



مختبر الكيمياء الحياتية

المرحلة الثالثة

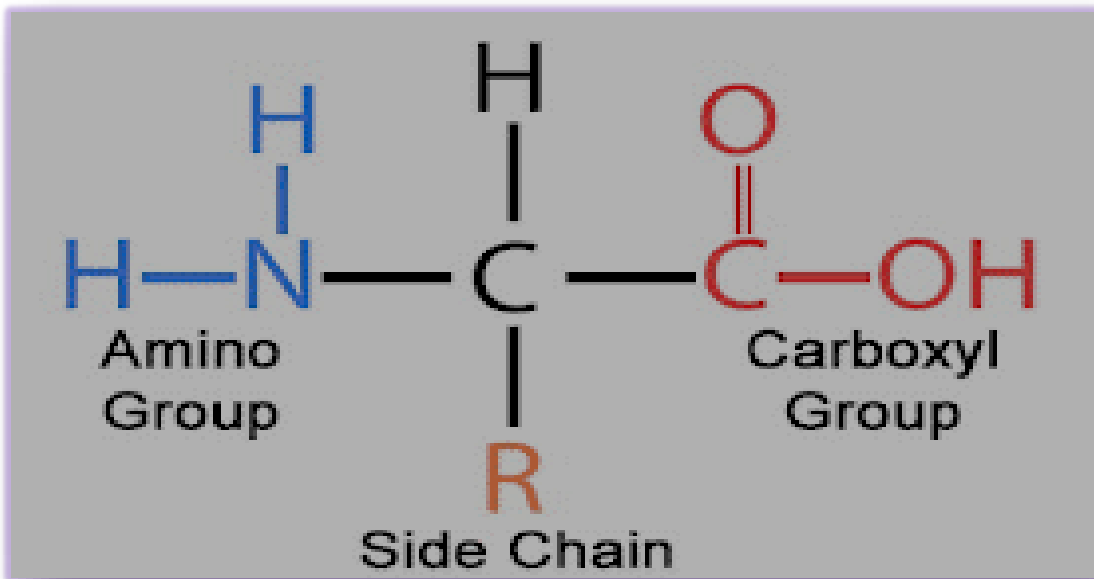
الكشوفات الخاصة بالأحماض الامينية



اعداد

ا.د لمياء عبد المجيد المشهدي

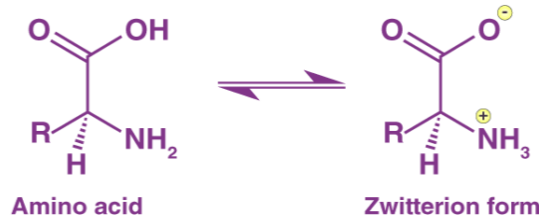
م.م امير عذاب عبد الكاظم العامري



الاحماض الامينية

الاحماض الامينية (بالإنجليزية: Amino Acids)، هي عبارة عن مركبات عضوية ترتبط مع بعضها البعض مكونة مركبات تسمى بالبروتينات، وتتكون الاحماض الامينية من مجموعة أمينية (بالإنجليزية: Amino Group)، ومجموعة كربوكسيلية (بالإنجليزية: Carboxyl Group)، ومجموعة جانبية تكون مميزة لكل حمض أميني. كما تحتوي الاحماض الامينية على مجموعة من العناصر وهي الكربون، والهيدروجين، والأكسجين، والنيتروجين.

تحتوي الاحماض الامينية على شحنة سالبة وشحنة موجبة أي (المجموعة الأمينية و المجموعة الكربوكسيلية) في حالة تأين عند $\text{PH} = 7$ يسمى الحالة الايونية (Zwitterion)



© Byjus.com

نقطة التعادل الكهربى Isoelectric point

-يرمز لها بالرموز الآتية IEP , pH(I) , pI :

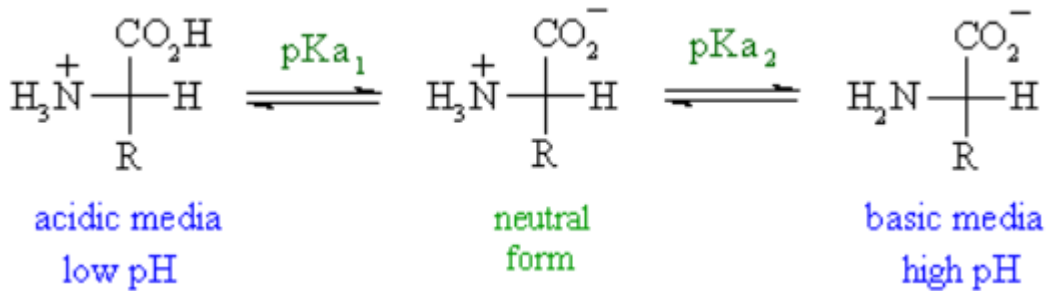
-هي درجة الحموضة في أي جزيء معين أو سطح معين أو جزيئة (مثل بروتينات) يحمل صافي الشحنة الكهربائية تساوي صفراً.

-أو هي الرقم الهيدروجيني الذي يكون عنده الجزيء يحتوي مجموعتين أو أكثر قابلة للتأين ولكن لا يوجد شحنة كهربائية (أي أنه محايد كهربائياً) لأن متوسط عدد الشحنات الموجبة يساوي متوسط عدد الشحنات السالبة.

-نقطة التعادل الكهربى للأحماض الامينية هي قيمة pH التي تعطي حمض أميني متعادل الشحنة الكهربائية.

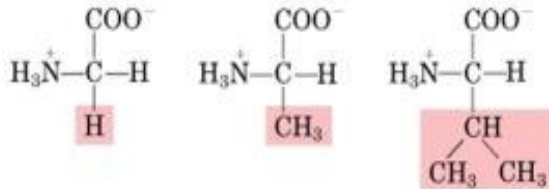
-نقطة التعادل الكهربى = متوسط مجموع pka للجزيء إذا كان يحتوى على COOH واحدة، NH_2 واحدة

$$\text{pI} = \frac{\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{a2}}{2}$$



تراكيب الاحماض الامينية

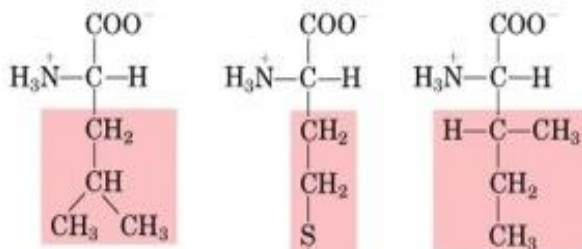
Nonpolar, aliphatic R groups



Glycine

Alanine

Valine

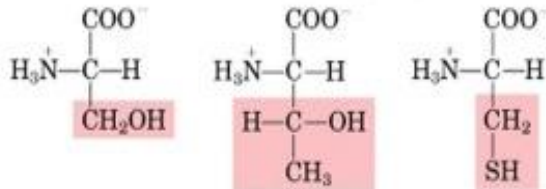


Leucine

Methionine

Isoleucine

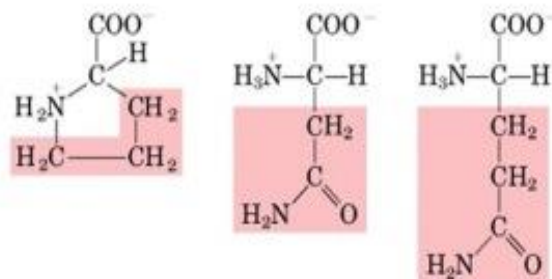
Polar, uncharged R groups



Serine

Threonine

Cysteine

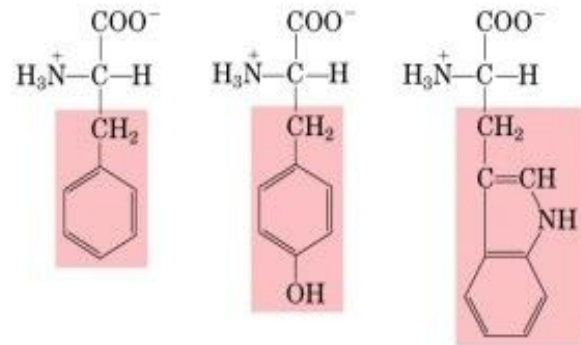


Proline

Asparagine

Glutamine

Aromatic R groups

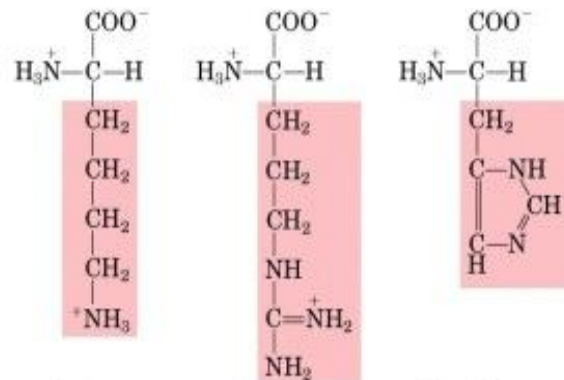


Phenylalanine

Tyrosine

Tryptophan

Positively charged R groups

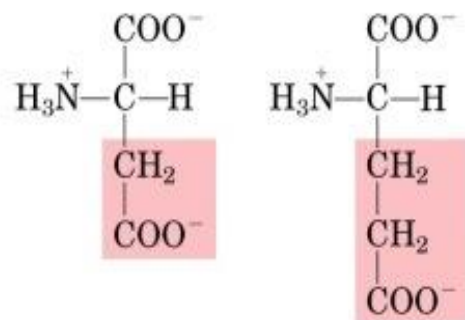


Lysine

Arginine

Histidine

Negatively charged R groups



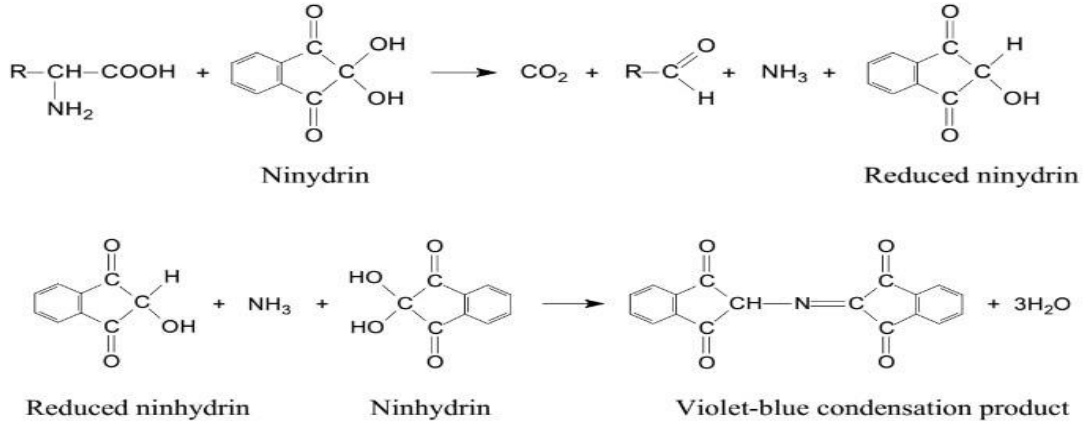
Aspartate

Glutamate

الكشوفات الخاصة بالأحماض الامينية

أولاً/ كشف الننهايدرين Ninhydrin Test

وهو كشف عام للأحماض الامينية يعطي لون بنفسجي مع الاحماض الامينية الأولية ولون اصفر مع الاحماض الامينية الثانوية (Arginine ، Cysteine،proline)



طريقة العمل

أضف الى 10 قطرات من الحامض الاميني 5 قطرات من الكاشف ثم سخن لمدة 3 دقائق في حمام مائي مغلي ولاحظ اللون الظاهر.

ملاحظات:

- (1) يعتبر الكشف عاماً لجميع الاحماض الامينية والبروتينات.
- (2) بالامكان تقدير كمية الاحماض الامينية من خلال حساب كمية CO_2 المتحررة.

ثانيا/ كشف الزانثوبروتك Xanthoprotic Test

اختبار Xanthoprotic هو اختبار كيميائي حيوي للكشف عن الأحماض الأمينية التي تحتوي على مجموعات فينولية أو إندولية مثل (phe, Tyr, Trp) (أحماض أمينية عطرية). يسمى الاختبار اختبار Xanthoprotic بسبب تكوين راسب أصفر من حمض الزانثوبروتيك. يشير مصطلح "Xantho" إلى "أصفر" ، لذلك يُطلق على الاختبار غالبًا اسم اختبار البروتين الأصفر. يعطي الاختبار نتيجة إيجابية للأحماض الأمينية التي تحتوي على حلقات بنزين أو مجموعات عطرية أخرى.

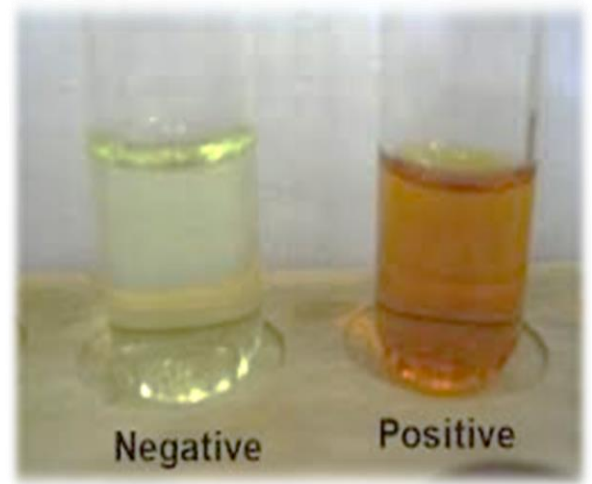
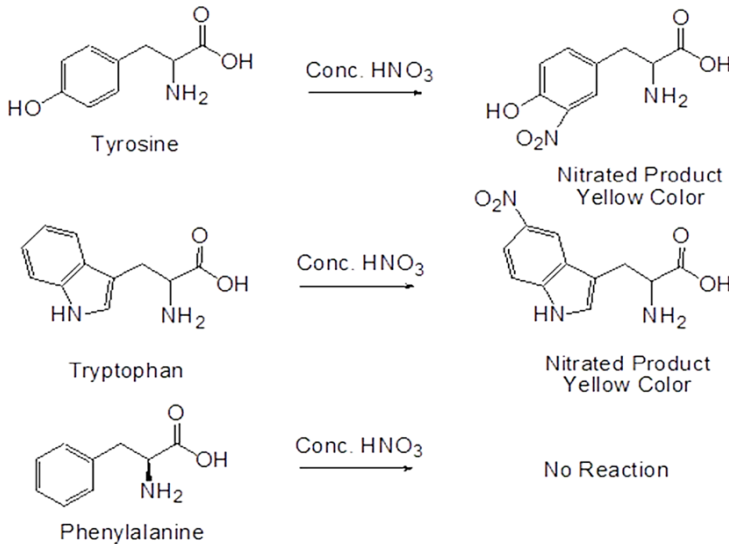
الغرض من الاختبار

- 1- للكشف عن وجود مجموعات عطرية تحتوي على أحماض أمينية مثل (Tyr, Trp).
- 2- لتمييز (Tyr, Trp) عن الأحماض الأمينية الأخرى.

مبدأ اختبار Xanthoprotic

يعتمد اختبار Xanthoprotic على حقيقة أن المجموعات العطرية في الأحماض الأمينية يتم نتراتتها بالتسخين باستخدام HNO_3 المركزة لإنتاج مشتق نيترو بلون أصفر مكثف.

ومع ذلك، عند إضافة القلويات، تتحول البقايا إلى اللون البرتقالي بسبب تكوين ملح من الشكل التوتوميري لمركب النيترو. لا تعطي الأحماض الأمينية المحتوية على حلقة البنزين مثل فينيل ألانين اختبارًا إيجابيًا لهذا الاختبار لأن مجموعة فينيل في فينيل ألانين مستقرة جدًا، والتي لا تتفاعل مع حمض النيتريك في ظروف هذا الاختبار. ومع ذلك ، قد يعطي الفينيل ألانين نتيجة إيجابية بعد فترة طويلة من التسخين.



Reagent

Concentrated Nitric acid, 40% NaOH

طريقة العمل

- 1- أضف إلى 10 قطرات من الحامض الاميني 5 قطرات من حامض النتريك المركز وسخن في حمام مائي مغلي لمدة 3 دقائق ولاحظ الألوان المتكونة
- 2- برد المحلول وأضف 10 قطرات من هيدروكسيد الصوديوم 40% ولاحظ تكون محاليل برتقالية اللون

ثالثا/ كشف ميلون Millon's Test

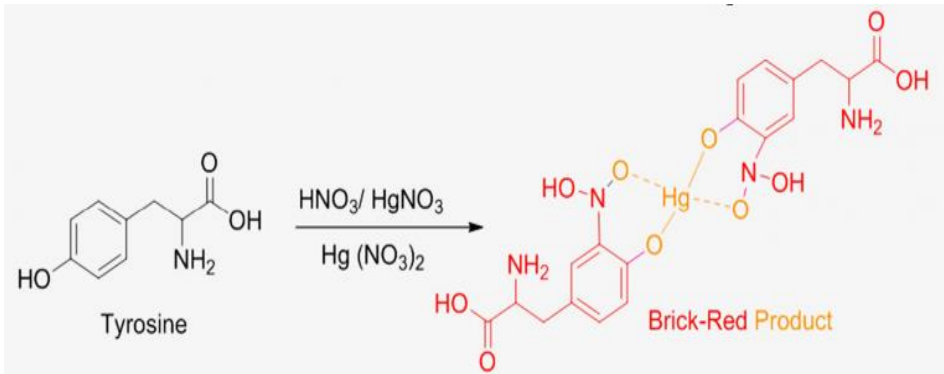
يعد اختبار Millon اختباراً محدداً لتحديد التايروسين. يحتوي التايروسين على البروتين عندما يتفاعل مع محاليل كبريتات الزنبق المحمضة يعطي ترسبات صفراء من مركب بروتين الزنبق. بالإضافة إلى محلول نترتيت الصوديوم والتسخين، يتشكل المركب الأصفر من فينولات الزنبق، وهو أحمر اللون. وبالتالي، فإن البروتينات التي تحتوي على التايروسين ستعطي نتيجة إيجابية.

ومع ذلك، فإن بعض البروتينات التي تحتوي على التايروسين تشكل في البداية راسباً أبيض يتحول إلى اللون الأحمر عند تسخينه، بينما يشكل البعض الآخر محلولاً أحمر على الفور. تعتبر كلتا النتيجتين إيجابيتين. لاحظ أن أي مركب مع مجموعة الفينول سوف ينتج عنه اختبار إيجابي، لذلك يجب أن يكون المرء على يقين من أن العينة التي سيتم اختبارها لا تحتوي على أي فينولات غير تلك الموجودة في التايروسين

فإن الاختبار مفيد في اكتشاف مثل هذه البروتينات. تم اكتشاف الاختبار بواسطة الكيميائي الفرنسي Auguste Nicolas Eugene Millon وسمي بهذا الاسم.

الغرض من الاختبار

- 1- للكشف عن وجود البروتينات المحتوية على التايروسين في عينة معينة.
- 2- للكشف عن وجود مركبات تحتوي على الفينول.
- 3- لتمييز التايروسين عن الأحماض الأمينية الأخرى.



Reagents:

- 10% percent mercuric sulphate in 10% percent sulphuric acid (acid mercuric sulphate solution)
- 1% sodium nitrite (NaNO₂) solution
- Test solution: 1 % arginine, 1 % tyrosine, protein solution, phenol solution

طريقة العمل

- 1- أضف الى 5 قطرات من الحامض الاميني 5 قطرات من الكاشف وسخن في حمام مائي مغلي لمدة 10 دقائق.
- 2- برد المحلول وأضف 2 قطره من نترتيت الصوديوم 10% ولاحظ تكون محلول احمر اللون

رابعاً/ كشف النايتروبروسايد Nitroprusside Test

اختبار النايتروبروسايد هو اختبار كيميائي حيوي يستخدم للكشف عن المجموعات الحرة-SH في الأحماض الأمينية أو الأحماض الأمينية **cysteine** في البروتين. الاختبار هو اختبار محدد **cysteine** لأنه الحمض الأميني الوحيد الذي يحتوي على مجموعة خالية من SH في الهيكل. ومع ذلك، لا يقتصر الاختبار على البروتينات والأحماض الأمينية حيث يمكنه اكتشاف مركبات مثل الكيتونات. الاختبار عبارة عن تفاعل ملون للحمض الأميني حيث تتفاعل مجموعة free-SH في الحمض الأميني مع كاشف النايتروبروسايد لتكوين مركب أحمر اللون. السيستين والميثيونين هما نوعان من الأحماض الأمينية مع مجموعات SH- ولكن مجموعة SH- في جزيء الميثيونين مقيدة في ارتباط thioester الذي يصعب كسره وبالتالي لا يمكن اكتشافه من خلال هذا الاختبار.

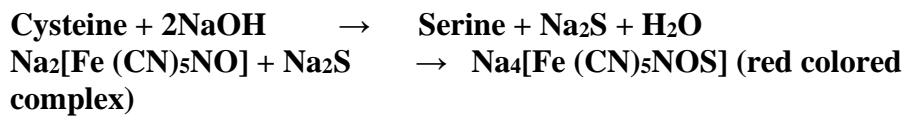
الغرض من الكشف

- 1- للكشف عن وجود حمض أميني cysteine في محلول بروتيني.
- 2- للتمييز بين الأحماض الأمينية cysteine وcystine.

مبدأ اختبار النايتروبروسايد

يعتمد الاختبار على الكشف عن ذرات الكبريت الحرة في محلول نتيجة تحلل مجموعة SH-. نتروبروسايد هو أنيون معقد يتكون من مركز حديدي ثماني السطوح محاط بخمس مجموعات سيانيد مرتبطة بإحكام. عندما يقترن الجزيء مع ذرة الكبريت يكون مركباً بنفسجياً أو أحمر اللون. يعمل عمل القلويات القوية على إطلاق مجموعة SH بصوت عالٍ في جزيء السيستين. ثم يتفاعل الكبريت مع أيون النايتروبروسايد لتكوين مركب أحمر اللون. قد لا تعطي بعض البروتينات نتيجة إيجابية على الفور، وفي هذه الحالة، يجب تسخين المحلول لأن هذه البروتينات قد تتطلب تخزيناً حرارياً لتحرير مجموعة SH-.

Reaction



Reagent

- 2% freshly prepared Sodium Nitroprusside
- Concentrated Ammonia
- Sample (1% cysteine)



طريقة العمل

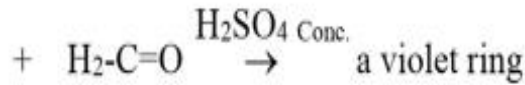
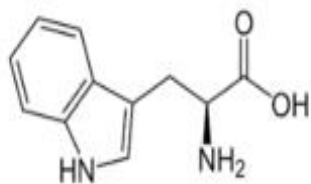
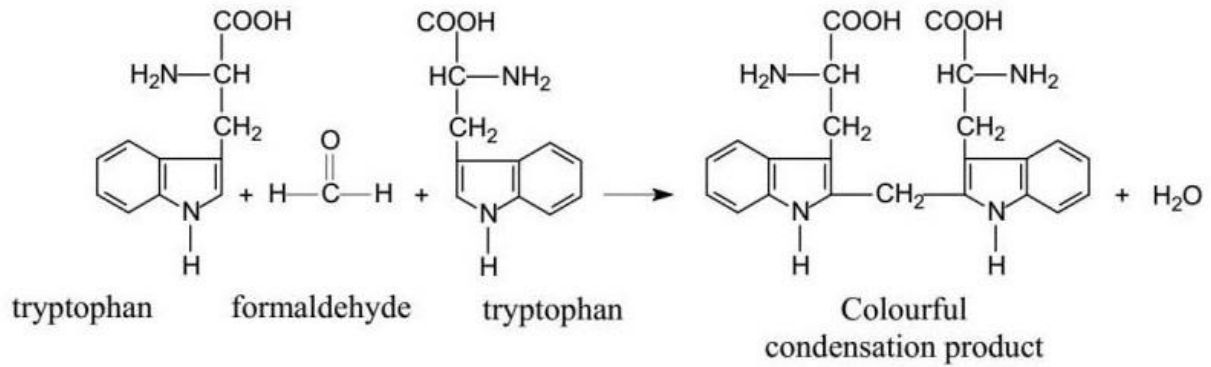
- 1- أضف إلى 10 قطرات من الحامض الاميني 2 قطرة من النايتروبروسايد
- 2- أضف 3 قطرات من الامونيا المركزة ولاحظ ظهور اللون الارجواني

خامسا/ كشف أكري-روزنهايم Acree-Rosenheim test

اختبار أكري-روزنهايم (الكشف عن التربتوفان) يُعرف أيضًا باسم اختبار الألدheid. يستخدم هذا الاختبار للكشف عن وجود التربتوفان في البروتينات

المبدأ

Acree-Rosenheim هو اختبار آخر للكشف عن التربتوفان (Trp) في محلول البروتين. يتم خلط التربتوفان مع الفورمالديهايد (CH₂O). يضاف حامض الكبريتيك المركز ليشكل طبقتين. المنطقة البنفسجية في نقطة تقاطع الطبقتين هي نتيجة إيجابية. يتم الحصول على نتيجة مماثلة من خلال تفاعل هوبكنز-كول الذي كثيرًا ما يستخدم للكشف عن Trp في محلول بروتيني.



طريقة العمل

- 1- أضف الى 10 قطرات من الحامض الاميني 10 قطرات من كلوريد الحديدك 1% و 10 قطرات من فورمالديهايد.
- 2- أضف 3 قطرات من حامض الكبريتيك المركز على جدران الانبوبة ولاحظ تكون حلقة بنفسجية اللون

سادسا/ كشف باولي Pauly's Test

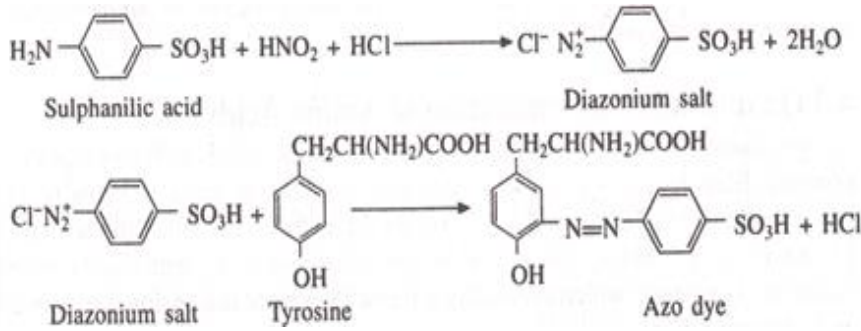
اختبار بولي (الكشف عن التايروسين أو الهيستيدين) اختبار باولي للكشف عن وجود التايروسين أو الهيستيدين. سمي على اسم الكيميائي الألماني هيرمان بولي ، الذي وصف التفاعل لأول مرة.

Diazotized sulphanilic acid couples with amines, phenols and imidazole to form highly colored compounds

يتشكل مركب الديازونيوم فقط في البرد ، لذلك يجب تبريد جميع المحاليل في الجليد قبل أن تصبح diazotization.

المبدأ:

هذا الاختبار محدد للكشف عن التايروسين أو الهيستيدين. يحتوي الكاشف المستخدم في هذا الاختبار على حمض السلفانيليك المذاب في حمض الهيدروكلوريك. ينتج حمض السلفانيليك عند التزاوج بوجود نترت الصوديوم وحمض الهيدروكلوريك في تكوين ملح الديازونيوم. يتكون ملح الديازونيوم من أزواج مع التايروسين أو الهيستيدين في وسط قلوي لإعطاء كروموجين أحمر اللون (صبغة أزو).



Reagents:

- **Amino acids:** 1 % solution of amino acids like tyrosine, histidine, glycine, etc.
- **Sulphanilic acid:** 1 % sulphanilic acid in 10 % HCl
- **5 % (w/v) sodium nitrite solution in water.**
- **10 % (w/v) sodium carbonate solution in water**

طريقة العمل

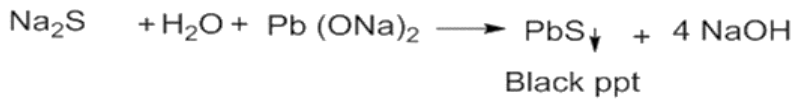
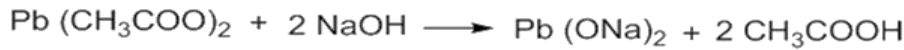
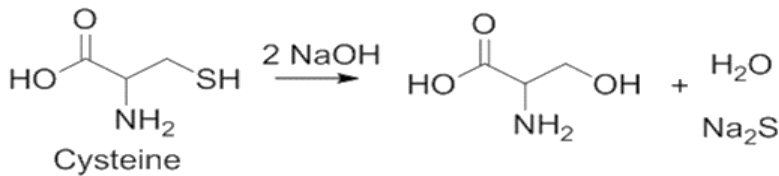
- 1- أضف الى 10 قطرات من الحامض الاميني 10 قطرات من حامض السلفانيليك مع رج الانبوبة و10 قطرات من نترت الصوديوم 10%.
- 2- اترك المحلول لمدة 5 دقائق ثم أضف 10 قطرات من كربونات الصوديوم 20% ولاحظ ظهور محلول ذو لون احمر

سابعا/ كشف كبريتيد الرصاص Lead Sulfide Test

اختبار خلات الرصاص (اختبار كبريتيد الرصاص) (الكشف عن الكبريت المحتوي على احماض امينية) هذا الاختبار خاص بالكبريت الذي يحتوي على احماض أمينية (Cysteine, Cystine, and Methionine)

المبدأ:

يتفاعل الأحماض الأمينية المحتوية على الكبريت مثل cysteine, cysteine, methionine (sulfhydryl/thiol group) مع أسيتات الرصاص تحت الظروف القلوية لتشكيل راسب بني. تتحلل هذه الأحماض الأمينية المحتوية على الكبريت في وسط قلوي قوي لإطلاق أيون الكبريتيد (S^{2-}) في شكل H_2S (كبريتيد الهيدروجين). يمكن أن تتفاعل أيونات الكبريتيد مع أسيتات الرصاص (II) لتكوين راسب أسود مائل إلى البني.



Reagents:

- Amino acids: 1 % solution of amino acids like glycine, cysteine, etc.
- 40% NaOH
- 20% lead acetate

طريقة العمل

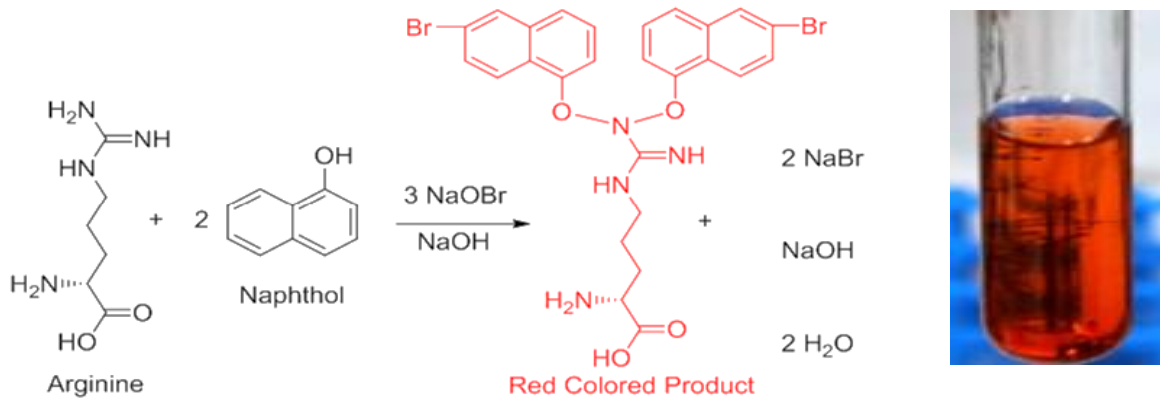
- 1- أضف إلى 2مل من الحامض الاميني الى 2مل من هيدروكسيد الصوديوم 40% مع التسخين لمدة دقيقة واحدة
- 2- برد المحلول ثم أضف 2 قطرة من خلات الرصاص 20% ولاحظ ظهور راسب اسود من كبريتيد الرصاص.

ثامنا/ كشف ساكاجوتشي Sakaguchi Test

اختبار ساكاجوتشي هو اختبار كيميائي يستخدم للكشف عن وجود الأرجينين في البروتينات. سمي على اسم عالم الطعام والكيميائي العضوي الياباني شويو ساكاجوتشي (1900-1995) الذي وصف الاختبار في عام 1925.

المبدأ:

يتم إجراء اختبار ساكاجوتشي بواسطة مركبات الجوانيدينيوم guanidinium compounds. الحمض الأميني الوحيد الذي يحتوي على مجموعة الجوانيديدين guanidine group هو الأرجينين. لذلك هذا الاختبار محدد لتحديد الأرجينين. يتفاعل الأرجينين مع α -naphthol في وجود عامل مؤكسد مثل ماء البروم أو هيبوكلوريت الصوديوم ليعطي منتجاً أحمر اللون. الجوانيديدين الآخر المحتوي على مركبات الأحماض غير الأمينية يعطي هذا التفاعل أيضاً



Reagents:

1. Amino acids: 0.1 % solution of amino acids like glycine, arginine, lysine, tyrosine, etc.
2. NaOH: 40% (w/v).
3. α -Naphthol: 1% in alcohol.
4. Bromine water: Add a few drops of bromine to 100 ml water and shake. This should be done in a fume chamber. (Caution: Bromine can cause severe burns). Or use 10% sodium hypochlorite solution

طريقة العمل

- 1- أضيف الى 1مل من الحامض الاميني 5 قطرات من هيدروكسيد الصوديوم 20% مع التسخين لمدة دقيقة واحدة
- 2- برد المحلول ثم أضيف 3 قطرات من الفانفتول و3 قطرات ماء البروم او 3 قطرات من هيبوكلوريت الصوديوم ولاحظ ظهور اللون الأحمر.

المحلول المجهول

كشف الننهايدرین

(-) لا تغير في اللون ليس حامض اميني (توقف)

(+) لون اصفر حامض اميني ثانوي البرولين (توقف)

(+) لون بنفسجي حامض اميني اولي (استمرار)

كشف الزانثوبروتيك

(-) لا تغير في اللون حامض اميني يحتوي على سلسلة اليفاتية ارجنين، سستين، ستانين، ميثونين

كشف باولي

(+) لون احمر الحامض الاميني الهستدين His

(+) لون اصفر حامض اميني يحتوي على حلقة اروماتية تربتوفان، تايروسين، فنيل الاتين (لا يستجيب) الهستدين (لا يستجيب)

كشف ميلون

(+) لون احمر مجموعة الفينول في الحامض الاميني التايروسين

كشف روزنهايم

(+) حلقة بنفسجية مجموعة الاندول في الحامض الاميني التربتوفان

كشف كبريتيد الرصاص

(+) راسب اسود مجموعة الكبريت في الحامض الاميني السستين والستانين

كشف ساكاجوتشي

(+) لون احمر مجموعة الكواندين في الحامض الاميني الارجنين

كشف النايتروبروسايد

(-) لا تغير باللون للحامض الاميني السستين

(+) محلول احمر اللون الاميني الستانين