

فصل ۹. آزمایش های مربوط به اسیدهای آمینه

آزمایش های شناسایی کننده اسید های آمینه

۱- آزمایش های کیفی شناسایی کننده اسیدهای آمینه

اسیدهای آمینه را با استفاده از معرف های مختلف می توان شناسایی کرد. این معرف ها در طی واکنش با اسیدهای آمینه سبب تولید رنگ می شوند. این آزمایش ها عبارتند از:

▪ آزمایش های عمومی شناسایی اسید های آمینه

(۱) **آزمایش نین هیدرین:** تمامی اسید های آمینه دارای گروه آمینو آزاد با نین هیدرین ایجاد کمپلکس آبی رنگ می کنند که در اثر حرارت به رنگ ارغوانی در می آید. ترکیب پرولین با نین هیدرین رنگ زردی حاصل می آورد که برای جستجوی چشمی قابل اعتماد نیست لذا از رنگ دیگری به نام **ایستاتین** استفاده می شود.

(۲) **فلورسکامین:** مشابه نین هیدرین با گروه آمینو آزاد اسید های آمینه واکنش و ایجاد کمپلکس رنگی می دهد. نسبت به نین هیدرین معرف حساس تری است و قابلیت شناسایی در حد نانو گرم را دارد.

▪ آزمایش های اختصاصی شناسایی اسید های آمینه

اسید های آمینه مختلف، بر اساس واکنش **گروه های جانبی** مختلف خود با معرف های شیمیایی، از یکدیگر تمایز داده می شوند. مهم ترین آزمایش هایی که سبب شناسایی اختصاصی اسیدهای آمینه می شوند در جدول ۱-۹ خلاصه شده است.

▪ آزمایش های غربالگری ناهنجاری های متابولیسمی اسیدهای عمومی

اختلال در متابولیسم اسیدهای آمینه با تجمع شماری از متابولیت ها در مایعات بدن و دفع آنها از طریق ادرار همراه است. این متابولیت ها با استفاده از آزمون های مختلف قابل شناسایی هستند (جدول ۲-۹).

جدول ۱-۹. آزمایش های اختصاصی شناسایی اسیدهای آمینه

آزمایش	جزء واکنش دهنده اسید آمینه	آزمایش	جزء واکنش دهنده اسید آمینه
ارلیخ	حلقه اندولی تریپتوفان	پاولی	حلقه های ایمیدازولی هیستیدین و فنلی تیروزین
هاپکن وکول	حلقه اندولی تریپتوفان	نیتروپروسیات	گروه تیول سیستئین
گزانتوپروتیک	حلقه بنزنی تیروزین، فنیل آلانین و تریپتوفان	سالوان	گروه تیول سیستئین
میلون	حلقه فنلی تیروزین	ساکاگوچی	گروه گوانیدینی آرژنین

جدول ۲-۹. آزمون های رنگی جستجوی اسیدهای آمینه در ادرار

ناهنجاری	متابولیت ها	آزمون
فنیل کتونوری	فنیل پیرووات	کلرید فریک
سیستینوری	سیستین	سیانید/ نیتروپروسید
بیماری ادرار شربت افرا	کتواسیدهای شاخه دار	۲، ۴- دی نیترو فنیل هیدرازین
تیروزینمی	تیروزین و متابولیت های آن	نیتروزونفتول

۲- خاصیت جذب و نشر نوری اسیدهای آمینه

هیچ کدام از اسیدهای آمینه نور مرئی را جذب نمی کنند اما اسیدهای آمینه آروماتیک تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین (به ترتیب از زیاد به کم)، دارای خاصیت جذب نور ماوراء بنفش هستند. زنجیره های جانبی آروماتیک در دامنه ۲۶۰ تا ۳۰۰ نانومتر جذب نوری دارند. البته، هیستیدین نیز به میزان کم نور ماوراء بنفش را جذب می کند.

- با کاهش قطبیت محیط، $\lambda_{\max}$ و ϵ اسیدهای آمینه آروماتیک افزایش می یابد. لذا جذب آنها در محیط آبی نسبت به محیط غیر قطبی در طول موج کمتر می باشد.
- با افزایش بار گروه های هیدروکسیل تیروزین و ایمیدازول هیستیدین $\lambda_{\max}$ و ϵ افزایش می یابد.

زنجیرهای جانبی فنیل آلانین (در حدود ۲۸۰ nm)، تیروزین (در حدود ۳۰۰ nm) و تریپتوفان (در حدود ۳۵۰ nm) دارای فلورسانس هستند. تیروزین دارای بیشترین خاصیت فلورسانسی است. البته شدت فلورسانس این ریشه ها شدیداً تحت تاثیر محیط آنها قرار دارد. مثلاً با کاهش قطبیت حلال، $\lambda_{\max}$ و ϵ طیف فلورسنت تریپتوفان به سمت طول موج های کوتاه تر جا به جا و شدت فلورسنت بیشتر می شود.

طول موج های نشری فنیل آلانین با طول موج های جذبی تیروزین همپوشانی دارند، به همین شکل طول موج های نشری تیروزین با طول موج های جذبی تریپتوفان همپوشان می باشند. از این رو، فقط فلورسانس تریپتوفان مشاهده می گردد.

۳- آزمون های نیمه کمی جستجوی اسیدهای آمینه

(۱) کروماتوگرافی لایه نازک (TLC). از این روش برای شناسایی اسیدهای آمینه در محلولی که حاوی ترکیبات مختلف است استفاده می شود. برای مشاهده اسیدهای آمینه جدا شده با TLC از معرف های نین هیدرین و ایستاتین استفاده می شود.

(۲) آزمایش گوتری. در این آزمایش اسپورهای باکتریایی به محیط کشتی که حاوی مهار کننده اختصاصی اسید آمینه مزبور است اضافه می شود. سپس کاغذ صافی آغشته به خون یا نمونه ادرار به سطح محیط اضافه می شود. در صورتی که مقادیر بالایی از اسید آمینه در نمونه وجود داشته باشد بر مهار کننده غلبه کرده و باعث رشد باکتری می شود.

۴- آزمون های کمی جستجوی اسیدهای آمینه

(۱) اسید نیترو: α - آمینو اسید ها در حضور اسید نیترو آمینه می شود. با اندازه گیری میزان نیتروژن آزاد شده، مقدار گروه آمینو آزاد موجود در اسید های آمینه قابل محاسبه است.

(۲) فرمل تیتراسیون: با افزودن فرمل (فرمالدئید) به محلول حاوی اسید آمینه، گروه های آمینو را خنثی کرده و با برآورد گروه های کربوکسیل آزاد، میزان اسید های آمینه را می توان شناسایی کرد.

(۳) الکتروفورز موئینه ای

(۴) کروماتوگرافی تعویض کاتیونی

(۵) کروماتوگرافی گازی (GC). تبخیر برخی از اسیدهای آمینه به دلیل حرارت آزمایش از نقاط ضعف آن می باشد.

(۶) کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC). محدودیت کروماتوگرافی گازی یعنی حرارت در طی آزمایش را ندارد.

(۷) اسپکترومتری جرمی پشت سر هم (MS/MS). یک تکنیک سریع و بسیار دقیق برای شناسایی اسیدهای آمینه می باشد.

سوالات

- ۱- کدام یک از آزمایش های زیر آزمایش اختصاصی گروه جانبی تیروزین است؟
 الف) پاولی ب) گزانتوپروتئیک ج) میلون د) اریخ
- ۲- در اندازه گیری غلظت پروتئین به طریق UV اسپکتروفوتومتری کدام اسید آمینه بیشترین نقش را دارد؟
 الف) پرولین ب) تیروزین ج) متیونین د) تریپتوفان
- ۳- ضریب خاموشی (Extinction coefficient) کدام اسید آمینه در طول موج ۲۸۰ نانومتر بیش از بقیه است؟
 الف) هیستیدین ب) تریپتوفان ج) فنیل آلانین د) تیروزین
- ۴- کاهش قطبیت حلال باعث چه تغییراتی در λ_{max} و شدت فلورسانس تریپتوفان می گردد؟
 الف) λ_{max} کاهش و شدت افزایش می یابند.
 ب) λ_{max} و شدت هر دو افزایش می یابند.
 ج) λ_{max} و شدت هر دو کاهش می یابند.
 د) λ_{max} افزایش و شدت کاهش می یابند.
- ۵- برای اندازه گیری فنیل آلانین به روش HPLC به صورت فاز معکوس (Reverse Phase) کدام یک از حلال های زیر مناسب تر است؟
 الف) هگزان ب) مخلوط هگزان و تتراهیدروفوران
 ج) مخلوط متانول و کلروفرم د) مخلوط متانول و بافر استات
- *۶- در روش HPLC هنگامی که اسیدهای آمینه زیر بر روی یک ستون Reverse Phase جدا می گردند، کدام یک دیرتر از ستون خارج می شوند؟
 الف) فنیل آلانین ب) آسپارتیک اسید ج) تیروزین د) آرژنین
- *۷- کدام یک از اسیدهای آمینه زیر در محلول بافری با $\text{pH} = 7$ ، زودتر از یک ستون تعویض کاتیونی خارج می گردد؟
 الف) لیزین ب) سیستئین ج) اسید آسپارتیک د) هیستیدین
- ۸- برای جستجوی اسیدهای آمینه در پلاسما و نشان دادن اختلالات متابولیکی آنها کدام روش زیر از حساسیت بیشتر و دقت بالاتری برخوردار است؟
 الف) گاز کروماتوگرافی ب) کروماتوگرافی تعویض یونی
 ج) الکتروفورز کاپیلری د) اسپکترومتری جرمی

۹- کدامیک از تست های زیر به شناسایی تریپتوفان کمک می کند؟

الف) ارلیخ و میلون
ب) سالوان و هاپکن و کول

ج) هاپکن و کول و گزانتوپروتئیک
د) ساکاگوچی و ارلیخ

۱۰- کدامیک از آزمون های نیمه کمی جستجوی اسیدهای آمینه همراه با کشت باکتری است؟

الف) کروماتوگرافی تعویض یونی
ب) آزمایش گوتری

ج) کروماتوگرافی لایه نازک
د) الکتروفورز موئینه ای

۱۱- اگر اسیدآمینه های تریپتوفان، تیروزین، فنیل آلانین و هیستیدین از محیط قطبی به

محیطی با قطبیت کمتر منتقل شوند، مقادیر λ_{max} (طول موج ماکزیمم) و ϵ چه تغییری می-

کنند؟

الف) هر دو افزایش می یابند.
ب) هر دو کاهش می یابند.

ج) λ_{max} افزایش و ϵ کاهش می یابد.
د) λ_{max} کاهش و ϵ افزایش می یابد.

۱۲- دارای بیش ترین جذب UV و در شرایط طبیعی محیط

دارای بیشترین نشر فلورسانس است.

الف) تیروزین، تیروزین
ب) فنیل آلانین، تریپتوفان

ج) هیستیدین، تریپتوفان
د) تریپتوفان، تیروزین