التقدير الطيفي للارجنين واللايسين باستخدام كاشف الاليزارين الأحمر S في المحلول المائي

ثابت سعيد الغبشة أمل محمد سعيد

قسم الكيمياء / كلية التربية

جامعة الموصل

الاستلام 2011 / 03 / 17 القبول 2011 / 06 / 26

Abstract

A simple, rapid and selective spectrophotometric method for the determination of arginine and lysine was developed. The method is based on the proton transfer reaction of arginine and lysine with alizarin red sulphonate in aqueous solution to form a violet coloured product which has maximum absorption at 530 nm. Beer's law obeyed over the range (1-10), (1-11) $\mu g.ml^{-1}$ for arginine and lysine respectively with a molar absorptivity 7830 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$ for arginine and 5990 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$ for lysine and accuracy (average recovery) 100.63% and precision (RSD) is less than 2.5%. The method has been applied for the determination of arginine in urine.

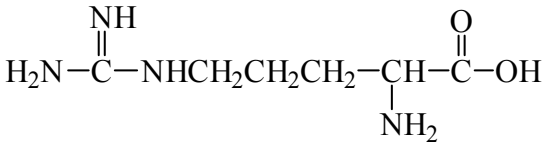
الخلاصة

تم تطوير طريقة طيفية بسيطة وسريعة وانتقائية لتقدير الارجنين واللايسين. تعتمد الطريقة على تفاعل انتقال البروتون بين الارجنين واللايسين مع كاشف الاليزارين الاحمر S لتكوين ناتج ذي لون بنفسجي يعطي اقصى امتصاص عند 530 نانوميتر وكان قانون بير ينطبق في مدى تركيز (1–10)، (1– 11) مايكروغرام.مللتر$^{-1}$ لكل من الارجنين واللايسين على التوالي. وبلغت الامتصاصية المولارية 7830 لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ للارجنين و 5990 لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ للايسين بدقة جيدة (اذ بلغ معدل نسبة الاسترجاع 100.63%) وتوافق جيد اذ ان الانحراف القياسي النسبي اقل من 2.5% وطبقت الطريقة لتقدير الارجنين في الادرار.

المقدمة

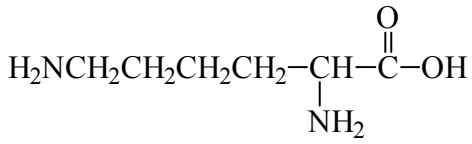
ينتمي الارجنين واللايسين الى مجموعة الاحماض الامينية القاعدية ولهما الصيغتان التركيبيتان الاتيتان[1]:

Arginine



M.Wt. = 174 g/mole

Lysine



M.Wt. = 146 g/mole

عرف الارجنين (2-امينو-5-كوانيدينو حامض البنتانويك) منذ عام 1895 بانه يوجد في بروتين البطين وله وظائف متعددة تتضمن دوره في مسار L-ارجنيز-اوكسيد النتريك وتجديد الخلايا ووظائف المناعة وصناعة وهدم البروتين[2]. كما يقوم في التخلص من مخلفات البروتين بعد انتهاء العمليات الحياتية وبناء العضلات وتنظيم الاوعية وصناعة RNA وتنظيم عمل الهرمونات داخل الجسم[3].

اما اللايسين فيمكن بوساطته السيطرة على نوعية الحليب الجاف اثناء ظروف الخزن والحرارة[4] وكذلك التقييم السريع للغذاء[5]. كما امكن استخدامه في مستحضرات التجميل[6]. استخدم ايضاً كمحلول منظم[7]. وكذلك استخدم اللايسين في المستحضرات الصيدلانية[8 ، 9]، كما امكن استخدامه في الاطعمة التجارية[10].

استخدمت طرائق تحليلية متعددة لتقدير الارجنين واللايسين تضمنت استخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل- الطور المعاكس ومكشاف طيف الكتلة في التقدير الآني للارجنين ونواتجه الايضية في الادرار[11] والـ HPLC [12، 13] والـ RP- HPLC [14، 15، 16] كما استخدمت تقنية كروماتوغرافيا الغاز- مطياف الكتلة GC-MS لتقدير اللايسين وبعض الاحماض الامينية في الادرار[17]. تم تقدير الارجنين بقياس الجهد الكهربائي باستخدام قطب الارجنين الذي يعتمد على نظام انزيمي مزدوج يتألف من انزيم arginase وانزيم urase مع وجود محسس لغاز الامونيا المتحرر نتيجة لعملية التحلل الانزيمي للارجنين[18]. تم تقدير اللايسين والارجنين بتقنية الهجرة الكهربائية الشعرية[19، 20]. وصفت طريقة طيفية لتقدير الارجنين الناتج من تحلل البروتين اعتمدت على تكوين ناتج اصفر يقاس اقصى امتصاص له عند طول موجي 440 نانوميتر باستخدام كاشف الثايمول بوجود هايبوبروميت الصوديوم في وسط قاعدي[21].

استخدمت طريقة طيفية بسيطة وانتقائية لتقدير كميات مايكروغرامية من الارجنين اعتمدت الطريقة على التفاعل مع كلورامين- T (CAT) اذ تضاف زيادة معلومة من CAT بوجود 0.25 مولاري حامض الهيدروكلوريك وتقدير CAT الغير متفاعل بقياس النقصان في امتصاص صبغة كالوسيانين (gallocyanine) عند 540 نانوميتر[22]. كما امكن تقدير اللايسين طيفياً وانتقائياً باستخدام الكاشف فورفورالديهايد (furfuraldehyde)[23]. استخدمت تفاعلات تكوين معقدات الشحنة المنتقلة في تقدير الارجنين واللايسين بوصفهما مانحين للالكترونات باستخدام مستقبلات للالكترونات مثل 7,7َ، 8, 8َ- رباعي سيانوكوينون ثنائي الميثان (TCNQ)[24] والبرومانيل[25] والفلورانيل[26] كما استخدمت تقنية الحقن الجرياني لتقدير الارجنين واللايسين [27، 28، 29، 30].

استخدمت في هذا البحث طريقة طيفية بسيطة وانتقائية لتقدير الارجنين واللايسين باستخدام الكاشف اليزارين احمر السلفونات عن طريق تفاعل انتقال البروتون لتكوين ناتج ملون يقاس اقصى امتصاص له عند 530 نانوميتر في المحلول المائي وطبقت الطريقة بنجاح في تقدير الارجنين في الادرار.

الجزء العملي:

الأجهزة المستخدمة:

تمت جميع القياسات الطيفية باستخدام جهاز
Shimadzu UV-210 Double Beam Spectrophotometer
واستخدام خلايا من السليكا ذات عرض 1 سم. أجريت عمليات الوزن باستخدام ميزان حساس نوع sartorius management system. وقيست الدالة الحامضية للمحاليل باستخدام جهاز الدالة الحامضية (pH meter) نوع Philips PW 9420 مرتبط بقطب نوع CE10-12 pH. وأجريت عمليات التسخين باستخدام حمام مائي نوع Forst Instruments, LTD.

المواد والمحاليل الكيميائية المستخدمة:

جميع الكواشف والمواد الكيميائية المستخدمة كانت على درجة عالية من النقاوة ومن إنتاج شركتي Fluka و BDH .

محلول الاليزارين الأحمر S .(ARS) 1 × 10^{-3} مولاري:

يحضر المحلول باذابة 0.0856 غرام من ARS في 250 مللتر ايثانول مطلق 99-100% ثم يوضع في قنينة معتمة ويبقى مستقرا لمدة شهر في الأقل.

المحاليل المنظمة pH7 :

محلول البورات المنظم:

يحضر بتركيز 0.05 مولاري من محلول بورات الصوديوم الرباعية وتضاف له كميات من 10% حامض البوريك مع قياس الدالة الحامضية باستخدام جهاز الدالة الحامضية.

محلول الكاربونات المنظم:

يحضر بضبط الدالة الحامضية لمحلول كاربونات الصوديوم (0.05 مولاري) الى 7 وذلك باضافة كميات من محلول حامض الهيدروكلوريك (0.1 مولاري) مع قياس الدالة الحامضية باستخدام جهاز الدالة الحامضية.

محلول الفوسفات المنظم:

يحضر بضبط الدالة الحامضية لمحلول فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية (KH_2PO_4, potassium dihydrogen phosphate) 0.2 مولاري الى 7 وذلك باضافة حجم معين من محلول 0.2 مولاري K_2HPO_4 باستخدام جهاز الدالة الحامضية.

محلول الخلات المنظم:

يحضر بضبط الدالة الحامضية لمحلول خلات الصوديوم 2 مولاري الى 7 وذلك باضافة حجم معين من محلول 2 مولاري حامض الخليك باستخدام جهاز الدالة الحامضية.

المحاليل القياسية للارجنين واللايسين:

تم تحضير محاليل كل من الارجنين واللايسين بتركيز 100 مايكروغرام.مللتر$^{-1}$ وذلك بوزن 0.0100 غرام لكل من الارجنين واللايسين على انفراد وتخفيفها الى 100 مللتر بالماء المقطر ومنه حضرت تراكيز اقل بالتخفيف عند الحاجة.

طريقة العمل:

الى مجموعة من القناني الحجمية سعة 10 مللتر تمت اضافة حجوم متزايدة (مللترات) من 100 مايكروغرام.مللتر$^{-1}$ من كل من الارجنين واللايسين لتغطية منحنيات التركيز (1−10) و (1−11) مايكروغرم. مللتر$^{-1}$ ثم تمت اضافة 2 مللتر من محلول ARS واكمل الحجم لجميع المحاليل الى حد العلامة بالماء المقطر. تركت المحاليل مدة 5 دقائق بدرجة حرارة المختبر بالنسبة للارجنين وفي 40 مْ بالنسبة للايسين ثم تم قياس الامتصاصات مقابل المحلول الصوري عند 530 نانوميتر.

تحضير محاليل الادرار[31]:

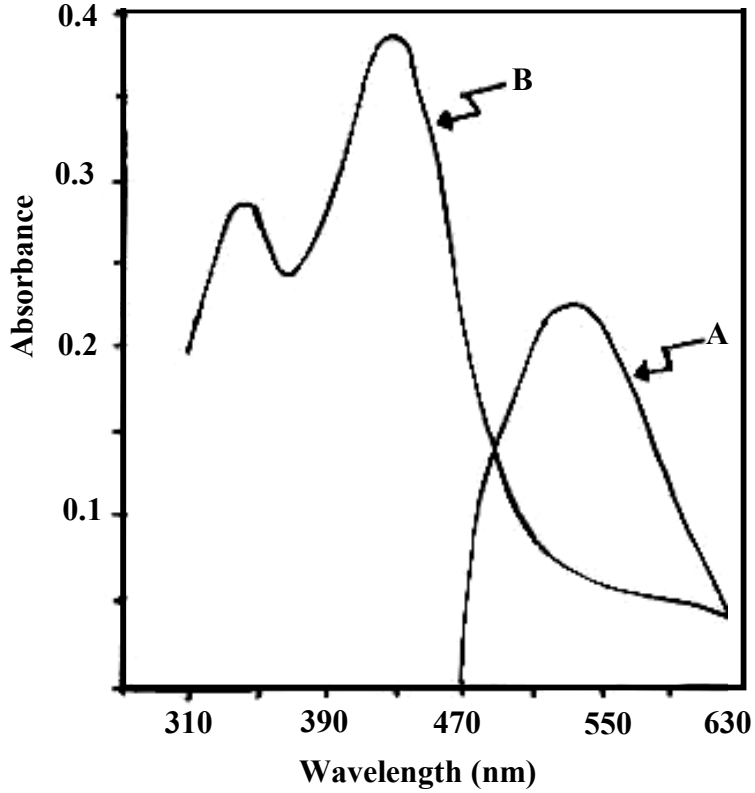
اضيفت كميات مختلفة (1−10 مايكروغرام.مللتر$^{-1}$) من الارجنين الى 1، 3، 5 مللتر من الادرار في قمع فصل ثم اضيف 3 مللتر من خلات الصوديوم (pH6) وبعد ذلك اضيف 3 مللتر من الاسيتونتريل (acetonitrile) و 5 مللتر من الكلوروفورم. بعدها يتم رج المحلول لمدة 5 دقائق في قمع الفصل، وبعد فصل الطبقة العضوية عن الطبقة المائية، اخذت الطبقة المائية

واضيف اليها 5 مللتر اخرى من الكلوروفورم ورج المحلول لمدة 5 دقائق ايضا وبعد الفصل الى طبقتين تؤخذ الطبقة العضوية وتضاف الى الطبقة العضوية السابقة. تؤخذ الطبقات العضوية المجمعة في قمع الفصل ويضاف اليها 2 مللتر من هيدروكسيد الامونيوم (0.05%) ويرج المحلول في قمع الفصل لمدة 5 دقائق وبعد الفصل، تؤخذ الطبقة العضوية ويضاف اليها 5 مللتر من الماء المقطر للغسل ويرج المحلول وبعد الفصل تؤخذ الطبقة المائية وتضاف الى الطبقة المائية السابقة. تؤخذ الطبقات المائية المجمعة وتوضع في قنينة حجمية سعة 10 مللتر ويضاف اليها 2 مللتر من كاشف ARS . وتم القياس عند 530 نانوميتر مقابل المحلول الصوري عند الكمية التي اخضعت للظروف المثالية للارجنين.

النتائج والمناقشة:

الدراسة التمهيدية:

في الدراسة التمهيدية تم استخدام 0.5 مللتر من محلول 100 مايكروغرام.مللتر$^{-1}$ من الارجنين واضيف اليه 2 مللتر من محلول الاليزارين الاحمر S (1×10^{-3} مولاري) واكمل الحجم الى 10 مللتر بالماء المقطر، لوحظ ظهور لون بنفسجي بعد اضافة الكاشف مباشرة يعطي اعلى امتصاص عند 530 نانوميتر، بينما اعطى المحلول الصوري اعلى امتصاص عند 430 نانوميتر كما مبين في الشكل (1).



الشكل (1): A. طيف امتصاص ناتج ارجنين–ARS بتركيز 50 مايكروغرام.10 مللتر$^{-1}$ مقابل المحلول الصوري
B. المحلول الصوري مقابل الماء المقطر

تأثير تركيز الكاشف:

حضرت تراكيز مختلفة لكاشف ARS كما هو مبين في الجدول (1) وقد تمت مفاعلة حجوم متماثلة (2 مللتر) من هذه التراكيز مع الارجنين، وقد لوحظ ان 1×10^{-3} مولاري عند تفاعله مع الارجنين يعطي اعلى امتصاص لذلك تم استخدام هذا التركيز في الدراسات اللاحقة.

الجدول (1): تأثير تركيز الكاشف في تقدير الارجنين

Conc. Of ARS (M)	Absorbance
2.5×10^{-4}	0.132
5.0×10^{-4}	0.149
1.0×10^{-3}	0.199
2.0×10^{-3}	Turbid

دراسة تأثير كمية الكاشف:

لاختيار الكمية المثلى لمحلول الكاشف 1×10^{-3} مولاري، تمت اضافة حجوم متزايدة من كاشف الاليزارين الاحمر S (0.5–3 مللتر) الى تراكيز متساوية من الارجنين في قناني حجمية سعة 10 مللتر وبعد اكمال الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة تم قياس الامتصاص مقابل المحلول الصوري عند طول موجي 530 نانوميتر بعد ترك المحاليل 10 دقائق في درجة حرارة المختبر. ويبين الجدول (2) ان 2 مللتر من محلول كاشف ARS بتركيز 1×10^{-3} مولاري أعطت أعلى امتصاص لذلك تم اعتماده في التجارب اللاحقة.

الجدول (2): تأثير كمية الكاشف على امتصاص الناتج الملون

ARS (1×10^{-3} M) (ml)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
Absorbance	0.156	0.168	0.185	0.200	0.179	0.176

تأثير المذيبات في تحضير الكاشف

لقد استخدمت عدة مذيبات للكاشف ARS كما هو مبين في الجدول (3)، وقد تمت اضافة 2 مللتر لكل محلول على انفراد الى 0.5 مللتر من 100 مايكروغرام.مللتر$^{-1}$ ارجنين واكمل الحجم الى حد العلامة بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 10 مللتر وقيس الامتصاص عند 530 نانوميتر.

الجدول (3): تأثير المذيب

ARS 1.0×10^{-3} M in	Absorbance
Ethanol	0.199
Methanol	0.142
Propanol	0.127
DMSO	0.185
Acetone	0.137

من خلال ملاحظة النتائج المدونة في هذا الجدول يتضح ان اذابة الكاشف في الايثانول يعطي اعلى امتصاص، لذا تم تحضير الكاشف في الايثانول المطلق في التجارب اللاحقة.

تأثير الدالة الحامضية:

تم قياس الدالة الحامضية لمحلول الارجنين القياسي وكانت الدالة الحامضية 8.2 وبعد اضافة 2 مللتر من محلول كاشف ARS اصبحت الدالة الحامضية 7، لذلك تم تحضير محاليل منظمة لها دالة حامضية 7 وتمت دراسة تاثيرها على تكوين الناتج الملون وكما هو موضح في الجدول (4).

الجدول (4): دراسة تاثير المحاليل المنظمة على امتصاص الناتج الملون (ارجنين–ARS)

Buffer solutions (pH7)	Absorbance	
	S vs. B	B vs. D.W
Borate	0.021	0.230
Carbonate	0.011	0.236
Acetate	0.043	0.221
Phosphate	0.051	0.219
without	0.200	0.017

من خلال ملاحظة النتائج يتضح ان المحاليل المنظمة تؤثر سلبا على امتصاص الناتج الملون، لذلك تم استبعادها في التجارب اللاحقة.

دراسة تأثير الزمن ودرجة الحرارة على تكوين الناتج (Arginine-ARS):

لإيجاد درجة الحرارة المثلى لتكوين الناتج فقد تمت دراسة تكوين ناتج الارجنين–ARS في درجات حرارية مختلفة تراوحت ما بين درجة الصفر المئوي و 50 °م. وقد أظهرت النتائج اعلى حساسية للناتج الملون عند درجة حرارة الغرفة(25 مْ)، اذ تم الحصول على اعلى امتصاص بعد 5 دقائق وبزمن استقرار 55 دقيقة، ويوضح الجدول (5) النتائج التي تم الحصول عليها.

الجدول (5): تاثير درجة الحرارة على زمن تكوين الناتج واستقراره

Temp.	Absorbance

(°C)	Time (min)									Time (hour)		
	0	5	10	15	20	25	30	40	50	1	1.5	2
0	0.19	0.19	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.19	0.19	0.19	0.18	0.18
Room temp.	0.19	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.19	0.19
40	0.19	0.19	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.17	0.17	0.17
50	0.19	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.17	0.17	0.17
Overnight 0.19												

Room temp. = 25 °C

تأثير المواد الفعالة سطحياً:

تمت دراسة تأثير أصناف متعددة من المواد الفعالة سطحيا الموجبة والسالبة والمتعادلة على شدة امتصاص الناتج وأدرجت النتائج في الجدول (6).

الجدول (6): تأثير المواد الفعالة سطحيا

Surfactant 0.1%	Absorbance / ml						
	Order	Without	0.5	1	2	3	4
Tween* 80	I	0.199	0.192	0.196	0.197	0.191	0.193
	II		0.194	0.192	0.194	0.187	0.189
CPC	I		0.191	0.196	0.191	0.197	0.195
	II		0.195	0.196	0.197	0.193	0.190
SDS	I		0.193	0.190	0.187	0.189	0.179
	II		0.185	0.179	0.188	0.183	0.174

* 1%
I Arginine + ARS + surfactant
II Arginine + surfactant + ARS

يتضح من الجدول اعلاه ان المواد الفعالة سطحيا ليس لها تاثير على امتصاص الناتج الملون ارجنين–ARS لذا تم استبعادها.

تم اتباع نفس الدراسات المذكورة انفا من اجل الحصول على الظروف المثلى في تقدير اللايسين. وفيما ياتي الجدول (7) الذي يوضح خلاصة الظروف المثلى التي تم التوصل اليها.

الجدول (7): ملخص الظروف المثلى لتقدير الارجنين واللايسين

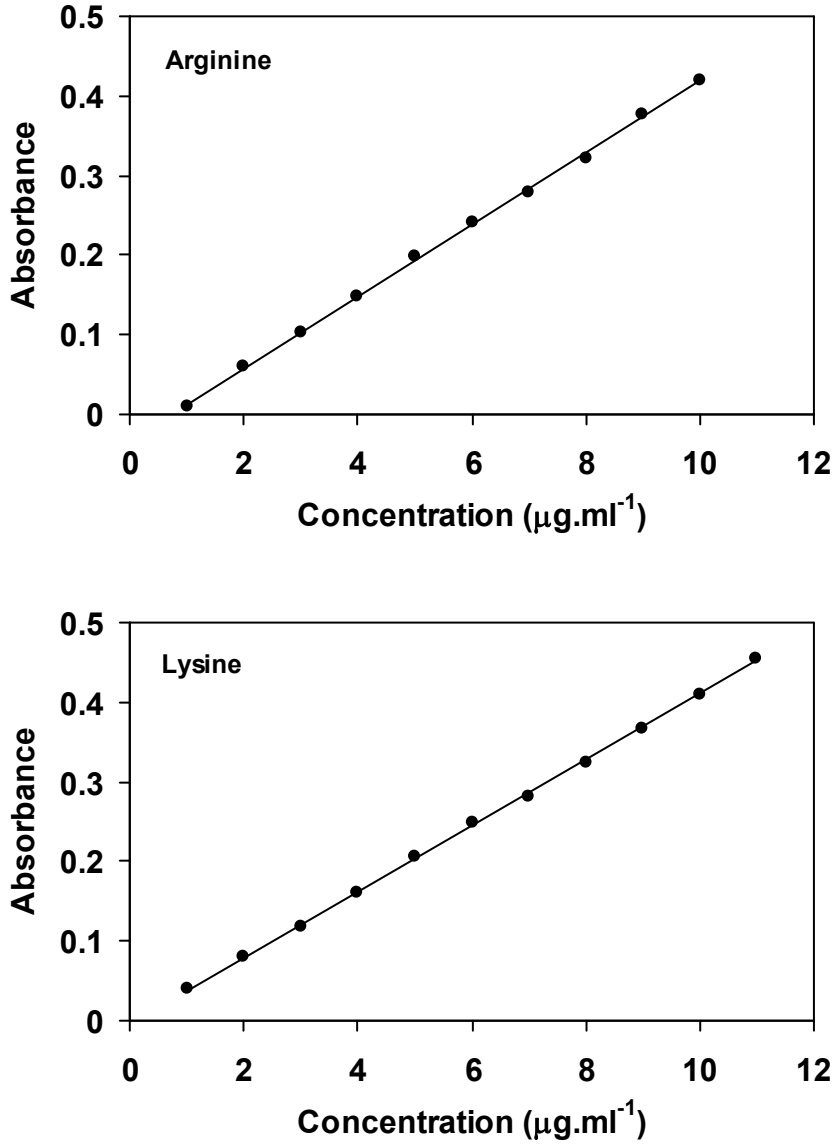
Compound	λ_{max} (nm)	Temp. (°C)	Development time (min)	Stability period (min)	ARS 1×10^{-3} M (ml)
Arginine	530	R.T	5	55	2
Lysine	530	40	5	45	2

المنحني القياسي:

يوضح الشكل (2) المنحنيين القياسيين اللذين يتبعان قانون بير ضمن المنحيات الموضحة في الجدول (10) للارجنين واللايسين، وان هناك انحرافا سلبيا عن قانون بير بعد الحدود التقديرية العليا. وتم حساب حدود الكشف للارجنين واللايسين بتطبيق المعادلة الاتية[32].

$$LOD = \frac{3\sigma_B}{S}$$

اذ ان σ_B = الانحراف القياسي للمحلول الصوري لعشرة تقديرات، S = ميل المنحني القياسي



الشكل (2): المنحنيين القياسيين لتقدير الارجنين واللايسين

الجدول (8): المدى التقديري وحدود الكشف والامتصاصية المولارية والميل والمقطع ومعامل الارتباط لتقدير الارجنين واللايسين

Compound	Linearity range ($\mu g.ml^{-1}$)	LOD ($\mu g.ml^{-1}$)	Molar absorptivity ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)	Slope	Intercept	Correlation coefficient
Arginine	1-10	0.058	7830	0.045	- 0.0318	0.9993
Lysine	1-11	0.063	5990	0.041	- 0.0031	0.9995

يوضح الجدول (8) امكانية تقدير كميات متناهية الصغر، اذ تم تقدير كميات تراوحت ما بين (1−10) و (1−11) مايكروغرام.مللتر$^{-1}$ لكل من الارجنين واللايسين على التوالي. كما يلاحظ من الجدول ان قيمة الامتصاصية المولارية للارجنين اعلى من قيمة الامتصاصية المولارية للايسين، ويعود السبب في ذلك الى وجود مجموعة الكواندين في الارجنين. وكانت قيم معامل الارتباط للارجنين واللايسين اكبر من 0.999 مما يدل احصائيا على ان المنحنيات القياسية تمتلك مواصفات خطية ممتازة.

دقة الطريقة وتوافقها:

لفحص دقة الطريقة وتوافقها تم حساب الاسترجاعية والانحراف القياسي النسبي (RSD) باستخدام ثلاثة تراكيز لكل من الارجنين واللايسين. يضم الجدول (9) النتائج التي تم الحصول عليها والتي تشير الى ان الطريقة ذات دقة جيدة اذ ان معدل نسبة الاسترجاع 100.63% وذات توافق جيد، اذ ان (RSD) اقل من 2.5%.

الجدول (9): دقة الطريقة وتوافقها

Compound	Amount added ($\mu g.ml^{-1}$)	Recovery* (%)	Average recovery (%)	RSD* (%)
Arginine	4	102.68	101.56	1.53
	6	101.08		0.71
	8	100.93		0.92
Lysine	4	101.24	99.70	2.16
	6	98.79		1.32
	8	99.07		1.49

* for six determinations.

دراسة تأثير المتداخلات:

من اجل فحص انتقائية الطريقة فقد درس تأثير وجود كميات من بعض المركبات العضوية النتروجينية وغير النتروجينية والاملاح المتواجد قسم منها في العينات الحيوية مع

الاحماض الامينية في تقدير الارجنين تحت الظروف المثلى. لقد تمت اضافة كميات من هذه المواد انفراديا الى قناني حجمية سعة 10 مللتر تحتوي على 50 مايكروغرام من الارجنين و 2 مللتر من ARS بتركيز 1×10^{-3} مولاري ثم اكمل الحجم الى حد العلامة بالماء المقطر. تم قياس الامتصاص مقابل المحلول الصوري عند 530 نانوميتر تحت الظروف المثلى للمنحني القياسي وقورنت النتائج مع امتصاص محلول يحتوي على نفس الكمية من الارجنين ولكن بدون وجود المتداخلات. يضم الجدول (10) النتائج التي تم الحصول عليها.

الجدول (10): تأثير المتداخلات في تقدير الارجنين

Foreign compound	Fold excess added	Relative error (%)
Oleic acid	5	+ 1.76
	10	+ 4.87
	20	+ 5.10
	50	+ 5.62
Creatine	5	+ 0.38
	10	+ 0.59
	50	+ 7.98
Creatinine	5	- 0.48
	10	- 1.67
	20	- 14.24
Isoleucine	14	- 2.10
	28	- 3.90
	42	- 9.40
Acetone	5	+ 1.12
	10	+ 0.27
	20	+ 0.19
	40	- 0.32
Citric acid	5	0.00
	10	- 9.21
	20	- 41.35
Glucose	5	+ 0.10
	10	+ 0.24
	20	+ 0.31
	50	+ 0.54
Glycerol	5	+ 0.37
	10	+ 0.56
	20	+ 1.12
	50	+ 1.70
	100	+ 5.31
Di-sodium hydrogen phosphate	5	+ 20.37
	10	+ 57.69
Sodium chloride	1	+ 17.36
	5	+ 84.88
	10	+ 97.11

Thiourea	5	+ 3.22
	10	+ 5.10
	20	+ 8.06
Urea	5	0.00
	10	+ 4.35
	20	+ 19.13
Xylose	5	- 0.41
	10	- 0.86
	20	- 2.81
	50	- 5.20
Sodium bicarbonate	5	+ 46.87
	10	+ 88.72
Ammonium sulphate	5	- 0.57
	10	- 0.98
	20	- 4.02
	30	- 5.14
Glycine	10	+ 1.56
	20	+ 3.90
	50	+ 6.80
Alanine	10	+ 2.70
	20	+ 5.33
	40	+ 12.60
Proline	10	0.00
	20	+ 2.20
	60	+ 6.10
4-Hydroxyproline	10	+ 2.60
	20	+ 4.40
	30	+ 8.30
Tryptophan	10	- 1.8
	20	- 3.5
	50	- 7.3
Methionine	10	- 2.10
	20	- 4.50
	50	- 9.00
Serine	10	+ 2.40
	20	+ 3.50
	50	+ 8.00
Threonine	10	0.00
	20	+ 1.10
	50	+ 6.30

من ملاحظة النتائج المستحصلة في الجدول (10) يمكن الاستنتاج بعدم حدوث تداخل ملحوظ بسبب وجود الاحماض الامينية المتعادلة والاحماض الامينية الحامضية مما يدل على ان الطريقة انتقائية للارجنين واللايسين فقط. ولكن وجد ان بعض مكونات السوائل الحيوية كالاملاح تحدث تداخلا ايجابيا واضحا لذلك لا يمكن تطبيق الطريقة المقترحة على السوائل الحيوية الا بعد استخلاص الارجنين ثم تقديره.

تقدير الارجنين في الادرار

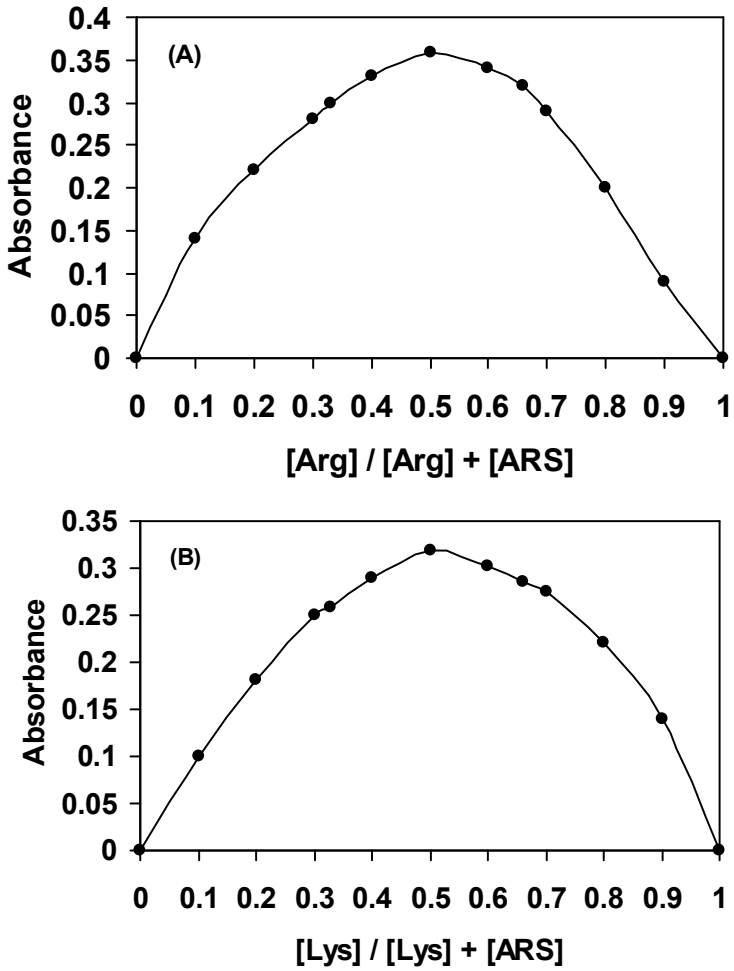
لقد طبقت الطريقة المقترحة بنجاح على تقدير الارجنين في السوائل الحيوية (الادرار) بعد الاستخلاص بالمذيب العضوي جدول (11).

الجدول (11): تطبيق الطريقة على تقدير الارجنين في الادرار

Arginine added (µg)/10 ml	Recovery % of arginine per ml of urine used		
	1	3	5
40	97.90	95.63	101.72
50	96.14	97.86	96.79
60	95.28	96.47	96.14
80	94.11	98.91	95.98

طبيعة ناتج الاليزارين الاحمر S مع الارجنين واللايسين:

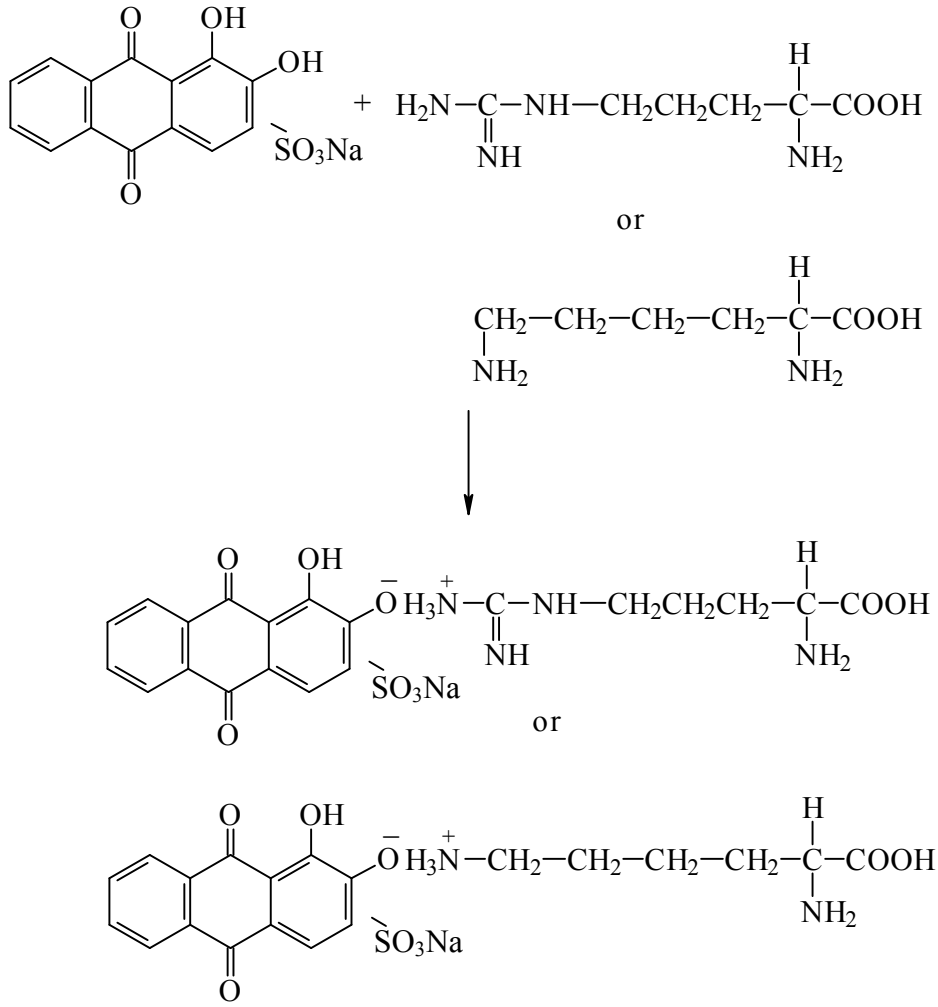
تم دراسة النسبة التركيبية للنواتج الملونة المتكونة من تفاعل الارجنين واللايسين مع ARS باستخدام طريقة التغير المستمر وكانت (1: 1)[33]، كما مبين بالشكل (3)



الشكل (3): رسم التغير المستمر لناتج: A. ارجنين–ARS ، B. لايسين–ARS

التفاعل الكيميائي المقترح وثابت استقرار ناتج ARS مع الارجنين واللايسين:

يتغير لون كاشف الاليزارين الاحمر S في الوسط القاعدي من الاصفر الى البنفسجي. وعند تفاعل الكاشف ذاته مع كل من الارجنين واللايسين يحصل نفس التغير في اللون لوجود مجموعة الامينو الطرفية وهذه المجموعة هي المسؤولة عن الصفة القاعدية لذلك يحصل تفاعل انتقال البروتون وبنسبة 1 حامض اميني : 1 ARS كما هو موضح في الميكانيكية المقترحة الاتية[34]:



كما تم حساب ثابت استقرار الارجنين واللايسين بنسبة 1:1 (حامض اميني : ARS) اذ تراوحت ما بين 1.78×10^5 لتر.مول$^{-1}$ للايسين و 2.21×10^5 لتر.مول$^{-1}$ للارجنين مما يشير الى استقراريتهما العالية[35].

الاستنتاج:

تم تطوير طريقة طيفية بسيطة وسريعة وحساسة وانتقائية لتقدير الارجنين واللايسين في المحلول المائي، حيث اعتمدت الطريقة على مفاعلة كل من الارجنين واللايسين مع الكاشف ARS في المحلول المائي ليعطي ناتجا ذا لون بنفسجي يقاس اقصى امتصاصه عند 530 نانوميتر. وكانت الطريقة تعاني من بعض التداخلات، لذلك اجريت عملية استخلاص الارجنين قبل تطبيق الطريقة على الادرار.

المصادر: **Reference**

1) J. McMurry, (2004), "International Student Edition Organic Chemistry", 6th edn., Brooks/Cole Thomson, Inc., pp. 892-898.

2) L. Beaumier, L. Castillo, Y.Y. Ajami and A.A. Young, (1996), "Arginine: New and exciting developments for an "old" amino acid", Biomed. Environ. Sci., 9, 2-3, 296-315.

3) A.A. Reyes, I.E. Karl and S. Klahr, (1994), "Role of arginine in health and in renal disease", Am. J. Physicol., 267, 3, F. 331-346.

4) J.D. Block, M. Merchiers and R.V. Renterghem, (1998), "Capillary electrophoresis of the whey protein fraction of milk powders. A possible method for monitoring storage conditions", International Dairy J., 8, 9, 787-792.

5) A. Curulli, S. Kelly, C. O'Sulivan, G.G. Guilbault and G. Palleschi, (1998), "A new interference-free lysine biosensor using a non-conducting polymer film", Biosensors and Bioelectronics, 13, 12, 1245-1250.

6) Ph. Dallet, L. Labat, E. Kummer and J.P. Dubost, (2000), "Determination of urea, allantoin and lysine pyroglutamate in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography", J. Chromatog. B: Biomed. Sci. and App., 742, 2, 447-452.

7) M. Teresa, S.D. Vasconcelos and M.A.O. Azenha, (1996), "Additional evidence of the operational character of the lability of complexes of copper (II) with simple organic ligands", Anal. Chim. Acta, 333, 1-2, 97-105.

8) J. Saurina, S. Hernandez-Cassou, S. Alegret and E. Fabregas, (1999), "Determination of lysine in pharmaceutical samples containing endogenous ammonium ions by using a lysine oxidase biosensor based on an all solid state potentiometric ammonium electrode", Biosensors and Bioelectronics, 14, 1, 67-75.

9) J. Saurina, S. Hernandez-Cassou, S. Alegret and E. Fabregas, (1999), "Amperometric determination of lysine using a lysine oxidase biosensor based on rigid-conducting composites", Biosensors and Bioelectronics, 14, 2, 211-220.

10) J. Saurina and S. Hernandez-Cassou, (1993), “Flow-injection spectrophotometric determination of lysine in feed samples”, Anal. Chim. Acta, 281, 3, 593-600.

11) L. Hyany, F. Guo, Y. Liang, Q. Hu and B. Cheng (2003), "Rapid Simultaneous determination of arginine and methylated arginine in human urine by high- performance Liquid chromatography- mass spectrometry", Anal. Chim. Acta, 487, 145.

12) G. D. Aniello, A. Tolino and G. F. Sher (2001), "Plasma L- arginine is markedly reduced in pregnant woman affected by preeclampsia", J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. and Applications, 753, 427.

13) B. Chen, L. Xia, S. Liang, G. Chen, f. Deng, W. Zhang and L. Tao (2001), "Simultaneous determination of L- arginine and dimethylarginine in human urine by high- performance liquid chromatography", Anal. Chim. Acta, 444, 223.

14) K. L. Woo, O. C. Hwang and H. S. Kim (1996), "Determination of amino acids in the foods by reversed- phase high performance liquid chromatography with a new precolumn derivatives, butylthiocarbamyl amino acid, compared to conventional phenylthiocarbamyl derivatives and ion- exchange", J. Chromatogr. A , 740, 31- 40.

15) H. Sultan, R, Onodera, M. M. Or- Rashid and S. Wadud (2001), "Convenient method for the determination of arginine and its related compounds in rumen fluid by reversed- phase high- performance liquid chromatography", J. Chromatography. B: BiomeD. Sci. and Applications, 755, 321.

16) Y. V. Tcherkas, L. A. kartsova and I. N. Krasnova (2001), "Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed- phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection" J. Chromatogr. A, 913, 303.

17) A. Namera, M. Yashiki, M. Nishid and T. Kojima (2002), "Direct extract derivatization for determination of amino acids in human urine by gas chromatography and mass spectrometry", J. Chromatogr. B, 776, 49.

18) D. P. Nikolelis and T. P. Hadjiioannou (1983), "Construction of an arginine enzyme electrode and determination of arginine in biological materials", Anal. Chim. Acta, 147, 33.

19) R. Driouich, T. Takayanagi, M. Oshima and S .Motomizu (2003), "Investigation of salicylaldehyde-5-sulfonate as a pre- column derivatizing agent for the determination of n-alkane diamines, Lysine, diaminopimelic acid and isonazide by capillary zone electrophoresis", J. Pharm. Biomed Anal., 30, 1523.

20) L. Zhang, Y. Liu and G. Chen (2004), "Simultaneous determination of allantion, choline and L- arginine in Rhizoma Dioscorease by capillary electrophoresis", J. Chromatogr. A, 1043, 317.

21) C.S.P. Sastry and M.K. Tummura, (1984), "Spectrophotometric determination of arginine in proteins", Food Chemistry, 15, 4, 257-260.

22) C.S.P. Sastry, K. Rama and K.M.M. Krishna Prasad, (1996), "Spectrophotometric determination of bioactive compounds with chloramines T and gallocyanine", Talanta, 43, 1625-1632.

23) I.M. Perl and M.P. Szakas, (1992), "Spectrophotometric determination of lysine in the presence of other amino acids and proteins using furfuraldehyde", Anal. Chim. Acta, 257, 2, 209-216.

24) N.M.L. Al-Karemy, (2005), "Development of spectrophotometric method for determination of some amino acids and primary amines using TCNQ reagent", M.Sc. Thesis, Mosul University.

25) T.S. Al-Ghabsha and M.M. Al-Sharook,(2005), "Spectrophotometric determination of trace amount of amino acids via charge-transfer complex formation reaction", J.J. Appl. Sci., 7, 2, 13-20.

26) T.S. Al-Ghabsha, (1991), "Spectrophotometric determination of microgram amount of some amino acids with fluoranil", J. Edu. & Sci., 12, 125-135.

27) A. Alonso, M.J. Almendral, M.J. Porras and C. Alonso, (1995), "Enzyme immobilization on an epoxy matrix. Determination of L-arginine by flow-injection techniques", Anal. Chim. Acta., 308, 1-3, 164-169.

28) A.M. Almuaibed and A. Townshend, (1997), "Flow injection amperometric and chemiluminescence individual and simultaneous determination of lysine and glucose with immobilized lysine oxidase and glucose oxidase", Anal. Chim. Acta, 338, 1-2, 149-154.

29) J. Michalowski and A. Kojlo, (2001), "Use of amino-carbonyl reaction and chemiluminescence detection to the flow-injection determination of some amino acids", Talanta, 54, 1, 107-113.

30) A. Alonso, M.J. Almendral, M.J. Porras and C. Alonso, (1995), "Enzyme immobilization on an epoxy matrix. Determination of L-arginine by flow-injection techniques", Anal. Chim. Acta., 308, 1-3, 164-169.

31) T. Heresztyn, M.I. Worthley and J.D. Horowitz, (2004), "Determination of L-arginine and $^{G}N,^{G}N$- and $^{G}N^{G1}N$-dimethyl L-arginine in plasma by liquid chromatography as ACCQ-fluor^{TM} fluorescent derivatives", J. Chromatog. B, 805, 2, 325-329.

32) M. Valcarcel, (2000), "Principles of Analytical Chemistry", Springer-Veralg. Berlin, Germany, p. 67.

33) R. Delevie, (1997), "Principle of Quantitative Chemical Analysis", McGraw-Hill, New York, p. 498.

34) O.V. Khranina, F.P. Chernyakovskii and G.S. Denisov, (1987), "UV-VIS electrochromism due to proton transfer", J. Mol. Struct., 177, 309-315; Chem. Abst., (1989), 111, 5, 38746w.

35) L.G. Haris, (1988), "Analytical Chemistry", Prentice-Hall, Inc., New Jersey, p. 427.