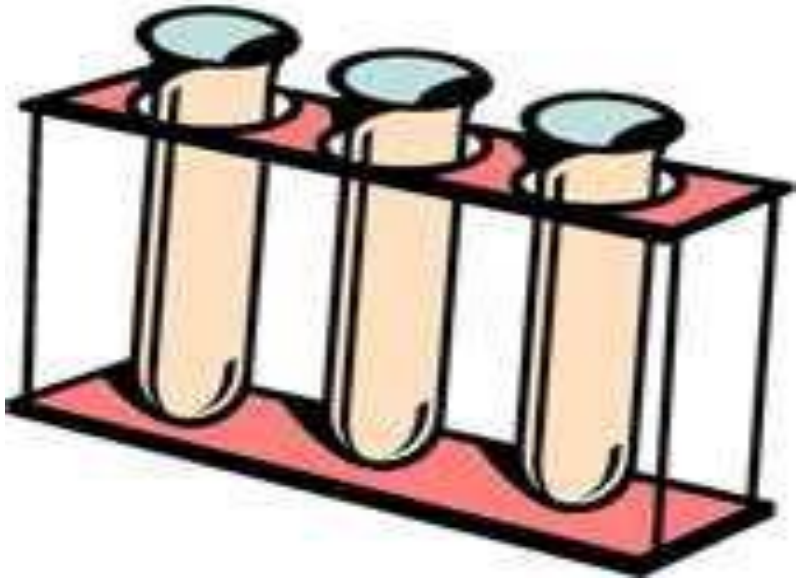
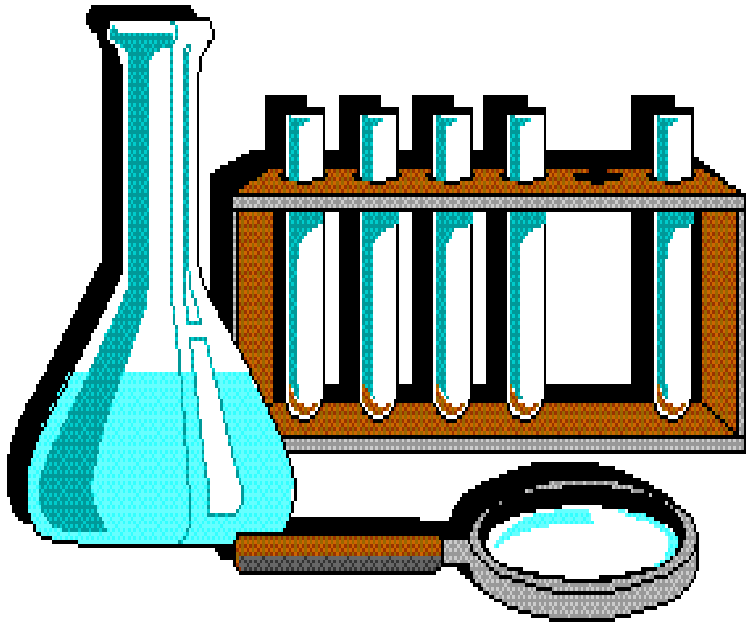
الكيمياء الحيوية العملية





السكشن الثامن

تحليل الإانزيمات و الفيتامينات

تحليل الإانزيمات

تقدير نشاط الإنزيمات:

يتم تقدير نشاط الإنزيمات باستخدام العديد من الطرق, والتي تعتمد على :

1. الزيادة في تركيز النواتج.
2. النقص في تركيز مادة التفاعل (Substrate).
3. الزيادة في تركيز المعاون الإنزيمي (Co-enzyme).

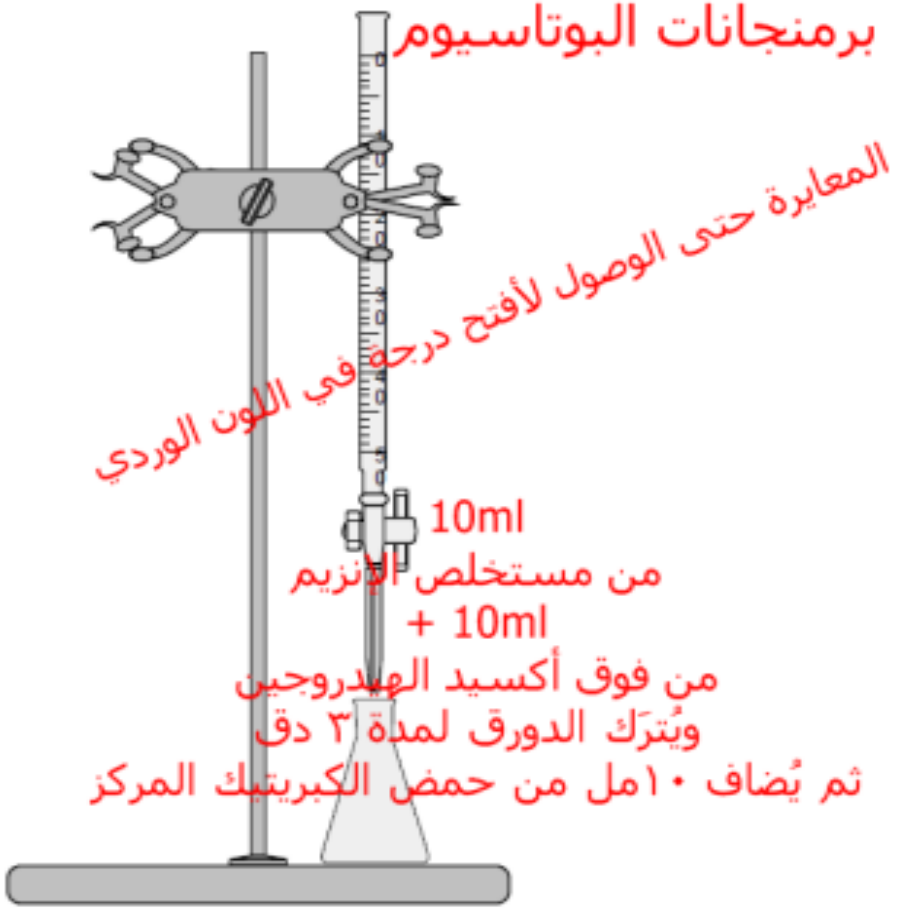
تقدير إنزيم الكتاليز

الإنزيم	تصنيفه	تواجُده	مادة التفاعل	أهميته	الأساس النظري لتقدير نشاطه
1- إنزيم الكتاليز Catalase	من إنزيمات الأكسدة والاختزال	يتواجد بكثرة في المصادر النباتية مثل: (أوراق الكرنب والقرنبيط ودرنات البطاطس) والمصادر الحيوانية مثل: (خلايا الكبد والكلى وكرات الدم الحمراء).	H_2O_2 فوق أكسيد الهيدروجين	له القدرة على تحليل 5 مليون مول من مادة التفاعل (H_2O_2) خلال دقيقة واحدة وعلى درجة حرارة الصفر المئوي.	يتم تقدير نشاط إنزيم الكتاليز من خلال المعايرة باستخدام محلول قياسي من البرمنجانات في وسط حمضي.

Catalase / 3min H_2SO_4/dil

$$2\,H_2O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + O_2 + H_2O_2 \text{ المتبقي} \longrightarrow KMNO_4$$

يتم تحضين مستخلص الإنزيم مع مادة التفاعل لفترة (3دق تقريبًا), وبعد ذلك يتم إيقاف التفاعل الإنزيمي بحمض الكبريتيك المخفف, ثم يتم معايرة فوق أكسيد الهيدروجين المتبقي بمحلول قياسي من برمنجانات البوتاسيوم.



الحسابات:

ملليمكافئات H_2O_2 المتحللة = (ح ب – ح ت) X ع

حيث ع هي التركيز العياري للبرمنجانات, ح ب هي قراءة البلانك, و ح ت هي قراءة السحاحة.

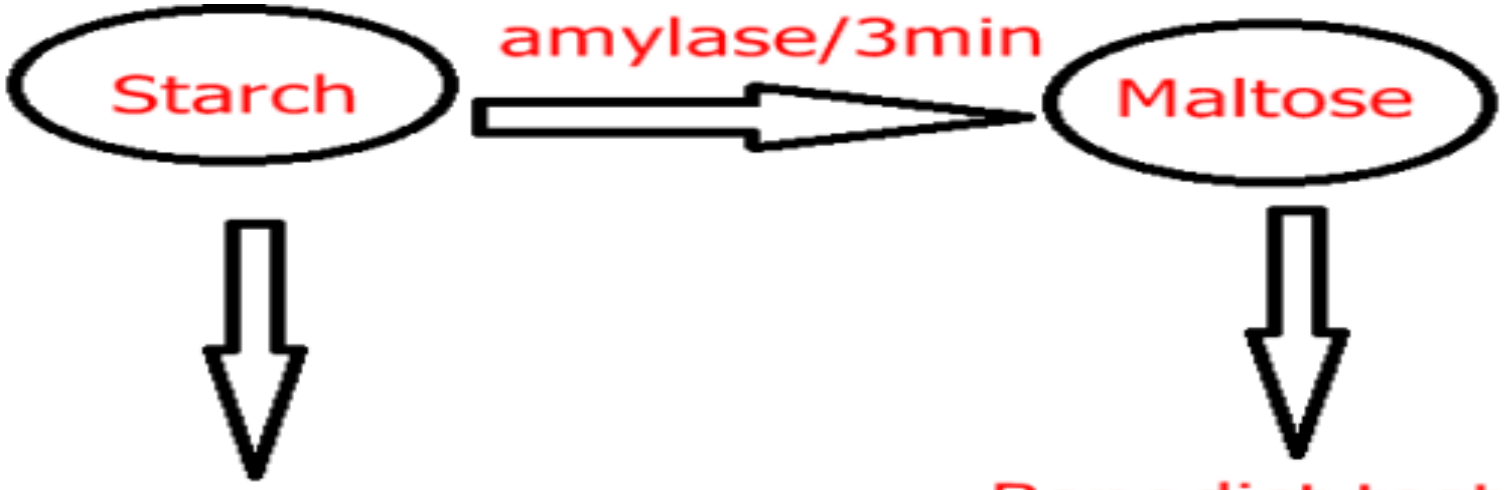
ويتم حساب ثابت نشاط إنزيم الكتاليز من هذه المعادلة:

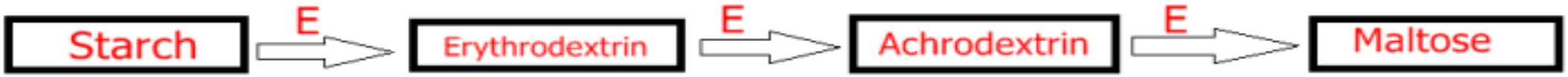
$$K = (2.303 / t) \times \text{Log}\,(a/a-x)$$

حيث **t** هي الزمن بالدقائق , **a** قراءة السحاحة في حالة البلانك, **a-x** قراءة السحاحة في التجربة, **K** هوثابت نشاط الإنزيم.

تقدير إنزيم الاميليز

الإنزيم	تصنيفه	تواجُده	مادة التفاعل	أهميته	الأساس النظري لتقدير نشاطه
2- إنزيم الأميليز Amylase	من إنزيمات التحليل المائي	يتواجد في اللُعاب والبنكرياس, وبعض المصادر النباتية والبكتيرية.	النشا Starch	1. له القدرة على تحليل النشا إلى مالتوز. 2. هذا الإنزيم له القدرة على تحليل الرابطة الجليكوسيدية من النوع ألفا 1-4 الموجودة في النشا, وفي وجود أيون الكلوريد كعامل منشّط.	يعتمد تقدير نشاط إنزيم الأميليز على تقدير الانخفاض في تركيز النشا باستخدام اليود, أو تقدير السكرات المختزلة (مالتوز) الناتج من تحلله بأي طريقة لونية متخصصة.





يتم تحديد نقطة الأكروميك (Achromic/point) و المقصود بها : الزمن الذي مرَّ على بدء التفاعل بين الإنزيم ومادة التفاعل, بحيث لم يُعطِ النشا لون أزرق مع اختبار اليود, وأعطى لون أصفر أو برتقالي مع اختبار بندكت, أي الزمن الذي عنده تحلّلت النشا بالكامل.

تقدير إنزيم التربسين

الإنزيم	تصنيفه	تواجُده	مادة التفاعل	أهميته	الأساس النظري لتقدير نشاطه
3- إنزيم التربسين Trypsin	من إنزيمات التحليل المائي	يُفرَز في البنكرياس في صورة غير نشطة (تربسينوجين) ثم يتحول إلى الصورة النشطة (تربسين) بواسطة إنزيم الإنتيروكينيز الذي يُفرَز من الإثنى عشر.	الجيلاتين "كمثال على بروتين"	له القدرة على تحليل البروتين إلى ببتيدات صغيرة الوزن الجزيئي وأحماض أمينية.	يتم تقدير نشاط إنزيم التربسين من خلال قدرته على تحويل البروتين من الحالة الصلبة (حالة الجيل) إلى الحالة السائلة, حيث يتم تحضين الإنزيم مع محلول الجيلاتين في حمام ثلجي لفترة زمنية معينة, ثم يتم الكشف عن حالة البروتين.

تقدير إنزيم Xanthine dehydrogenase

4- إنزيم Xanthine dehydrogenase (تفاعل شاردِنجَر)	من إنزيمات الأكسدة والاختزال	يوجد في اللبن وتتوقف كميته على عدد الكائنات الحية الدقيقة التي يحتويها اللبن, ويتلف بالحرارة, لذلك بعد غليان اللبن يكون الإنزيم غير نشط.	الفورمالدهيد	له القدرة على نقل الهيدروجين من معطي كالفورمالدهيد إلى مستقبل كصبغة أزرق الميثيلين في تفاعل أكسدة واختزال, فتتحول الصبغة من الصورة المؤكسدة إلى الصورة المختزلة, ويتخفي لونها.	يتم تقدير نشاط إنزيم ال Xanthine dehydrogenase من خلال ملاحظة التغير في لون صبغة أزرق الميثيلين تحت الظروف المختلفة مثل: - غليان اللبن ثم تبريده (الإنزيم نشط أم لا). - وجود أو غياب مادة التفاعل (الفورمالدهيد).

تقدير إنزيم السكريز

الإنزيم	تصنيفه	تواجُده	مادة التفاعل	أهميته	الأساس النظري لتقدير نشاطه
5- إنزيم الإنفرتيز(السكريز) Invertase	من إنزيمات التحليل المائي	يُفرَز في الأمعاء الدقيقة, ويتواجد في الخميرة , وقصب وبنجر السكر.	السكروز	له القدرة على تحليل السكروز إلى جلوكوز وفركتوز.	يتم تقدير نشاط إنزيم الإنفرتيز من خلال الكشف عن نواتج تحلل السكروز وهي عبارة عن سكرات مختزلة, وذلك باختبار اختزالي مثل اختبار بندكت.

تحليل الفيتامينات

يوجد العديد من الطرق المستخدمة لتقدير الفيتامينات, إما طرق حجمية أو لونية أو كروماتوجرافية, ولكل فيتامين طريقة خاصة لتقديره, وسنُعنَى في هذا الجزء بتقدير حمض الأسكوربيك (فيتامين جـ) فقط, وبطريقة حجمية.

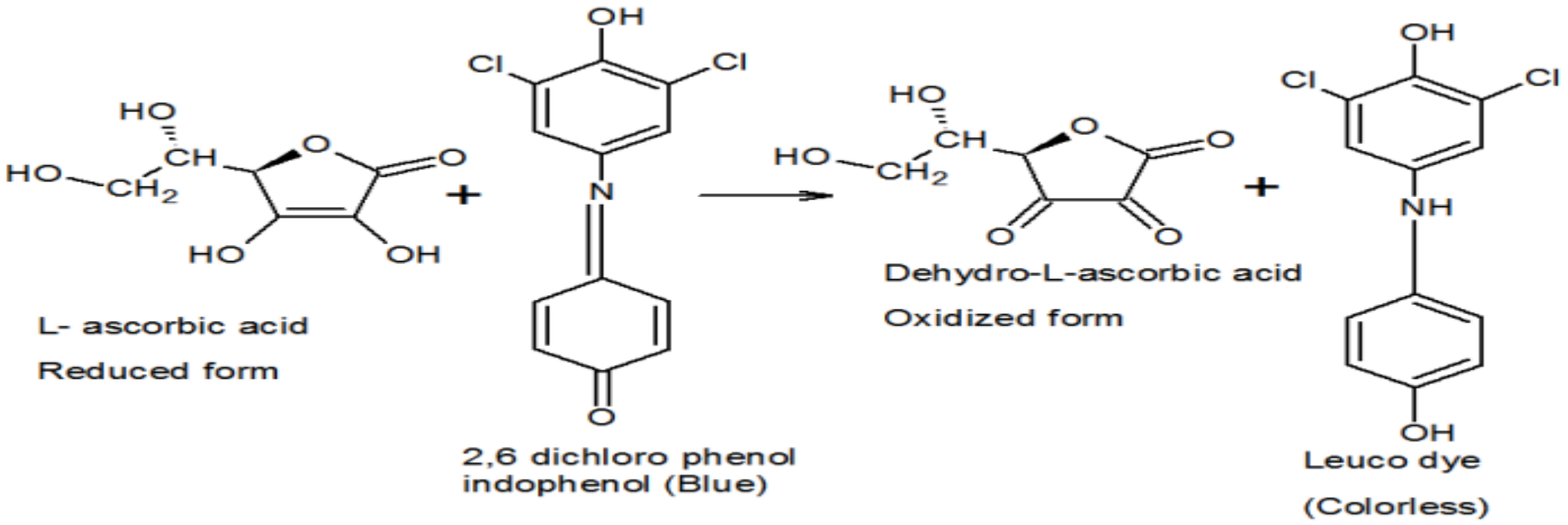
يُستخلص حمض الأسكوربيك من مصادره الطبيعية مثل الموالح والجوافة والطماطم والبقدونس, ويتم ذلك باستخدام مجموعة من الأحماض مثل حمض الفوسفوريك أو حمض الخليك أو حمض الأكساليك.

تقدير فيتامين C

أولًا طريقة المعايرة بصبغة 2,6 – ثنائي كلورو فينول – إندوفينول:

الأساس النظري:

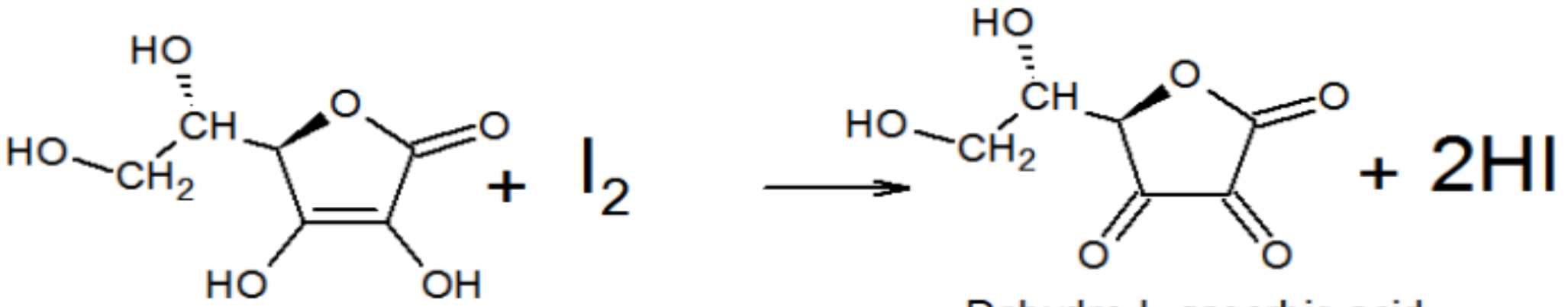
- فيتامين C عامل مختزل, يتأكسد بفعل صبغة 2,6 – ثنائي كلورو فينول – إندوفينول الزرقاء, فيتحول الفيتامين من الصورة المختزلة إلى الصورة المؤكسَدَة وتُختَزَل الصبغة (زرقاء) إلى الصورة المؤكسَدَة (عديمة) .



ثانيًا طريقة المعايرة باستخدام اليود: (عملي)

الأساس النظري:

- يحدث تفاعل بين حمض الأسكوربيك كعامل مختزل, وبين اليود كعامل مؤكسد, نتيجة هذا التفاعل هو تحوُّل الأسكوربيك إلى الصورة المؤكسَدَة, وتحوُّل اليود إلى اليوديد (يوديد الهيدروجين).
- تتم هذه المعايرة في وجود دليل النشا, حيث تتم المعايرة من اللون العديم إلى الأزرق.



L- ascorbic acid

Reduced form

Dehydro-L-ascorbic acid

Oxidized form

الحسابات:

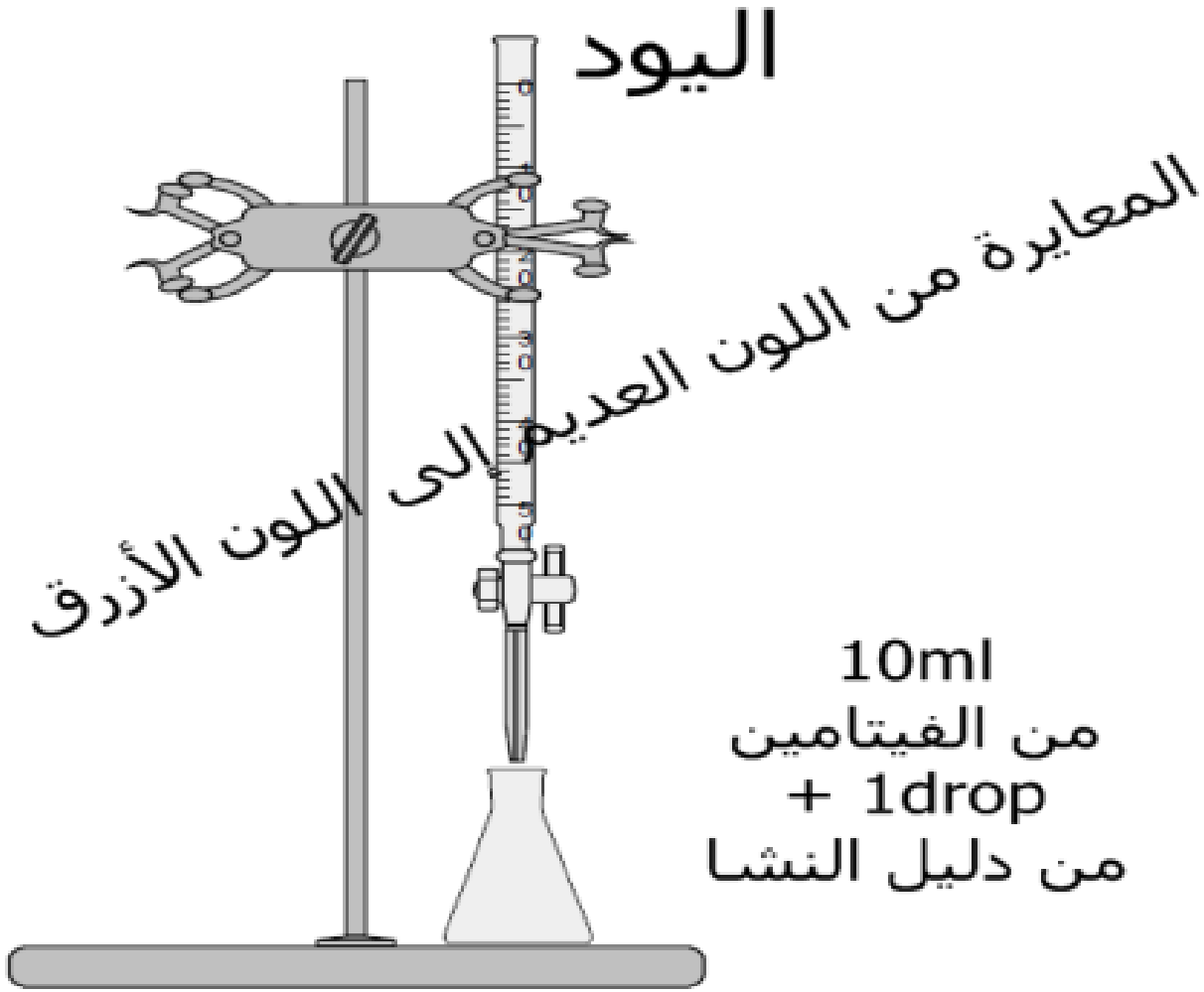
عدد جرامات حمض الأسكوربيك / 10 مل =

$$\frac{\text{ح } X \text{ ع } X \text{ م}}{1000}$$

حيث ح قراءة السحاحة

ع عيارية اليود

م الوزن المكافئ لفيتامين C وهي 88




Thank you!