---- مجلة علوم الرافدين، المجلد 20، العدد 3، ص61-78، 2009----

دراسة الخواص الثرموداينميكية لترابط الحامض الاميني السستين مع الألبومين باستخدام فولتا متري الموجة المربعة

سعد الله توفيق سليمان **زهراء عادل بدر**

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 26/ 10 / 2008 ؛ تاريخ القبول 16/ 3/ 2009)

الملخص

يتضمن أبحث دراسة الخواص الفولتا مترية للحامض الاميني السستين (L-cysteine) باستخدام فولتاموغرام الموجة المربعة (SWV) في ألمحلول الفوسفاتي المنظم عند الرقم الهيدروجيني (pH = 7). اعطى الحامض الاميني موجة اختزال عند الجهد (0.546-) فولت ضد القطب المرجع[Ag/AgCl,sat.KCl] وكانت العلاقة خطية بين تيار الانتشار والتركيز لمدى يتراوح بين [(3.98×10^{-7}) - (2×10^{-6})] مولاري وبمعامل ارتباط (0.9974) ولوحظ عند التراكيز العالية (اكبر من (3×10^{-6})) مولاري حصول انشطار موجة الاختزال وظهور موجة جديدة عند جهد (0.46-) فولت والتي تعود إلى تجمع جزيئيتين من الحامض الاميني السستين (L-cystiene) مكونة الحامض الاميني السستاين (L-cystine).

كما تم دراسة ترابط الألبومين مع الحامض الاميني السستين وذلك من متابعة الانخفاض الناتج من تيار الانتشار بسبب الترابط بينهما ومنها تم الحصول على قيم ثابت الترابط (K) بدرجات حرارية مختلفة وبتطبيق معادلة فانت هوف تم الحصول على القيم الثرموداينميكية ($\Delta H, \Delta S, \Delta G$) وقد تم استنتاج بأن عملية الترابط هي من نوع ايون- ايون (Ion-Ion) .

The Volta metric and Thermodynamic Behavior of Cysteine and its Interaction with Albumin

Sa'adalla T. Sulaiman **Zhraa A. Bader**

Department o f Chemistry
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The work involves the quantitative determination of (L – cysteine) using (SWV). L – cysteine gives a well- defined reduction peak at (-0.546) volts against[(Ag/AgCl,sat. KCl)] using phosphate buffer solution (pH = 7).The relationship between the diffusion current and concentration over the range [2×10^{-6}(M) – 3.98×10^{-7}(M)] is linear with a correlation coefficient of (0.9974). At higher concentrations above [3×10^{-6}] molar, the reduction peak of the (L – cysteine)divided into two peaks where the original one belongs to (L – cysteine) at (-0.52 volt) and a small peak at (-0.46 volt) which may be belong to the formation of (L – cystine) amino acid.

The interaction of Albumin-Amino acid (L-cysteine) was also carried out and It was found that the reduction peak of the amino acid decreases with increasing addition amount of Albumin. The binding constant (K) is calculated at different temperatures. Vant Hoff relation was applied to obtain the thermodynamics parameters (**ΔH, ΔS,ΔG**). The interaction seems to be of the (ion-ion) type.

المقدمة

السستين Cysteine

ويرمز له (Cys) وهو احد الاحماض الامينية العشرين والموجودة في بروتينات الحيوانات الراقيـة والتي تكون من نوع (L) (النجفي، طلال 1987) والسستين مع مجاميع السلفا يمثلان الوحدة الاساسية التي تساهم في الخصائص الوظيفية والتركيبية للبروتين ولهما اهمية كعوامل محفزة في كثيـر مـن الانزيمـات والعوامل المساعدة والبروتينـات المنظمـة (Wen *et al*., 2004; Alfafara *et al*., 1992) كمـا يعتبـر السستين مادة مضادة للتسمم داخل الخليـة (Mendoza- *et al*., 2005 ; Aranda and del Olmo, 2004) ومن الممكن عزل السستين ناتجاً عن هدرجة بعض البروتينات ونتيجة لوجود (S) من الممكن ان ترتبط جزيئتان منه ويتحول الى السستاين مكوناً جسور الكبريت التي تعطي استقرارية عالية للبروتين مـن خلال استقرارية الشكل الثلاثي للبروتين (Zapardid A. *et al*., 1995) والسستين من الاحمـاض الامينيـة المهمـة في حياتنـا بوصفـه المكـون الرئيسـي للبروتيـن والمولـد للشـعر وكرايتيـن الجلـد

(Apps. D. K., *et al.*, 1994). لـوحظ ان الالبـومين هـو الحامـل الاول للاواصـر الكبريتيـة (Homocysteine) إذ إن ترابط (Cys) مع (Homocysteine) سوف يؤدي الى تغير في الـشكل الطبيعـي للبروتين وكذلك تغير وظيفته (Alana, K. Majors *et al.*, 2002) ولقد أشارت الدراسات الحديثة بـأن استهلاك السلفا يودي ال التخليق الحيوي للسستين وتكون العملية منظمة جدا اذ تزداد خلال احتيـاج الخليـة للحامض الاميني الكلوتاثايون وخاصة عند تعرضه الى الفلزات الثقيلة والمواد السامة في الخمائر والنباتات (Mendoza-Cozatl. *et al*., 2005; Aranda and del Olmo 2004) وبالرغم من الفائدة الكبيرة للسستين في العمليات الايضية وازالة التسمم وفي خالات الاجهاد ولكن اذا زاد عن الحد الطبيعي داخل الخلية يـسبب لها تسمم (Kumar *et al*., 2006).

وتوجد طرق عديدة لتقدير ألسستين ومنها:-

استخدام تقنية الطور العكوس السائل كروماتوغرافي ذي الاداء العالي (HPLC) لقيـاس وتحديـد معـدل الهوموسستين و حامض السستين في مصل دم مرضى القلب المصابين بالذبحة الصدرية والمصابين باحتشاء عضلة القلب والمصابين بارتفاع ضغط الدم(Kumar *et al*., 2002). استخدمت تقنية فولتامتري الانتزاع الكاثودي (Cathodic stripping rot.) لتقدير السستين في ماء البحر بوجود ايونات النحاس (II) في وسـط دالته الحامضية (8.5) وذلك باستخدام الموجة الكاثودية عند جهد (0.55-) فولـت (Van *et al*., 1988 den Berg) ولقد امكن تقدير كميات مايكروغرامية من السستين في المستحضرات الصيدلانية باستخدام تقنية التحليل بالحقن الجرياني بالاعتماد على تكوين معقد ينتج من تفاعل الكوبلت (II) مع السستين ويقـاس عنـد (360) نانوميتر (Icardo *et al*., 1998).وتم تقدير الـ (Cys) طيفياً بعد اكسدته بواسطة ايون الحديد (III) بوجود الفيروزين (Ferrozine) اذ يتكون معقد ملون له اقصى امتصاص عند (562) نانوميتر ولقـد امكـن تقدير كميات ضئيلة تتراوح ما بين (0.02 و 6) جزء بالمليون من الـ (Cys) وطبقـت الطريقـة لتقـدير (Cys) في المستحضرات الطبية (Eid .M. A ., 1998) كما تـم تقـدير الحامـضين ألامينـين الـسستين (cysteine) والسستاين (cystine) في الصوديوم كازنيت (Sodium Caseinate) بولاروكرافيـاً بواسـطة قطب الزئبق المتقاطر (DME) وكذلك تم تقديرالحامض الاميني السستين(cysteine) بتقنيتي الحقن الجرياني والفولتامتري باستخدام قطب الكاربون الزجاجي بوجـود ايـون النحـاس الثنـائي (Copper II) (2002 Zekerya Dursun,) كما قام بعض العلماء بدراسات فولتامترية ومجها دية للحـامض الامينـي الـسستين (cysteine) باستخدام قطب الكاربون المحور إلى ثنائي كوبلت فثالوسيانين (Cobalt (II) phthalocyanine) (Khaloo *et al*., 2002) كما تم تقدير ألحامض الاميني السستين (L-cysteine) فولتامتريآ بواسطة قطـب الماس الموصل (Nicolae Spataru *et al*., 2001).

ويتضمن هذا البحث دراسة الخواص الفولتامتريـة للحـامض الامينـي السـستين (L-cysteine) استخدام فولتاموكرام الموجة المربعة (SWV) وتطبيق الطريقة لتقدير كميات قليلة جداً من ألحامض الاميني السستين (L-cysteine) فضلآ عن دراسة ترابطه مع الالبومين.

الجزء العملي

1- المواد الكيميائية المستخدمة

إن جميع المواد المستخدمة على درجة عالية من النقاوة وهي مجهزة من شركة (Fluka) السويسرية

1- Bovine Albumin الألبومين البقري

تم تحضير [1×10^{-5}] مولاري من الالبومين وذلك بوزن (0.0066) غم مـن الالبـومين البقـري وإذابته بالماء المقطر وإكمال الحجم إلى (10) مل في قنينة حجمية سعتها (10) مل ويتم تحضيره يومياً .

2 - Cysteine الحامض الاميني السستين

تم تحضير [10^{-3}] مولاري من السستين وذلك بوزن (0.0121) غم من السستين وإذابته في المـاء المقطر ثم إكمال الحجم إلى (100) مل وذلك باستخدام قنينة حجمية سعتها (100) مل .

3- Phosphate buffer (ph = 7)

المحلول المنظم :

تم تحضيره بمزج (30.5) مل من محلول (K_2HPO_4) ذي تركيز [0.2] مولاري مع (19.5) مـل مـن محلول (KH_2PO_4) ذي تركيز [0.2] مولاري ثم أكمل الحجم إلى (100) (D. D. Perrinc, 1974) .

2- الأجهزة المستخدمة

تمت القياسات باستخدام جهاز التحليل

EG&G PARC Model 384B Polarographic Analyser equipped with unit SMDE 303A and diyital plotter DMPO4-44.

3- طريقة ألعمل

طريقة القياس تتم بإتباع تقنية (SWV) في الجهاز وكالآتي :-

1- إضافة (5) ملليلتر من محلول (0.2) مولاري من محلول فوسفات منظم كالكتروليت مساعد عنـد رقـم هيدروجيني (pH =7) في خلية القياس.

2- إمرار غاز النتروجين لمدة (240) ثانية في المحلول الفوسفاتي .

3- يتم تسليط الجهد المناسب ثم ترسم النتيجة التي تمثل الفولتاموكرام للمرجع (blank).

4- يتم اضافة كميات متعاقبة من محلول الحامض الاميني (L-cysteine) بتركيز [10^{-4}] مولاري الى خلية القياس . تمت القياسات ألاولية باستخدام الظروف الاولية المثبتة في الجهاز والموضحة في ألجدول (1)

الجدول 1: يوضح الظروف الأولية لقياس الحامض الاميني (L-cysteine).

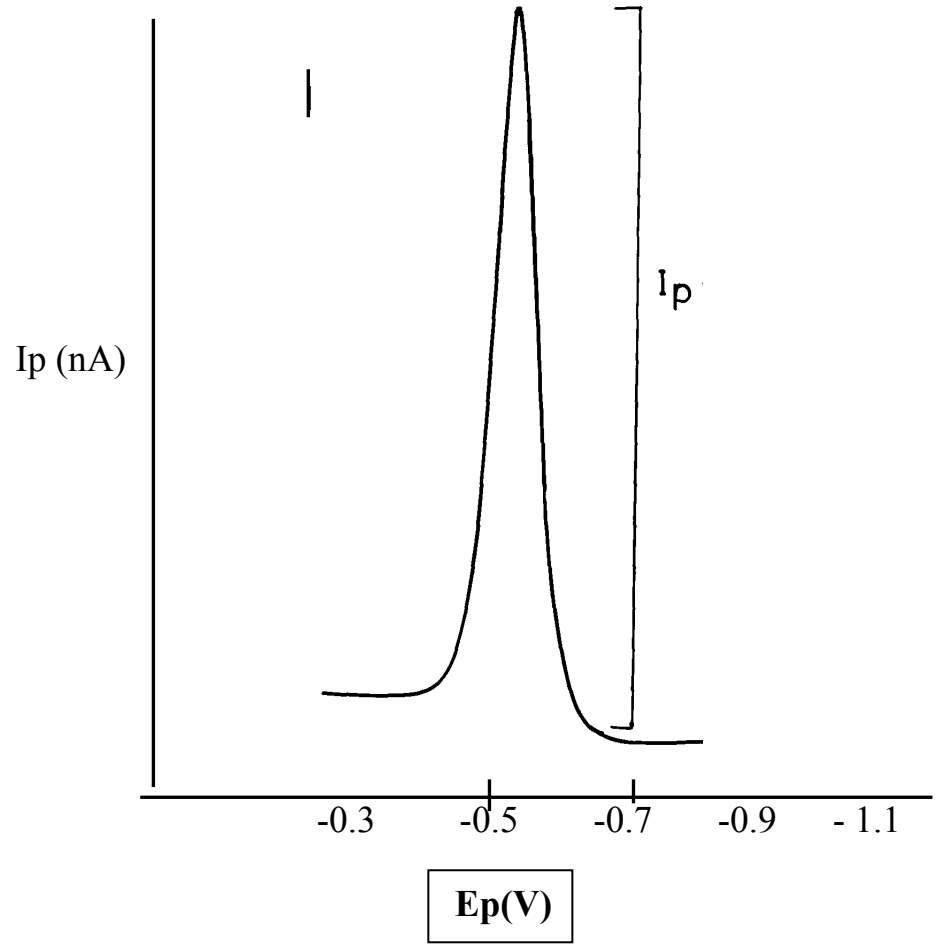
Optimum Condition	Values
Deposition Time	(30)sec
Conditioning Time	(0)sec
Equilibration Time	(5)sec
Scan Increment	(2)mV
Frequency	(100)Hz
Pulse height	(0.02) mV

4- تقدير الترابط بين الحامض الاميني(L-cysteine) والألبومين عند درجات حرارية مختلفة باستخدام تقنية(SWV)

تم تسجيل فولتاموغرام الموجة المربعة **(SWV)** لمحلول [10^{-4}]مولاري من الحامض الاميني (L-cysteine) عند الرقم الهيدروجيني (pH=7) وبعد ذلك تضاف كميات متعاقبة من الالبومين بتركيز [10^{-5}]مولاري، وقد تم تتبع الانخفاض في تيار الانتشار (Ip) للسستين بوجود الألبومين و($Ip_{\circ}$) يمثل تيار الانتشار الحامض الاميني(L-cysteine) لوحده قبل إضافة الألبومين وبرسم العلاقة ($Ip/Ip_{\circ}$) ضد تركيز ألالبومين المضاف لحساب ثابت الترابط (K) وتعاد نفس التجربة في درجات حرارية مختلفة (293,303,310,315) ومنها تم رسم العلاقة بين لوغارتم ثابت الارتباط (Log K) ضد مقلوب درجة الحرارة المطلقة لغرض حساب القيم الثرموداينميكية (ΔH , ΔG , ΔS) .

ألنتائج والمناقشة

سجل فولتاموغرام الموجة المربعة للحامض الاميني (L-cysteine) بتركيز [9.9×10^{-7}] مولاري في المحلول الفوسفاتي المنظم ذي الرقم الهيدوجيني pH=7 باستخدام الظروف المثلى للقياس ويلاحظ فولتاموغرام الموجة المربعة في الشكل (1) اذا يظهر موجة اختزال عند جهد (0.546-) فولت .



شكل1 : فولتاموغرام الموجة المربعة للحامض الاميني(L-cysteine) بتركيز[9.9×10^{-7}] مولاري في المحلول الفوسفاتي عند رقم هيدروجيني (pH=7).

تحديد الظروف المثلى لقياس فولتاموغرام الموجة المربعة للحامض الاميني (L-cysteine)

سجلت فولتاموغرامات الموجة المربعة (SWV) لمحلول تركيزه [9.9×10^{-7}] مولاري من الحامض الاميني (L-cysteine) في (5) ملليليترمن المحلول الفوسفاتي المنظم ذي الرقم الهيدرجيني (pH=7) بوصفه الكتروليتا مساعدا بتغييرالظروف الاولية والمثبة في الجهاز كلآ على إنفراد والموضحة في الجدول (2) وعند جهد ابتدائي (0.3-) فولت وجهد نهائي(0.65-) فولت.

الجدول 2 : يوضح جميع الظروف التي تم قياسها للحامض الاميني (L-cysteine)

Optimum Condition

D.T (Sec)		Cond. Time (Sec)		Equili. Time (Sec)		Freq (Hz)		Scan Increment (mV)		Pulse height(mV)	
Val.	Ip(nA)	Val.	Ip(nA)	Val.	Ip (nA)	Val.	Ip(nA)	Val.	Ip (nA)	Val.	Ip(nA)
30	111	0	270.9	0	289.3	100	319.6	1	397.6	0.02	401
40	56.1	5	285.5	5	289	110	347.3	2	382.9	0.04	872
50	115.6	10	289	10	319.6	120	382.9	3	تشوه ألموجة		
60	175.5										
90	230.8										
110	270.9										

وقد تم اختيار الظروف المثلى بناءا على اختيار إما اعلى قيمة للتيار أو افضل شكل للفولتاموكرام والجدول (3) يوضح الظروف المثلى لقياس الحامض الاميني (L-cysteine) والتي تم الاعتماد عليها في القياسات اللاحقة:-

الجدول 3 : يوضح الظروف المثلى لقياس الحامض الاميني (L-cysteine).

Optimum Condition	Values
Deposition Time	(110)sec
Conditioning Time	(10)sec
Equilibration Time	(10)sec
Scan Increment:	(1)mV
Freq	(120)Hz
Pulse height	(0.02) mV

تأثير الرقم الهيدروجيني **pH Effect**

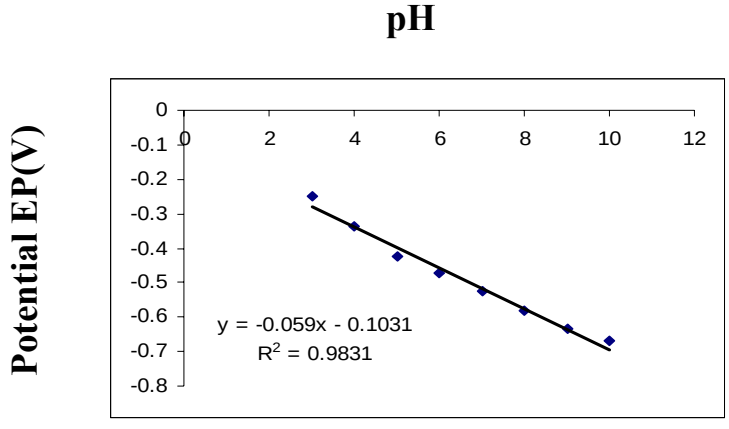
درس تأثير الرقم الهيدروجيني على جهد الاختزال (Ep) وتيار الانتشار (Ip) لموجة اختزال الحامض الاميني (L-cysteine) باستخدام تقنية (SWV) حيث سجل فولتاموغرام الموجة المربعة لمحلول تركيزه [1.19×10^{-6}] مولاري في (5) مليليتر من محلول فوسفاتي منظم لمدى من الرقم الهيدروجيني من (3 - 10) وقد تم القياس وذلك باستخدام الظروف المثلى له والمثبتة في الجدول (3) والنتائج المستحصلة موضحة في الجدول (4) الآتي :

الجدول 4: يوضح تأثير الرقم الهيدروجيني في جهد الاختزال(Ep) وتيار الانتشار(Ip) لمحلول يحتوي على [1.16×10^{-6}] مولاري من الحامض الاميني (L-cysteine).

pH	Ep(V)	Ip(nA)
3	-0.25	364
4	-0.336	67
5	-0.426	1346
6	-0.47	783
7	-0.526	654
8	-0.58	915
9	-0.636	805
10	-0.67	689
R=-0.9915		

يلاحظ من الجدول (4) وكما متوقع زيادة في جهد الاختزال بالقيمة السالبة كلما زادت الدالة الحامضية (pH) وعند رسم العلاقة ما بين الرقم الهيدروجيني(pH) وجهد الاختزال(Ep) كما في ألشكل (2) وقد تم الحصول على خط مستقيم وقيمة الميل ($0.059\ V\ pH^{-1}$) وهي مطابقة كلياً للقيمة النظرية المحسوبة من قبل العالم هامت (Hammett) تساوي ($0.059\ V\ pH^{-1}$) (Hammett,1940) وان قيمة معامل الارتباط تساوي (-0.9915)

ومن ناحية أخرى لوحظ تغير كبير لتيار الانتشار مع الرقم الهيدروجيني وإن أعلى قيمة لتيار الانتشار عند الدالة الحامضية (pH=5) وقد تم اختيارها أثناء الدراسة إضافة الى اختيار الدالة الحامضية عند (pH=7) كونها قريبة جدا من الدالة الحامضية لمصل الدم البشري. وكذلك لدراسة الترابط بين الحامض الاميني (L-cysteine) و الالبومين البقري.



الشكل 2: يوضح العلاقة بين جهد الاختزال (Ep) والرقم الهيدروجيني (pH) للحامض الاميني (L-cysteine) لمحلول تركيزه [1.19×10^{-6}] مولاري.

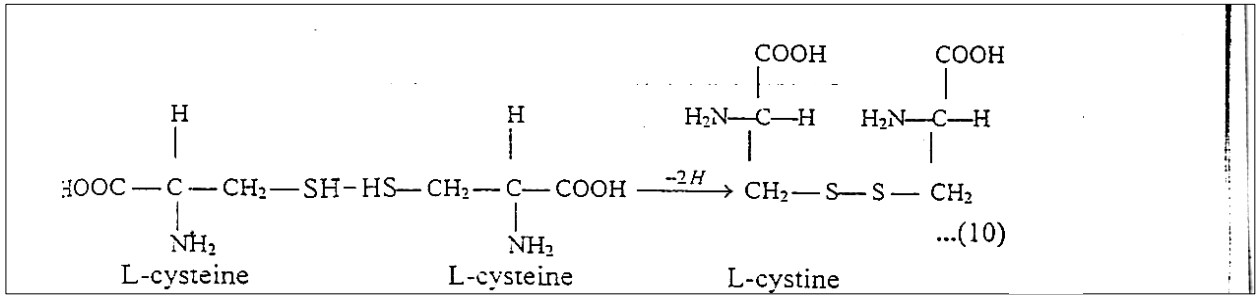
تأثير تركيز على تيار الانتشار الحامض الاميني (L-cysteine) عند الرقم الهيدروجيني (pH=7)

سجل فولتاموغرام الموجة المربعه لمحلول يحتوي على تراكيز معينة من الحامض الاميني(L-cysteine) حيث تم إجراء القياسات لهذا الحامض بإضافة كميات متعاقبة من المحلول يحتوي على[10^{-4}] مولاري من الحامض (20-160) مايكروليتر للحصول على تراكيز تتراوح ما بـين [$3.98x10^{-7}$ -$3.10x10^{-6}$] مـ ولاري باستخدام الظروف المثلى والمثبتة في الجدول (3) بعد تثبيت الجهد الابتدائي (0) فولت والجهد النهائي عند (-0.75) فولت. والنتائج التي تم الحصول عليها موضحة في الجدول (5).

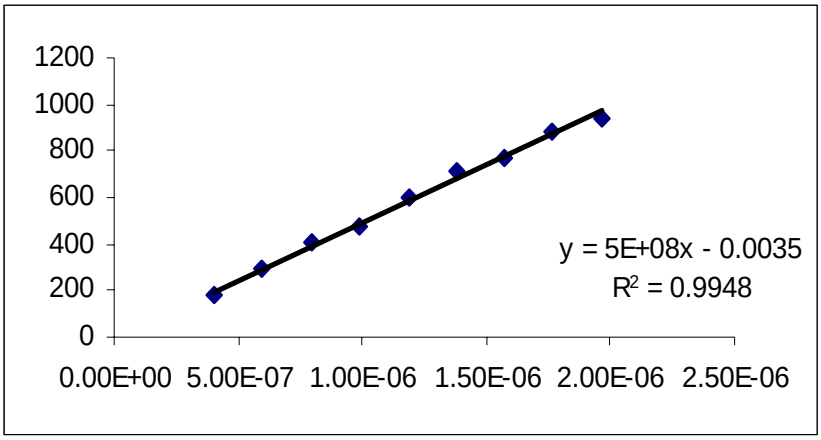
الجدول 5: يوضح المنحني القياسي لمحلول يحتوي على [10^{-4}] مولاري بتراكيز تتراوح مابين [$3.10x10^{-6}$ - $3.98x10^{-7}$] مولاري من الحامض الاميني (L-cysteine) عند (pH=7) .

موجة السستين			موجة السستاين	
Conc.of cysteine	**Ep1 (V)**	**Ip1 (nA)**	**Ep2 (V)**	**Ip2 (nA)**
3.98×10^{-7}	-0.5	244.82		
5.96×10^{-7}	-0.502	339.42		
7.94×10^{-7}	-0.506	452.22		
9.90×10^{-7}	-0.51	521.42		
1.19×10^{-6}	-0.512	647.82		
1.38×10^{-6}	-0.516	761.82		
1.57×10^{-6}	-0.516	820.82		
1.77×10^{-6}	-0.518	929.82		
1.96×10^{-6}	-0.518	987.82		
2.34×10^{-6}	-0.52	235	-0.46	52.9
2.72×10^{-6}	-0.522	229	-0.456	116
3.10×10^{-6}	-0.52	90.8	-0.45	510
R= 0.9974				

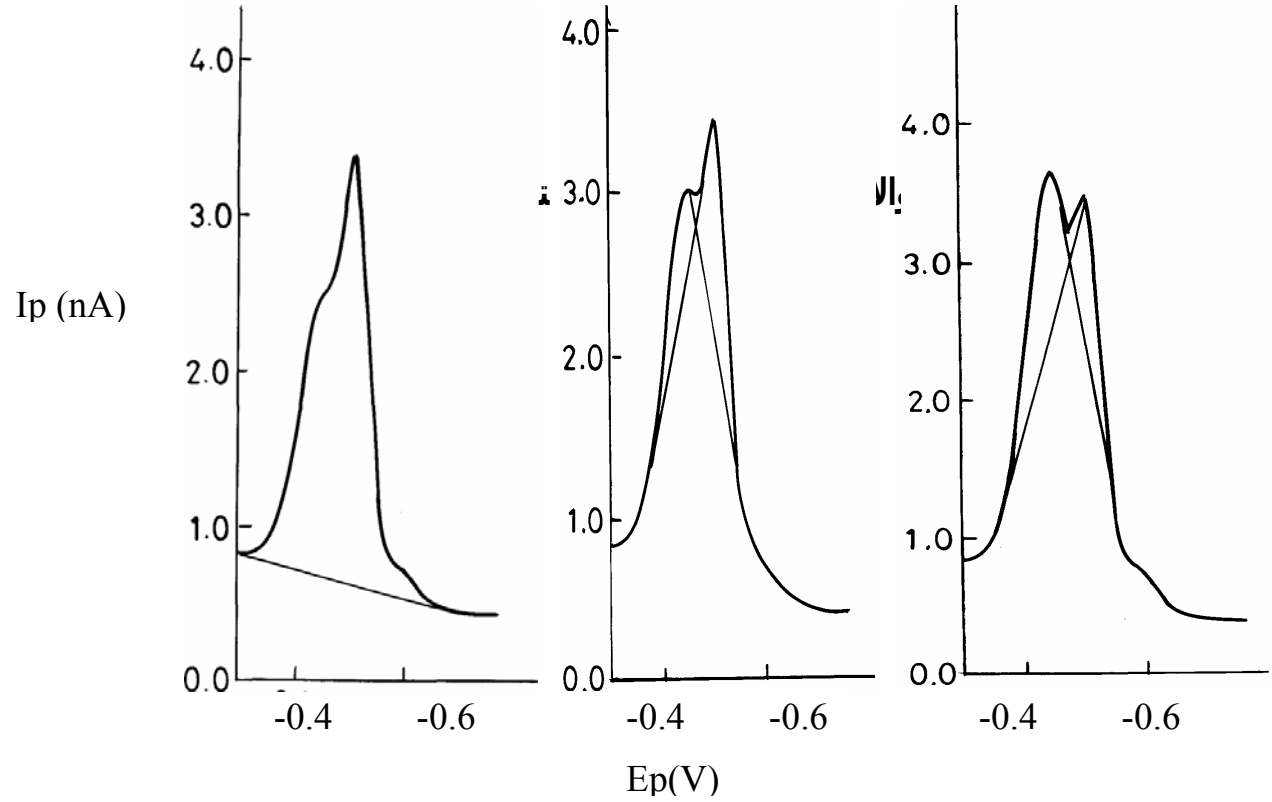
ومن الجدول (5) ومن الشكل (4) لوحـظ حصول انشطار في فولتاموغرام الحامـض الاميـنـي (L-cysteine) وهذه الحالة بدأت عند وصول تركيز الحامض الاميـنـي (L-cysteine) الـى [$2.34x10^{-6}$] مولاري حيث لوحظ انخفاض كبير في تيار الانتشار لموجة الحامض الاميني (L-cysteine) وهذا الانخفاض يزداد بازدياد تركيز السستين. وفي نفس الوقت ظهور موجة جديدة عند جهد (-0.46) فولت والتي تعود الى الحامض الاميني(L-cystine)حيث ان تجمع جزيئتين من الحامض الاميني (L-cysteine) يؤدي الى تكـوين الحامض الاميني (L-cystine) .



وعند رسم العلاقة ما بين تيار الانتشار والتركيز للمدى من [3.98×10^{-7} _ 1.96×10^{-6}] تم الحـصول على خط مستقيم وبمعامل ارتباط (0.9977) وكما هو موضح في الشكل (3) .



الشكل 3: يمثل المنحني القياسي لمحلول يحتوي على تراكيز تتراوح ما بين [3.98×10^{-7} - 1.96×10^{-6} مولاري من الحامض الاميني (L-cysteine) عند (pH=7).]



الشكل 4(C,B,A) : يوضح خطوات الانشطار للفولتاموغرام وتحول الحامض الاميني L-cysteine الى L-cystine

استقرارية الحامض الاميني "L-cysteine "

- تأثير الزمن

لمعرفة مدى استقرارية موجة اختزال الحامض الاميني (L-cysteine) فقد سجل فولتاموغرام الموجة المربعة لمحلول يحتوي على [9.9×10^{-7}] مولاري من الحامض الاميني (L-cysteine) في محلول الفوسفات المنظم عند (pH=7) وقد تم القياس في فترات زمنية متعاقبة وفي خلية واحدة والنتائج التي تم الحصول عليها موضحة في الجدول (5).

الجدول 5: يوضح مدى تأثير الزمن على محلول يحتوي على [9.9×10^{-7}] مولاري من الحامض الاميني (L-cysteine).

Time (Sec)	Ip(nA)
0	302
5	303.4
10	312
15	305.8
20	294
25	279.8
30	298.1
40	287.6
50	284
60	284.9

من الجدول (5) تم ملاحظة ان تغير قيمة تيار الانتشار بفروق قليلة نسبياً هذا يعني استقرار الحامض الاميني(L-cysteine) ويمكن تقديره بفترة إجراء التجربة.

2- دقة الطريقة **Accuracy of Method**

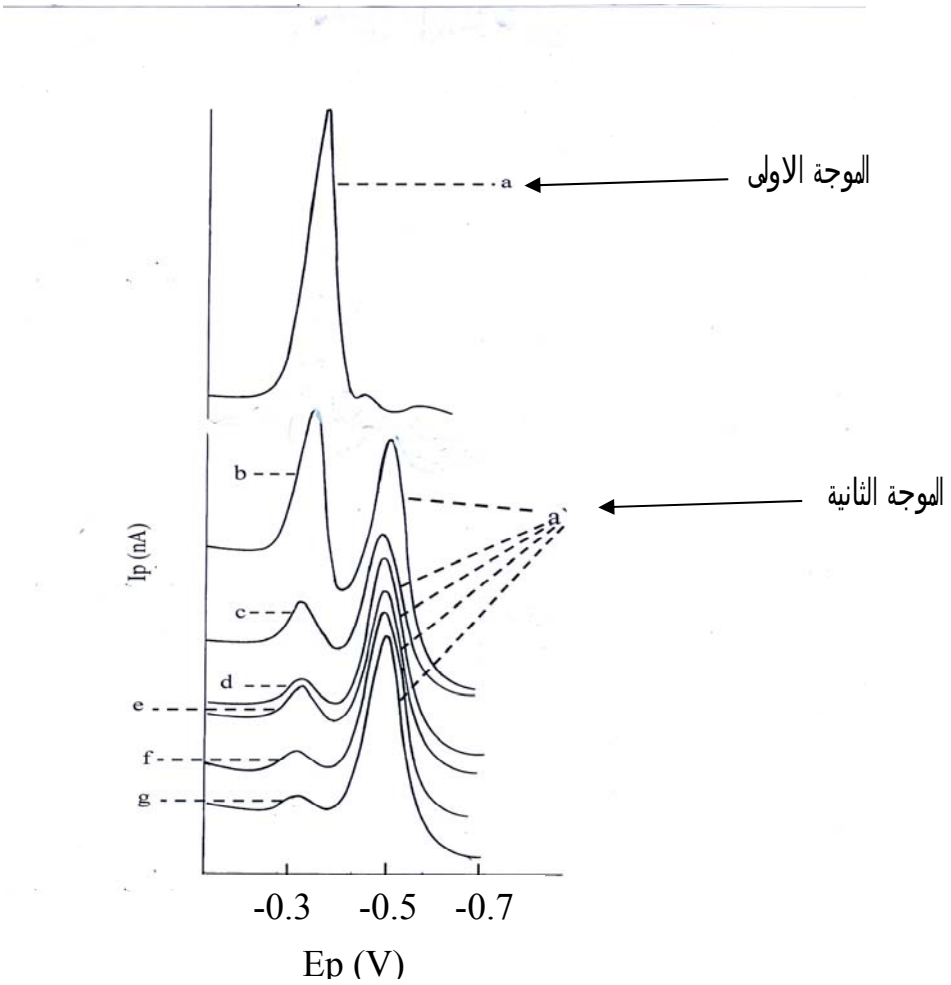
لمعرفة مدى دقة طريقة تقدير الحامض الاميني (L-cysteine) فقد سجل (SWV) من خلال استخدام خلية واحدة واعادة القياس عدة مرات حيث تحتوي الخلية على[9.9×10^{-7}] مولاري من الحامض الاميني (L-cysteine) في (5) ملييلتر في المحلول الفوسفاتي المنظم عند (pH=7) حيث تم الحصول على عدة تيارات وبفترات زمنية مختلفة ومنها تم حساب قيمة كل من (S. D) و(R. S. D). والتي تساوي(S.D=±7.364) و(R. S. D=±0.02%).

دراسة عملية الترابط بين الحامض الاميني (L-cysteine) مع الألبومين

سجل فولتاموغرام الموجة المربعة لمحلول الحامض الاميني (L-cysteine) بتركيز[5.84×10^{-6}] مولاري باضافة كميات متعاقبة من الألبومين في المحلول الفوسفاتي المنظم عند (pH=7) بعد ان تم تثبيت الظروف المثلى للقياس وهي افضل الظروف لدراسة الترابط بين الألبومين و الحامض الاميني (L-cysteine) ونلاحظ من النتائج التي تم الحصول عليها في الجدول (6) والتي توضح الانخفاض الناتج في

تيار الانتشار (Ip_2) لموجة السستين عند جهد (0.52-) فولت مع إضافة الالبومين وظهور موجة جديدة للالبومين عند جهد (0.65) فولت وعند رسم العلاقة بين($Ip_2/Ip°$) مقابل تركيز الالبومين تم الحصول على المنحني الموضح في الشكل(7) مع العلم بان ($Ip°$) تعود الى موجة السستين بدون الالبـومين ومنهـا تـم الحصول على ثابت الترابط (K) (Elsevier Sequoia, S.A.; J.S of Electroanl, 1986)

والـشكل 5 يوضـح كيفيـة حـصول الانخفـاض فـي موجـة الحـامض الامينـي (L-cysteine) نتيجة الإضافات المتتالية للالبومين والتـي تتـراوح مـا بـين [$3.77 \times 10^{-5} - 3.91 \times 10^{-6}$] مولاري ويمكن توضيح التداخل الحاصل كما في الشكل (5).



الشكل 5: يوضح كيفية حصول الانخفاض في موجة الحامض الاميني (L-cysteine) نتيجـة الاضـافات المتتالية للالبومين والتي تتراوح ما بين [$3.77 \times 10^{-5} - 3.91 \times 10^{-6}$] مولاري حيث ان الموجـة الاولى تمثل موجة الحامض الاميني (L-cysteine) لوحده بدون الالبومين وان الموجات (b-c-d-e-f-g) تمثـل موجـة الحـامض الامينـي(L-cysteine) بوجـود الالبـومين باضـافة (10,20,30,40,50,60,70) مليليترعلى التوالي والموجة الثانية تعود الى الالبومين.

تأثير درجة الحرارة على عملية ترابط الألبومين مع الحامض الاميني (L-cysteine)

سجـل فولتاموغرام الموجة المربعة لمحلول الحامض الاميني (L-cysteine) بتركيـز [5.84×10^{-6} مولاري في المحلول الفوسفاتي المنظم عند (pH=7) بعد تثبيت كافة الظروف المثلـى وتثبيـت الجهـد الابتدائي (0.3-) فولت والجهد النهائي عند (0.8-) فولت وفي درجات حرارة مختلفة (293,303,310,315) مطلقة وفي كل من هذه الدرجات الحرارية تم متابعة فولتامـوغـرامات المـوجـة المربعـة للحـامض الاميني(L-cysteine) بعد اضافات متعاقبة من الألبومين وتم متابعة قيم تيار الانتشار (Ip°) للحامض الاميني (L-cysteine) لوحده وكذلك (Ip_2) للحامض الاميني (L-cysteine) بوجود الألبومين ونلاحظ من النتـائج التي تم الحصول عليها مايلي:-

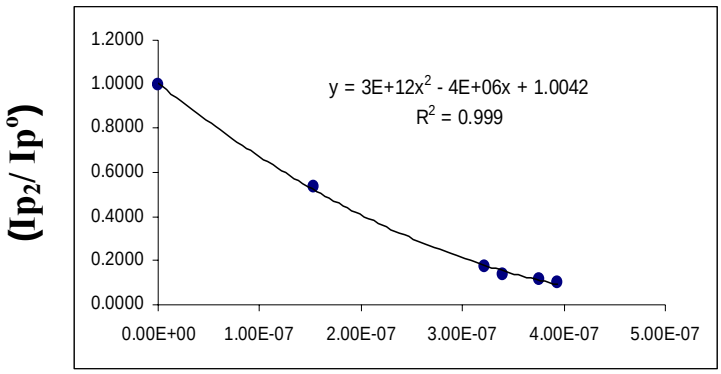
1- ان قيم تيار الانتشار (Ip°) لموجة الحامض الاميني (L-cysteine) لوحده تزداد بازدياد درجة الحرارة وكما هو متوقع حيث ان سرعة الانتشار تزداد تودي الى زيادة سرعة الاختزال .

2- ان تيار الانتشار (Ip_2) لموجة الحامض الاميني (L-cysteine) تنخفض باستمرار مع زيـادة تراكيـز الالبومين المضاف ولكافة الدرجات الحرارية وان نسبة الانخفاض تزداد بازدياد درجة الحرارة وهذا يعطـي دليلاً على ان عملية الترابط تتناسب طردياً مع درجة الحرارة وعند رسم العلاقة ما بـين (Ip_2 / Ip°) ضـد تركيز الألبومين المضاف باستخدام المعادلة من الدرجة الثانية تم الحصول على المنحنيات كما في الشكل (6) ومنها تم الحصول على قيم ثابت الارتباط (K) والتي تلاحظ في الجدول (7).

الجدول6: يوضح تأثير الاضافات المتتالية للألبومين بتراكيز تتراوح ما بين [$1.16\times10^{-7} - 3.40\times10^{-7}$] مولاري على الحامض الاميني (L-cysteine) بتركيز [2.34×10^{-6}] مولاري عند(303) مطلقة.

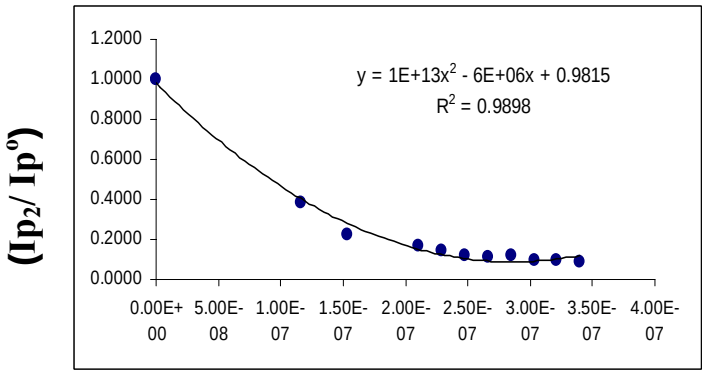
Conc.(M) of cysteine	**Ep(V)**	**Ip(nA)**	
5.84×10^{-6}	**-0.47**	**3.39×10^{2}**	
موجة Albumine		**موجة Cysteine**	
Conc.	Ip_1(nA)	Ip_2(nA)	Ip_2/ Ip^o
0	0	3.39×10^{2}	1.0000
1.16×10^{-7}	70.4	1.30×10^{2}	0.3826
1.54×10^{-7}	116.4	7.59×10^{1}	0.2239
2.10×10^{-7}	162	5.72×10^{1}	0.1687
2.29×10^{-7}	175	4.88×10^{1}	0.1440
2.48×10^{-7}	184.4	4.13×10^{1}	0.1218
2.66×10^{-7}	202.4	3.74×10^{1}	0.1103
2.85×10^{-7}	218.4	4.00×10^{1}	0.1180
3.03×10^{-7}	237.4	3.14×10^{1}	0.0926
3.21×10^{-7}	251.1	3.12×10^{1}	0.0920
3.40×10^{-7}	261.3	2.88×10^{1}	0.0850

وبهذه الطريقة تم دراسة الترابط مابين الحامض الاميني والالبومين عند درجات حراريـة مختلفـة وكمـا موضحة في الشكل6.



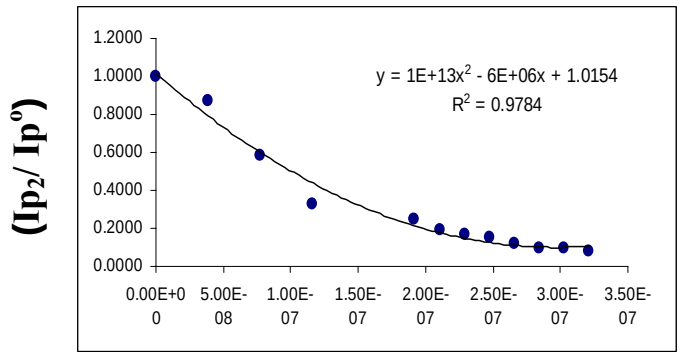
Conc (M)

at (293) K



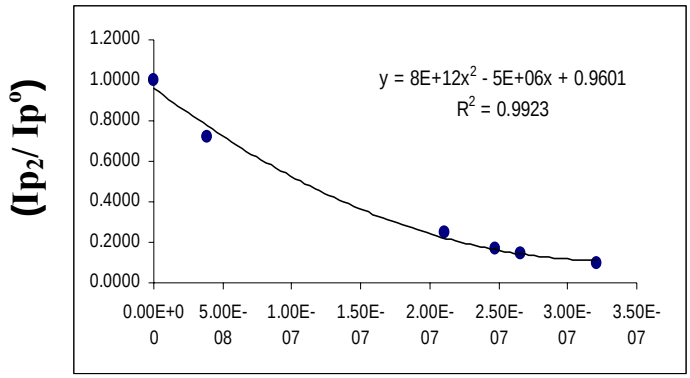
Conc (M)

at (303) K



Conc (M)

at (310) K



at (315)K

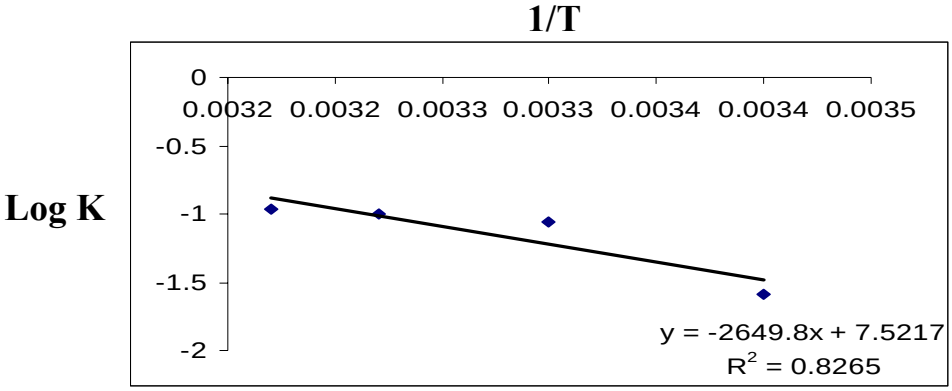
الشكل 6: يوضح العلاقة ما بين (Ip_2/ Ip^o) ضد التركيز نتيجة الإضـافات المتتاليـة للالبـومين بتراكيـز مختلفة على الحامض الاميني (L-cysteine) بتركيز [2.34×10^{-6}] مولاري باستخدام تقنية (SWV) عند درجات حرارية مختلفة.

حساب القيم الثرموداينميكية

نلاحظ من الجدول (7) ان قيم (K) ثابت الارتباط تزداد بزيادة درجة الحرارة و عند رسم العلاقة مابين (LogK) مع مقلوب درجة الحرارة المطلقة(1/T) حسب علاقة فانت هوف تم الحصول علـى خـط مستقيم كما في الشكل(7) ومن قيمة الميل تم الحصول على قيمة الانثالبي (ΔH) .

الجدول 7: يبين قيم ثابت الارتباط (K) الحامض الاميني(L-cysteine) مع الالبومين مـع مقلـوب درجـة الحرارة المطلقة الناتجة من تداخل الالبومين مع الحامض الاميني (L-cysteine) في المحلول الفوسفاتي المنظم عند (pH=7).

Temp. (K°)	**(1/T) (10^{-4})**	**L-cysteine**	
		K	Log K
298	34	0.026	-1.585
303	33	0.089	-1.0504
310	32.2	0.099	-1.0043
315	31.7	0.1098	-0.9593
Slop	-2649.77		
Intercept	7.5217		
R	-0.90914		



الشكل 7: يوضح العلاقة مابين (Log K) لتيار الحامض الاميني (L-cysteine) مع مقلوب درجة الحرارة المطلقة والناتج من تداخل الالبومين مع الحامض الاميني (L-cysteine) في المحلول الفوسفاتي المنظم عند (pH=7)

حيث ان :-

$\Delta H = -$ Slope * R * 2.303

حيث Rتمثل ثابت الغاز وتساوي قيمتها (8.314) جول . درجة$^{-1}$. مول .

والطاقة الحرة القياسية (ΔG) تم حسابها من المعادلة الموضحة ادناه :

$\Delta G = -2.303 * R * T * \text{Log } K$

حيث **T** تمثل درجة الحرارة

و **K** تمثل ثابت الارتباط

من علاقة جبس تم حساب قيم الانتروبي (ΔS) والموضحة كما يلي :

$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$

وتلاحظ القيم الثرموداينميكية التي تم الحصول عليها لترابط الحامض الاميني (L-cysteine) مع الالبومين مبينة في الجدول (8).

الجدول 8: يوضح القيم الثرمودايناميكية لتداخل الحامض الاميني (L-cysteine) مع الالبومين

315	5.785	0.1427	50.736
Temp. (K°)	**L-cysteine**		
	ΔG (KJ / mole)	**ΔS(KJ /mole . Sec)**	**ΔH(KJ/mole)**
293	8.892	0.1428	50.736
303	6.093	0.1473	50.736
310	5.961	0.1440	50.736

أن القيمة الموجبة لـ Δ H يعني التفاعل ماص للحرارة وفي هذه الحالة فان ارتفاع درجة الحرارة وكما هو متوقع يؤدي الى زيادة قيم ثابت الارتباط.

وان القيمة الموجبة لـ Δ S سببه زيادة العشوائية بسبب زيادة عدد الجزيئات في المحلول وهذا يسبب عمليـة "الارتباط بروابط عديدة ومختلفة في القوى الايونية" وذلك لاحتواء الالبومين على عدة مواقع للارتباط سواء من نوع فاندرفالز او ايون-ايون وهي اواصر غير تساهمية ضعيفة ، وخلال عملية الترابط فان الجزء الحر من الجزيئة يلعب دور كبير في تحرير حركة الجزيئة والتي تؤدي الى زيادة العشوائية وعليه فانΔ S موجبة والقيمة الموجبة ألواطئة نوعا ما ل(ΔG) فانها تدل على ان الترابط من نوع ايون- ايون (R.C.Bohinski, 1987).

المصادر العربية

قبع، رنا عبد الملك سليمان علي ، (1999). دراسة حركيات وميكانيكيات اكسدة بعض الاحماض الامينية باستخدام ايون البرمنكنات . رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل .

النجفي، طلال سعيد (1987). "الكيمياء الحياتية"، كلية العلوم، جامعة الموصل، قسم الكيميـاء، ص 70 – 73.

المصادر الأجنبية

Abid, F. M.; Adori, K. M.; Ahmed, E.; Khalab, H. I. ; Salomi, A. A. (2002). Determination of total homocystiene and cystine in patients with cardiovascular disease and normotensive by HPLC. *Natio. J. Chem.*, **6 , 305-321.**

Alana, K . Majors.; Shantanu, S.; Belinda, W.; Michael, T. K.; Reed, E. P.; Donald, W. J. (2002). Homocysteine bind to human plasma fibronectin and inhibits its interaction with fibrin. *American* , **22 , 1345.**

Alfafara, C. G.; Kanda, A. ; Shio, T.; Shimizu, H.; Shioya, S. (1992). Effect of amino acids on glutathione production by saccharomyces cerevisiae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36,538–540.**

Apps, D. K. ; Cohen C. M., (1994). " Biochemistry". 3 th edn. , W. B. Saund , U. K. , pp.165-167.

Aranda, A.; del Olmo, M. L. (2004). Exposure of saccharomyces cerevisiae to, acetaldehyde induces sulfur amino acid metabolism and polyamine transporter genes, which depend on met4p and haa1p transcription factors. *Respectively. Appl. Environ. Microbiol*. **70,1913–1922.**

Bohinski, R.C. (1987). "Modern Concepts in Biochemistry". 5th edn ., Allyn and Bacon, Inc ., Massachusetts , 38 p .

Eid, M. A. (1998). Spectrophoto metric method for the determination of cysteine and N-acetyl cysteine. *Mikrochem. Acta* ,**129, 91-95**.

Elsevier Sequoia, S.A., S (1986). Of electroaual . *Chem.,* **212(16), 471-478.**

Hammett, L.B. (1940). "Physical Organic Chemistry". MS Craw –Gill, New York, pp.184-199.

Icardo, M. C.; Zamora, L. L. ; Calataynd, J. M. (1998). Solid- phase reactors as high stability reagent sources in flow analysis : selective flow injection pharmaceutical formation. *Analyst ,* **123 , 89-1685.**

Khaloo, S.S.; Amini, M.K.S.; Tangestaninejad, S. S. ; Kia , R., 5 January (2004). Voltammetric and Potentiometric Study of Cysteine at Cobalt (II) Phthalocyanine Modified Carbon- Paste Electrode. *Iran. J. Chem*., **1(2),128-135.**

Kumar, A.; John, L.; Alam, M. M.; Gupta, A.; Sharma, G. (2006). Homocysteine- and cysteine-mediated growth defect is not associated with induction of oxidative stress response genes in yeast. *Biochem. J.*, **396, 61–69.**

Mendoza-Cozatl, D.; Loza-Tavera, H.; Hernandez-Navarro, A. ; Moreno-Sanchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev*. **29, 653–671**.

Nicolae, S.; Bulusu, V. S.; Elena P.; Donald A. T; Akira, F., February 1 (2001). Voltammatric determination of L-cysteine at conductive diamond electrodes. *Analytical Chem.***, 73(3), 514-519.**

Perrinc., D.D. (1974). "Bufers, pH and Metal Ion Control", Hasted press division of John Weily and Sons, Inc., New York.

Van den Berg, C. M. G.; Househam B. C. ; Riley J. P. (1988). Determination of cystine and cysteine in sea water using cathodic stripping voltammetry in presence of copper. *J. Electroanal Chem. Interfacial Electro Chem. Clzem. Abst.,* **137-148**.

Wen, S.; Zhang T. and Tan, T. (2004). Utilization of Amino Acids to Enhance Glutathione Production in Saccharomyces Cerevisiae. *Enzyme Microb. Technol*. **35, 501–507**

WWW. Metrohm UK Potentiometric and Karl Fischer Titration. htm on 29 November (2006).

Zapardid, A.; Bermejo E.; Lopez J.A. P. ; Hernandezl., Gil E. (1995). Electro analytical determination of halazepam study of interaction with human serum albumin. *Microchem. J.* , **52 , 41 – 52 .**

Zekerya, D.; Ahbaz, I. ; Nil, E. F. ; Giirel N. E. (2003). Volammetric and flow injection amperometric determination of cysteine at a glassy carbon electrode in the presence of copper (ii) ions., *Turk. J. Chem*. **27, 513-519**.