصغر تركيز محدد بالنسبة لـ Ser و $\pm 3.07\%$ بالنسبة لـ Gly، وبناتج صحيحة تتضح من خلال المردود النسبي المئوي (102.0-103.0) % بالنسبة لـ Ser و (94.0-95.8) % بالنسبة لـ Gly.
8. نوصي بتطبيق وتطوير هذه الطريقة لتحديد كمية سيرين وغلايسين في عينات مختلفة، مثل العينات الغذائية أو المستحضرات الدوائية أو العينات الحيوية.
9. نوصي بإجراء دراسات أخرى مماثلة لتحديد الحموض الأمينية الهامة الأخرى.

المراجع:

- 1- WHO TECHNICAL REPORT, *Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation*, series 2007-no.935.
- 2- GUOYAO WU.; *Amino Acids: Biochemistry and Nutrition*. 2013, by CRC Press.
- 3- HIRAYAMA,A.; and SOGA T.; *Amino Acid Analysis by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*. *Methods in Molecular Biology* 828, 2012, 77-82.
- 4- ULLMER R.; PLEMATL A.; and RIZZI A.; *Derivatization by 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate for Enhancing The Ionization yield of Small Peptides and Glycopeptides in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization and Electro spray Ionization Mass Spectrometry*, *Rapid Commun Mass Spectrom* 20, 2006, 1469–1479.
- 5- PIETROGRANDE M.C.; and BASAGLIA G.; *Enantiomeric Resolution of Biomarkers in Space Analysis: Chemical Derivatization and Signal Processing for Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Chiral Amino Acids*, *Journal of Chromatography A*,1217, 2010, 1126-1133.
- 6- ZAMPOLLI M.G.; BASAGLIA G.; DONDI F.; STERNBERG R.; SZOPA C.; and PIETROGRANDE M.C.; *Gas Chromatography–mass Spectrometry Analysis of Amino Acid Enantiomers as Methyl Chloroformate Derivatives: Application to Space Analysis*, *Journal of Chromatography A*,1150, 2007, 162-172.
- 7- GATTIA R.; GIOIA M. G.; LEONIA A.; and ANDREANI A.; *2,5-Dimethyl-1H-pyrrole-3,4-Dicarbaldehyde as a Pre Column Derivatization Reagent for HPLC/UV Detection of Amino Acids*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53, 2010, 207-211.
- 8- SCHWARZA E. L.; ROBERTSA W. L.; and PASQUALI M.; *Analysis of Plasma Amino Acids by HPLC with Photodiode Array and Fluorescence Detection*. *Clinica Chimica Acta*, 354, 2005, 83–90.
- 9- HUNG Y.T.; CHEN P.C.; CHEN R.L.C.; and CHENG T.J.; *Sequential Determination of Tannin and Total Amino Acid Contents in Tea for Taste Assessment by a Fluorescent Flow-Injection Analytical System*. *Food Chemistry*, 118 , 2010, 876–881.
- 10- CHAN S.W.; LIN G.; YAMAMOTO K.; YEW D.T.; and RUDD J.A.; *Simultaneous Determination of Amino Acids in Discrete Brain Areas in *Suncus Murinus* by High Performance Liquid Chromatography With Electrochemical Detection*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(3), 2010, 705-709.
- 11- HOU S.; HE H.; ZHANG W.; XIE H.; and ZHANG X.; *Determination of Soil Amino Acids by High Performance Liquid Chromatography- Electro Spray Ionization-Mass Spectrometry Derivatized with 6-aminoquinolyl-N-ydroxy succinimidyl Carbamate*. *Talanta* 80, 2009, 440–447.
- 12- DIETZEN D.J.; WEINDEL A.L.; CARAYANNOPOULOS M.O.; LANDT M.; NORMANSELL E.T.; REIMSCHISEL T.E.; and SMITH C.H.; *Rapid Comprehensive Amino Acid Analysis by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry: Comparison to Cation Exchange with Post-Column Ninhydrin Detection*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(22) 2008, 3481–3488.
- 13- FABIANI A.; VERSARI A.; P ARPINELLO G. P.; CASTELLARI M.; and GALASSI S.; *High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Free Amino Acids in Fruit Juices Using Derivatization with 9-Fluorenylmethyl-Chloroformate*. *Journal of Chromatographic Science*, 40(1), 2002, 14–18.

- 14- KANG X.; XIAO J.; HUANG X.; and GU Z.; *Optimization of Dansyl Derivatization and Chromatographic Conditions in The Determination of Neuroactive Amino Acids of Biological Samples*. Clinica Chimica Acta, 366, 2006, 352 – 356.
- 15- JORFI R.; MUSTAFA S.; MAN Y. B.C.; HASHIM D. B. M.; SAZILI A. Q.; FARJAM A. S.; NATEGHI L.; and KASHIANI P.; - *Differentiation of Pork From Beef, Chicken, Mutton and Chevon According to Their Primary Amino Acids Content For Halal Authentication*. African Journal of Biotechnology, 11(32), 2012, 8160-8166.
- 16- MALDONADO M.; and MAEYAMA K.; *Simultaneous Electrochemical Measurement Method of Histamine and N^r-Methylhistamine by High-Performance Liquid Chromatography–Amperometry with o-Phthalaldehyde–Sodium Sulfite derivatization*. Analytical Biochemistry, 432(1), 2013, 1–7.
- 17- PEREIRA V.; PONTES M.; CAMARA J.S.; and MARQUESJ.C.; *Simultaneous Analysis of Free Amino Acids and Biogenic Amines in Honey and Wine Samples Using in Loop Ortho-phthalaldehyde Derivatization Procedure*. Journal of Chromatography A, 1189, 2008, 435–443.
- 18- KOROS A.; VARGA ZS.; and MOLNAR-PERL I.; *Simultaneous Analysis of Amino Acids and Amines as Theiro-Phthalaldehyde-Ethanethiol-9Fluorenylmethyl Chloroformate Derivatives in Cheese by High-performance Liquid Chromatography*. Journal of Chromatography A, 1203, 2008, 146–152.
- 19- DEVAL A.J.; BLAKE R.; LANGMAN N.; SMITH C.G.S.; RICHARDS D.A.; and WHITEHEAD K.J.; *Monolithic Column-Based Reversed-Phase Liquid Chromatography Separation for Amino Acid Assay in Microdialysates and Cerebral Spinal Fluid*. Journal of Chromatography B, 848, 2007, 323–328.
- 20- JAMBOR A.; and MOLNAR-PERI I.; *Amino Acid Analysis by High Performance Liquid Chromatography After Derivatization with 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl Chloride*. Journal of Chromatography A, 1216, 2009, 3064-3077.
- 21- CASTRO M.J.G.; HERNANDEZ J.L.; LOZANO J.S.; and CONCHA M.J.O.; *Determination of Amino Acids in Green Beans by Derivatization With Phenylisothiocyanate and High Performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection*. Journal of Chromatographic Science, 35, 1997, 181-185.
- 22- MILLER JC.; and MILLER JN.; *Statistical in Analytical Chemistry*. 3rd Ed., Ellis Horwood, New York, 1993.