كلية الصيدلة

الكيمياء الحيوية (١)

الجلسة العملية السابعة

الأحماض الأمينية والبروتينات (١)

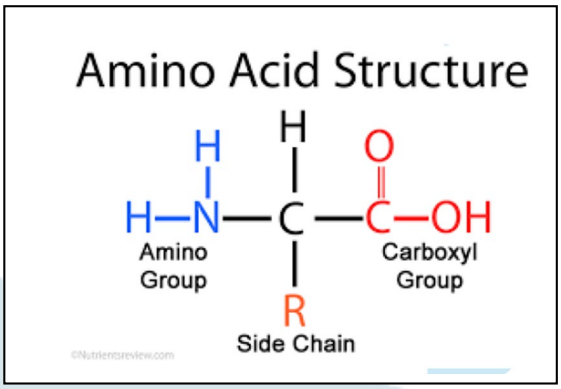
اختباري النينهيدرين والبيوريت

❖ أهداف الجلسة:

١. **التعرف على تفاعلات الكشف عن الأحماض الأمينية في محاليلها وتمييزها عن المحاليل البيولوجية الأخرى.**

٢. **التعرف على تفاعلات الكشف عن البروتينات في محاليلها وتمييزها عن المحاليل البيولوجية الأخرى.**

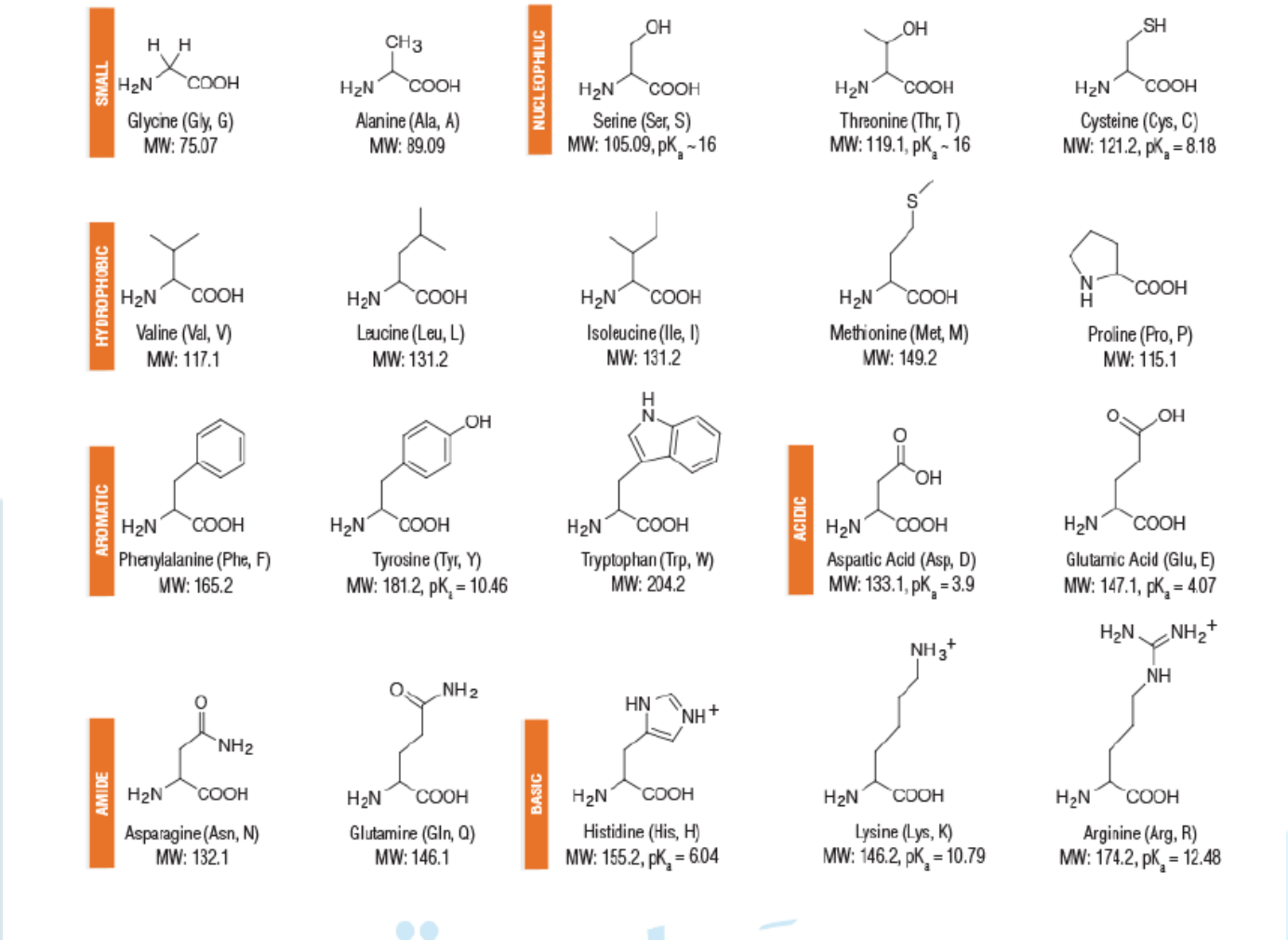
❖ مقدمة:



الأحماض الأمينية هي الوحدات الأساسية في بناء عديدات الببتيد والبروتينات. وتنتج عن الحلمهة الكيميائية أو الأنزيمية للبروتينات. جميع الحموض الأمينية المكونة للبروتينات الحيوية تشترك بأنها تحتوي على زمرة كربوكسيلية حمضية وزمرة أمين أولي قاعدية (عدا البرولين والهيدروكسي برولين فيحتويان على أمين ثانوي).

تم التعرف حتى الآن على حوالي 150 حمض أميني موجود في تركيب المادة الحية إما بشكل حر أو مرتبط. 20 حمضاً أمينياً منها فقط هي التي تدخل في تركيب البروتينات. يمكن اصطناع بعض الحموض الأمينية في الجسم، أما بعضها الآخر فلا يمكن اصطناعه ويجب الحصول عليه حصراً عن طريق الغذاء وتدعى تلك الأحماض الأمينية بالأحماض الأمينية الأساسية (التربتوفان، الليزين، الميتيونين، الفينيل ألانين، التريونين، الفالين، اللوسين، الايزولوسين). وتصنف الأحماض الأمينية وفق بنيتها الكيميائية إلى خطية وحلقية، كما تصنف بناء على امتلاكها لمجموعات وظيفية معينة (هيدروكسيلية مثل السيرين والتريونين، كبريتية مثل الميتيونين والسيستئين)، أو بناء على خصائص كيميائية معينة (الأحماض الأمينية الحمضية مثل حمض الأسبارتيك والغلوتاميك، الأحماض الأمينية القلوية مثل الليزين والأرجينين والهيستيدين).

يرمز للأحماض الأمينية بالأحرف الثلاثة الأولى من اسمها:



البروتينات: هي جزيئات مكونة من تسلسل من الأحماض الأمينية المرتبطة مع بعضها بروابط ببتيدية.

تتشكل الرابطة الببتيدية من تفاعل الزمرة الحمضية من حمض أميني مع الزمرة الأمينية من الحمض الأميني الذي يليه بعد حذف جزيئة ماء.

تصنف البروتينات وفق تركيبها الكيميائي إلى بروتينات بسيطة متجانسة (تعطي عند حلمهتها أحماض أمينية فقط، مثل الألبومين والغلوبولين) وبروتينات معقدة أو غير متجانسة (تعطي عند حلمهتها جزيئات أخرى غير الأحماض الأمينية، مثل البروتينات السكرية والبروتينات الشحمية والبروتينات النووية والبروتينات المعدنية).

❖ **التجارب العملية:**

التجربة رقم (1):

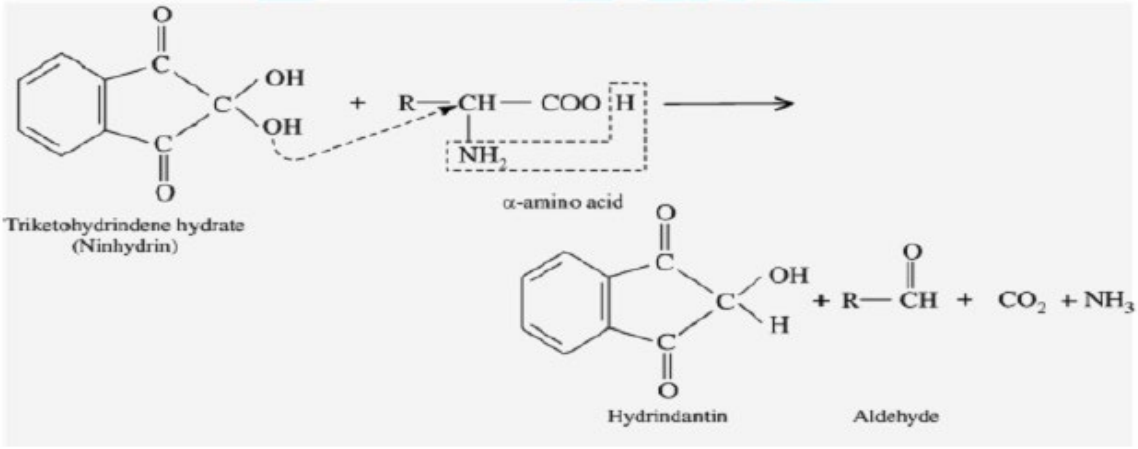
تفاعل النينهيدرين Ninhydrin reaction:

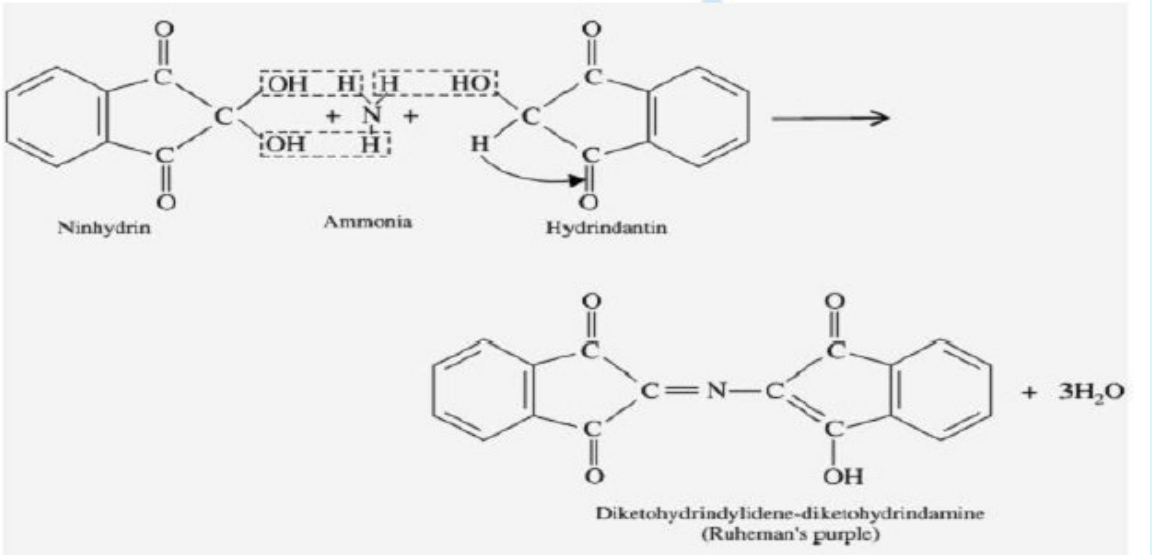
- **المبدأ:** هو تفاعل عام يستخدم للكشف عن الحموض الأمينية الحاوية على زمرة أمينية حرة في الموقع α.

يتم التفاعل على مرحلتين: في الأولى يحصل تفاعل أكسدة-إرجاع بين النينهيدرين والحمض الأميني فيتحرر غازي النشادر وثاني أوكسيد الكربون ويتشكل الشكل المرجع للنينهيدرين والذي يدعى بالهيدريندانتين Hydrindantine.

أما في الثانية فيتم تكاثف جزيئة من الهيدريندانتين وجزيئة من النينهيدرين الحر بوجود النشادر لإعطاء معقد ذو لون أزرق بنفسجي.

ملاحظة: لا يتفاعل الحمضان الأمينيان برولين وهيدروكسي برولين مع النهيدرين ويعطيان لوناً أصفر مع هذا الاختبار.





- **المواد المستعملة:**

✓ محلول النينهيدرين 0.1%

✓ محلول ألبومين

✓ محاليل أحماض أمينية (غليسين 0.5%، برولين 0.5%)

- **طريقة العمل:**

١. أضف 1 مل من محلول النينهيدرين 0.1% إلى كل المحاليل التالية:

a. 2 مل من محلول الألبومين.

b. 2 مل من محلول الغليسين.

c. 2 مل من محلول البرولين.

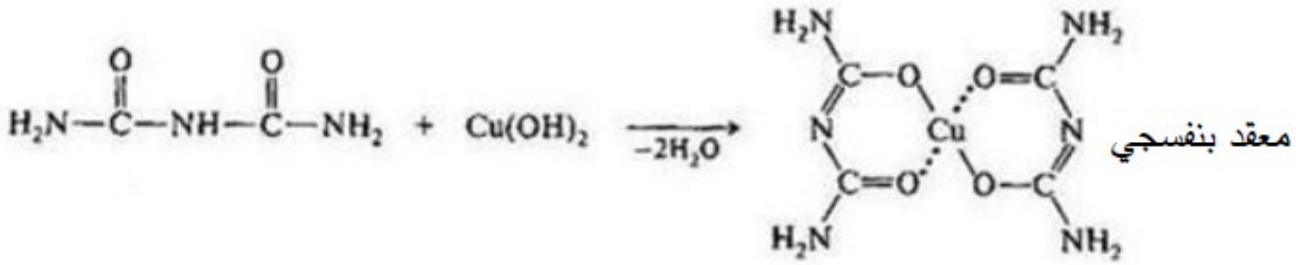
٢. سخن الأنابيب في حمام الماء المغلي 100 م لمدة دقيقة واحدة.

٣. لاحظ الألوان المتشكلة ودون نتائجك وملاحظاتك.

التجربة رقم (2):

تفاعل البيوريت (البولة المضاعفة) Biuret reaction:

- **المبدأ:** هو التفاعل النوعي لكشف عديدات الببتيد والبروتينات وتمييزها عن الأحماض الأمينية. يعتمد تفاعل البيوريت على مبدأ معاملة البروتين بمحلول كبريتات النحاس في وسط قلوي فينتج مركب بنفسجي اللون. يشترط وجود رابطتين ببتيديتين على الأقل لكي يعطي هذا الاختبار نتيجة إيجابية، لذلك فإن أبسط مركب يعطي نتيجة إيجابية هو البيوريت (ثنائي البولة)، وانطلاقاً من ذلك سمي التفاعل بهذا الاسم.



- **المواد المستعملة:**

✓ كاشف البيوريت: يحضر بإذابة 1.5 غ من كبريتات النحاس المائية مع 6 غ من طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم في 500 مل ماء مقطر، ثم يضاف 300 مل من ماءات الصوديوم 10%، ويكمل الحجم بالماء المقطر حتى اللتر. يمكن إضافة يوديد البوتاسيوم 1 غ للحفظ.

✓ محلول الألبومين.

✓ محلول حمض أميني (غليسين).

- **طريقة العمل:**

١. أضف 3 مل من كاشف البيوريت إلى 2 مل من كل المحاليل التالية:
   a. محلول الألبومين
   b. محلول الغليسين
٢. احضن الأنابيب الزجاجية لمدة عشر دقائق بالدرجة 37م.
٣. لاحظ تشكل اللون البنفسجي من عدم تشكله في الأنابيب.
٤. دون النتائج والملاحظات.