منشورات جامعة حماة
كلية الزراعة

الكيميـــــــاء الحيـــــــوية
الجـزء العمـــــلي
Eperimental Biochemistry

الفصل الثامن
مفاهيم عامة
General Considerations

8-1 التعليمات الواجب اتباعها للعمل المخبري

المخابر هي الأماكن المخصصة لإجراء التجارب التي تمكن الطالب من تثبيت معلوماته النظرية عن طريق إجراء تجارب مخبرية يرى فيها الطالب نتائج ملموسة تقارن بالمعلومات النظرية. للمخابر جو خاص وطريقة في العمل لم يعتدها الطالب بعد. لذا لابد من اتباع بعض الملاحظات حفاظاً على سلامته وسلامة زملائه والعناية بالأجهزة والأدوات التي يعمل بها، توخياً للحصول على نتائج مرضية صحيحة تقوده إلى جانب المعرفة.
لذلك لابد من اتباع التعليمات الآتية:

1- لايسمح للطالب بالدخول إلى المخابر إلا في أثناء الجلسات العملية فقط. ويستوجب على الطلاب الدخول إلى المخبر دون تزاحم بهدوء ونظام بحيث يأخذ كل طالب مكاناً مخصصاً وثابتاً طيلة التجارب المقررة.

2- على الطالب قبل دخوله المخبر ارتداء اللباس الأبيض المخصص للعمل في المخبر.

3- يجب على كل طالب أن يعمل في المكان المخصص له فقط ولايسمح للطالب بالتنقل من مكان إلى آخر في المخبر حتى لايعيق عمل زملائه أو يسبب الفوضى داخل المخبر.

4- على كل طالب أن يعمل بهدوء ودون ضجيج أو فوضى، ويقلل التحدث مع زملائه في أثناء الجلسة حفاظاً على حسن سير العمل في المخبر.

5- تمنع زيارة الطلاب في المخبر مهما كانت الأسباب لعدم إرباك العمل.

6- يجب الحفاظ على مكان العمل نظيفاً ومرتباً ولاتنشر في مكان العمل سوى الأدوات الواجب استعمالها في التجارب المخصصة للجلسة العملية. ويتوجب على الطالب رمي المناديل الورقية وغيرها في سلة المهملات وعدم رميها في أحواض المغاسل.

7- يجب الحيطة في استخدام مصباح الغاز وعدم استخدامه إلا عند اللزوم.

8- لايجوز البدء بالتجارب دون وجود المشرف على الجلسة العملية.

9- على الطالب عدم استخدام زجاجات المواد الكيميائية مالم تحمل لصاقة تبين اسم المادة التي تحتويها.

10- يحظر على الطالب نقل الكواشف أو الزجاجات من أماكنها ، بل يجب إعادتها إلى أماكنها بعد الاستعمال مباشرة وعدم تركها أمامه على الطاولة.

11- إغلاق الزجاجات بعد الاستعمال مباشرة وعدم ترك الأغطية على الطاولة منعاً لتداخل المواد الكيميائية وفساد الكواشف وتلوث المحاليل.

12- يتم التخلص من الكيميائيات والمحاليل الخاصة بكل تجربة في حوض المغسلة مع فتح صنبور الماء لمدة من الزمن من أجل تمديد الكيميائيات بالماء ، إذ يقل تاثيرها في أنابيب صرف المياه. لايجوز إجراء أي تجربة أو مزج مواد كيميائية لايقرها المشرف على الجلسة ويجب على الطالب التقيد بخطوات العمل بدقة حرصاً على سلامته وعلى حسن ظهور النتائج.

13- عند الحاجة لغليان محلول في أنبوب اختبار على اللهب، يسخن الأنبوب بوضع مائل مع الحرص على عدم توجيهه نحو الزملاء. وفي أثناء الغليان ثابر على الرج الخفيف للمحلول خلال التسخين وإبعاده عن اللهب كلما شعرت باقتراب الفوران.

14- يمنع تناول الأطعمة والمشروبات والتدخين داخل المخبر.

15- لاتستعمل أدوات العمل في شرب السوائل أو الماء مهما بدت نظيفة.

16- يجب إبعاد الزجاجات الحاوية سوائل سريعة الاشتعال عن مصادر اللهب.

17- تتضمن بعض التجارب استخدام كواشف سامة Toxic أو مؤكسدة Corrosive أو مهيجة Irritant والتي تستوجب التعامل معها بحذر شديد.

18- في أثناء القيام بعمل تجربة يراعى مايأتي:

أ- لاتصب الماء أو السائل على الحمض المركز بل العكس مع استمرار التحريك.

ب- وجه فوهة الأنبوب في أثناء إضافة المواد أو التسخين بعيداً عن وجهك ووجه زملائك الذين يعملون حولك وقم بكل الإضافات والتسخين مع جعل الأنبوب مائلاً وليس عمودياً.

ت- يجب استعمال منظمات الغليان عند التسخين أو استعمل لهباً هادئاً منتظماً.

ث- استعمل المقادير المحددة من المواد الكيميائية بدقة ماامكنك دون الاسراف في استعمال المواد الكيميائية منعاً للهدر.

ج- تجنب استنشاق الأبخرة المتصاعدة في أثناء الغليان ماأمكن. وعدم استنشاق المذيبات العضوية ، وإجراء الاختبار المطلوب تحت الساحبة وفتح النوافذ لتهوية المخبر. استعن بالمشرف عند إخفاقك في الاختبار ولاتلجأ لزملائك، المشرف موجود في المخبر للأجابة على تساؤلاتك وتوجيهك لحسن سير العمل.

ح- لاتعيد بقية مادة كيميائية ما زادت عن حاجتك إلى زجاجتها بل خذ مايكفيك فقط لإجراء تجارب، وفي حال توفر بقية ارمها في حوض الغسيل.

خ- عند تلوث يديك بأي مادة كيميائية بادر بسرعة لغسلها بالماء لمدة كافية. وتجنب تلويث الجدار الخارجي للأنبوب بالمواد الكيميائية المستعملة.

د- قبل مغادرتك المخبر نظف مكان عملك ولاتترك أي مواد أو فضلات فيه.

ذ- تنجم معظم الأسباب الشائعة للحوادث المخبرية من استخدام الأدوات الزجاجية المكسورة (المشعورة) ، وعليه يجب عدم استخدام مثل هذه الأدوات لإجراء التجارب المخبرية.

ر- يحتل الانزلاق على الأرضيات الرطبة المرتبة الثانية لأكثر اسباب الحوادث في المختبر، لذا يجب تجفيف أي ماء موجود على أرضية المختبر.

ز- وأخيراً يجب إخبار المشرف على الجلسة في حال الشعور بأي أعراض مرضية، ويوصى بعدم إجراء الاختبار.

2-8 المحاليل المنظمة Buffer Solutions

تعمل المحاليل المنظمة (الواقية، أو الدارئة) على حماية الوساطة الحيوية من التغيرات المفاجئة في قيم الـ pH عند انسياب حمض أو قلوي إلى الوسط الحيوي. حيث إن الوسط الحيوي يحتوي تراكيز محددة من أيونات الهيدروجين H^+ والهيدروكسيل OH^- لايجوز زيادتها بشكل كبير حرصاً على سلامة العضو الموجود فيه. تستطيع الكائنات الحية جميعها تحمل التغيرات الطفيفة في قيمة الـ pH في أوساطها الحيوية ولكنها لاتستطيع تحمل التغيرات الكبيرة المفاجئة.

على ذلك نجد أن الأوساط الحيوية جميعها تحتوي محاليل منظمة تقوم بآلية خاصة تساعد على إبقاء درجة الحموضة ضمن المجال المسموح به في هذه الأوساط وتمنع التغيرات بشكل كبير.

إن عمليات الاستقلاب التي تتم في العضوية تنتج الكثير من الحموض وبعض القلويات، وحتى لاتتغير الحموضة في الأوساط الحيوية بشكل كبير، كان لابد أن تحتوي الخلايا والأوساط الحيوية محاليل منظمة لدرجة الحموضة، أو محاليل منظمة، يكون التغير فيها إضافة الحموض أو القلويات أقل ما يمكن وضمن المجال المسموح به لاستمرارية عمل هذا العضو.

يتكون المحلول المنظم من حمض ضعيف مع أحد أملاحه، أو من أساس ضعيف مع أحد أملاحه. ولتوضيح قدرة المحلول المنظم على مقاومة التغيرات في درجة الحموض لدى إضافة حمض قوي أو أساس قوي. نقوم بالتجربة الآتية:

ناخذ محلولاً منظما يحتوي حمض الخل (حمضاً ضعيفاً) وخلات الصوديوم (ملح الحمض)، نضيف للمحلول كمية من حمض كلور الماء (حمض قوي) يحدث التفاعل الآتي:

$$HCl + CH_3COONa \rightarrow NaCl + CH_3COOH$$

إن ملح كلوريد الصوديوم المتشكل هو ملح متعادل ، لاتؤثر أيوناته في درجة حموضة الوسط. وحمض الخل هو موجود في وسط التفاعل بالأصل إضافته إلى المحلول تؤدي إلى حدوث انخفاض ضئيل في درجة حموضة الوسط، الأمر الذي يعد مهملاً بالمقارنة مع مايحدث عند إضافة حمض كلور الماء إلى الوسط الذي لايحتوي خلات الصوديوم.

بالمقابل عند إضافة كمية من أساس قوي مثل هيدروكسيد الصوديوم NaOH إلى المحلول المنظم السابق عندها سيحدث التفاعل:

$$NaOH + CH_3COOH \rightarrow CH_3COONa + H_2O$$

إن تشكل ملح خلات الصوديوم يؤدي إلى زيادة كمية خلات الصوديوم في المحلول المنظم، سيزيد ذلك من تركيز خلات الصوديم في الوسط الأمر الذي يؤدي إلى ارتفاع ضئيل في درجة الحموضة بدلاً من الارتفاع الكبير الذي قد تسببه إضافة NaOH إلى المحلول الذي لايحتوي حمض الخل.

لقد قام العالمان هندرسن – هاسيلبالخ Henderson–Hasselbalch بتوضيح العلاقة التي تربط بين حموضة المحلول المنظم وتراكيز مكوناته من الحمض والملح بعلاقة رياضية تمكن من حساب حموضة الوسط عند أي تركيز للحمض مع ملحه:

$$pH = pK_a + \log (C_s/C_a)$$

$pK_a = -\log K_a$ اللوغاريتم العشري السالب لثابت توازن الحمض الضعيف K_a

C_s تركيز الملح، C_a تركيز الحمض الضعيف.

وعندما يتكون المحلول المنظم من قاعدة ضعيفة مع ملحها فإن المعادلة تصبح على الشكل:

$$pH = 14 - pK_b + \log K_b$$

حيث $pK_b = -\log K_b$ اللوغاريتم العشري السالب للأساس الضعيف. C_b تركيز الأساس الضعيف.

إن قدرة المحلول المنظم على مقاومة تغيرات الـ pH تتناسب طرداً مع تركيز المحلول المنظم، وتبلغ حدها الأقصى عندما يتساوى تركيز الحمض (أو الأساس) مع تركيز الملح في المحلول $C_{a,b} = C_s$. وفي هذه الحالة فإن نصف تركيز الحمض في حالة تأين والنصف الباقي بالطبع غير متأين، وعندها:

$$pK_a = pH$$

وتنخفض قدرة المحلول المنظم على مقاومة تغيرات الحموضة إلى درجة غير مقبولة عندما يقل تركيز أحد مكونيه عن عشر تركيز المكون الثاني $C_s = 0.1C_b$. إن تمديد المحلول المنظم بالماء المقطر يغير تركيزه ولكنه لايغير النسبة بين تراكيز مكونيه، ولذلك لايتغير رقم الحموضة pH المحلول المنظم بإضافة الماء إلا عندما يصل التمديد إلى الدرجة التي يصبح فيها المحلول المنظم عاجزاً عن مقاومة تأثير أيونات الماء في درجة حموضة المحلول بسبب انخفاض تركيز مكوناته عن التمديد الكبير.

ومن هنا نتبع أهمية اختيار الحمض الضعيف لتحضير محاليل منظمة للاستعمال في الأوساط الحمضية بحيث يكون أسه الأيوني pK_a أقرب مايكون إلى الـ pH المطلوب.

أما المحاليل المنظمة المراد استعمالها في الأوساط القلوية فيتم تحضيرها من قاعدة (أساس) ضعيفة مع ملحها. وفي هذه الحالة نختار الأساس الذي أسه الأيوني pK_b مساو للفرق بين الـ pH المطلوب والرقم 14 حسب الآتي:

$$pK_b = 14 - pH$$

والجدير بالذكر أن المهتمين بالكيمياء الحيوية يفضلون استخدام الأس الأيوني للأساس الضعيف pK_b لأنهما يرتبطان بالعلاقة:

$$pK_a + pK_b = 14$$

تطبيقات على الفعل التنظيمي للمحلول المنظم (الواقي، أو الدارئي):

1- حضر 100ml من محلول منظم تركيزه 0.1N للاستعمال عند pH = 4.7 مستعملاً حمض الخل الذي يملك pK = 4.76.

مواد التجربة

أ- جهاز قياس pH.

ب- محلول حمض خل 0.1N.

ت- محلول خلات الصوديوم 0.1N.

ث- محلول حمض كلور الماء 1N.

ج- محلول هيدروكسيد الصوديوم 1N.

2- تحضير محلول الخلات 0.1N

من أجل تحضير محلول درجة حموضته 4.8 ، نأخذ 48ml حمض خل 0.1N ونكمل الحجم إلى 100ml بخلات الصوديوم 0.1N.

طريقة العمل

- خذ 50ml ماءاً مقطراً في كأس زجاجي سعته 100ml وقس حموضته pH ، ثم أضف 1ml حمض كلور الماء 1N ، وامزج جيداً ثم قس الـ pH بالمقياس ولاحظ انخفاض قيمة الـ pH بشكل ملحوظ.
- أعد التجربة السابقة بإضافة NaOH بدلاً من HCl ولاحظ ارتفاع قيمة الـ pH.
- أعد التجربة مستخدماً 50ml من محلول خلات الصوديوم المنظم الذي حضرته بدلاً من الماء المقطر، لاحظ مقاومة المحلول المنظم لتغير الـ pH في حالتي إضافة الحمض HCl, NaOH.

الفصل التاسع

اختبارات السكريات Carbohydrate Testes

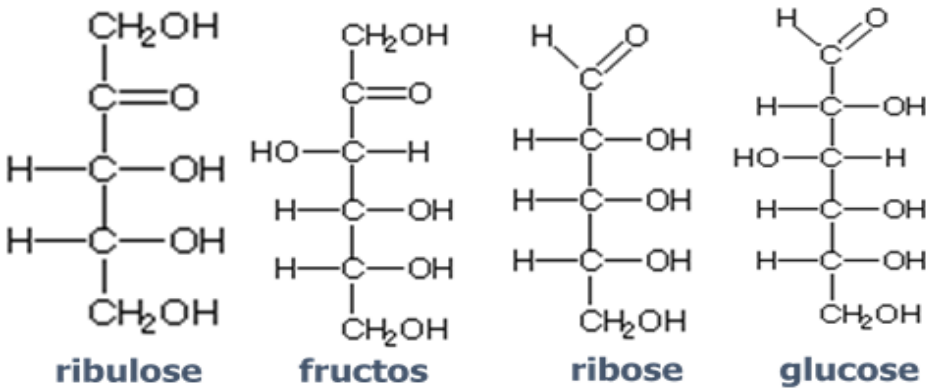
توجد السكريات (الكربوهيدرات) في المملكة النباتية وفي المملكة الحيوانية وتكون مرتبطة مع الدسم والبروتينات وفي انسجة أخرى في الحيوان. وتعد السكريات من أكثر المواد الغذائية انتشاراً في الطبيعة كما تكون نسبة عالية من مكونات الوجبة الغذائية اليومية.

من جهة أخرى تشكل الكربوهيدرات مجموعة من المركبات المهمة جداً، إذ إن بعضها يؤدي دورا بنائيا مهماً، حيث تدخل هذه الأنواع من الكربوهيدرات في تركيب جدران الخلايا وتشكل الهيكل الأساسي للنبات (السيللوز والهيمي سيللوز)، في حين يؤدي بعضها الآخر دوراً تخزينياً، إذ تعد الكربوهيدرات مخزناً للطاقة في الحيوان، وتحتفظ بها النبات في الثمار والحبوب والدرنات (نشاء). ويمكن القول بشكل عام، إن الكربوهيدرات تشكل مصدراً غذائياً مهماً من مصادر الطاقة للكائنات الحية ، ومن وجهة نظر اقتصادية، فإن العديد من الصناعات الغذائية تقوم عليها كصناعة الطحين والخبز والمعجنات بأنواعها المختلفة وكذلك التخمرات واستخراح السكر وغيرها.

ومن الناحية الكيميائية تتكون الكربوهيدرات من عناصر الكربون والهيدروجين والأكسجين وتمتلك جميعها على الأقل وظيفة كحولية ووظيفة مختزلة متمثلة بمجموعة كربونيل. وحسب عدد وحدات السكر البسيط لها تقسم الكربوهيدرات إلى سكريات أحادية وسكريات قليلة التعدد (أوليغو) وسكريات معقدة كثيرة التعدد. وحسب نوع مجموعة الكربونيل تقسم السكريات الأحادية إلى ألدوزات تحتوي مجموعة ألدهيدية، وكيتوزات تحتوي مجموعة كيتونية.

ومن الناحية التصنيفية يمكن التمييز بين السكريات البسيطة (أوزات oses) والسكريات المركبة (أوزيدات osides). فالسكريات البسيطة تتكون من جزيئة سكر واحدة فقط (أي إنها غير قابلة للحلمهة) في حين تعطي السكريات المركبة بالحلمهة عدداً صغيراً أو كبيراً من جزيئات السكريات البسيطة يمكنها أن تكون متماثلة أو غير متماثلة. كما أن السكريات البسيطة تكون

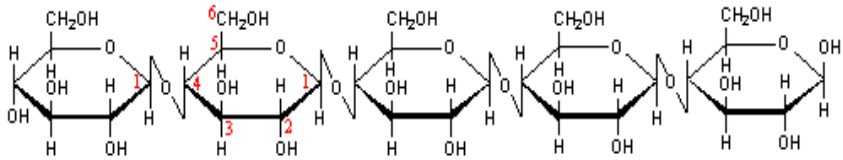
بدورها مصنفة بحسب عدد ذرات الكربون فيها، مثلاً التريوزات trioses تحتوي ثلاث ذرات كربون C3 والتتروزات tetroses تشمل السكريات التي تحتوي C4 والبنتوزات pentoses للسكريات التي تحتوي C5، والهكسوزات تشمل السكريات التي تحتوي C6 وهكذا سواءً كانت ألدوزات أم كيتوزات.



الشكل(9-1): بعض السكريات الأحادية: غلوكوز، ريبوز. فركتوز، والريبولوز.

سوف ندرس في الجزء العملي من سكريات الأوليغو (قليلة التعدد)، وبعض السكريات الثنائية منها، والشائعة في حياتنا اليومية، وهي اللاكتوز (سكر الحليب)، والمالتوز (سكر الشعير)، والسكروز (سكر القصب).

من الكربوهيدرات كثيرة التعدد التي تتعرض لها التجارب لكشفها وبيان خواصها الكيميائية، السكريات واسعة الانتشار والتداول: النشا، والدكسترين، السيللوز، والغليكوجين.



الشكل(9-2): السيللوز

تعتمد التجارب الواردة جميعها على فهم الصيغة الجزيئية للسكريات. والسكريات في هذه التجارب تقسم إما إلى سكريات مختزلة أو غير مختزلة في الوسط القلوي لكواشف فهلنغ وبندكت، أو أنها مختزلة وغير مختزلة في الوسط الحمضي الخفيف لكاشف بارفويد. كما نستفيد أيضاً من وجود نوعي مجموعة الكربونيل (الألدهيدي والكيتوني) في تمييز السكريات الكيتونية عن السكريات الألدهيدية عند استعمال كاشف سيلوانوف. ونجد كثيراً من التجارب : مثل اختبارات موليش ، بيال، وخلات الانيلين، تعتمد على تأثير الحمض المعدني القوي (حمض الكبريت أو حمض كلور الماء) على الحلقة الخماسية أو السداسية للسكر، لإنتاج الفورفورال أو مشتقه هيدروكسي ميتيل الفورفورال، في الحصول على نواتج ملونة. وتعطي هذه التفاعلات نواتج معقدات عضوية متغيرة الألوان تفيد في تمييز أنواع السكريات .

يمكن أن نضع مخططاً يوضح الاختبارات الوصفية للسكريات:

1- اختبار الذوبان في الماء والمذيبات العضوية.

2- الاختبارات العامة وتشمل:

اختبار موليش واختبار الأنثرون

3- اختبارات السكريات المختزلة:

فهلنغ ، بندكت، بارفويد، تولنز، الاوسازون، وحمض البيكريك.

4- اختبارات خاصة للتمييز بين أنواع السكريات:

i. اختبارات خاصة بالسكريات الخماسية ومنها اختبار خلات الأنيلين واختبار بيال.

ii. اختبارات خاصة بالسكريات الكيتونية ومنها اختبار سيلفانوف واختبار تاوبر للكيتونات.

5- اختبارات أخرى:

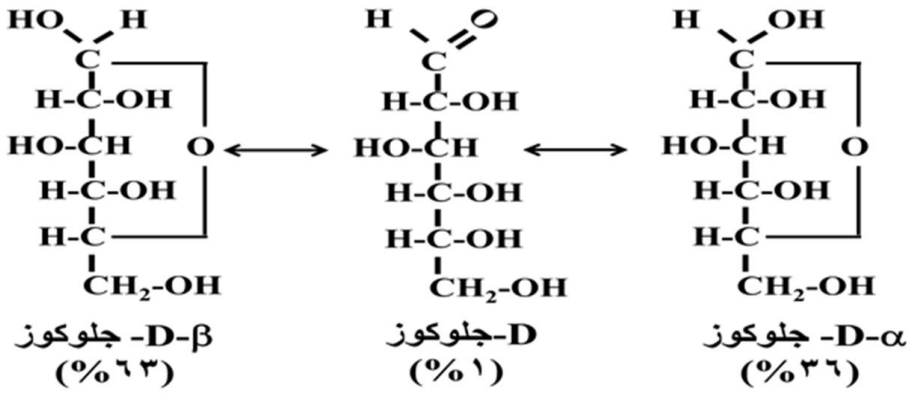
وتشمل اختبار حمض الميوسيك، اختبار كشف غش عسل النحل، اختبار الكشف عن السكروز، اختبار الحلمهة الحامضية للسكروز، واختبار الحلمهة الإنزيمية للسكروز.

6- اختبارات الكربوهيدرات العديدة:

اختبار الحلمهة الحامضية للسيللوز، اختبارات النشا، اختبار اليود، اختبار الحلمهة الحمضية للنشاء، اختبارات الحلمهة الإنزيمية للنشاء، اختبار تحلل الغليكوجين بالحموض، واختبار خلات الرصاص القاعدية للنشاء.

وهكذا نجد أن مبادئ التجارب تعتمد على فهم الصيغ الكيميائية وسلوكها في الأوساط والكواشف المختلفة. ومن هنا نجد أنه على الطالب وضعها في ذهنه في أثناء إجراء التجارب حتى يسهل تفسير النتائج.

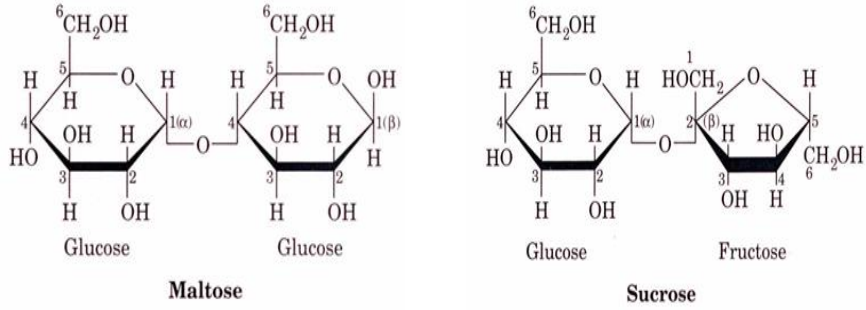
توجد الصيغة المفتوحة للسكريات دائماً بنسب ضئيلة بالمقارنة مع الصيغ المغلقة وبحالة توازن معها. وقد تنفتح الصيغة المغلقة تحت تاثير شروط معينة، ويغدو السكر مركباً كيميائياً ذا سلسلة مستقيمة مفتوحة يحتوي مجموعة ألدهيد حرة H–C=O ، أو يحتوي مجموعة كيتون حرة > C=O .



الشكل(9–3): الصيغة المفتوحة للغلوكوز

السكريات الأحادية والثنائية، مواد صلبة ، عديمة اللون، أو سوائل كثيفة، تتميز بأنها ذوابة في الماء، وغير ذوابة في الايثر ومعتدلة التفاعل. وتشبة متعددات السكر في كثير من

صفاتها الفيزيائية النوعين الأولين من السكريات، إلا أنها عامة غير ذوابة في الماء لوزنها الجزيئي المرتفع. وتتحلمه ثنائيات ومتعددات السكر إلى سكريات أحادية بالحلمهة الحمضية أو الأنزيمية.



الشكل(9-4): السكروز والمالتوز

اختبارات السكريات

9-1 اختبار الذوبان

الهدف من الاختبار تمييز السكريات الأحادية والثنائية من السكريات العديدة أو غير السكريات

مبدأ الاختبار

تختلف قابلية السكريات الأحادية والثنائية والعديدة في درجة قابليتها للذوبان في الماء، فالسكريات الأحادية والثنائية قابلة للذوبان في الماء. أما السكريات العديدة فهي شحيحة الذوبان أو عديمة الذوبان في الماء، نتيجة ضخامة جزيئاتها، وفي حال إذابتها فهي تعطي محاليل غروية. أما الذوبان في المذيبات العضوية فيختلف من سكر إلى آخر، وتقل سرعة الذوبان تبعا لارتفاع الكتلة الجزيئية.

مواد التجربة

- بلورات من السكريات المختلفة: غلوكوز، فركتوز، رايبوز، أرابينوز، زايلوز؛ سكروز، لاكتوز، مالتوز؛ نشاء، سيللوز.
- مذيبات عضوية: ايتانول، اسيتون، كلوروفورم، بنزن...
- ماء مقطر.

طريقة العمل

يؤخذ 0.5g من كل سكر موجود (غلوكوز، فركتوز...) وتوضع كل منها في أنبوب اختبار ثم يضاف لكل أنبوب 3ml ماء، وترج محتويات الأنابيب، فيلاحظ تفاوت في سرعة الذوبان. تعاد التجربة باستخدام مذيبات عضوية مختلفة (ايتانول، اسيتون، بنزن...) وتوضع النتائج في جدول للمقارنة.

9-2 الاختبارات العامة للكربوهيدرات

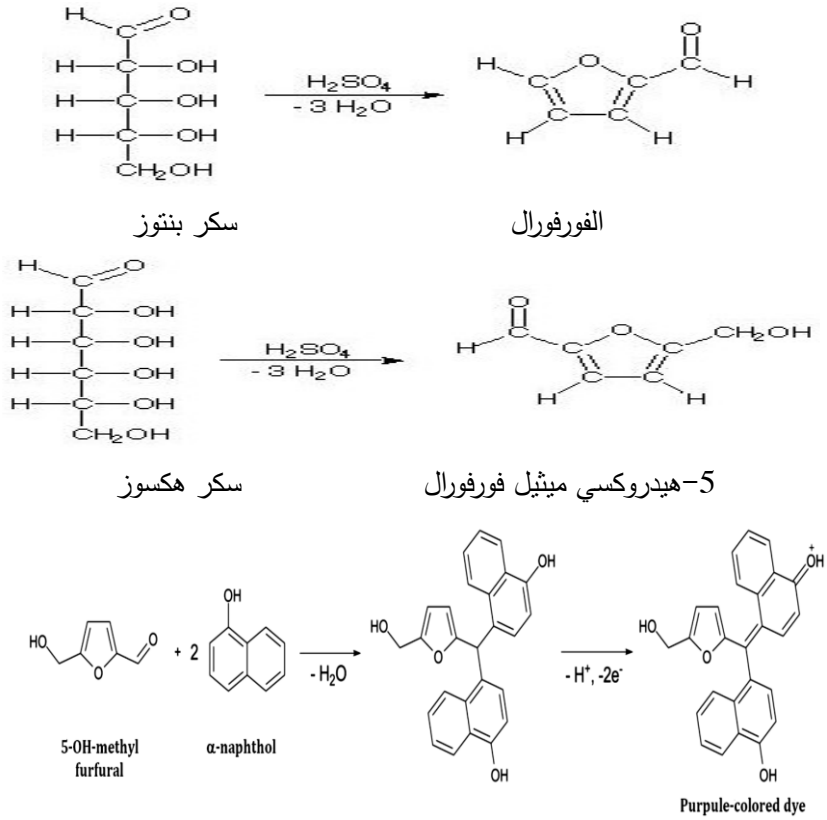
9-2-1 اختبار موليش Molish' s test

تمييز الكربوهيدرات من غيرها من المركبات الأخرى مثل البروتينات، الليبيدات.

مبدأ الاختبار

يحلمه الحمض المركز (حمض الكبريت، حمض كلور الماء) الروابط الغليكوزيدية ليعطي سكريات أحادية أولا، أو ثانيا. يتم نزع ثلاثة جزيئات ماء فيتحول السكر الأحادي إلى مركب فورفورال furfural بتأثير الحمض نفسه إذا كان السكر خماسيا، أما اذا كان السكر سداسيا فينتج مركب 5- هيدروكسي ميتيل فورفورال 5-Hydroxy methylfurfural.

تتفاعل المركبات الألدهيدية السابقة (الفورفورال أو 5-هيدروكسي ميتيل فورفورال) مع كاشف الفا نفثول α- Naphthol بوجود الحمض السابق فيتشكل معقد يظهر على شكل حلقة بنفسجية محمرة بين طبقة المحلول السكري وطبقة حمض الكبريت المركز. هذا التفاعل كاشف عام للكربوهيدرات . ووجد أيضا أن الألدهيدات والكيتونات تعطي نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار، ولكن بسرعات متفاوتة.



الشكل(9–5): تفاعل حمض الكبريت مع كل من السكريات السداسية (هكسوز) ومع السكريات الخماسية (بنتوز).

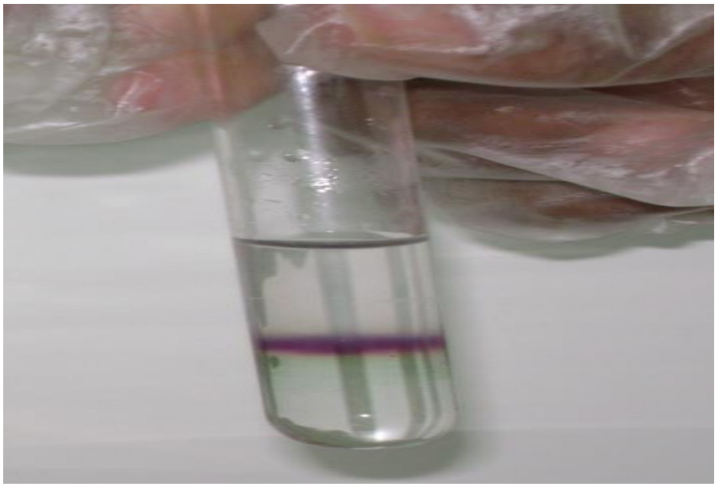
مواد التجربة

- محاليل كربوهيدراتية 1% (غلوكوز، فركتوز، نشاء، ...).
- حمض كبريت مركز.
- كاشف موليش: 5% الفا نفثول في الايتانول، حديث التحضير.

طريقة العمل

ضع نحو 2ml من المحلول السكري المراد اختباره في أنبوب اختبار. ثم أضف إليه نقطتين من كاشف موليش. رج الأنبوب، ثم أضف ببطء، وإلى جدران الأنبوب الداخلية بعد إمالته 45 درجة 2–3ml من حمض الكبريت، لتنشأ طبقتان سائلتان في الأنبوب، عند وجود مادة كربوهيدراتية تظهر حلقة حمراء تتحول إلى اللون

البنفسجي عند نقطة الاتصال بين الطبقتين. خذ أنبوباً شاهداً وضع بدلاً من المحلول السكري محلولاً بروتينياً أو زيتياً أو ماء، لاحظ النتيجة، قارن وفسر النتائج.



الشكل(9-6): الحلقة البنفسجية في تفاعل موليش

ملاحظات:

أ- لاحظ تفاوت زمن ظهور الحلقة البنفسجية في الأنابيب الحاوية محاليل سكرية مختلفة.

ب- عدم ظهور حلقة بنفسجية في أنبوب الحاوي ماء وإنما حلقة سمراء.

ت- تخضع السكريات العديدة تحت تأثير الحموض للحلمهة متحولة إلى سكريات أحادية أولاً.

ث- إذا لم تكن طريقة إضافة الحمض صحيحة أو كان الأنبوب غير نظيف فلن تظهر الحلقة البنفسجية وإنما يظهر المحلول كله بلون بنفسجي.

ج- تعطي بعض المركبات العضوية كحمض اللاكتيك وحمض الستريك اختباراً إيجابياً وخاصة إذا كانت مركزة بسبب شدة حساسية اختبار موليش.

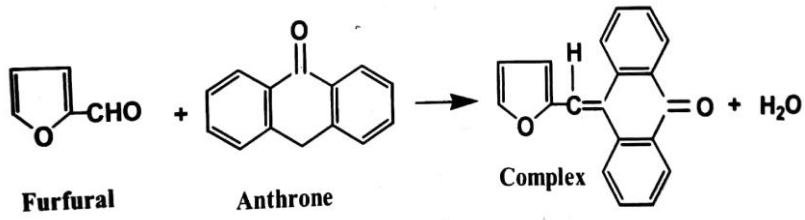
9-2-2 اختبار الانثرون Anthrone test

الهدف من الاختبار هو الكشف العام عن السكريات.

مبدأ الاختبار

يتفاعل الانثرون بوجود حمض الكبريت مع نواتج الكربوهيدرات مثل الفورفورال أو 5- هيدروكسي ميتيل فورفورال فينتج معقد لونه أخضر إلى أخضر مزرق.

يمكن استخدام هذا الاختبار في التقدير الكمي لبعض السكريات وذلك بقياس شدة اللون بوساطة جهاز التحليل الطيفي الضوئي حيث تتناسب شدة اللون مع تركيز السكر(راجع طريقة التحليل الطيفي في الفصل الأخير من الكتاب).



الشكل(9-7): تفاعل الانثرون مع الفورفورال ليعطي معقداً ذا لون أخضر مزرق

مواد التجربة

- محاليل سكرية 2%
- حمض الكبريت.
- كاشف الانثرون، ويحضر قبل الجلسة العملية بإذابة 0.1g انثرون في 350ml حمض كبريت مركز، ثم مدد الحجم إلى 500ml بالماء المقطر مع الحذر الشديد.

طريقة العمل

تضاف قطرتان من المحلول السكري المراد اختباره إلى نحو 1ml من محلول الانثرون مع الرج بشدة. فيلاحظ ظهور لون أخضر مزرق في حالة وجود الكربوهيدرات. قد يحتاج

ظهور اللون وضع الأنبوب في حمام مائي يغلي (تجنب التسخين المباشر للأنبوب)، وذلك تبعاً لنوع المادة الكربوهيدراتية وتركيزها، كما أن اللون يختلف من سكر لآخر.

3-9 اختبارات السكريات المختزلة Reducing Test of Sugar

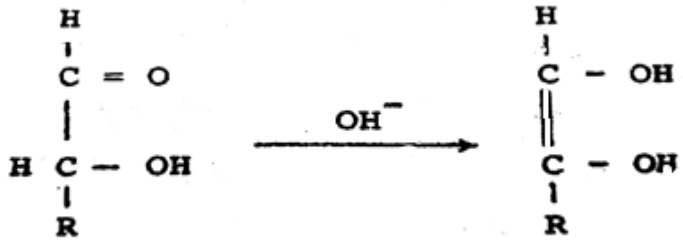
تتميز المركبات المحتوية مجموعة كربونيل (ألدهيدات، وكيتونات) بقدرتها على الاختزال، أي إنها قادرة على إعطاء إلكترونات إلى المواد المؤكسدة فتختزلها وتتأكسد هي إلى حموض عضوية. ونظراً لأن السكريات الأحادية كافة ومعظم السكريات الثنائية شائعة الاستعمال (عدا السكروز) تحتوي مجموعة كربونيل على شكل هيمي اسيتال أو هيمي كيتال فهي جميعاً سكريات مختزلة. أما السكريات العديدة فليس لها قدرة اختزالية بسبب وجود مجموعة كربونيل وحيدة في طرف سلاسلها الغليكوزيدية الطويلة، إلا أنها بالتحلل المائي تعطي سكريات مختزلة.

تعتمد أكثر اختبارات السكريات شيوعاً على قدرتها على اختزال أيونات كثيرة من المعادن كالنحاس والفضة والزئبق. فعلى سبيل المثال يتم اختزال أيون النحاسيك Cu^{2+} في الوسط القلوي بالتسخين مع السكريات المختزلة فيتحول إلى نحاسوز Cu^{+} (النحاسي). بعبارة أخرى تختزل السكريات هيدروكسيد النحاس الأزرق إلى أكسيد النحاسي الأحمر وتتحول هي إلى حموض عضوية، توضح المعادلة عملية التحول:

$$R-CHO + 2Cu(OH)_2 \rightarrow R-COOH + Cu_2O + 2H_2O$$

وعلى الرغم من أن القدرة الاختزالية وكمية الراسب المتشكل من أكسيد النحاسي تتناسب طرداً مع تركيز السكر المختزل الذي قد يستخدم في التقدير الكمي، إلا أن المعادلة المكتوبة لاتعبر بدقة عن التفاعل الحاصل. حيث يحصل تحطم جزئي للسكر في الوسط القلوي فينتج مركبات من نوع ايندول endiols وهي مركبات نشطة كيميائياً تتفكك بسهولة عند الرابطة الزوجية معطية نواتج ألدهيدية أقوى في قدراتها الاختزالية من جزيء السكر الأصلي. تعطي هذه النواتج إلكتروناتها بسهولة إلى المواد المؤكسدة مثل أيون

النحاس فيتحول إلى نحاسي (النحاسوز) مترسباً على شكل أكسيد النحاسي وينتج في التفاعل مجموعة من الحموض العضوية.



ألدوز　　ايندويول

الشكل(9-8): تأثير القلوي في الألدوزات.

عند تحضير هيدروكسيد النحاس $Cu(OH)_2$ القليل الذوبان تجري إضافة بعض المواد التي تشكل معقدات ذوابة مع أيون النحاس لمنع ترسبه. تضاف طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم (ملح روشيل Rochelle Salt) في اختبار فهلنغ، والسترات في اختبار بندكت. وقد يجري اختبار الاختزال في وسط حمضي حيث يضاف حمض الخل والخلات كما في اختبار بارفويد فيصبح الاختزال بطيئاً جداً مع السكريات الثنائية، أما السكريات الأحادية فترسب أكسيد النحاسي (النحاسوز) خلال بضع دقائق.

9-3-1 اختبار فهلنغ Fehling's Test

الهدف من الاختبار تمييز السكريات المختزلة وغير المختزلة.

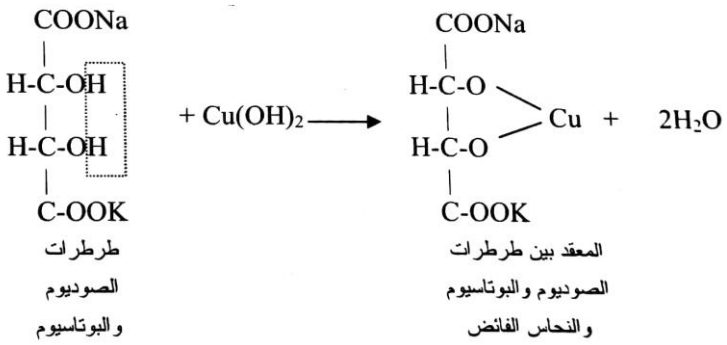
مبدأ الاختبار

يمكن للسكريات الأحادية والثنائية المختزلة أن تختزل أيونات النحاس Cu^{2+} في وسط قلوي إلى أيونات النحاسي Cu^{+} .

فكبريتات النحاس $CuSO_4$ (فهلنغ A) الموجودة في وسط قلوي (طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم) تتحول إلى هيدروكسيد النحاس $Cu(OH)_2$ الأزرق اللون.

$$CuSO_4 + 2NaOH \rightarrow Cu(OH)_2 + Na_2SO_4$$

بوجود السكر المختزل والتسخين يتم تفاعل بين السكر المختزل والقلوي ويتشكل مركبات من نوع ايندیول Enediols وهي مركبات نشطة كيميائيا تتفكك بسهولة عند الرابطة الزوجية معطية نواتج ألدهيدية أقوى في قدرتها الاختزالية من جزيء السكر الأصلي.



الشكل(9-9): تشكل المعقد بين النحاس وطرطرات الصوديوم والبوتاسيوم.

تأخذ أيونات النحاس الثنائية Cu^{2+} الإلكترونات من الايندیول وتختزل إلى أيونات النحاسي Cu^{+}، ومن ثم يترسب أكسيد النحاسي Cu_2O ذو اللون الأحمر الإجري، أما السكر فيتأكسد إلى حمض الأدونيك المناظر (في حال الغلوكوز يتحول إلى حمض الغلوكونيك).

9-3-2 اختبار بندكت Benedict's Test

الهدف من الاختبار التمييز بين السكريات المختزلة والسكريات غير المختزلة.

مبدأ الاختبار

يُعد هذا الاختبار أشد حساسية من تفاعل فهلنغ، يعتمد على اختزال أيونات النحاس إلى أيونات النحاسي، ويختلف عن تفاعل فهلنغ في نوعية المركب القلوي المستخدم لمنع

ترسب هيدروكسيد النحاس ، فبدلاً من إضافة ملح روشيل Rochelle Salt في تفاعل فهلنغ يضاف سترات الصوديوم.

يحتوي كاشف بندكت محلول كبريتات النحاس وكربونات الصوديوم وسترات الصوديوم. ولون كاشف بندكت أزرق ثابت لايتغير بالغليان، إلا بوجود سكر مرجع إذ يترسب أكسيد النحاسي الأحمر اللون.

يمكن المقارنة بين محلول بندكت وفهلنغ:

1- إن طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم أقل ثباتاً من سترات الصوديوم.

2- اختبار بندكت أشد حساسية للسكريات المختزلة من تفاعل فهلنغ فهو حساس لسكريات مختزلة حتى تركيز 0.08%. لهذا السبب يستخدم في الكشف عن السكر في البول ولا يتأثر بالعوامل المختزلة الأخرى الموجودة في البول مثل حمض البوريك والكرياتين.

3- تتحول الصورة الحلقية للسكريات إلى الصورة الاينولية في المحلول بتأثير القلوي (كربونات الصوديوم).

4- يؤدي تسخين السكر مع هيدروكسيد الصوديوم في محلول فهلنغ إلى تحطيم بعض جزيئات السكر.

5- استخدام اختبار بندكت أسهل من فهلنغ لأنه مكون من محلول واحد.

آليات تفاعل بندكت تتم وفق المراحل الآتية:

- عند تحضير محلول بندكت يتكون راسب من كربونات النحاس نتيجة تفاعل كربونات الصوديوم مع كبريتات النحاس، ولكن لايذوب الراسب بسرعة بوساطة سترات الصوديوم.

$$CuSO_4 + NaCO_3 \rightarrow CuCO_3 \downarrow + NaSO_4$$

- يتفاعل ملح سترات الصوديوم مع مركب كربون النحاس الراسب فيشكل ملح يتكون من سترات الصوديوم والنحاس.

H_2O + CO_2 + معقد سترات الصوديوم والنحاس ← سترات الصوديوم + كربونات النحاس

- ثم يتأين معقد سترات الصوديوم والنحاس الذائب معطيا ايونات النحاس Cu^{2+} .
- يتأكسد بعد ذلك السكر المختزل بوساطة شوارد النحاس Cu^{2+} الذائبة إلى حموض عضوية مع تكوين راسب من أكسيد النحاسي.

مواد التجربة

- محاليل كربوهيدراتية 2%.
- كاشف بندكت ويتكون من محلولين هما:

المحلول الأول: يذاب 173g من سترات الصوديوم و 100g كربونات اللامائية والنقية في 800ml ماء مقطر مع التسخين، ويرشح المحلول اذا بقيت فيه رواسب. بعد ذلك يبرد المحلول حتى يصل الحجم إلى 850ml بالماء المقطر (يوصى بالإضافة وبحذر حيث أن التفاعل ناشر للحرارة) .

المحلول الثاني: يذاب 17.3g كبريتات النحاس المائية المبلورة $CuSO_4.H_2O$ في 100ml ماء مقطر.

أضف المحلول الثاني إلى المحلول الأول ببطء مع التحريك وامزجهما جيداً تحصل على محلول بندكت. يمكن حفظ هذا الكاشف لمدة طويلة.

طريقة العمل

ضع في أنبوب اختبار 2ml محلول بندكت ثم أضف إليه 5 نقط من محلول السكر المراد اختباره. رج المزيج جيداً وضعه في حمام مائي يغلي. لاحظ تغير اللون ثم تشكل الراسب الأحمر خلال بضع دقائق إذا كان السكر المختبر مختزلاً. أما السكر غير المختزل فلا يغير اللون ولا يشكل أي راسب.

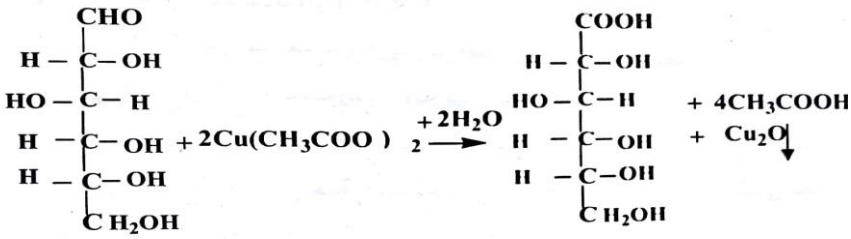
إجر التجربة على أحد السكريات الأحادية كالغلوكوز أو الفركتوز، وعلى أحد السكريات الثنائية كالمالتوز أو اللاكتوز، وعلى سكر ثنائي غير مختزل (السكروز)، وعلى سكر عديد كالنشا.

9-3-3 اختبار بارفويد Barfoed's Test

الهدف من الاختبار التمييز بين السكريات الأحادية المختزلة والثنائية المختزلة.

مبدأ الاختبار

اختبار بارفويد من الاختبارات الخاصة بالسكريات الأحادية فقط. تقوم السكريات الأحادية باختزال شوراد النحاس الموجودة في خلات النحاس $Cu(CH_3COO)_2$ إلى أكسيد النحاسي الأحمر Cu_2O في وسط حمضي ضعيف. أما السكر فإنه يتأكسد إلى حمض الأدونيك المناظر، فهو يشبه اختبار فهلنغ وبندكت ولكن يختلف من حيث الوسط الحمضي الضعيف هنا.



غلوكوز خلات النحاس حمض الغلوكونيك + حمض الخل

أكسيد النحاسي

الشكل(9-10): تشكل حمض الغلوكونيك بتأثير خلات النحاس في الغلوكوز.

بما أن هذا التفاعل يتم بوسط حمضي ضعيف من حمض الخل الممدد، فإنه يؤدي لتغيرات بطيئة في السكريات بعكس التغيرات التي تتم في الوسط القلوي والتي تتصف بسرعتها حتى في الأوساط القلوية الممدة. فالتماكب يتم ببطء في الوسط الحمضي. ونظراً لأن السكريات الأحادية في الوسط الحمضي أكثر قدرة على الاختزال من السكريات الثنائية المختزلة، فإن السكريات الأحادية فقط هي التي تعطي نتيجة موجبة خلال الدقائق الأولى من الغليان. إلا أن السكريات الثنائية المختزلة يمكنها أيضاً

أن تعطي نتيجة موجبة ولكن بعد مدة أطول من التسخين، لذلك يعتمد على العامل الزمني للتمييز بين السكريات الأحادية والثنائية المختزلة.

مواد التجربة

- محاليل سكرية 1% (أحادية وثنائية).
- كاشف بارفويد : يحضر بإذابة 13.3g من بلورات خلات النحاس في 200ml ماء مقطر، رشح اذا اقتضت الضرورة، ثم أضف إلى المحلول الناتج 1.8ml حمض خل مركز.

طريقة العمل

يضاف 2ml من كاشف بارفويد إلى اختبار يحوي 2ml من المحلول السكري المختبر، تمزج محتويات الأنبوب وتسخن في حمام يغلي لدقائق عدة. يلاحظ تشكل راسب أحمر إذا كان السكر أحادي خلال دقائق. أما السكريات الثنائية المختزلة فإنها تحتاج لمدة زمنية أطول لكي يظهر الراسب الأحمر.

9-3-4 اختبار تولانز Tolan's Test

الهدف من الاختبار تمييز السكريات المختزلة من السكريات غير المختزلة.

مبدأ الاختبار

يعتمد اختبار تولانز على الخاصية الاختزالية لجزيئة السكر، إذ تقوم مجموعة الكربونيل النشطة باختزال أيون الفضة النشادرية Ag^+ إلى معدن الفضة Ag الذي يترسب على شكل مرآة في وسط قلوي من هيدروكسيد الأمونيوم. حسب التفاعل

$$AgNO_3 + 3\ NH_4OH \rightarrow [Ag(NH_3)_2]OH + NH_4NO_3$$

$$R-CHO + [Ag(NH_3)_2]OH \rightarrow R-COOH + Ag\downarrow + NH_3$$

مواد التجربة

- محاليل سكرية 2%.
- هيدروكسيد الأمونيوم NH_4OH 5%.
- محلول نترات الفضة $AgNO_3$ 3%.

طريقة العمل

تؤخذ أربعة أنابيب اختبار ويوضع في **الأول** 2ml محلول غلوكوز، في **الثاني** 2ml محلول لاكتوز، في **الثالث** 2ml فركتوز، وفي **الرابع** 2ml سكروز. يضاف إلى كل أنبوب من الأنابيب السابقة 1ml محلول نترات فضة، وعدة قطرات من هيدروكسيد الأمونيوم حتى يتشكل راسب أبيض ينحل بمتابعة الإضافة. ثم توضع الأنابيب في حمام مائي ساخن لنحو 10 دقائق. فيلاحظ ظهور مرآة فضية على السطح الداخلي للأنابيب الثلاثة الأولى، وهي راسب معدن الفضة، بينما لايلاحظ ظهور المرآة الفضية في الأنبوب الحاوي على السكروز، لماذا؟

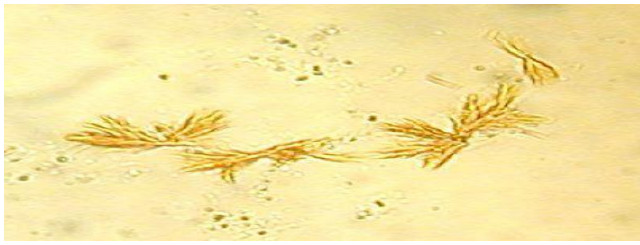
9-3-5 اختبار الأوسازون Osasone's Test

الهدف من الاختبار التمييز بين السكريات المختزلة الأحادية والثنائية من خلال شكل بلورات الأوسازون الناتج تحت المجهر، مع ملاحظة اختلاف الزمن اللازم لتشكل البلورات لكل منها.

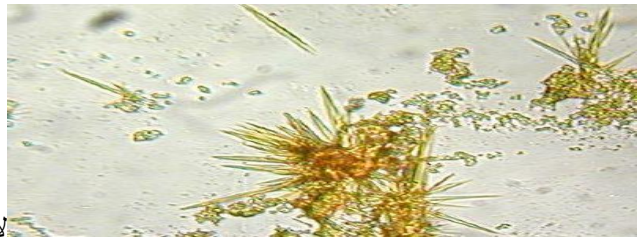
مبدأ الاختبار

تتفاعل الزمرة الكربونيلية الحرة (ألدهيدية أو كيتونية) الموجودة في السكريات المختزلة مع مركب فينيل هيدرازين Phenyl Hydrazine في وسط حمضي ضعيف، فينتج أولاً هيدرازون السكر المناظر القابل للذوبان، الذي يتفاعل مع جزيئتين جديدتين من فينيل هيدرازين لينتج الاوسازون Osazone المناظر، وهو على شكل نواتج بلورية صغيرة ذات درجة انصهار محددة، غير قابلة للذوبان في الماء البارد، يمكن رؤيتها تحت المجهر. تختلف البلورات حسب التوزع الفراغي لمجاميع الهيدروكسيل على جزيء السكر. يسمى الأوسازون الناتج تبعا لنوع السكر(غلوكواوسازون Glocoosazone ، رايبو اوسازون Raiboosazone ، أو لاكتواوسازون Lactoosazone). ويؤدي الزمن دوراً مهماً في تشكيل البلورات وذلك حسب نوع السكر المستخدم. فالسكريات الأحادية المختزلة تعطي رواسب عند درجة حرارة $100^{\circ}C$ خلال 20 دقيقة. أما السكريات الثنائية غير المختزلة فيمكن الحصول على أوسازوناتها بالتسخين عند C

100° لمدة 10–15 دقيقة ثم التبريد. أما السكروز فيعطي الأوسازون بعد نصف ساعة نتيجة التحلل التدريجي للسكروز إلى الغلوكوز والفركتوز، ولا تتكون اوسازوناتها عند التسخين لمدة 10–15 دقيقة ثم التبريد.



مالتواوسازون



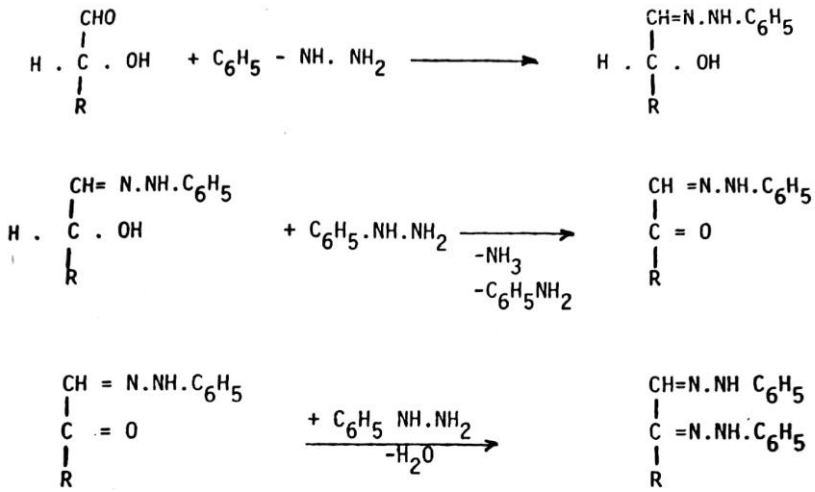
لاكتواوسازون

غلوكواوسازون

الشكل(9–11): أشكال بلورات الأوسازون.

يمكن التمييز مبدأياً بين ثلاثة أنواع من السكريات الأحادية والثنائية المختزلة وغير المختزلة، عن طريق ملاحظة الزمن اللازم لتكوين الأوسازون. وأيضاً يمكن التمييز بين السكريات بأشكال البلورات الناتجة. فالسكريات التي تختلف في المجموعات الذرية على ذرتي الكربون الأولى والثانية، وتتشابه في باقي المجموعات مثل الغلوكوز والفركتوز والمانوز فإنها تعطي أوسازونات ذات شكل مجهري واحد، ولكن الأول يتكون بعد أربع دقائق والثاني بعد دقيقتين والثالث بعد نصف دقيقة.

تبدو أشكال بلورات الغلوكواوسازون تحت المجهر على شكل إبر مجتمعة كالسنبلة، وبلورات الغالاكتواوسازون على شكل صفائح كالحراب مجتمعة حول مركز واحد. اللاكتواوسازون يبدو تحت المجهر بشكل دوائر حوافها مشتركة كالقنفذ، أما المالتواوسازون فإبره ذات شكل مثلثات قائمة الزاوية مجتمعة الرؤوس كالوردة. ينتج بالإضافة للأوسازون الأنيلين والنشادر وجزيئات الماء.



الشكل(9-12): مراحل تشكل الأوسازون.

مواد التجربة

- محاليل سكرية 2%.
- خلات الصوديوم على شكل بلورات.
- فينيل هيدرازين أو فينيل هيدرازين هيدروكلوريد. يجب الحذر والانتباه عند التعامل مع الفينيل هيدرازين لأنه مادة مسرطنة Carcinogenic.

طريقة العمل

ضع 3ml من محلول سكري (غلوكوز، فركتوز، مالتوز، سكروز) في أنبوب ثم أضف إليه باحتراس نحو نصف حجمه من كاشف فينيل هيدرازين هيدروكلوريد الممزوج مع خلات الصوديوم بنسبة 1:1 . رج المزيج وضعه في حمام بدرجة الغليان لمدة 30 دقيقة

مع التحريك، يتم إخراج الأنابيب وتبريدها، فيلاحظ تشكل بلورات الأوسازون الصفراء اللون. سجل زمن تشكل الراسب لكل أنبوب (عينة سكر). خذ عينة من بلورات الأوسازون المتشكلة على شريحة زجاجية وغطها بساتر وافحصها تحت المجهر.

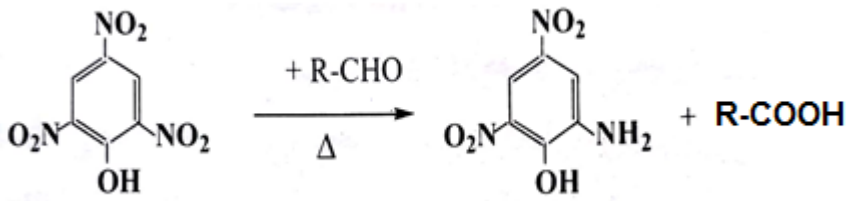
لاحظ أن سكر القصب (السكروز) لايعطي بلورات لغياب الهيدروكسيل الغلوكوزيدي القادر على التكاثف.

9-3-6 اختبار حمض البكريك Picric Acid's Test

الهدف من الاختبار الكشف عن السكريات المختزلة.

مبدأ الاختبار

تعمل السكريات المختزلة في الوسط القلوي على اختزال حمض البكريك (2,4,6- ثلاثي نترو فينول) ذي اللون الأصفر إلى حمض البيكراميك (2- أمينو 4,6-ثنائي نتروفينول) ذي اللون الأحمر.



2 -امينو 4-6 ثنائي نتروفينول حمض بكراميك

2، 4، 6 -ثلاثي نتروفينول حمض البيكريك

مواد التجربة

- محاليل سكرية مختلفة 2%.
- محلول كربونات الصوديوم 10%.
- محلول مشبع لحمض البيكريك.

طريقة العمل

يوضع في إنبوب اختبار 2ml من المحلول السكري ويضاف إليه 1ml من محلول مشبع من حمض البيكريك ثم تضاف عدة قطرات من محلول كربونات الصوديوم. تمزج محتويات الأنبوب ويوضع في حمام مائي، يلاحظ بعد عدة دقائق ظهور اللون المحمر، يدل على السكر المختزل.

4-9 اختبارات خاصة للتمييز بين أنواع السكريات

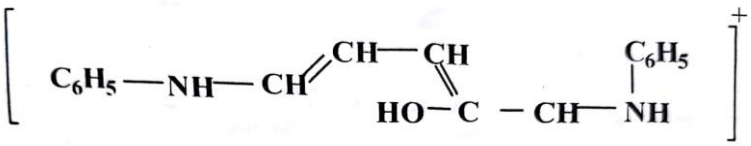
1- الاختبارات الخاصة بالسكريات الخماسية (البنتوزات)

a- اختبار خلات الأنيلين Aniline Acetate

الهدف من الاختبار التمييز بين السكريات الأحادية الخماسية (بنتوزات: رايبوز، أرابينوز، زايلوز ...) والسكريات الأحادية السداسية (هكسوزات: غلوكوز، فركتوز،...).

مبدأ الاختبار

يؤدي نزع الماء من السكريات الخماسية بتأثير الحموض المعدنية المركزة لتكوين الفورفورال الذي يتفاعل مع بعض الأمينات (خلات الأنيلين) مؤدية لتشكيل معقدات ذات لون أحمر كرزي. ويعد الفورفورال أسرع تطايراً من هيدروكسي ميتيل الفورفورال التي تعطية السكريات السداسية. وبذلك يمكن التمييز بين البينتوزات والهكسوزات.



الشكل(9-13): معقد أحمر كرزي ناتج من تحول سكر بنتوز بوجود حمض مركز مع الأنيلين.

مواد التجربة

- محاليل سكرية 2%.
- حمض كلور الماء المركز.

- ورق ترشيح.
- كاشف خلات الأنيلين: يحضر بإضافة 40ml حمض خل ثلجي إلى 100ml ماء مقطر ثم يضاف للناتج بعد الرج 60ml أنيلين.

طريقة العمل

يؤخذ نحو 2ml محلول سكري ويضاف إليه 1ml من محلول حمض كلور الماء المركز، يسخن في حمام مائي، مع وضع قطعة من ورق ترشيح مبللة بخلات الأنيلين على فوهة الأنبوب ونستمر في عملية الغليان حتى انطلاق أبخرة تلون ورقة الترشيح المبللة بخلات الأنيلين بلون أحمر كرزي. نلاحظ سرعة تلون ورقة الترشيح في الأنبوب الحاوي سكراً خماسياً بشكل أسرع من الأنبوب الحاوي سكراً سداسياً.

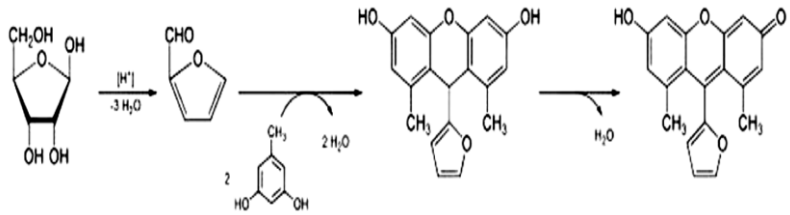
يمكن تسخين الأنبوب فوق اللهب مباشرة مع الرج وعندها يظهر اللون في وقت أسرع.

ملاحظات:

- يمكن للفركتوز أن يعطي نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار، وذلك لتكوين كمية قليلة من الفورفورال بالتسخين مع حمض كلور الماء.
- ينجح هذا الاختبار بسرعة مع البنتوزات وذلك لتكاثف الفورفورال بسهولة مع الأمينات العطرية.
- يمكن أن يلاحظ تلون الجدار الداخلي للأنبوب بلون أحمر ويكون هذا نتيجة لحدوث التفاعل التكثيفي لخلات الأنيلين المتساقطة من الورقة على جدار الأنبوبة.

b- اختبار بيال

الهدف من الاختبار تمييز البنتوزات من الهكسوزات.



بنتوز فورفورال اورسينول معقد أخضر غامق اللون

الشكل(9-14): تفاعل البنتوزات مع الفورفورال.

مبدأ الاختبار

تتحول السكريات الخماسية تحت تأثير حمض كلور الماء المركز إلى مركب الفورفورال الذي يتفاعل مع جزيئتين من الأورسينول (3,5–dihydroxytoluene) Orcinol بوجود أيونات الحديد فيعطي لوناً أخضر مزرقاً. ولكن في حال التسخين الطويل فإن الهكسوزات تعطي لوناً أخضراً غامقاً.

لذلك فإن هذا الاختبار يعتمد على سرعة ظهور اللون للتمييز بين البنتوزات والهكسوزات.

مواد التجربة

- محاليل سكرية 2%.
- كاشف بيال (محلول الاورسينول): يحضر بحل 0.25 g من الأورسينول في 125ml من حمض كلور الماء المركز ، ويضاف إلى هذا المحلول 1ml من كلور الحديد $FeCl_3$ 10%. يحفظ الكاشف في زجاجة عاتمة محكمة الإغلاق. تجدر الإشارة إلى أهمية تحضير هذا المحلول عند الحاجة إليه، لأنه يفسد بسرعة.

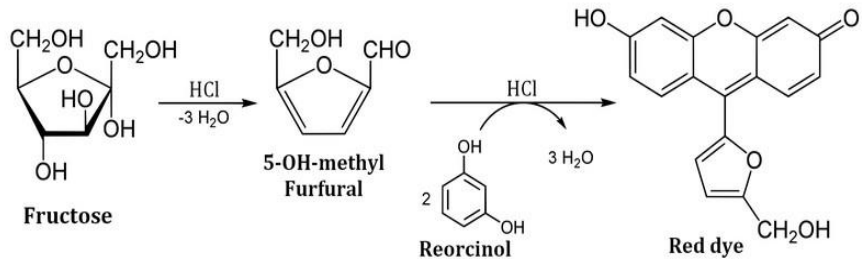
طريقة العمل

خذ 1ml من محلول سكري وأضف 2ml من كاشف بيال في أنبوب اختبار، امزج محتويات الأنبوب، ثم ضعه في حمام مائي لعدة دقائق فيظهر لون أخضر غامق في الأنبوب الذي يحوي السكر الخماسي.

2- لاختبارات الخاصة بالسكريات الكيتونية

ا- اختبار سيلفانوف Seliwanoanoff's Test

الهدف من الاختبار الكشف عن السكريات الحاوية مجموعة كيتونية حرة.



الشكل(9-15): تشكل معقد أحمر ناتج عن تفاعل السكر والريزورسينول

مبدأ الاختبار

يعتمد هذا الاختبار على تحويل السكر الكيتوني بالتسخين بوجود حمض كلور الماء إلى مركب هيدروكسي ميثيل فورفورال الذي يتكاثف مع Resorcinol (1,3-dihydroxy benzene) الريزورسينول مشكلاً مركباً معقداً ذا لون أحمر.

مواد التجربة

- محاليل سكرية 2%.
- كاشف سيلفانوف: يحضر بحل 0.5g من الريزورسينول في 100ml حمض كلور الماء 50%.

طريقة العمل

خذ 3ml من المحلول السكري، ثم أضف إليها 2ml من كاشف سيلفانوف وسخن على اللهب المباشر حتى الغليان. لاحظ تشكل لون أحمر دليل وجود سكر كيتوني.

ملاحظات:

- يعطي السكروز نتيجة إيجابية، بسبب تأثير حمض كلور الماء فيه وتفككه إلى مكونيه الغلوكوز والفركتوز.
- لايزيد زمن التسخين عن 30 ثانية.
- تنفصل أحياناً رواسب لونها يتدرج من الأحمر إلى البني تذوب في الكحول، فبإضافة كمية من الكحول إلى مزيج التفاعل يزيد من كثافة اللون الأحمر.
- يجب ألا يزيد تركيز السكر عن 2%.

اختبار آخر للسكريات الكيتونية: خذ في أنبوب اختبار 2ml من المحلول السكري وأضف إليه 2ml حمض كلور ماء كثيفاً . اغل بحذر شديد ولاحظ تشكل معقد برتقالي يدل على وجود سكر كيتوني.

ب- اختبار تاوبر للكيتونات Tauber's Test

الهدف من الاختبار تمييز السكريات الكيتونية عن الألدهيدية.

مبدأ الاختبار

تتفاعل السكريات الكيتونية مع مركب الأمينوغوانيدين Aminoguanidine فتعطي لوناً بنفسجياً محمراً زاهياً خلال دقيقة واحدة ويستمر التفاعل لساعات عدة. ويعد هذا الاختبار حساساً جداً ومميزاً للسكريات الكيتونية (الفركتوز). يمكن الكشف بوساطة هذا الاختبار عن الفركتوز بكميات صغيرة جدا 0.5%. ومن أهم مميزات الاختبار عدم تداخل السكريات الألدهيدية حتى بتراكيز أعلى من 1%. أما التراكيز المرتفعة فإنها تعطي نتيجة موجبة، لذلك لابد من ضبط تركيز المحاليل المختبرة بحدود 0.5-1% . لا يتكون لون مع الألدوزات الخماسية والنشا والغليكوجين والبروتينات المرتبطة أو الفورم ألدهيد. يعطي هذا الاختبار نتيجة إيجابية لكل من السكروز والإينولين وغيرها من السكريات العديدة المحتوية في تركيبها الفركتوز.

مواد التجربة

- محاليل سكرية 1% (غلوكوز، فركتوز، سكروز)
- مركب أمينوغوانيدين: يحضر بتركيز 2.5% في الماء المقطر.
- حمض كبريت مركز.

طريقة العمل

يوضع 1ml من حمض الكبريت المركز في أنبوب اختبار نظيف وجاف، ثم يضاف إليه دون خلط 0.2ml محلول كبريتات المينوغوانيدين، ثم يضاف إليه 0.2ml من محلول سكري، يتم الخلط جيداً. في حال وجود سكريات كيتونية (سواء حرة أم مرتبطة) أم المركبات التي تعطي بالتحلل المائي هذه السكريات يتكون لون بنفسجي محمر زاه خلال دقيقة واحدة.

9-5 اختبارات أخرى

9-5-1 اختبار حمض الميوسيك Music Acid 's Test

الهدف من الاختبار التمييز بين سكر الغالاكتوز واللاكتوز من ناحية وباقي السكريات المختزلة من ناحية أخرى.

مبدأ الاختبار

بتسخين السكريات الأحادية مع الآزوت الكثيف تتكون حموض ثنائية الكربوكسيل تذوب بالمحلول بينما نجد أن تسخين محلول الغالاكتوز مع حمض الآزوت المركز يتكون حمض الميوسيك الذي لايذوب بل يترسب في قعر الأنبوب.

مواد التجربة

- محاليل سكرية 2% (غلوكوز، غالاكتوز، لاكتوز، سكروز).
- حمض الآزوت المركز 50%.

طريقة العمل

خذ في أنبوب اختبار 1ml من محلول الغلوكوز الكثيف وفي أنبوب آخر 1ml من محلول الغالاكتوز الكثيف.

أضف لكل أنبوب 1ml من حمض الآزوت المركز. سخن في حمام مائي لمدة ساعة ونصف ، ثم أضف لكل أنبوب 5ml ماء. اترك الأنابيب طوال الليل، وفي الصباح ستلاحظ وجود رواسب في الأنبوب الحاوي محلول الغالاكتوز. يعطي اللاكتوز نتيجة إيجابية لتحلله أولاً إلى الغالاكتوز إلى حمض الميوسيك.

9-5-2 اختبار الكشف عن غش عسل النحل

الهدف من الاختبار الكشف عن غش عسل النحل بالسكر المحول.

مبدأ الاختبار

يغش عسل النحل بإضافة السكر المحول بالحمض إذ ينتج عن هذا التحويل مركبات الفورفوال التي تتفاعل مع كاشف الريزورسينول لتعطي مركبات معقدة ملونة.

مواد التجربة

كاشف الريزورسينول: ويحضر بإذابة 1g ريزورسينول نقي في 100ml حمض كلور الماء كثافته $1.18g/cm^3$

طريقة العمل

يذاب 2g عسل نحل في 10ml ماء ويستخلص بالغسيل بالإيثر. ثم تؤخذ طبقة الإيثر وتركز إلى 5ml في أنبوب اختبار، ثم يضاف إليها 3ml من كاشف الريزورسينول حديث التحضير.

يرج ويلاحظ اللون المتكون، فإذا ظهر لون أحمر كرزي خلال دقيقة يدل على وجود سكر محول تجاري. ظهور اللون الأصفر يدل على أن النتيجة سلبية. يجرى هذا الاختبار على البارد.

9-5-3 اختبار الكشف عن السكروز

الهدف من الاختبار تمييز السكروز من السكريات الثنائية الأخرى.

مبدأ الاختبار

يعتمد هذا الاختبار على تفاعل السكروز مع كبريتات الكوبالت $CoSO_4$ في وسط قلوي، فيتكون لون بنفسجي في حال وجود السكروز.

مواد التجربة

- محاليل سكرية 2% (سكروز، لاكتوز، مالتوز).
- محلول كبريتات الكوبالت 2%.
- محلول هيدروكسيد الصوديوم أو البوتاسيوم 5%.

طريقة العمل

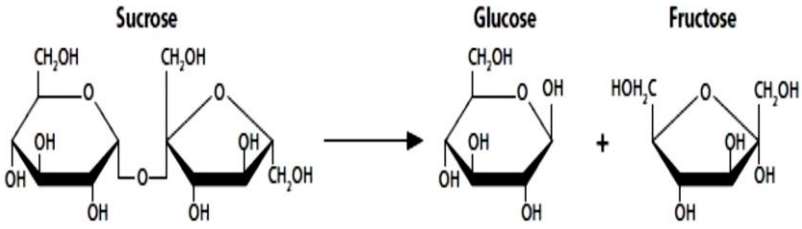
خذ 2ml محلولاً سكرياً في أنبوب اختبار، أضف إليه 1ml محلول هيدروكسيد الصوديوم ثم بضع قطرات من محلول الكوبالت، امزج جيداً، تشكل لون بنفسجي يشير إلى وجود السكروز.

9-5-4 اختبار الحلمهة الحمضية للسكروز

الهدف من التجربة تحديد مكونات السكروز بعد التحلل المائي.

مبدأ الاختبار

السكروز سكر ثنائي غير مختزل ولكن بتسخين محلوله مع حمض معدني قوي يتفكك السكروز ويتحرر جزيء غلوكوز وجزيء فركتوز ويصبح المحلول بعدها مختزلاً. باستخدام اختبارات الاختزل السابقة (فهلنغ، وبندكت...) يمكن الكشف عن نواتج الحلمهة.



الشكل(9–16): حلمهة السكروز إلى الغلوكوز والغركتوز.

مواد التجربة

- حمض كلور الماء المركز.
- هيدروكسيد الصوديوم 10%.
- كواشف خاصة (فهلنغ، بندكت، بارفويد،...)

طريقة العمل

نأخذ أنبوبي اختبار ونضع:

في الأنبوب الأول: 2ml كاشف فهلنغ + 2ml محلول سكروز.

وفي الأنبوب الثاني: 2ml محلول سكروز + 0.5ml من HCl .

سخن الأنبوب الثاني في حمام مائي لمدة ربع ساعة، ثم أضف للأنبوب الأول 0.5ml محلول هيدروكسيد الصوديوم، ثم أضف إليه 2ml محلول فهلنغ ، وسخن الأنبوبين في حمام مائي لمدة ثلاث دقائق ولاحظ النتيجة. علل النتائج؟

9-5-5 اختبار الحلمهة الانزيمية للسكروز

الهدف من الاختبار تحديد مكونات السكروز بعد التحلل الإنزيمي.

مبدأ الاختبار

بوساطة خميرة السكراز Sucrase (انزيم بيتا – فركتوبيرانوسيداز) تتفكك الرابطة الغليكوزيدية ويتحرر الغلوكوز والفركتوز. خميرة السكراز توجد في خميرة الخبز العادية.

مواد التجربة

- خميرة العجين (أمصدر إنزيمياً).
- محلول سكروز 2%.
- الكواشف الخاصة فهلنغ، بندكت، وسيلفانوف...

طريقة العمل

تذاب كمية من الخميرة في الماء. ثم يؤخذ منها 3ml في أنبوبي اختبار. أحدهما نتركه في درجة حرارة الغرفة والثاني نسخنه على النار حتى الغليان ثم نبرده. ثم نضيف إلى كل من الأنبوبين 3ml من محلول السكروز. ونتركه بحرارة الغرفة لمدة ربع ساعة. رشح محتويات الأنبوبين. نأخذ 3ml من رشاحة كل من الأنبوبين. ونضيف إليها 3ml من كاشف بندكت ونضع الأنبوبين في حمام مائي يغلي وبعد خمس دقائق نسجل النتائج.

9-6 اختبارات السكريات العديدة Polysaccharides

تحتوي افراد هذه المجموعة من السكريات عددا كبيرا من جزيئات السكر الأحادي وهي لاتذوب بالماء وليس لها طعم حلو ولا رائحة مميزة بل تشكل محلولاً غروياً بالماء الساخن. ويجب أن نتذكر أن جميع السكريات العديدة تعطي نتيجة موجبة في اختبار موليش.

من أهم السكريات العديدة:

1- **النشا Starch**: وهو مخزون الكربوهيدرات في النباتات، تتكون وحدات النشا من اتحاد جزيئات D-غلوكوز. ويتألف النشا من نوعين: الأميلوز Amylose ويشكل 10%-20% والأميلوبكتين ويشكل 80%-90%.

يتألف الأميلوز من سلاسل مستقيمة من الفا D-غلوكوز مرتبطة ببعضها بين ذرات الكربون 1,4 وينحل الأميلوز بالماء الساخن.

أما الأميلوبكتين Amylopectin فهو يتألف من الفا D-غلوكوز مرتبطة بذرات الكربون ببعضها بطريقتين 1,4 والنوع الآخر 1,6 التي تشكل سلاسل متفرعة، ويشكل الأميلوبكتين مع الماء الساخن محلولاً صمغياً (هلامياً).

2- **الغليكوجين Glycogen** : يوجد في كبد وعضلات الإنسان والحيوان، ويتألف من الفا D-غلوكوز على شكل سلاسل مستقيمة ، وأخرى كثيرة متفرعة.

3- **السيللوزCellulose**: يشكل السيللوز جدر الخلايا في النباتات جميعها، وهو واسع الانتشار في الطبيعة. ويتألف من وحدات بيتا غلوكوز، وتكون الروابط بين ذرات الكربون 1,4 . ولا ينحل السيللوز بالماء نهائياً ولا يتاثر بالخمائر الموجودة في جهاز هضم الإنسان بعكس الحيوانات التي تحلل السيللوز لوجود بكتيريا في جهاز الهضم.

4- **الانيولين Inulin**: يوجد في الجذور وأجزاء النباتات الأخرى، وهو يتألف من بيتا D-غلوكوز على شكل سلاسل مستقيمة، وأخرى كثيرة التفرع.

9-6-1 اختبار الحلمهة الحمضية للسيللوز

الهدف من الاختبار حلمهة حمضية للسيللوز لتحلله إلى وحداته الأساسية (الغلوكوز).

مبدأ الاختبار

ارتباط وحدات D-β -غلوكوز تكون جزيء السيللوز، الذي لايبدي خواص اختزالية في حين تتمتع نواتج الحلمهة (الغلوكوز) بالخواص الاختزالية.

مواد التجربة

- قطن طبي أو ورق ترشيح.
- حمض كبريت 50%.
- هيدروكسيد الأمونيوم.
- كاشف فهلنغ.

طريقة العمل

توضع كمية من القطن في كأس زجاجي ويضاف إليها 50ml حمض الكبريت. وتسخن في حمام مائي مدة ساعة خلالها يتحلل السيللوز إلى وحدات البناء الأساسية ألا وهي الغلوكوز. ثم تجرى تجربة فهلنغ على نواتج تحلل كل من السيللوز، ونواتج تحلله بعد تعديل الوسط بإضافة هيدروكسيد الأمونيوم بوساطة عباد الشمس.

9-6-2 اختبار اليود ، النشا

الهدف من الاختبار دراسة خصائص النشا.

مبدأ الاختبار

تتوضع جزيئات اليود ضمن لفات حلزون الأميلوز فتمتص معظم موجات الضوء المرئي عدا الأزرق منها فيظهر اللون الأزرق لمعقد النشا واليود. اما الديكسترينات والأميلوبكتين والغليكوجين فإنها تعطي ألواناً بنية في حين لاتعطي السكريات الأحادية والثنائية أي لون مميز.

يزول اللون الأزرق لمعقد نشاء–يود عند التسخين لأن سلسلة الأميلوز تنفرد ويبتعد اليود عنها، ويعود اللون ثانية بالتبريد.

وعند إضافة هيدروكسيد الصوديوم يختفي اللون الأزرق بسبب ارتباط اليود بالصوديوم مكوناً يودات الصوديوم وهيبويوديد الصوديوم وهذه النواتج لاتعطي لون أزرق مع اليود:

$$6NaOH + 3I_2 \rightarrow 5NaI + NaIO_3 + 3H_2O$$

وعند معادلة الوسط القلوي بحمض كلور الماء عندها تتفاعل المركبات السابقة مع حمض كلور الماء فيتحرر اليود من جديد ويتوضع ضمن لفات الأميلوز فيعود اللون الأزرق مرة ثانية.

لاحظ أن النشا لايعطي الاختبارات الاختزالية (فهلنغ، بندكت، وتولنز...) نظراً لضخامة جزيئته على الرغم من احتوائه الوظيفة الاختزالة في نهاية السلسلة. ولكن هذه الخواص تظهر بعد إجراء الحلمهة الكيميائية أو الإنزيمية، فيتحلل النشا إلى ديكسترينات ثم إلى مالتوز وأخيرا يعطي الغلوكوز.

مواد التجربة

- محاليل سكرية: سكروز 2%، غليكوجين 2%، وديكسترين 2%.
- حمض كلور الماء 20%.
- هيدروكسيد الصوديوم 5%.
- محلول اليود البوتاسي KI: يحضر بإضافة كمية ماء مقطر إلى 2g يود بوتاسي. ثم يحل في هذا المحلول 1g من اليود ، يكمل الحجم بالماء المقطر إلى 100ml.
- محلول النشا1%: يحضر بخلط 1g نشاء مع 10ml ماء مقطر بارد حتى الحصول على محلول معلق. ثم يضاف 80ml ماء مع التحريك والتسخين حتى الغليان بالاستمرار لمدة 5 دقائق حتى الحصول على محلول رائق نترك المحلول يبرد ونكمل الحجم إلى 100ml ماء.

طريقة العمل

يوضع في أنبوب اختبار 2ml من محلول النشا ، ثم يضاف قطرة من اليود البوتاسي فيلاحظ لون أزرق غامق.

سخن الأنبوب نلاحظ اختفاء اللون.

برد الأنبوب تحت صنبور الماء ، نلاحظ عودة اللون الأزرق. فسر ذلك.

أضف نقطتين من محلول هيدروكسيد الصوديوم، نلاحظ اختفاء اللون ثانية.

أضف نقطتين من حمض كلور الماء ، يعود اللون من جديد. ناقش تغير اللون.

خذ ثلاثة أنابيب اختبار وضع في كل منها غليكوجين وسكروز وديكسترين.

أضف إلى كل أنبوب عدة قطرات من محلول اليود على البارد يتغير لون المحلول في الغليكوجين إلى أحمر بنفسجي، وفي السكروز إلى أصفر فاتح(لون اليود)، وفي الديكسترين إلى بني محمر (بنفسجي).

حلمهة النشا

الهدف من الاختبار حلمهة النشا بالحمض إلى وحداته الأساسية (D–غلوكوز) أو مع الانزيمات (الأميلاز) يعطي النشا سكر المالتوز.

مواد التجربة

- محلول النشا 2%.
- محلول حمض كلور الماء 20%.
- هيدروكسيد الصوديوم 5%.
- كاشف فهلنغ.
- خميرة الأميلاز أو اللعاب عن طريق المضمضة في كأس زجاجي في ماء دافئ.

هناك طريقتين لحلمهة النشا:

a) الحلمهة الحمضية بوساطة حمض كلور الماء

مبدأ الاختبار

حمض كلور الماء يفكك الروابط الغليكوزيدية بين جزيئات الغلوكوز في النشا بالتسخين، وبهذا يتحرر الغلوكوز.

طريقة العمل

خذ في أنبوب اختبار 5ml من محلول النشا. أضف إليه 0.5 ml من حمض كلور الماء المركز. وخذ في أنبوب آخر 5ml من محلول النشا. سخن في حمام مائي نحو ربع ساعة ثم برد الأنبوبين. أضف لكل أنبوب لكل أنبوب 5ml من محلول فهلنغ بعد تعديل حموضة الأنبوب الذي أضيف إليه HCl.

سخن الأنبوبين في حمام مائي ولاحظ تشكل راسب أحمر في الأنبوب المضاف له HCl بينما لايظهر أي راسب في الأنبوب الآخر. علل ذلك.

b) الحلمهة الانزيمية بوساطة انزيم الأميلاز

انزيم الأميلاز تفكك النشا إلى المالتوز

طريقة العمل

خذ في أنبوب اختبار 5ml من محلول النشا ، وأضف إليها 1ml محلول اللعاب. سخن في حمام مائي نحو ربع ساعة. ثم خذ 2ml من الأنبوب وإجر تجربة اليود، والباقي إجر عليه اختبار فهلنغ . سجل ملاحظاتك.

9-6-3 حلمهة الغليكوجين Glycogen Hydrolysis

الهدف من الاختبار الحصول على الغلوكوز بحلمهة الغليكوجين.

مبدأ التجربة

حمض كلور الماء يفكك الغليكوجين بالتسخين إلى الجزيئات المشكلة له وهي الغلوكوز.

طريقة العمل

نسخن 5ml من محلول الغليكوجين في الاختبار السابق مع 3ml حمض كلور الماء المركز نحو ربع ساعة، عدل الحموضة بإضافة هيدروكسيد الصوديوم ثم إجر تجربة اليود، واختبار فهلنغ. ناقش النتائج.

9-7 الاختبارات الفيزيائية، اختبارات الترسيب Soluting Out

9-7-1 اختبار خلات الرصاص القاعدية للنشاء

الهدف من الاختبار هو تمييز النشا عن الديكسترين.

تتكون الديكسترنات بوصفها نواتج وسطية في أثناء التحلل المائي بوساطة الحموض أو الإنزيمات أو المعاملات الحرارية المختلفة. والديكسترينات لها طبيعة غروية، وتذوب في الماء بسهولة. وتعطي مع اليود ألواناً تختلف حسب الوزن الجزيئي. وتتحلل الديكسترينات مائياً بفعل الحموض والإنزيمات إلى مالتوز وغلوكوز.

مبدأ الاختبار

خلات الرصاص القاعدية ترسب النشا. في حين لايلاحظ حدوث ترسيب مع الديكسترين.

مواد التجربة

- خلات الرصاص القاعدية
- محلول النشا (محضر سابقا).
- محلول الديكسترين.

طريقة العمل

يضاف 1ml من محلول خلات الرصاص القاعدية إلى 3ml محلول النشا. نلاحظ ترسب النشا في أسفل الأنبوب. تكرر التجربة مع محلول الديكسترين فلا نلاحظ ترسبه.

9-7-2 الترسيب بوساطة الكحول

خذ في أنبوب اختبار 3ml من محلول النشا ، ثم أضف إليها 3ml من الكحول، كرر الاختبار مستخدماً الديكسترين، الغليكوجين. سجل ملاحظاتك.

9-7-3 الترسيب بوساطة كبريتات الأمونيوم

i. الترسيب بالإشباع الكامل

خذ في أنبوب اختبار 5ml من محلول النشا ، وأضف إليها بلورات من كبريتات الأمونيوم، امزجها جيداً حتى يتكون عندك محلول مشبع مع كبريتات الأمونيوم، رشح وخذ الرشاحة وأجرِ عليها الاختبارات الآتية:

اختبار فهلنغ، واختبار اليود، دون ملاحظاتك ثم كرر التجربة على الديكسترين ثم الغليكوجين.

ii. الترسيب بالإشباع النصفي

خذ في أنبوب اختبار 5ml من محلول النشا ، وأضف إليها 5ml من محلول كبريتات الأمونيوم المشبعة. رشح وإجر اختبار اليود على الرشاحة، كرر التجربة مستعملاً محلول الديكسترين، ثم الغليكوجين. سجل ملاحظاتك.

الفصل العاشر

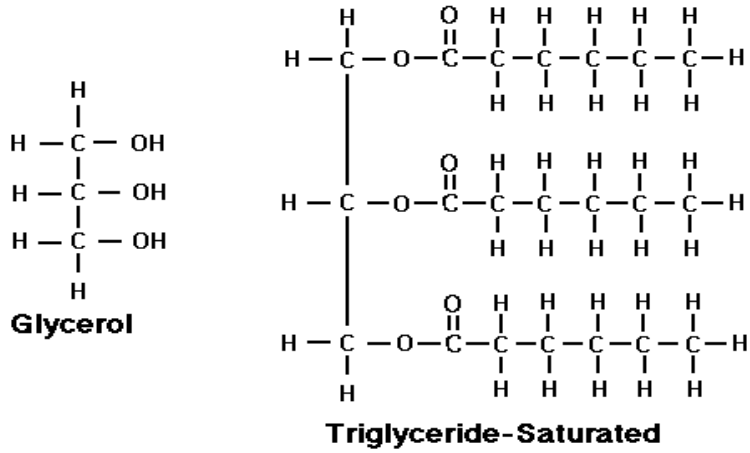
اختبارات الليبيدات Lipid Tests

الليبيدات مركبات عضوية نباتية أو حيوانية تتركب من العناصر الأساسية الكربون، الهيدروجين، والأكسجين. وهذه المركبات لها صفات مشتركة في عدم قابليتها للذوبان بالماء، ولكن تذوب بمواد عضوية تسمى المذيبات (المحلات) العضوية، مثل الإيثر الايثيلي، الكلووفورم، الإيثر البترولي، ورابع كلور الكربون. وتشمل الليبيدات كلاً من الدهون والزيوت والشموع وبعض المركبات الأخرى المشتقة.

تتكون الزيوت والدهون الغذائية أساساً من استرات ثلاثية للغليسيرول مع الحموض الدهنية أو مايعرف بالغليسيريدات الثلاثية. تختلف هذه الغليسيريدات فيما بينها تبعاً لأنواع الحموض الدهنية الداخلة في تركيبها، فالزيوت سائلة عند درجات الحرارة العادية نتيجة لإرتفاع محتواها من الحموض الدهنية غير المشبعة، وهذه الحموض ذات درجة انصهار منخفضة، بينما ترتفع نسبة الحموض الدهنية المشبعة في الدهون مما يؤدي إلى ارتفاع درجة انصهارها وصلابتها عند درجة الحرارة العادية.

أكثر الحموض الدهنية المشبعة انتشاراً في الطبيعة حمض البالميتيك $C_{15}H_{31}COOH$ وحمض ستياريك $C_{17}H_{35}COOH$. أما أكثر الحموض الدهنية غير المشبعة انتشاراً فهي حمض أولييك 9 cis 18:1 الذي يحتوي رابطة زوجية من نوع cis بين ذرتي الكربون 9 و 10؛ اللينوليك 9,12 cis 18:2 الحاوي على رابطتين زوجيتين والذي يعد من الحموض الدهنية الضرورية التي لاتستطيع الحيوانات تصنيعها. تتحلل الغليسيريدات الثلاثية مائياً بالحرارة في وسط حمضي فتنتج الحموض الدهنية والغليسيرول الشكل (10–1) ، وفي وسط قلوي تنتج الصابون

والغليسيرول. كما تتفاعل الغليسيريدات غير المشبعة مع الهالوجينات كالبروم أو اليود في مواضع الروابط الزوجية فيستدل من كمية الهالوجين المتفاعل على درجة عدم الاشباع.



الشكل(10-1): الغليسيريدات، الغليسيرول

10-1 اختبار الذوبان

الهدف من الاختبار دراسة ذوبان بعض المواد الدسمة.

مبدأ الاختبار

تذوب الليبيدات في المذيبات العضوية كالايثر والكلوروفورم والكحول والأسيتون ولكنها لاتذوب بالماء. وعلى الرغم من وجود بعض الليبيدات التي لا تذوب في جميع المذيبات العضوية (تترسب الفوسفوليبيدات بالأسيتون)، ووجود مركبات غير ليبيدية قابلة للذوبان في المذيبات العضوية، فإن الذوبان يبقى المقياس الأكثر استعمالاً لتمييز الليبيدات من غيرها من المركبات.

مواد التجربة

- مذيبات عضوية بنزن، كلوروفورم، اسيتون...
- زيت نباتي، سمن حيواني، حمض ستياريك، وحمض الأوليبك.

طريقة العمل

يجرى اختبار الذوبان بوضع بضع نقاط من المادة المراد اختبارها. أو نحو 0.25g إذا كانت المادة صلبة في أنبوب اختبار وإضافة 2–3ml من الماء أو المذيب العضوي إليها. يرج المزيج وتلاحظ النتيجة.

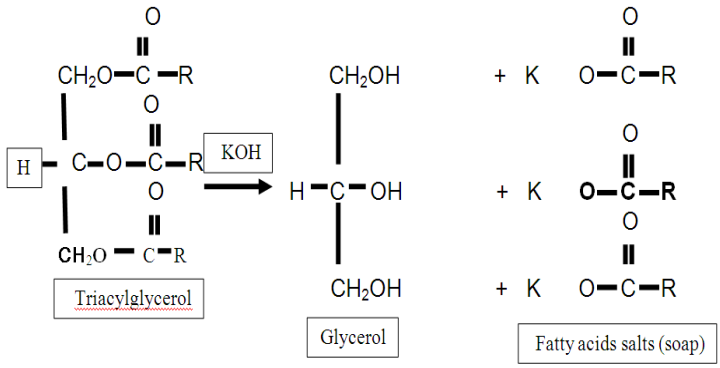
إجر اختبار الذوبان في كل من الماء والكحول والكلوروفورم للمواد الآتية: زيت نباتي، سمن حيواني. حمض ستياريك، حمض أوليك.

2–10 اختبار التصبن Saponification test

الهدف من الاختبار هو تكوين الصابون.

مبدأ الاختبار

التصبن هو عملية تحليل الزيوت أو الدهن مائيا في وسط قلوي، وينتج عن ذلك غليسرول وأملاح الأحماض الدهنية (الصابون Soap) الشكل(10–2).



الشكل(10–2): تشكل الصابون

مواد التجربة

- زيت نباتي أو دهن حيواني.
- هيدروكسيد الصوديوم الكحولية 10%.
- محلول مشبع من كلوريد الصوديوم: يحضر بحل 50g من كلوريد الصوديوم في 150ml ماء مقطراً.
- محلول كلوريد الكالسيوم 10%.
- حمض كلور الماء المركز.

طريقة العمل

1) ضع في أنبوب اختبار 0.5ml من الدسم . أضف 5ml من محلول هيدروكسيد الصوديوم الكحولية. امزج جيداً.
2) ضع في حمام مائي بدرجة الغليان نحو 10 دقائق (حتى التاكد من تمام التصبن ونستدل على ذلك باختفاء قطرات الزيت كلها. تؤدي هذه العملية لتشكيل مستحلب من الصابون وانفراد الغليسيرول. نبرد الأنبوب فيتصلب الصابون.
3) استخرج الصابون بإضافة كمية من محلول كلوريد الصوديوم المشبع في الأنبوب فيرتفع الصابون للأعلى. الصابون الصوديومي غير ذواب في المحلول الملحي لكلوريد الصوديوم المشبع. ضع الصابون على ورقة ترشيح.
4) خذ قليلاً من الصابون وأضف إليه نحو ضعفه ماء مقطراً. رج المزيج مع التسخين اللطيف على اللهب، ولاحظ تشكل الرغوة كثيفة . برد المحلول وإجر عليه التجارب الآتية:

a- خذ نحو 2ml في أنبوب آخر وأضف إليه بضع نقاط من محلول HCl حتى يصبح المحلول حامضياً، سخن قليلاً ثم اتركه مدة من الزمن، فتلاحظ انفصال الحموض الدهنية على شكل عكارة أو طبقة زيتية أعلى المحلول وقد تتجمد الحموض الدهنية بالتبريد.

b- خذ نحو 2ml من محلول الصابون وأضف إليه نقاط من محلول كلوريد الكالسيوم 10%، لاحظ ترسب الصابون الكالسيومي غير الذواب.

c- خذ جزءاً آخر من محلول الصابون في أنبوب اختبار وأشبعه بكلوريد الصوديوم (يفضل أن يكون على شكل بودرة ناعمة) حتى ظهور كلوريد على شكل راسب فنلاحظ انفصال الصابون على السطح مما يسهل فصله. تسمى هذه الظاهرة بعملية التمليح المرسب Salting out. بهذه الطريقة المبسطة يفصل الصابون صناعياً.

يمكن استخدام عملية التصبن في فصل المواد القابلة للتصبن عن المواد غير القابلة للتصبن (التي توجد ذائبة في الليبيدات) .

اختبار مبسط في التصبن

مواد التجربة

- زيت أو دهن.
- كحول 95%.
- هيدروكسيد الصوديوم أو هيدروكسيد البوتاسيوم 5N.
- كلوريد الكالسيوم 5%.
- كلوريد الصوديوم المشبع.

طريقة العمل

خذ في بيشر 1ml زيتاً ، وأضف إليها 20ml كحولاً 95%، و10ml من هيدروكسيد الصوديوم أو هيدروكسيد البوتاسيوم 5N.

سخن البيشر فوق لهب خفيف وحرك محتوياته باستمرار قرابة ربع ساعة حتى تزول حبيبات الدهن ويصبح المحلول قاتماً وتظهر رغوة على سطح المزيج. لاحظ تشكل الرغوة وانفصال الصابون على السطح وتجمده.

خذ قطعة من الصابون الذي تجمد وأذبها في ماء التسخين.

خذ 5ml من محلول الصابون الذي حصلت عليه ، أضف إليه 3ml كلوريد الكالسيوم 5%. لاحظ ترسب صابون الكالسيوم الذي لايذوب.

خذ 5ml من محلول الصابون ثم أضف إليه 5ml من محلول مشبع من كلوريد الصوديوم ولاحظ ترسب الصابون.

10-3 تعيين ثوابت الزيوت أو الدهون

10-3-1 تقدير الرقم الحمضي Acidic Number

الرقم الحمضي Acid number هو الكمية اللازمة من هيدروكسيد البوتاسيوم (بوحدة mg) اللازمة لمعادلة الحموض الدهنية الحرة الموجودة في غرام من العينة.

مبدأ الاختبار

تحتوي الزيوت والدهون بعض الحموض الدهنية التي يمكن أن تقدر بالمعايرة مع محلول قلوي (هيدروكسيد البوتاسيوم أو هيدروكسيد الصوديوم) قياسي بوجود دليل الفينول فتالين. يدل الرقم الحمضي على مدى التحلل المائي للزيت أو الدهن وهذا مايحدث عند نشاط انزيم الليباز أو عند تخزين الزيت غير مناسبة من الرطوبة والحرارة وتوفر العوامل المؤكسدة مما يؤدي إلى انفراد الحموض الدهنية الحرة، وهو يتناسب عكساً مع جودة الزيت. ويستخدم في تدريج تصنيف درجات جودةالزيوت حسب نسبة الحموض الدهنية الحرة ، كما هو الحال في زيت الزيتون.

مواد التجربة

- مواد دسمة: زيت زيتون، زيت دوار الشمس. زيت ذرة...
- كحول متعادل: ويحضر بمعادلة الكحول 95% باستخدام هيدروكسيد البوتاسيوم 0.1N بوجود دليل الفينول فتالين حتى الحصول على لون زهري.
- هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولية 0.1N : يحضر بإذابة 5.61g من هيدروكسيد البوتاسيوم النقية في قليل من الماء، ويمدد بالايتانول حتى 1000ml.
- كاشف الفينول فتالئين 1%.

طريقة العمل

- توزن كمية من المادة الدسمة تقدر بنحو 3g ، ثم توضع في أرلينة سعة 250ml.
- يضاف 25ml من الكحول المتعادل، ثم يسخن المزيج في حمام مائي وتخلط محتويات الارلينة جيداً ويدفأ المزيج. ثم تضاف عدة نقاط من دليل الفينول فتائين.
- تعاير محتويات الارلينة بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولية 0.1N مع الرج الشديد خلال المعايرة حتى نقطة التعادل (يدوم اللون القرنفلي مدة 30 ثانية).
- الحسابات: يحسب الرقم الحمضي باستخدام المعادلة:

$$\text{الرقم الحمضي} = \frac{NV \times 56.1}{w} \quad (\text{mg KOH /g})$$

حيث N نظامية KOH V حجم KOH

56.1 الوزن الجزيئي لـ KOH ، W وزن العينة من الدسم.

الجدول (10-1): يصنف زيت الزيتون على أساس النسبة المئوية لحموضة الزيت

النسبة المئوية للحموض الدسمة الحرة	نوع زيت الزيتون
0-0.8	ممتاز
0.8-1	نوع أول
1-2	نوع ثان
2-3	نوع ثالث
فوق 3	صناعي

كما يعبر عن حموضة الزيت بطريقة أخرى وهي النسبة المئوية للحموض الدهنية الحرة مقدرة كحمض أولييك، فتحسب على أساس أن عدد ميللي مكافئات هيدروكسيد البوتاسيوم اللازمة لتعديل حموضة 100g دسم وهو نفسه عدد ميللي مكافئات حمض الاولييك. والميللي مكافئ الواحد من حمض الاولييك = 0.282g . بذلك فإن النسبة المئوية للحموض الدسمة مقدرة كحمض اولييك (حمض الزيت) تحسب وفق المعادلة:

النسبة المئوية للحموض الدسمة مقدرة كحمض اولييك= $\frac{NV\text{x}0.282}{w}$

اختبار مبسط

يؤخذ أنبوبا اختبار، يوضع في الأول زيت حديث الإنتاج وفي الثاني زيت قديم. ثم يضاف إلى كل من الأنبوبين 3ml من مذيب عضوي. ثم يضاف بضع نقاط من دليل الفينول فتالين. ثم تعادل الحموض الدسمة الحرة بمحلول ممدد من هيدروكسيد الصوديوم أو هيدروكسيد البوتاسيوم. فنلاحظ أن الأنبوب الذي يحتوي زيتا قديما يستهلك كمية أكبر من القلوي بالمقارنة مع ذلك الذي يحتوي زيتا حديثا. مما يدل على وجود نسبة أكبر من الحموض الدسمة الحرة في الزيت القديم. تستخدم هذه الطريقة في اختبار التزنخ التحللي.

10-3-2 تعيين رقم التصبن Saponification Number

رقم التصبن هو كمية هيدروكسيد البوتاسيوم بوحدة mg اللازمة لتصبن الحموض الدسمة الموجودة في 1g من المادة الدسمة سواء كانت هذه الحموض حرة أو مرتبطة.

مبدأ الاختبار

تتحلل الغليسيريدات مائياً بفعل هيدروكسيد البوتاسيوم إلى أملاح البوتاسيوم للحموض الدسمة (أو مايعرف بالصابون) والغليسيرول. وتكون الحموض الدسمة ذات الوزن الجزيئي الكبير ذات رقم تصبن منخفض. أي هناك تناسب عكسي بين رقم التصبن والأوزان الجزيئية للحموض الدهنية الموجودة في العينة.

يجري تقدير رقم التصبن بتسخين وزن معلوم من المادة الدسمة مع حجم معين من KOH الكحولية (لأن الليبيدات لاتذوب في المحاليل المائية). ويؤخذ حجم مماثل من القلوي لاستخدامه شاهدا. بعد اتمام عملية التصبن يعاير الشاهد كما تعاير الزيادة من هيدروكسيد البوتاسيوم غير المتفاعل في العينة بمحلول قياسي من حمض كلور الماء بوجود دليل الفينول فتالئين. ومن الفرق بين كمية KOH (الموجودة في الشاهد) وبين الزيادة منها ، تحسب كمية KOH اللازمة لتصبن الوزن المأخوذ من المادة الدهنية.

وبذلك تحسب كمية KOH بـ mg التي تلزم لتصبن 1g دسما. وهو مايعرف برقم (أو قرينة) التصبن.

الجدول(10-2): قرائن التصبن لبعض الزيوت والمواد الدسمة

المادة الدسمة	رقم التصبن
زيت الزيتون	196-185
زيت الذرة	193-187
زيت جوز الهند	264-250
شحم البقر	200-190
زيت بذرة القطن	198-190
زيت دوار الشمس	194-188
الزبدة	235-215

مواد التجربة

- زيوت نباتية أو دهون.
- حمض كلور الماء 0.5N .
- هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولية 0.5N : تحضر بحل 28g من KOH النقي في كمية من الكحول الايتيلي 95% ثم يستكمل الحجم إلى 1000ml بالكحول الايتيلي.
- الكحول المتعادل: يحضر بمعادلة الكحول 95% باستخدام هيدروكسيد البوتاسيوم 0.1N بوجود الفينول فتالئين حتى الحصول على اللون الزهري الفاتح.

طريقة العمل

1. يوزن بالضبط 1g دسما من المادة الدسمة في دورق مخروطي حجمه 250ml
2. يضاف إلى دورق بالماصة 10ml بالضبط من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولية المحضرة 0.5N . رج المزيج وسخنه على سخان كهربائي بحيث لانسمح للمزيج بالغليان إلا ببطء شديد. استمر بالتسخين الهادئ نحو 30–45 دقيقة حتى يصبح المحلول رائقاً. لإتمام عملية التصبن ، إذا تبخر معظم الكحول يعوض عنه بإضافة كحول متعادل، يلاحظ تشكل لون زهري خفيف عند إضافة الكحول وذلك لاحتواء الكحول المتعادل على الفينول فتالين.
3. اضف إلى الدورق الساخن نقطتين من الفينول فتالين وعاير محتوياته بمحلول حمض كلور الماء 0.5N . حتى اختفاء اللون الزهري، سجل الحجم V_1 .
4. تجرى في نفس الوقت تجربة الشاهد والخطوات السابقة نفسها ولكن دون عينة الزيت وتسجل V_2 الحجم اللازم من HCl لمعايرة الشاهد.
5. الحسابات:

$$\text{رقم التصبن} = \frac{N(V_1 - V_2)\text{x } 56.1}{w} \quad \text{(mg KOH /g)}$$

V_1 حجم HCl المستخدم في معايرة العينة. V_2 حجم HCl المستخدم في معايرة الشاهد. N نظامية الحمض وهنا 0.5. W وزن العينة.

10–3–3 تعيين رقم اليود Iodine Number

يعرف الرقم اليودي بأنه كمية اليود مقدرة بالغرامات اللازمة لإشباع الروابط الزوجية الموجودة في 100g من المادة الدسمة.

مبدأ الاختبار

ينضم اليود إلى مواقع الرابطة الزوجية في السلسلة الهيدروكربونية للحمض الدهني، وكلما زاد عدد الروابط الزوجية في الحمض الدهني يزداد الرقم اليودي. يمثل الرقم اليودي مقياساً لدرجة عدم الإشباع لهذه الدهون والزيوت، والذي يختلف كثيراً من زيت لآخر.

الرقم اليودي للزبدة نحو 45، بينما الرقم اليودي لزيت بذرة القطن قرابة 110. أي إن الدهون التي تحتوي كمية قليلة من الحموض الدهنية غير المشبعة تملك أرقاما يودية منخفضة وتكون صلبة عند درجة حرارة الغرفة، وعلى العكس فإن الزيوت التي تحتوي كمية كبيرة من الحموض الدهنية غير المشبعة تكون سائلة. ذلك يدل على أن هناك علاقة بين درجات الانصهار والأرقام اليودية. ومن الجدير بالذكر أنه كلما ارتفع مقدار عدم التشبع فإن الزيت أو الدهن تزداد قابليته للتزنخ عن طريق الأكسدة.

يعد الرقم اليودي مؤشراً أيضاً لمتابعة عملية الأكسدة عند القلي أو لمتابعة عملية الهدرجة أو غش الزيوت والدهون بين بعضها.

جدول(10-3): الرقم اليودي لبعض المواد الدسمة

المادة الدسمة	الرقم اليودي	المادة الدسمة	الرقم اليودي
زيت الكتان	177-200	زيت الزيتون	80-90
زيت الجوز	141-151	شحم البقر	35-50
زيت الذرة	103-128	الزبدة	33-45
زيت بذرة القطن	102-110	زيت نوى النخيل	14-22
زيت بذرة عباد الشمس	125-136	زيت جوز الهند	8-10
زيت فول الصويا	120-141	زيت الخروع	81-88
زيت الفول السوداني	84-100	زيت اللفت	79-108

يقدر الرقم اليودي بتفاعل وزن معلوم من المادة المراد اختبارها بكمية محددة من الكشف الهالوجيني (بروم، يود، كلور) فتتحول إلى مشتقاتها الهالوجينية وتصبح جميع الروابط مشبعة. وتذاب المادة الدسمة عادة في الكلوروفورم أو رابع كلور الكربون لتسهيل التفاعل. يترك المزيج مدة لإكمال التفاعل ثم يضاف يوديد البوتاسيوم KI لتحرير الكمية المكافئة من الهالوجين غير المتفاعل على شكل يود.

$$2RCOOH + 2H^+ + 2KI \rightarrow I_2 + 2ROH + K_2O + H_2O$$

يقدر اليود المتحرر بمعايرته بمحلول قياسي من ثيوكبريتات الصوديوم $Na_2S_2O_3$

$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \rightarrow 2Na_2S_4O_6 + 2NaI$$

يود **ثيوكبريتات الصوديوم** **تترا ثيونات الصوديوم** **يوديد الصوديوم**

تعبر هذه الكمية عن الهالوجين الزائد أي اليود غير المتفاعل مع الروابط الزوجية. وتجرى التجربة بنفس الإجرءات دون عينة الزيت بوصفه شاهدا.

وبطرح نتيجة معايرة العينة من نتيجة معايرة الشاهد نحصل على كمية الثيوكبريتات المكافئة لكمية اليود الذي ارتبط بالروابط الزوجية في العينة المدروسة.

A- تقدير الرقم اليودي باستخدام محلول هانوس Hanus

مواد التجربة

- مادة دسمة.
- محلول نشا 1%: أضف 1g من مسحوق النشا إلى كمية كافية من الماء البارد لتعمل منه عجينة رخوة ثم أضف كمية من الماء المغلي ثم اغل المحلول لمدة دقيقة واحدة.
- محلول يوديد البوتاسوم 20%.
- كلوروفورم أو رابع كلور الكربون.
- محلول ثيوكبريتات الصوديوم 0.1N: يحضر بحل 24.84g من ثيوكبريتات الصوديوم في لتر من الماء المقطر.
- كاشف هانوس: يحضر بحل 13g من بلورات اليود في 200ml حمض الخل المركز، يضاف إلى المحلول 8.2g من البروم ننتظر حتى تمام الذوبان ثم يكمل الحجم إلى 1000ml بحمض الخل المركز. يجب تحضير الكاشف تحت ساحبة الهواء، وحفظه في زجاجة عاتمة الجدران نظراً لسمية البروم بالملامسة والاستنشاق.
- ويمكن تحضير كاشف هانوس بطريقة أخرى بإذابة 1g من بروم اليود BrI في 400ml حمض خل ثم يكمل الحجم إلى 500ml من حمض الخل الثلجي.

طريقة العمل

1- يؤخذ دورقان جافان سعة كل منهما 250ml ، نأخذ في الأول 0.5g زيت (0.2-0.3 g دهن) و 10ml كلوروفورم أو رابع كلور الكربون للإذبة. ويوضع في الثاني 10ml كلوروفورم أو رابع كلور الكربون فقط بوصفه شاهدا.

2- يضاف لكل من الدورقين 25ml من كاشف هانوس، ويغلقان بشكل جيد بسدادة محكمة، ترج المحتويات بحذر وتوضع في مكان مظلم لمدة ساعة، مع الرج الخفيف كل بضع دقائق.

3- يضاف إلى الدورقين 10ml محلول يوديد البوتاسيوم 20%، و50ml ماء مقطرا للتمديد.

4- تعاير المحتويات بمحلول ثيوكبريتات الصوديوم حتى ظهور اللون الأصفر الباهت. يضاف بعدها 2-3 ml محلول نشاء ونتابع المعايرة حتى زوال اللون الأزرق، وبعد اختفاء اللون الأزرق من الجزء المائي ترج المحتويات جيدا (الجزء المائي وجزء رابع كلور الكربون الموجود في الأسفل) ثم تستكمل المعايرة حتى زوال اللون بالكامل.

5- الحسابات:

نطرح نتيجة معايرة الشاهد من نتيجة معايرة العينة فنحصل على كمية الثيوكبريتات المكافئة لليود الذي ارتبط مع الروابط الزوجية في عينة الزيت. وبضرب الناتج بنظامية الثيوكبريتات 0.1N ينتج عدد ميللي مكافئات الثيوكبريتات الذي يساوي ميللي مكافئات اليود المتفاعلة مع العينة.

$$\text{الرقم اليودي} = \frac{N(V_2 - V_1)\text{x } 0.127\text{x}100}{w}$$

V_1 حجم ثيوكبريتات الصوديوم اللازمة لمعايرة اليود المتبقي في دورق التجربة

V_2 حجم ثيوكبريتات الصوديوم اللازمة لمعايرة اليود في الشاهد.

N نظامية الثيوكبريتات = 0.1

W وزن عينة الدسم بالغرام.

0.127 يعبر عن ميللي المكافئ الواحد من اليود بالغرام.

B- تقدير الرقم اليودي باستخدام محلول ويج :

مواد التجربة:

- مذيب عضوي (كلوروفوروم أو رابع كلور الكربون)
- يوديد البوتاسيوم 15%.
- ثيوكبريتات الصوديوم 0.1N .
- دليل النشا.
- محلول ويج: ويحضر بإضافة 10g من ثالث كلوريد اليود إلى 300ml رباعي كلور الكربون ثم حل المزيج بـ 700ml حمض خل .

لتقدير قوة محلول ويج : نأخذ 25ml منه في دورق جاف ويضاف إليه 15ml من محلول يود البوتاسيوم ثم يضاف 100ml ماء مقطرا ثم نعادل اليود المنفرد مع التقليب باستخدام ثيوكبريتات الصوديوم حتى يصبح لون المحلول أصفر، ثم نضيف نقاطا من دليل النشا ونكمل عملية المعايرة حتى يتحول اللون الازرق في الطبقة المائية واللون القرمزي في طبقة رابع كلور الكربون إلى عديم اللون.

ملاحظة: إذا لزم التعادل 35ml-37 ثيوكبريتات الصوديوم يدل ذلك على صلاحية المحلول لتقدير الرقم اليودي. أما إذا كان حجم الثيوكبريتات أقل من ذلك فإنة يلزم إضافة كمية أخرى من ثالث كلور اليود . أما إذا كان حجم ثيوكبريتات الصوديوم أكثر من 37 فإنه يتم تخفيف محلول ويج بوساطة المذيب .

طريقة العمل

نأخذ وزناً معلوماً من المادة الدهنية في دورق مصنفر ويضاف إليها 20ml من رباعي كلور الكربون ثم يضاف 25ml من محلول ويج بوساطة سحاحة ثم يغطى الدورق بالغطاء المصنفر ويوضع في مكان مظلم 30 دقيقة، ثم يضاف 20ml يوديد بوتاسيوم وترج محتويات الدورق ثم تغسل جوانب الدورق بماء مقطر سبق غليانه وتبريده (وذلك للتخلص من الكلور في حال وجوده بالماء لأنه يشبع الروابط الزوجية).

ثم تجري المعايرة لمحتويات الدورق بثيوكبريتات الصوديوم 0.1N حتى اللون القرمزي ، ثم نضيف دليل النشا ونكمل التعادل حتى اختفاء اللون الأزرق من اللون المائي واللون القرمزي من الوسط العضوي.

ونحسب الرقم اليودي من المعادلة الآتية :

$$\text{الرقم اليودي} = \frac{N(V_2 - V_1)\text{x } 127\text{x}100}{w\text{x}1000}$$

V_1 حجم ثيوكبريتات الصوديوم اللازمة لمعايرة اليود المتبقي في دورق التجربة.

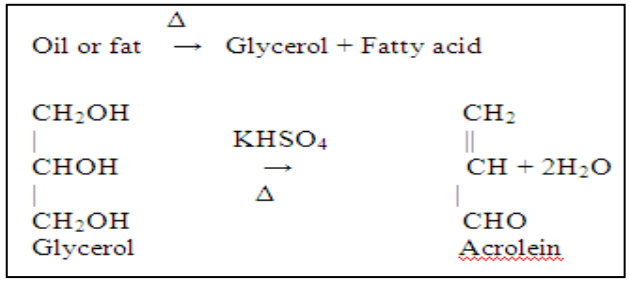
V_2 حجم ثيوكبريتات الصوديوم اللازمة لمعايرة اليود في الشاهد.

N نظامية الثيوكبريتات = 0.1 ، W وزن عينة الدسم بالغرام.

10-4 اختبار الأكرولين، الغليسيرول

مبدأ الاختبار

بنزع جزيئتي ماء من جزيء الغليسيرول نحصل على الأكرولين. ينتج الأكرولين من الغليسيرول سواء كان حراً أم مؤسترأ مع الحموض الدهنية على شكل غليسيريد ثلاثي الشكل(10-3).



الشكل(10-3): تشكل الأكرولين.

مواد التجربة

- كبريتات المغنزيوم أو كبريتات البوتاسيوم الحامضية. -غليسيرول.

طريقة العمل

خذ 1ml زيتا في أنبوب اختبار أو 1g دهن ،أضف إليها 5g من كبريتات المغنزيوم.

سخن الأنبوب بلطف فوق اللهب حتى تسود محتوياته. لاحظ الرائحة الواخزة للأكرولين.

جميع الدهون والزيوت، وحتى الغليسيرول تعطي الأكرولين عند التسخين مع كبريتات المغنزيوم أو كبريتات البوتاسيوم.

10-5 اختبار شيف للكشف عن الألدهيدات

الهدف من الاختبار كشف المجموعة الألدهيدية في المادة الدهنية.

مواد التجربة

- زيت أو دهن.
- كاشف شيف: أذب 0.5g من الفوكسين (صبغة أرجوانية من هيدروكلوريد روز أنيلين) في 9g من ثنائي كبريتيت الصوديوم في نصف لتر ماء ، وأضف 10ml من حمض كلور الماء.

طريقة أخرى : 4.5ml بنزألدهيد يمزج مع 3ml كحولا ايتيليا ويضاف إلى المحلول 4.5ml من الأنيلين، يمزج الخليط مع التحريك ويضاف حوالي 3ml محلول هيدروكسيد الصوديوم. يصعد المزيج لمدة أربع ساعات ، ويضاف إليه ماء بارد. فنحصل على محلول أصفر صلب يرشح ويجفف.

طريقة العمل

خذ 5ml زيتا أو 5g دهنا. أضف إليه 5ml من كاشف شيف وخض الأنبوب جيداً.

إذا كانت المادة الدهنية تحتوي الألدهيد فإن المزيج يتلون باللون الأرجواني ، يكون اللون واضح خلال ربع ساعة. عدم ظهور اللون الأرجواني خلال ثلث ساعة دليل خلو الدسم من الألدهيد.

10-6 اختبار ضم اليود أو إضافته

الهدف من الاختبار تشبع الروابط المضاعفة في الزيت باليود.

مبدأ التجربة

للحموض الدهنية غير المشبعة قابلية لضم اليود لإشباع روابطها المضاعفة.

مواد التجربة

- حمض الأوليبك (زيت زيتون)، حمض البالميتيك، الستياريك، وحمض اللينوليك.
- مذيب عضوي مثل الايتر، ومحلول اليود.

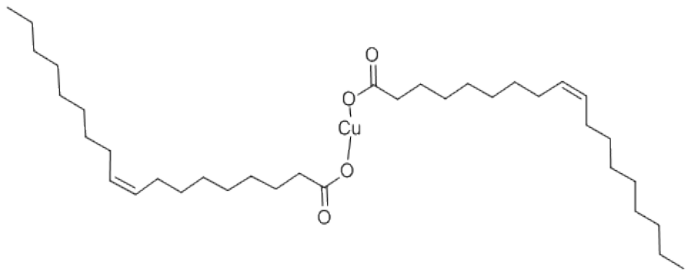
طريقة العمل

أذب 1ml زيت زيتون في5ml ايتر، لاحظ زوال لون اليود. أضف كميات أخرى من اليود حتى بداية عدم اختفاء لون اليود دليل إشباع الروابط المضاعفة في الزيت.

كرر التجربة مع كل من حمض البالميتيك، ثم الستياريك، ثم حمض اللينوليك. اكتب ملاحظاتك.

10-7 اختبار خلات النحاس

الهدف من الاختبار التمييز بين الدهون المتعادلة والحموض الدسمة وكذلك بين الحموض الدسمة المشبعة وغير المشبعة.



الشكل(10-4): أولييات النحاس الناتجة من تفاعل خلات النحاس مع حمض الأوليبك.

مواد التجربة

- دسم: حمض الأوليبك، وحمض الستياريك
- ايتر بترولي .
- خلات النحاس.

طريقة العمل

أذب 1g من الدهن أو الزيت في 5ml ايتر بترولي او ايتر ثم اضف 5ml خلات النحاس. امزج جيدًا، واترك الأنبوب لتهدأ محتوياته، تتكون طبقتان .

كرر التجربة مستعملاً حمض الاوليك ثم حمض الستاريك بدل الدهن ثم لاحظ مايأتي :

في حال استخدام الدهن تجد ان كلتا الطبقتين بقيتا عديمتي اللون وهذا دليل وجود دهن متعادل .

في حال استعمال حموض دهنية فإن إحدى الطبقتين تصبح ملونة، بينما تبقى الثانية عديمة اللون.

في حال استخدام حمض الأوليك نجد أن الطبقة السفلية عديمة اللون ، والطبقة العليا تتلون باللون الأخضر، وهذا دليل على وجود حموض دهنية دسمة غير مشبعة .

أما في حال استخدام حمض الستياريك نجد أن الطبقة السفلى تتلون باللون الأخضر، بينما تبقى الطبقة العليا عديمة اللون وهذا دليل على وجود حموض دسمة مشبعة .

10-8 اختبار الكشف عن التزنخ

الهدف من الاختبار هو الكشف عن مدى صلاحية المادة الدسمة للاستهلاك الغذائي عند التخزين الطويل. كلما ارتفعت درجة التزنخ تدنت نوعية الزيت.

مبدأ الاختبار

تتعرض الحموض الدهنية غير المشبعة سواء كانت حرة أم مرتبطة على شكل غليسيريدات ثلاثية إلى الأكسدة عند الرابطة الزوجية بتأثير الأكسجين في الهواء الجوي. فتتكون مركبات تسمى بيروكسيدات (فوق أكاسيد) والتي تتحلل بعد ذلك إلى ألدهيدات وكيتونات وحموض دسمة حرة وكحول وغيرها ذات وزن جزيئي منخفض، وهذا يعطي طعماً ورائحة غير سائغة أو ما يسمى التزنخ. وفي هذه الحالة يسمى التزنخ التأكسدي Oxidative rancidity.

$$R{-}CH{=}CH{-}(CH_2)_n{-}COOH + 2[O] \rightarrow R{-}\underset{\displaystyle O}{\underset{|}{CH}}{-}\underset{\displaystyle O}{\underset{|}{CH}}{-}(CH_2)_n{-}COOH$$

حمض دهني غير مشبع **بيروكسيدات الحمض الدهني**

يساعد على حدوث هذا النوع من التزنخ الضوء والحرارة المرتفعة خلال التخزين ووجود الأكسجين ووجود نسبة عالية من الحموض الدهنية غير المشبعة ووجود عوامل مساعدة مثل النحاس والحديد والزنك وإنزيم الليباز.

هناك نوع آخر من التزنخ يسمى التزنخ التحليلي Hydrolytic rancidity وهو التزنخ الناتج عن حلمهة الزيوت والدهون بوساطة أصناف عديدة من الفطور والخمائر والبكتريا بما تفرزه من إنزيمات الليباز التي تسبب تحلل المواد الدسمة وانفراد الحموض الدهنية على شكل حر ويشترط توفر حد معين من الرطوبة في وسط التفاعل.

مواد التجربة

- زيوت نباتية حديثة وقديمة الإنتاج.
- مذيب عضوي: ايتانول أو رابع كلور الكربون ...
- محلول يوديد البوتاسيوم المشبع في حمض الخل الثلجي.
- دليل النشا.

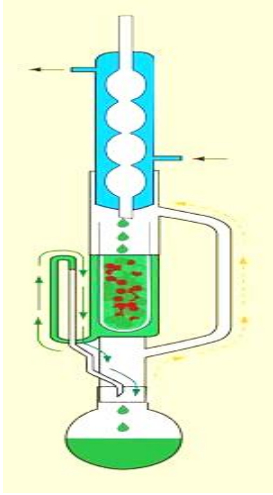
طريقة العمل في اختبار التزنخ الأكسيدي

يذاب 1g من الدسم (حمض دهني غي مشبع) في 5ml مذيب عضوي في أنبوب اختبار، ثم يضاف إليه 1ml محلولا مشبعا من يوديد البوتاسيوم في الخل الثلجي. نلاحظ افراد اليود من يوديد البوتاسيوم نتيجة لوجود الأكسجين الفعال على شكل بيروكسيدات. يمكن الكشف عن اليود بإضافة بضع نقاط من النشا فيظهر اللون الأزرق في الأنبوب. دلالة على وجود البيروكسيدات.

10-9 استخلاص الليبيدات

يعتمد استخلاص الليبيدات مخبرياً وتقديرها كمياً على خاصية ذوبانها في المذيبات العضوية. يفضل أن تكون المادة المراد استخلاصها جافة وطحونة أو مجزأة إلى حبيبات صغيرة لتسهيل عملية الاستخلاص. يستخدم ايثر البترول أو ايثر الايتيل أو مزيج منهما كما يستخدم أيضاَ الكلوروفورم ، أو مزيج منه مع الميثانول بنسبة 1 : 2 . توزن عينة من المادة المراد استخلاصها وتضاف كمية من المذيب تعادل بضعة أمثال حجمها وترج جيداً، وقد يتم الرج مع التسخين ثم ترشح. يستخلص الراسب ثانية بكمية جديدة من المذيب ويرشح ثم تعاد العملية مرتين أو ثلاثاً حتى تمام الاستخلاص. ويعد غياب الصبغات وخاصة الكلوروفيل في الراسب دلالة على اتمام الاستخلاص. تجمع دفعات الراشح الحاوية المذيب العضوي والليبيدات المستخلصة ويبخر المذيب منها بالتقطير العادي أو تحت التفريغ. بعد الحصول على الليبيدات الخالية من المذيب توزن ويتم حساب النسبة المئوية في العينة المأخوذة. وقد تدرس الليبيدات الناتجة وتجرى عليها الاختبارات لتحديد خواصها ومواصفاتها.

يستخدم في المخابر جهاز زجاجي خاص يدعى جهاز سوكسليت Soxhlet الشكل(10-5) الذي يعتمد على الاستخلاص المستمر لليبيدات لبضع ساعات بوساطة المذيب العضوي. ويسود استعمال هذا الجهاز على نطاق واسع في المختبرات للتقدير الكمي لليبيدات في العديد من الاغذية والأعلاف.



الشكل(10-5): جهاز سوكسليت لاستخلاص الليبيدات.

التقدير الكمي لليبيدات بطريقة سوكسليت

الهدف من الاختبار هو تقدير النسبة المئوية لليبيدات الموجودة في المواد الغذائية الجافة بجهاز سوكسليت.

تُلف العينة الموزونة بدقة بورقة ترشيح إذا كانت صلبة وتوضع في كشبتان الجهاز الذي يوضع في مكانه في الجهاز. يوضع المذيب في البوتقة الزجاجية الجافة والموزونة بدقة أيضاً. توصل البوتقة بإحكام في الجهاز ثم يوصل الأخير بالمكثف الذي يمرر فيه الماء.

تسخن البوتقة على سخان كهربائي فتتصاعد أبخرة المذيب مارة بالذراع الجانبي الواسع لجسم الجهاز وتصل إلى المكثف، فتتكثف وتنزل على شكل نقط تتجمع في الجهاز فوق العينة.

يستخلص المذيب الليبيدات من العينة ويتجمع حتى يصل مستواه إلى الطرف العلوي للذراع الزجاجية الدقيقة المتصلة بجسم الجهاز. عندها تحدث عملية تفريغ، ينزل بوساطتها كل المذيب المتجمع في جسم الجهاز والليبيدات المستخلصة معه إلى البوتقة عن طريق الذراع الجانبية الدقيقة. يستمر المذيب النقي في التبخر والتكثف والتجمع فوق العينة ويستخلص الليبيد منها ثم يحدث

التفريغ والنزول إلى البوتقة. تستمر هذه العملية لبضع ساعات بعدها تصبح العينة خالية من الليبيدات الموجودة في البوتقة.

أخيراً، يبخر كل المذيب من البوتقة بالتقطير ثم تبرد بوضعها في مجفف ثم توزن ، وبمعرفة الفرق بين هذا النوع ووزن البوتقة فارغة يحسب وزن الليبيدات المستخلصة من العينة.

$$\text{النسبة المئوية للدهن} = \frac{\text{وزن الدهن المستخلص}}{\text{وزن العينة الجافة}} 100\text{x}$$

نظرا للحساسية الشديدة لطبيعة الليبيدات للأكسدة، والتحليل المائي فإنه لابد من استخدام مذيبات عضوية عالية النقاوة وخالية تماماً من الشوائب.

10-10 الشحوم الفوسفورية (الفوسفوليبيدات)

تعد الفوسفوليبيدات إحدى المكونات المهمة لأغلفة الخلايا النباتية والحيوانية ، كما توجد في الدم والأنسجة العصبية والحليب وصفار البيض. تتكون الفوسفوليبيدات من غليسيريدات ثنائية مرتبطة بحمض الفوسفور والحمض مؤستر بمركب كحولي مثل الكولين أو الايثانول أمين، فمع الكولين ينتج فوسفاتيديل كولين واسمه الشائع الليسثين ، ومع ايتانول أمين ينتج فوسفاتيديل ايتانول أمين واسمه الشائع سيفالين. إن هذين المركبين في الظروف الفيزيولوجية للخلية يحملان شحنة سالبة على المجموعة الحمضية لحمض الفوسفور وشحنة موجبة على النيتروجين الرباعي في الكولين أو الايتانول أمين.

تساعد الفوسفوليبيدات على تشكيل مستحلبات ثابتة من الزيوت والدهون في المحاليل المائية نتيجة لقدرتها على الذوبان جزئياً في الماء وجزئياً في الدهون. ولذلك تسمى عوامل مستحلبة Emulsifiers ، فالجزء من الفوسفوليبيد المحتوي السلاسل الهيدروكربونية للحمضين الدهنيين غير قطبي وكاره للماء، لذلك يذوب في قطيرات الزيت أو الدهن بينما يتجه الجزء القطبي المشحون والمحب للماء إلى خارج القطيرات ليذوب في الماء. وبذلك يتشكل غلاف مائي يحيط بكل قطيرة

زيت ويمنعها من التجمع والالتصاق مع القطيرات الأخرى المجاورة فيتشكل مستحلب ثابت من الزيت في الماء.

تضم العوامل المستحلبة مركبات أخرى غير الفوسفوليبيدات مثل المفرزات الصفراء والغليسيريدات الأحادية والثنائية وبعض البروتينات. وتلعب دورا هاما في تسهيل هضم الدهون وامتصاصها داخل الأمعاء نتيجة لتجزئتها وتكبير السطح المعرض (سطح التلامس) surface area منها لحدوث التفاعلات الحيوية. كما أن للعوامل المستحلبة أهمية في البروتوبلازما والأغلفة الحيوية وفي نقل الليبيدات في السوائل الفيزيولوجية داخل الكائنات الحية وفي افراز تلك الليبيدات، كما في الحليب عند الثدييات.

10-10-1 اختبار الترسيب بالأسيتون

الهدف من الاختبار الكشف عن الليسيثين.

مبدأ الاختبار

لا تذوب الفوسفوليبيدات في الأسيتون لذلك يستخدم هذا المذيب العضوي لترسيبها صناعيا.

طريقة العمل

ضع في أنبوب اختبار جاف 2ml من الأسيتون واضف ببطء عدة نقط من محلول الليسيثين في الكحول. لاحظ تشكل عكارة لا تلبث ان تترسب إلى قاع دلالة على ترسب الليسيثين بالأسيتون.

10-10-2 اختبار تشكيل مستحلبات

ضع عدة قطرات من الزيت في أنبوب اختبار وأضف اليها نحو 2ml من الماء المقطر. رج المزيج جيدا ولاحظ شكل مستخلب غير ثابت لا يلبث ان ينفصل فيه الزيت عن الماء.

أضف للمزيج عدة نقاط من محلول الليسيثين ورج المزيج جيداً فتلاحظ تشكل مستحلب ثابت تنتشر به قطيرات الزيت في الماء مشكلة طبقة واحدة .

10-10-3 اختبار وجود الفوسفات

الهدف من الاختبار الكشف عن الفوسفور في المواد الدسمة.

مبدأ الاختبار

تتحلل الفوسفو ليبيدات مائيا في وسط قلوي فتتحرر الفوسفات التي يمكن أن يكشف عنها بالتفاعل مع موليبيدات الالمنيوم فينتج راسب أصفر مع الفوسفومولیبیدات. تتفاعل الفوسفومولیبیدات مع المواد المختزلة _مثل كلوريد القصديري _ فينتح معقد الموليبدينيوم الأزرق.

مواد التجربة

- محلول الليسيثين : يحضر جاهزاً. أو يحضر من صفار البيض، ضع في كأس زجاجي صفار بيضة واحدة ثم فتتها بقضيب زجاجي . أضف نحو 50ml ايتانول دافئ. حرك جيداً ثم رشح خلال ورقة ترشيح.
- محلول هيدروكسيد الصوديوم الممدد 20%.
- كاشف موليبيدات الأمونيوم: يحضر بإذابة 7.5g من مركب موليبيدات الأمونيوم في 200ml ماءا مقطرا. ثم أضف إليه 100ml حمض الكبريت 10N . أكمل الحجم إلى 400ml بالماء المقطر.
- بلورات كلوريد القصديري.

طريقة العمل

ضع نحو 1ml من محلول الليسيثين في أنبوب اختبار ثم اضف نحو 2ml من هيدروكسيد الصوديوم الممددة. اغل المحتويات على اللهب بلطف لمدة دقيقة او دقيقتين ثم أضف إليها نحو 2ml من كاشف موليبيدات الأمونيوم ولاحظ تشكل الراسب الأصفر ، أضف نقطة واحدة من محلول القصديري ولاحظ تشكل معقد الموليبدنيوم الازرق بعد الرج دلالة على وجود الفوسفور .

10-11 الستيرولات

الستيرولات هي ليبيدات غير قابلة للتصبن لأنها لاتحوي حموضا دسمة وهي ذات تركيب حلقي خاص وتؤدي أدوارا حيوية مهمة. أشهر أمثلة لهذه المركبات هو الكوليسترول الذي يكثر في الأنسجة العصبية وجدران الخلايا الحيوانية، وهو مادة التصنيع الأولية للستيرولات الأخرى في الجسم.

من أهم الستيرولات الأخرى مفرزات الصفراء مثل حمض الكوليك الذي يسهم في استحلاب الدهون في الأمعاء وتسهيل هضمها وامتصاصها، وبعض الهرمونات الجنسية وهرمونات الغدة الكظرية. كما يعد فيتامين D أحد المشتقات المهمة للستيرولات. توجد الستيرولات في المملكة النباتية أيضاً ومن أهمها سايتوستيرول في النباتات الراقية وارغوستيرول في الفطريات.

10-11-1 اختبار تأثير حمض الكبريت في الستيرولات

الهدف من الاختبار هو الكشف عن الستيرولات بوساطة حمض الكبريت.

مبدأ الاختبار

تتفاعل الستيرولات المذابة في الكلوروفورم مع حمض الكبريت المركز فينتج لون أحمر إلى بنفسجي، ويختلف اللون تبعاً لوجود المواد الدسمة غير المشبعة المرافقة للستيرولات.

طريقة العمل

ضع نقطتين أو ثلاثة من زيت الزيتون في أنبوب اختبار جاف وأضف إليها نحو 2ml من الكلوروفورم ثم أضف إليها باحتراس وعلى جدران الأنبوب 2ml حمض الكبريت المركز. رج المزيج بلطف ولاحظ ظهور اللون البنفسجي دلالة على وجود الستيرولات في الزيت.

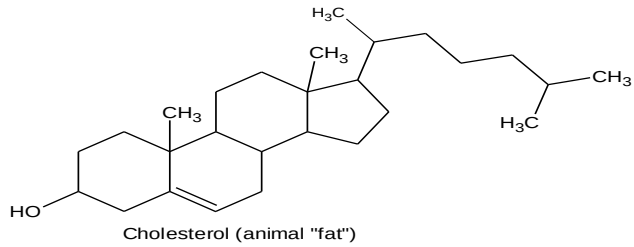
10-11-2 اختبار ليبرمان – بورشارد للكوليسترول

Cholesterol Liebermann- Burchard's Test

الهدف من الاختبار هو الكشف عن الكوليسترول الشكل(10-6).

مبدأ الاختبار

تتفاعل معظم الستيرولات المذابة في الكلوروفورم مع بلاماء (انهيدريد) حمض الخل في وجود حمض الكبريت المركز فينتج لون أخضر. يعرف هذا التفاعل باسم ليبرمان بورشارد ويستفاد منه بتقدير الكوليسترول كمياً في الدم باستخدام أجهزة التحليل الطيفي الضوئي لأن شدة اللون الأخضر تتناسب طردا مع تركيز الكوليسترول.



الشكل(10-6): الكوليسترول.

طريقة العمل

ضع في أنبوب اختبار جاف 2ml من محلول الكوليسترول 1% في الكلوروفورم. ثم أضف إليها عشر نقاط من بلاماء حمض الخل. أضف بعد ذلك باحتراس على جدران الأنبوب نحو 2ml حمض الكبريت المركز. لاحظ بعد بضع دقائق ظهور لون أحمر بنفسجي يتغير بعد عدة دقائق إلى لون أخضر دلالة على وجود الكوليسترول.

ملاحظة: لاينجح هذا الاختبار بوجود آثار من الماء سواء أكانت في أنبوب الاختبار أم في الكيماويات المستخدمة.

الفصل الحادي عشر

اختبارات البروتينات Protein Tests

تتكون البروتينات من عدد كبير من الحموض الأمينية التي ترتبط فيما بينها بروابط ببتيدية تنشأ من ربط مجموعة الكروبوكسيل من حمض أميني مع مجموعة الأمين – الفا من الحمض الأميني المجاور له.

وتؤدي البروتينات وظائف مهمة ومختلفة نذكر منها :

1- وظيفة غذائية Nutritional.
2- عوامل ناقلة Transport agents.
3- عوامل مهمة في تنشط الدم .
4- إنزيمات.
5- عوامل واقية من الجراثيم والأمراض Protective proteins.
6- محلول منظم Buffer لتغير تركيز PH في الدم.

وبما ان البروتين يحتوي عددا كبيرا من الحموض الأمينية لذلك لا يوجد لكل نوع من أنواع البروتينات كاشف خاص به، بل يوجد كاشف خاص لكل حمض أميني معين أو كل زمرة كيميائية معينة . لذلك تعطي البروتينات والحموض الأمينية المكونة لها عددا من التفاعلات اللونية الخاصة لتميز هذه البروتينات أو بالأحرى الحموض الأمينية .
وتعتمد طرق الكشف عن البروتينات على الاختبارات اللونية والاختبارات الفيزيائية.

11-1 الاختبارت اللونية

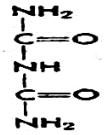
تعتمد هذه الاختبارات على تشكيل ألوان معينة حسب طبيعة الحموض الأمينية ونوعيتها الموجودة في البروتين .

وتقسم الاختبارات اللونية إلى قسمين اختبارات لونية عامة واختبارات لونية خاصة.

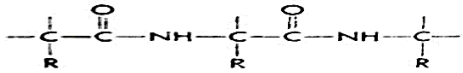
11-1-1 الاختبارات اللونية العامة

11-1-1-1 اختبار اليوريا المضاعفة (البايوريت) Biuret test

المبدأ: هذا التفاعل عام بالنسبة لجميع أنواع البروتينات والببتيدات ، وقد استمد هذا التفاعل اسمه من مركب البايوريت الناتج عن تكثيف جزيئين من البولة (اليوريا).



البايوريت

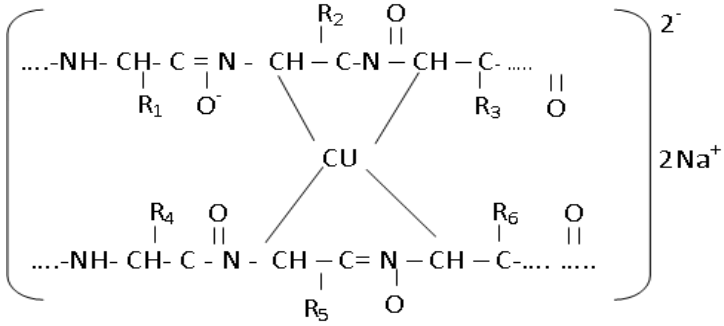


رابطتان ببتيديتان في البروتين

ويعتمد هذا التفاعل على وجود الروابط الببتيدية في المركب البروتيني حيث تتفاعل هذه الروابط مع شوارد النحاس بوسط قلوي وتشكل معها معقداً تساندياً ذا لون أزرق بنفسجي.

طريقة العمل

خذ 2ml محلولا بروتينيا في أنبوب اختبار، يضاف 2ml من محلول 20% NaOH تمزج محتويات الأنبوب بلطف. ويضاف قطرتان من محلول كبريتات النحاس 1%، تمزج محتوتات الأنبوب جيداً . بوجود البروتين يتحول اللون من الأزرق إلى اللون البنفسجي.



الشكل (11-1): معقد بنفسجي بين أيون النحاس والروابط الببتيدية

11-1-1-2 اختبار موليش

تعطي البروتينات المرتبطة بالسكريات مثل الميوسين اختباراً إيجابياً.

راجع اختبار موليش في السكريات وأجر الاختبار بنفس الطريقة على البروتينات.

11-1-1-3 اختبار هيللر Heller

خذ في أنبوب اختبار 3ml من حمض الكبريت المركز. أضف ببطء والأنبوب مائل 5ml محلولا بروتينيا. يلاحظ تشكل حلقة بيضاء (حلقة هيللر) عند الحد الفاصل بين الطبقتين، ناشئة عن تخثر البروتين.

ملاحظة: يفضل ترشيح المحلول البروتيني إذا كان عكرا.

11-1-1-4 اختبار نتروبروسيد الصوديوم

الهدف من الاختبار الكشف عن مجموعة السلفوهيدريل الموجودة في الحموض الأمينية وفي البروتينات المشوهة (تغير في التركيب الطبيعي).

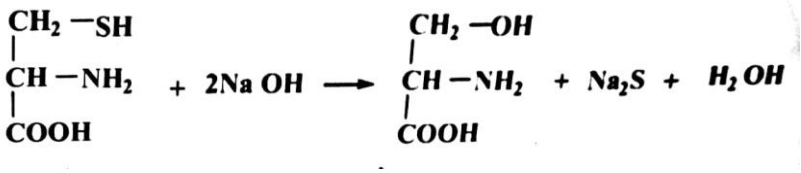
مواد التجربة

- محلول نتروبروسيد الصوديوم 20 g/lit.
- محلول السيستئين 0.1%.
- محلول ألبومين البيض 2%.

طريقة العمل

خذ ثلاثة أنابيب: في الأنبوب **الأول** 1ml من ألبومين البيض المحضر حديثاً وغير ممدد. وفي **الثاني** 1ml محلول سيستيئين. وفي الأنبوب **الثالث** 1ml محلول ميثيونين.

نضيف إلى كل أنبوب 2ml من محلول هيدروكسيد الصوديوم. نسخن الأنابيب لمدة 3 دقائق ثم نبردها. ثم نضيف لكل أنبوب 3 قطرات من محلول نتروبروسيد الصوديوم. ولاحظ اللون.



سيستئين **السيرين**

$$Na_2S + Na_2[Fe(CN)_5NO] \rightarrow Na_4[Fe(CN)_5NOS]$$

معقد ملون **نتروبروسيد الصوديوم**

11-1-1-5 اختبار النينهيدرين Ninhydrin Test

يفيد اختبار النهيدرين في كشف زمرة الأمينو الحرة في كل من الحموض الأمينية والببتيدات والبروتينات.

مبدأ الاختبار

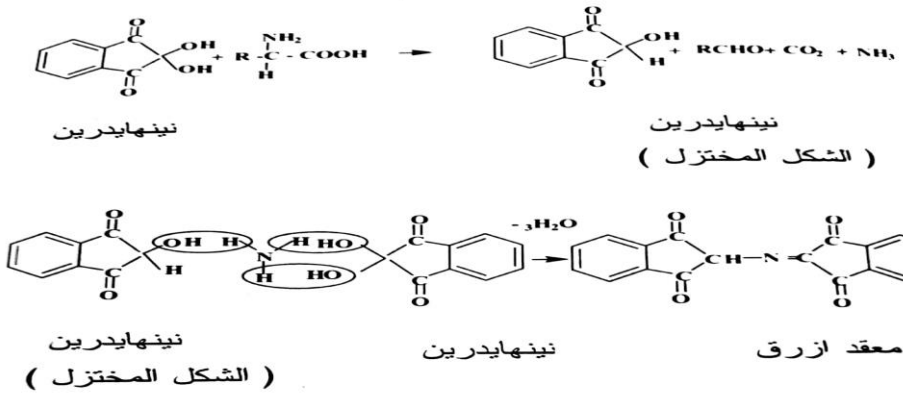
تتفاعل المجموعات الأمينية الحرة مع النينهيدرين بالحرارة فينتج معقد أزرق اللون. يتم التفاعل على مرحلتين. في الأولى تتحرر مجموعات الأمينو على شكل نشادر. ويتم اختزال النينهيدرين إلى مركب آخر الهايدرين دانتين. يتفاعل الهايدرين دانتين مع النشادر وجزيء نينهيدرين فينتج معقد أزرق اللون الشكل(11-2).

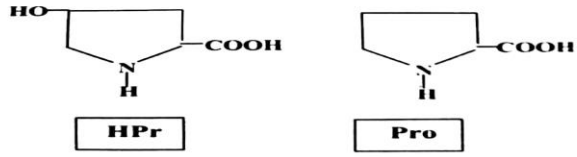
الجدير بالذكر أن البرولين يعطي لوناً أصفر مع النينهيدرين نتيجة احتوائه مجموعة ايمينو.

طريقة العمل

ضع في أنبوب اختبار نحو2ml من محلول بروتيني ، أضف إليها نقاطاً من النينهيدرين. رج المزيج واغل بلطف على اللهب. لاحظ تشكل اللون الأزرق خلال مدة قصيرة من الغليان. في حال التسخين في حمام يظهر اللون خلال دقيقتين. تفاعل الحموض الأمينية الحرة يكون أسرع من البروتينات.

إذا كان الوسط قلويا pH>7 أو شديد الحموضة pH<5 قد لاينجح الاختبار، لذلك يفضل استخدام ورق عباد الشمس.



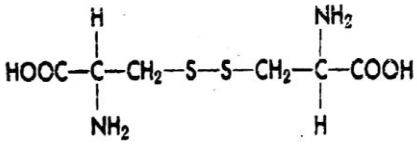


الشكل(11-2): تأثير النينهيدرين في الحموض الأمينية.

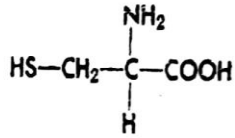
11-1-2 اختبارات لونية خاصة

11-1-2-1 اختبار الكبريت (اختبار فوليا)

يوجد الكبريت في بعض الحموض الأمينية مثل السيستئين Cysteine والسيستين Cystine والميثيونين Methionine، كذلك الببتيد الثلاثي الغلوتاثيون Glutathione.



حمض السيستين



حمض السيستئين

مواد التجربة

- محلول بروتيني.
- محلول خلات الرصاص 5%.
- محلول هيدروكسيد الصوديوم20%.
- كاشف فوليا: يضاف إلى محلول مائي من خلات الرصاص 5% محلول من هيدروكسيد الصوديوم 30% . (الحجم نفسه حتى ينحل الراسب العكر).

طريقة العمل

5ml في اختبار من محلول بروتيني، ثم يضاف 2ml من NaOH . يغلى المزيج مدة خمسة دقائق (يتحول الكبريت إلى Na_2S)، يبرد المحلول ويضاف 2ml خلات الرصاص ويظهر لون بني أو راسب أسود في الاختبار الايجابي.

11-1-2-2 اختبار الهيستيدين (اختبار بولي)Pouly – test

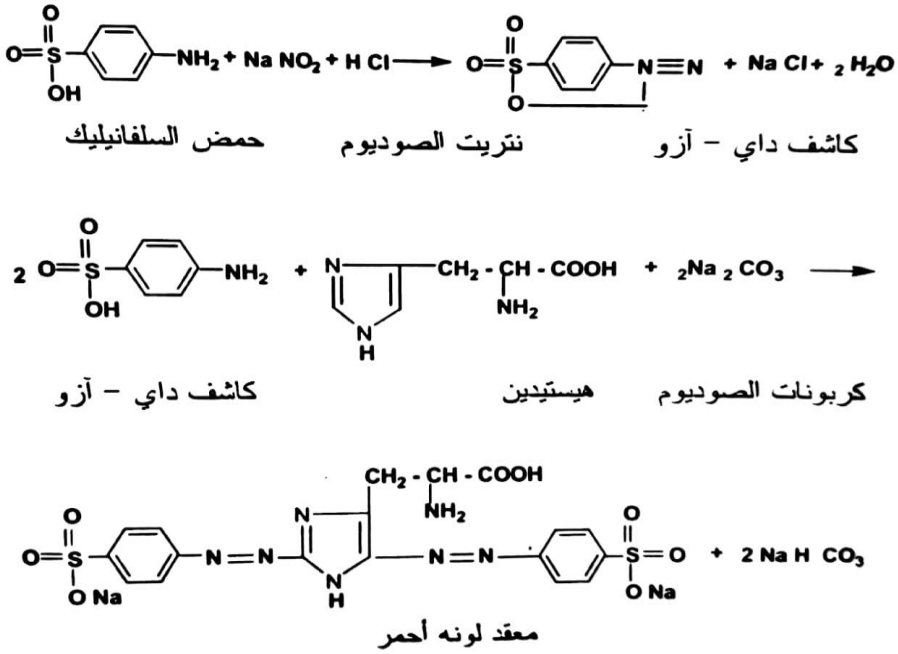
يهدف الاختبار إلى الكشف عن الهيستيدين والتيروسين والبروتينات المحتوية عليهما. ويعطي التيروسين تفاعلاً إيجابياً مع كاشف دي- آزو الشكل (11-3).

مبدأ الاختبار

تشكل مركب يعرف باسم كاشف داي آزو (Di-azo) وذلك بتفاعل حمض السلفانيليك مع نتريت الصوديوم بوجود HCl . تفاعل جزيئتين من الكاشف مع الهيستيدين بوجود كربونات الصوديوم وتشكل معقد لونه أحمر.

مواد التجربة

- محلول بروتيني.
- محلول داي- آزو: ويحضر بمزج 60ml من محلول حمض السلفانيليك 1% في حمض كلور الماء 2% و 2ml من محلول نتريت الصوديوم 0.5%.



الشكل (11-3): تشكل كاشف دي آزو وتأثيره في الهيستيدين.

طريقة العمل

تؤخذ 1ml من محلول بروتيني في أنبوب اختبار نظيف وجاف. يضاف المحلول 1ml من كاشف آزو وبعد دقيقة يضاف إلى المزيج 2ml من محلول كربونات الصوديوم . يترك الأنبوب جانباً بضع دقائق يلاحظ لون أحمر غامق دليل وجود الهيستيدين.

11-1-2-3 التفاعلات اللونية

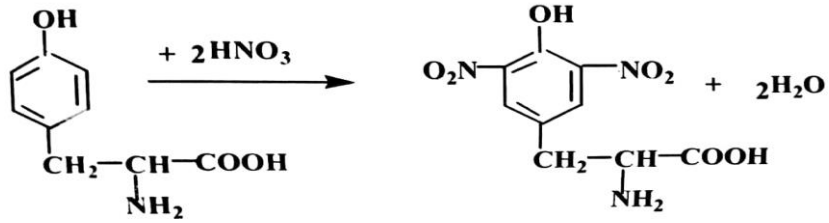
i- اختبار الكزانتوبروتين Xanthoprotein

مبدأ الاختبار

يتوقف هذا الاختبار على وجود حلقة عطرية (التيروسين، فنيل آلانين، وترتبتوفان) في البروتين.

طريقة العمل

يوضع في اختبار 3ml من محلول البروتين، ثم يضاف 1ml من حمض الآزوت. نغلي لمدة دقيقة ، نلاحظ تحول المحلول إلى اللون الأصفر. يبرد الأنبوب ويضاف هيدروكسيد الأمونيوم المركزة حتى يصبح المحلول قلوياً، يتحول المحلول إلى الأصفر ثم إلى اللون البرتقالي.



حمض التيروسين ثنائي النتروتيروسين

ملاحظات:

- يمكن استخدام هيدروكسيد الأمونيوم أو هيدروكسيد الصوديوم.
- الجيلاتين لايحوي التيروسين لذلك تكون النتيجة سلبية.
- يحدث تلون أصفر إذا لامس حمض الآزوت اليد، ذلك يعود لتفاعل نترجة تيروسين بروتين الجلد.

ii- اختبار ميلون Millon Test

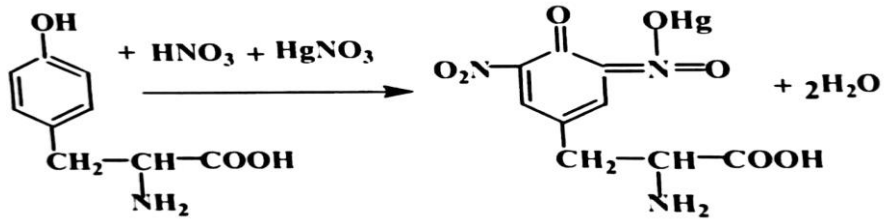
الهدف من الاختبار الكشف عن الحمض الأميني التيروسين الموجود بشكل حر أو المرتبط مع البروتينات.

مواد التجربة

- محلول بروتيني، حمض الآزوت، والزئبق.
- يحضر كاشف ميلون بحل 60ml حمض الآزوت كثافته 1.40، مع 40g من الزئبق في درجة حرارة الغرفة، ويوضع في حوض مائي ساخن حتى يتوقف انطلاق أبخرة أكاسيد الآزوت العنيفة. ثم تمزج محتويات الأنبوب بعد ذلك ويضاف الماء المقطر بمقدار الضعف 120ml. نمدد المحلول الناتج بالماء بنسبة (1:1).

طريقة العمل

يوضع في أنبوب اختبار 3ml من محلول البروتين. ثم يضاف قطرات عدة من كاشف ميلون. يسخن الأنبوب فيظهر لون قرميدي Brick red.



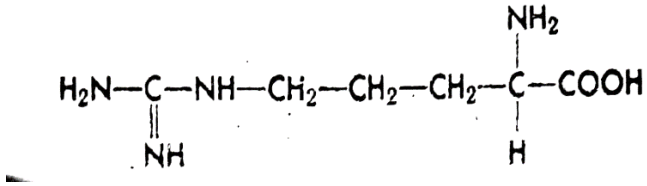
التيروسين الملح الزئبقي لثنائي نترو التيروسين

ملاحظات:

- يحضر كاشف ميلون تحت الساحبة.
- تزداد حساسية تفاعل ميلون بوجود كمية من أكاسيد الآزوت الحرة في محلول الكاشف.
- فعالية كاشف ميلون تكمن في تفاعله مع جميع الفينولات.
- تؤدي إضافة كمية فائضة من كاشف ميلون إلى محلول بلون أصفر بدلاً من اللون الأحمر. الزيادة من كاشف ميلون تؤدي إلى حدوث تفاعل نترجة بدلاً من النترزة.
- يعطي الجيلاتين نتيجة سلبية مع كاشف ميلون، وذلك لعدم وجود الحمض الأميني التيروسين في الجيلاتين.

11-1-2-4 التفاعل اللوني للآرجنين (اختبار ساكاغوتشي Sakguechi)

الهدف من الاختبار الكشف عن الآرجنين والبروتينات المحتوية عليه.



الشكل (11-4): الآرجنين

مبدأ الاختبار

يتوقف هذا الاختبار على وجود حمض الآرجنين في جزيء البروتين.

مواد التجربة

- محلول البروتين : آرجنين.
- هيدروكسيد الصوديوم 20%.
- محلول كحولي إلفا – نفتول 5% .
- ماء البروم.
- تحضير محلول هيبوبروميت الصوديومNaBrO : بحل 5ml من البروم في 100ml من محلول هيدروكسيد الصوديوم 30% تحت الساحبة على البارد. وقبل الاستخدام يمدد 6 مرات (1:5) بمحلول هيدروكسيد الصوديوم 10%.

طريقة العمل

يوضع في أنبوب اختبار 2ml من محلول البروتين. يضاف قطرات من هيدروكسيد الصوديوم 20%، حتى يصبح المحلول قلويا. ثم يضاف قطرتان من محلول كحولي إلفا – نفتول 5% . ويضاف عدة قطرات من ماء البروم، فيظهر لون أحمر ساطع إذا كان الاختبار إيجابياً.

يوضع في أنبوب اختبار 2ml من محلول الآرجنين 0.01%، ويوضع في أنبوب ثان 2ml من محلول ألبومين البيض 1% . يضاف إلى كل من الأنبوبين 2ml محلول هيدروكسيد الصوديوم 10% و 3 قطرات من محلول إلفا – النفتول 0.2%، يتم مزج الأنابيب بشكل جيد. ثم يسكب 2ml من NaBrO في كل أنبوب، وتمزج الأنابيب ثانية. يضاف بسرعة 1ml من محلول البولة 40%، من أجل ثبات اللون.

ملاحظة: يحوي الآرجنين زمرة غوانيدينية بوجود إلفا – نفتول تتأكسد بمادة هيبوبروميت في وسط قلوي، ويتشكل ناتج تكاثف بلون أحمر إلى بنفسجي.

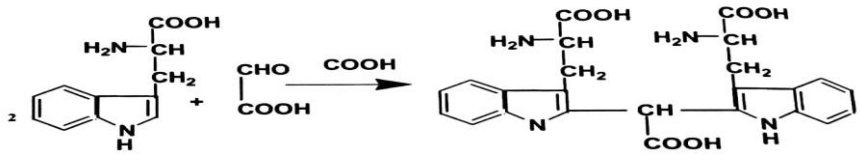
11-1-2-5 اختبار التربتوفان هوبكنز – كول

Hopkins – Cole, s Test

الهدف من الاختبار التعرف على المحاليل التي تحوي حمض التريبتوفان (البروتينات المحتويه عليه).

مبدأ الاختبار

تتفاعل مجموعة الإندول في التريبتوفان مع الزمرة الألدهيدية لحمض الجلايكوكسيليك HOC–COOH في وسط حمضي فينتج معقد بنفسجي محمر.



تريبتوفان **معقد بنفسجي**

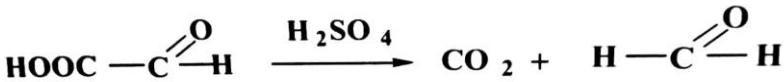
طريقة العمل

يوضع في أنبوب اختبار جاف ونظيف قطرات عدة من محلول بروتيني، يضاف نحو 2ml من حمض الخل المركز، يسخن المزيج، وبعدها يترك يبرد. يضاف إلى الأنبوب

بشكل مائل حمض الكبريت المركز فيلاحظ بعد مدة زمنية ظهور حلقة بنفسجية محمرة بين السطح الفاصل بين الطبقتين.

ملاحظات:

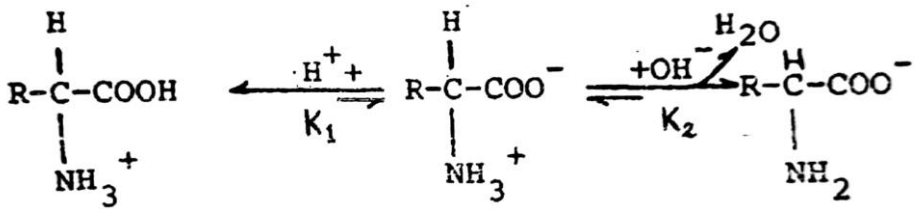
- يوجد حمض الجلايكوكسيليك على شكل شوائب في حمض الخل. يعرض حمض الخل للضوء كي يحوي حمض الجلايكوكسيليك كشائبة.
- لايحتوي الجيلاتين حمض التريبتوفان.
- يظهر اللون بشكل أسرع إذا كان المحلول دافئاً.
- بوجود كميات ضئيلة من شاردة النحاس تزداد حساسية التفاعل.
- نتيجة تأثير حمض الكبريت المركز في حمض الغلايكوكسيليك يتحرر الفورم ألدهيد.



حمض الغلايكوكسيليك فورم ألدهيد

2-11 الحموض الأمينية

تحتوي الحمض الأمينية مجموعة كربوكسيل واحدة على الأقل ومجموعة أمينو واحدة على الاقل، إذ يمكنها ذلك من أن تسلك سلوك الحمض والقلويات ويعتمد تأين هذا المجموعات – ومن ثم الشحنات التي يحملها الحمض الأميني – على درجة الـ PH حيث تكون الحموض الأمينية موجبة الشحنة في الوسط الحمضي . وسالبة الشحنة في القلوي وعلى شكل أيون ثنائي القطبية Zwitterion أي متساوي الشحنات الموجبة عند نقطة التعادل الكهربائي للحمض الأمين(pI) . وعلى ذلك يمكن معايرة الحموض الأمينية مع الحموض ومع القلويات. كما يمكن من منحنى المعايرة معرفة ثوابت تأين مجموعات الكربوكسيل والأمينو.

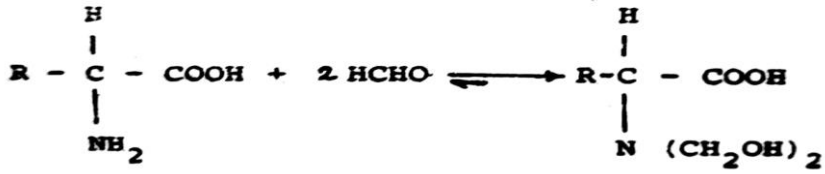


الحمض الأميني في الوسط القلوي	الأيون ثنائي القطبية Zwitterion	الحمض الأميني في الوسط الحمضي

يحدد ثابت التأين k1 تأين مجموعة الكربوكسيل COOH حيث تكون في مرحلة نصف التأين عندما يتساوى pH المحلول مع أسها الأيوني pk1 .

كما يحدد ثابت التأين k2 تأين مجموعة الأمينو NH_3^+ حيث تكون في مرحلة نصف التأين عندما يتساوى pH = pk2. غير أنه نظراً لضآلة قيمة التأين لمجموعة الأمينو الضعيفة ($k = 10^{-10}$) لايمكن تحديد نقطة انتهاء معايرتها مع القلويات باستخدام الأدلة كالفينول فتالين حيث يكون تغير لون الدليل بطيئاً وغير واضح نتيجة تشكل محلول منظم في مجال تغير لون الدليل. لذلك يستخدم جهاز قياس pH في هذه المعايرة. أو يستخدم طريقة المعايرة بإضافة الفورم ألدهيد ووجود الفينول فتالين.

تتفاعل مجموعة الأمينو مع جزيئين من الفورم ألدهيد فينتج الحمض القوي نسبياً ثنائي ميثيلول الحمض الأميني pk = 6.5 تقريباً والذي يمكن معايرته بقلوي قياسي في وجود الفينول فتالين حيث يتغير لون الدليل عند نقطة التكافؤ بإضافة حجم ضئيل جداً من القلوي:



ثنائي ميثيلول الحمض الأميني فورم ألدهيد حمض أميني

التجربة

ستجري معايرة الحمض الأميني مع محلولين قياسيين من حمض كلور الماء وهيدروكسيد الصوديوم باستخدام جهاز قياس الـ pH في غياب الفورم ألدهيد وفي وجوده لمعرفة الفائدة من إضافته. وللتأكد من استخدام دليل فينول فتالين بوجود الفورم ألدهيد لتحديد نقطة انتهاء المعايرة. وفي نهاية المعايرة يتم رسم منحن التعادل وتحديد الأس الأيونية لكل من مجموعتي الكربوكسيل والأمينو (pk1, pk2) ونقطة التعادل pI للحمض الأميني.

خذ أربعة كؤوس سعة (50 or 100 ml) ورقمها، ثم ضع في كل منها 20ml من محلول الغليسين 0.1M (7.5g/lit). استخدم مقياس الـ pH بعد ضبطه. ومحركا مغناطيسيا لتحريك المحلول أثناء المعايرة يمكن إجراء التحريك ، برج الكأس يدوياً وبعناية فائقة في أثناء المعايرة ولكن استخدام المحرك المغناطيسي أفضل.

قس رقم الـ pH لمحلول الغليسين في الكأس **الأول** واترك جهاز قياس الـ pH مفتوحاً للقياس في أثناء المعايرة. عاير المحتويات بمحلول حمض كلور الماء 0.1N مع التحريك المغناطيسي البطيء والمستمر حتى الوصول إلى pH = 2 . سجل الحجوم اللازمة من الحمض لكل تغيير في الـ pH قدره 0.5 درجة.

أضف للكأس **الثاني** عشر نقاط من دليل الفينول فتالين وعاير المحتويات لمحلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1N بالطريقة نفسها حتى الوصول ال pH = 11.2 مع تسجيل الحجوم اللازمة من القلوي لكل تغيير في الـ pH قدره 0.5 درجة. سجل أيضاً الحجم الذي لزم من القلوي لتغير لون الدليل ولاحظ عدم إمكان تحديد نهاية المعايرة بالاعتماد

على ذلك. أضف إلى الكأس **الثالث** 20ml من الفورم ألدهيد 15% (المتعادل والمحضر حديثاً) وعاير المحتويات بحمض كلور الماء كما فعلت في الكأس الأول حتى pH = 2 مع تسجيل الحجوم اللازمة من الحمض لكل تغيير في الـ pH قدره 0.5 درجة.

أضف إلى الكأس **الرابع** 10 نقاط فينول فتالين و20ml من الفورم ألدهيد وعاير المحتويات بهيدروكسيد الصوديوم كما في الكأس الثاني حتى pH = 11.2. سجل الحجم المستهلك من القلوي لكل تغيير في الـ pH قدره 0.5 درجة. والحجم الذي لزم من القلوي لإحداث التغير في لون الدليل من عديم اللون إلى الوردي الخفيف.

ارسم منحن معايرة الغلايسين بحمض كلور الماء وهيدروكسيد الصوديوم في الكأسين الأوليين حيث تكون درجات الـ pH على محور العينات والحجوم المأخوذة على محور السينات.

اجعل صفر السينات في منتصفه وسجل حجوم القلوي إلى يمين الصفر وحجوم الحمض إلى يسار الصفر. ارسم نتائج المعايرة للكأسين الثالث والرابع على المنحني نفسه ولاحظ الفرق الناتج وكيف أن إضافة الفورم ألدهيد مكنت من تحديد نهاية المعايرة بتغير لون الفينول فتالين.

حدد من منحن المعايرة مع حمض كلور الماء قيمة الأس الأيوني pk1 لمجموعة الكربوكسيل، ثم حدد من منحن المعايرة مع هيدروكسيد الصوديوم في غياب الفورم ألدهيد قيمة الأس الأيوني pk2 لمجموعة الأمينو.

ماذا حصل للأس الأيوني pk2 عند إضافة الفورم ألدهيد؟ أين تقع نقطة التعادل الكهربائي للغلايسين؟

ملاحظة : راجع الجزء النظري لرسم منحن المعايرة ونقطة التعادل.

11-3 الاختبارات الفيزيائية

11-3-1 اختبار الذوبانية للبروتينات

مبدأ الاختبار

تعد طبيعة البروتينات جزيئات عملاقة تحتوي مجموعات فعالة عليها شحنات كهربائية خاصة في السلاسل الجانبية للحموض الأمينية مثل NH_3^+ و NH_2^+ و NH^+ و COO^- و S^- و O^- .....الخ. وكذلك هي مواد امفوتيرية يذوب الكثير من البروتينات في الماء لارتباط جزيئات الماء القطبية بالمجموعات الفعالة في البروتين وتكون محاليل غروية نظراً لكبر حجم جزيئات البروتين وتتأثر درجة الذوبان بقيمة PH المحلول وتبلغ أدناها عند درجة التعادل الكهربائي للبروتين. حيث يزيد التجاذب بين الجزيئات ويسبب تجمعها وترسبها. أما في وسط حمضي بالنسبة لنقطة التعادل الكهربائي فتتناظر الجزيئات نتيجة لوجود شحنة موجبة مما يمنع ترسب الجزيئات، وكذلك في الوسط القلوي بالنسبة لنقطة التعادل الكهربائي، حيث تكون الجزيئات سالبة الشحنة الكهربائية.

مواد التجربة

- محلول زلال البيض
- محلول حمض الهيدروكلوريك HCl وهيدروكسيد الصوديوم NaOH .

طريقة العمل

اختبرِ ذوبانية زلال البيض في الماء وفي محلول حمض الهيدروكلوريك وكذلك في محلول هيدروكسيد الصوديوم.

استخلاص اللاكتوز والكازئين من مسحوق الحليب

في هذه التجربة يتم استخلاص سكر اللاكتوز من ماء الجبن بعد ترسيب وإزالة بروتينات الحليب واللاكتوز سكر ثنائي يعطي عند تحلله المائي سكر الغلكوز والغالاكتوز ، مسحوق الحليب الجاف يحتوي 50% سكر لاكتوز.

مواد التجربة

مسحوق الحليب الجاف ، حمض الخل 1% ، كربونات الصوديوم ، كحول ايثيلي 95%.

طريقة العمل

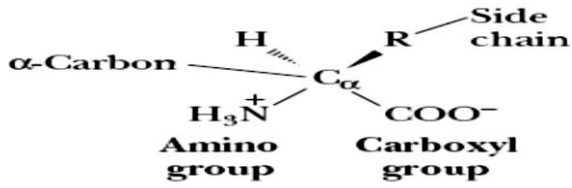
يوضع 25g من مسحوق الحليب الجاف (الخالي من الدهن) في دورق زجاجي سعه 250ml ثم يضاف 75ml من الماء الدافئ ويمزج وتضبط حراره المزيج ما بين 40 – 50°م ثم يضاف 10 ml من حمض الخل ويرج جيداً لحين تختثر بروتين الحليب (الكازئين)، ويمكن التأكد من تمام عملية الترسيب بملاحظة تغير لون المحلول من الأبيض ليصبح رائقاً ثم يرشح.

يحول الراشح الناتج إلى دورق زجاجي ويتم تركيزه إلى حجم 30 ml ويضاف 125 ml من الكحول الايثيلي يرج المزيج جيدا ويرشح ثم يترك الراشح ليتبلور لمده 24 ساعة في دورق مخروطي مغلق وتجمع بلورات اللاكتوز .

11-3-2 اختبارات الترسيب Precipitation Test

تتكون البروتينات من الوحدات البنائية، الحموض الأمينية، التي ترتبط مع بعضها بروابط ببتيدية. وتشكل البروتينات أحد المكونات المهمة جداً بالنسبة للخلايا الحية سواء من الناحية الكمّية أم من الناحية النوعية، فهي أكثر الجزيئات العضوية غزارة في الخلية (تمثل أكثر من نصف الوزن الجاف للخلايا)، كما أنها توجد في الخلايا كافة بلا استثناء، حيث تؤدي أدواراً حيوية مهمة نذكر منها: تشكيل البنية الخلوية، الوظائف البيولوجية للخلية (الوساطة الإنزيمية، تنظيم الاستقلاب ...)، إبانة الاعلام الوراثي، إنها تقوم بدور كبير في عمليات التقلص العضلي، وفي تحقيق عملية النقل لعدد كبير من المركبات البيولوجية، وفي المحافظة على الضغط الحلولي للدم وتحقيق النفوذية الانتقائية للغشاء الخلوي، إضافة إلى العديد من الوظائف الحيوية المهمة.

الحموض الأمينية العشرين الداخلة في تركيب البروتينات (باستثناء البرولين والهيدروكسي برولين) تحتوي مجموعة كربوكسيل حرة ومجموعة أمينو حرة محمولتين على ذرة الكربون إلفا الشكل (11–5). وتجدر الإشارة إلى أن المجموعتين تكونان مشحونتين في الظروف الفيزيولوجية، وذلك تبعا لقيمة الـ pH.



الشكل(11–5): صيغة مفصلة لحمض أميني متعادل.

على الرغم من اشتراك الحموض الأمينية في بعض الصفات الخاصة بمجموعتي الكربوكسيل والأمينو، فهي تختلف في الجذر R من حيث التركيب والقطبية والمجموعات التي يحملها، وهذا يؤدي إلى الاختلاف الكبير في خواصها وطرائق الكشف عنها.

يوجد في الطبيعة بروتينات مختلفة عن بعضها كثيراً. وهي تتميز بشكل عام بكبر أوزانها الجزيئية حيث يتكون الجزيء منها على بضع عشرات إلى عدة مئات من الحموض الأمينية. تلتف السلاسل الببتيدية في تراكيب معقدة (التركيب الثانوي والثالثي) تثبتها بعض الروابط الثانوية اللامشتركة كالروابط الهيدروجينية والتجمعات الكارهة للماء والتداخلات الكهربائية الساكنة وغيرها. كما أن وجود العديد من المجموعات الوظيفية المتأينة في جذور الحموض الأمينية المكونة للبروتينات يسهم ليس فقط في خواص البروتينات بل وفي ثبات تركيب جزيئاتها أيضاً.

تختلف البروتينات فيما بينها في العديد من الصفات الفيزيائية والكيميائية. على سبيل المثال البروتينات الرئيسية الموجودة في الشعر، الكولاجين، الكيراتين، فهي تختلف كثيراً في الوزن الجزيئي والتركيب الكيميائي عن البروتينات ذات الوزن الجزيئي المنخفض مثل الأنسولين الذي يعمل كهرمون. ونجد في الجانب الآخر أن الفروق في البنية الكيميائية بين بعض البروتينات قليل، ومع ذلك فإن هذه الفروق الضئيلة تترافق مع اختلافات كبيرة

في الوظائف البيولوجية التي تقوم بها هذه البروتينات في الخلية، ومثال ذلك الأنزيمات بمختلف أنواعها وهيموغلوبين A، وهيموغلوبين B اللذان يختلفان فقط بحمض أميني واحد، بينما نجد أن وظائفهما في خلايا الدم الحمراء مختلفة تماماً. ولذلك نجد عند دراسة كيمياء البروتينات والحموض الأمينية المكونة لها ضرورية لفهم الوظيفة البيولوجية التي تناسب البروتينات.

تتأثر البروتينات الذوابة بعوامل عديدة كالشوارد وبعض الأملاح والمذيبات والحرارة والحموض والقلويات حيث تترسب أو يتغير تركيبها الطبيعي (ظاهرة التشوه البروتيني) كما يتضح من التجارب الخاصة بتأثير تلك العوامل على البروتينات. والتغير الحاصل في التركيب الطبيعي للبروتين هو اختلال في التركيب الثانوي والثالثي لجزيء البروتين وارتخاء الحلزونات وانفصام بعض الروابط الهيدروجينية والأيونية وثنائية الكبريت التي تثبتها، فيفقد البروتين تركيبه المميز الأصلي ويقل ذوبانه وتزداد لزوجته وتنعدم خواصه الفيزيائية كالنشاط الأزيمي. غير أن ترسب البروتين أو تجمعه ليس مصحوباً دائما بتغير (أو تشوه) في التركيب الطبيعي، حيث يمكن ترسيب البروتينات في محاليلها دون أن يحصل لها تغير في تركيبها الطبيعي، وأفضل مثال على ذلك ترسيب البروتينات في المحاليل المشبعة من كبريتات الأمونيوم. في المقابل يمكن إحداث التغير (أوالتشوه) في التركيب الطبيعي للبروتين دون أن يترافق ذلك بترسبه أو تخثره، وهذا مايحصل عند تسخين البروتينات في وسط حمضي أو قلوي حيث يذوب البروتين المشوه في المحلول الحمضي أو القلوي.

إن دراسة تركيب البروتينات وخواصها ليس بالأمر السهل نظراً لتعقد ذلك التركيب وصعوبة عزل البروتينات بصورة نقية من مصادرها، ولحاجة تلك الدراسة إلى الوقت الطويل والتجهيزات الكثيرة. يبدأ استخلاصها بشكل عام من المواد الحيوية. يبدأ استخلاص البروتينات بسحق الخلايا، ويتم ذلك عادة بخلاط خاص، فتتحطم بنيتها المنظمة وتتحرر الجزيئات المكونة لها. يحتوي هذا المستخلص الذي يكون محلولاً غروياً على أنواع مختلفة متعددة من الجزيئات.

فكيف يمكن عزل وتنقية البروتين المرغوب من ضمن بروتينات متعددة وجزيئات أخرى من المستقلبات الوسطية؟ في الواقع لاتوجد طريقة بسيطة وحيدة لتنقية وعزل جميع البروتينات، فالطريقة المفيدة مع البروتين تؤدي إلى تشوه بروتين آخر. نضيف إلى ذلك أن حدوث تغيرات كيميائية طفيفة في البروتينات يؤدي إلى تغير كبير في بنيتها وهذا يؤدي بدوره إلى تغير في سلوك البروتين خلال عمليات التنقية، لكن مهما اختلفت طرائق عزل وتنقية البروتينات فإنها تعتمد على بعض المبادئ الأساسية، فيؤخذ في تطبيق بعض الفروق البسيطة في الصفات الفيزيائية والكيميائية الموجودة بين بروتينات المستخلص الخام. تتضمن عمليات تنقية البروتينات الكثير من محاولات الخطأ والصواب لعدم معرفة الفروق الكيميائية والفيزيائية التي تفرق البروتينات المختلفة بعضها عن بعض في بداية عملية التنقية. ولذلك نجد أن الحصول على بروتين متجانس يتطلب الاستفادة من الخواص المختلفة للبروتينات.

11-3-3 ترسيب البروتينات وتجزئتها Precipitation and Fractionation of Protein

ترتبط انحلالية البروتينات في المحلول بالعوامل الآتية: درجة الحموضة pH، القوة الشاردية، الصفات الكهربائية للمذيب، ودرجة الحرارة. إن هذه المتغيرات يمكنها أن تستعمل من أجل فصل مزائج من البروتينات، لأن كل بروتين يمثل تركيباً مميزاً وذلك بالحموض الأمينية التي تحدد سلوكه كالكهرليت.

ومن تفاعلات الترسيب مايكون عكوسياً ومنها مايكون غير عكوسي. ففي تفاعلات الترسيب العكوسية يبقى البروتين محافظاً على شكله الفراغي الثلاثي الأبعاد والفعال، أما في تفاعلات الترسيب اللاعكوسية فإن تغيرات كبيرة تطرأ على البنية الفراغية للبروتين ومن ثم تفقد جزيئة البروتين فعاليتها البيولوجية.

لندرس أهم تفاعلات الترسيب العكوسية واللاعكوسية:

11-3-3-1 تفاعلات الترسيب العكوسية

i. الترسيب بوساطة أملاح المعادن القلوية والقلوية الترابية (عمليات التمليح)

المبدأ: تؤثر الأملاح المعتدلة في انحلالية البروتينات الكروية. فعند وجود تركيز منخفض من الأملاح تزداد انحلالية كثير من البروتينات. وهي ظاهرة التمليح Salting out أي الانحلال في الوسط الملحي. أما عند تركيز مرتفع من الأملاح فإن انحلالية البروتين تبدأ بالتناقص. فعند قوة أيونية مرتفعة للغاية يمكن للبروتين أن يترسب بالكامل.

ظاهرة التمليح أو الفصل بالترسيب بالتمليح Salting out وانحلال البروتين بالملح Salting in ، تعدان من التقانات المهمة من أجل فصل مزيج بروتيني. لأن البروتينات المختلفة لاتستجيب بالطريقة نفسها لتراكيز الأملاح المعتدلة. وتكون قدرة الترسيب أعلى كلما اقترب pH المحلول من نقطة التعادل الكهربائي للبروتينات.

تختلف البروتينات من حيث نوع الأملاح اللازمة لترسبها وتركيزها، ولكن معظم البروتينات (ما عدا الببتونات Peptones) تترسب في المحاليل المائية عندما يشبع المحلول بكبريتات الأمونيوم كما تترسب أيضاً في المحاليل الحمضية عند إشباعها بكلوريد الصوديوم NaCl . أما في الغلوبيولينات فيكفي لترسيبها محلول نصف مشبع من كبريتات الأمونيوم أو محلول مشبع من كلوريد الصوديوم. وتحتفظ البروتينات المترسبة بوساطة الأملاح المعتدلة بشكلها الأصلي وبفعاليتها البيولوجية. ويمكنها أن تنحل من جديد دون تخريب ولذلك تستخدم هذه الطريقة في تجزئة البروتينات وفصل بعضها عن بعض اعتماداً على اختلاف تركيز الأملاح اللازمة لترسيب كل منها، كما تفيد هذه الطريقة في تنقية البروتينات من الشوائب.

مواد التجربة

- محلول بياض البيض ممدد عشر مرات في محلول ملحي فيزيولوجي المضاف إليه NaCl بمعدل 0.9%.
- محلول مشبع من كبريتات الأمونيوم: بإذابة 767g ملح صلب في 1 لتر ماء مقطر.
- مسحوق كبريتات الأمونيوم الناعم جداً.
- مسحوق كلوريد الصوديوم الناعم.
- مسحوق ناعم من كبريتات المغنيزيوم.
- حمض الخل 1%.

طريقة العمل:

❖ **الترسيب بوساطة كبريتات الأمونيوم**

أ- أضف إلى 1ml بياض البيض 1ml من محلول مشبع من كبريتات الأمونيوم. امزج ولاحظ ترسب الغلوبولين. أضف 2ml ماء وامزج. لاحظ انحلال الغلوبولين.

ب- أضف إلى 10ml من بياض البيض 10ml من محلول مشبع من كبريتات الأمونيوم وامزج. رشح لإزالة الغلوبولين المترسب. تكون الرشاحة الأولى غير صافية. رشح مرة ثانية على ورقة الترشيح الأولى نفسها حتى تحصل على رشاحة صافية. احفظ الرشاحة للخطوات الآتية:

- أضف إلى 2ml من الرشاحة السابقة في قطرة واحدة من محلول 1% حمض الخل. إغل لمدة عشر ثوان، تتشكل خثارة من الألبومين.
- أشبع 2ml من الرشاحة بكبريتات الأمونيوم بالطريقة الآتية: أضف قليلاً من بلورات كبريتات الأمونيوم ورج الأنبوب. أعد ذلك حتى ترى بلورات كبريتات الأمونيوم راسبة في قعر الأنبوب، لاحظ ترسب الألبومين. أضف 2ml من الماء ورج الأنبوب، هل ينحل الراسب؟

- أشبع 5ml من الرشاحة بكبريتات الأمونيوم. رشح، أضف قطرة من 1% حمض الخل وإغل ثم لاحظ عدم تكون الخثارة. هذا دليل على أن الألبومين قد ترسب تماماً بالمحلول المشبع من كبريتات الأمونيوم.

❖ **الترسيب بوساطة كلوريد الصوديوم وكبريتات المغنيزيوم**

- خذ أنبوبي اختبار جافين ونظيفين وضع في كل منهما 5ml من محلول بروتين بياض البيض.
- أضف وبشكل تدريجي إلى الأنبوب **الأول** مسحوق كلوريد الصوديوم وإلى الأنبوب **الثاني** مسحوق كبريتات المغنيزيوم مع التحريك اللطيف والمستمر حتى الحصول على المحلول المشبع.
- اترك الأنبوبين لمدة دقائق ولاحظ ظهور الراسب في أسفل الأنبوبين الذي يعد غلوبولينات. وهذا يعني أن الألبومينات لاتترسب من محاليلها إذا وجدت في وسط مشبع من محاليل الأملاح المعتدلة للمعادن القلوية والقلوية الترابية (بعكس ترسيب الألبومينات بوساطة محلول مشبع من كبريتات الأمونيوم).
- رشح الأنبوبين وافصل الراسب عن الرشاحة الحاوية الألبومينات. أضف إلى رشاحة محلول حمض الخل حتى يصبح الوسط حمضي (استخدم ورق عباد الشمس) ولاحظ ظهور الراسب من الألبومينات.

ii. الترسيب بوساطة المذيبات العضوية

المبدأ: تقوم المذيبات العضوية المعتدلة القابلة للامتزاج بالماء كالكحول واسيتون بسحب الماء الموجود على شكل غشاء محيط بجزيئات البروتينات عند وجودها في المحاليل المائية مما يؤدي إلى انخفاض ثبات الجزيئات في المحلول وترسبها. ولقد بينت دراسة كمية حول هذه الظاهرة ،أن الانحلالية البروتينية، عند درجة حموضة وقوة تشردية معينتين، تكون مرتبطة بثابت العزل الكهربائي (القطبية) للوسط. وبما أن ثابت العزل الكهربائي للايتانول أو الاسيتون (أو مذيبات عضوية أخرى) يكون بشكل عام أصغر من ثابت العزل

الكهربائي للماء، لذا فإن إضافة المذيبات العضوية الآنفة الذكر إلى محلول مائي للبروتينات يزيد القوى الجاذبة بين الشحنات المتضادة، ويخفض من درجة تشرد السلاسل الجانبية للبروتينات. وعندئذ تميل الجزيئات البروتينية لأن تتجمع وتترسب. ويكون الترسيب أكثر فعالية كلما اقترب المحلول من نقطة التعادل الكهربائي للبروتين. كما أن الترسيب بالكحول يتضح أكثر عند وجود الالكتروليتات في المحلول، فبإضافة قليل من كلوريد الصوديوم إلى المحلول البروتيني يساعد على تعديل شحنات جزيئات البروتين وتسهيل ترسيبها بالكحول. ويمكن للمزائج من البروتينات أن تنفصل عن بعضها بعضاً عند درجة حرارة منخفضة بوساطة الاختلافات الكمية لانحلاليتها في المزائج كحول – ماء، أو اسيتون – ماء. وتعد عملية الترسيب هذه من التفاعلات العكوسية لمحافظة البروتين المترسب على بنيته الفراغية الأصلية الفعالة بيولوجياً، ومن ثم إمكان إذابته من جديد في الماء. إلا أنه من مساوئ هذه الطريقة تخرب البروتينات إذا تمت عملية الترسيب في درجات الحرارة المرتفعة، لذا يجب أن نجري هذه العملية في درجات حرارة منخفضة محصورة بين صفر و 54 ْم.

مواد التجربة

- محلول بروتين بياض البيض (من دون كلوريد الصوديوم).
- مسحوق كلوريد الصوديوم.
- كحول ايتيلي أو اسيتون.

طريقة العمل

ضع في أنبوب اختبار جاف ونظيف 2ml من محلول البروتين وأضف إليه كمية قليلة من ملح كلوريد الصوديوم ، ثم رج المحتويات حتى تمام الذوبان.

أضف إلى الأنبوب نحو 5ml من الكحول الايتيلي أو أسيتون بهدوء على جدران الأنبوب وحرك بلطف ثم اترك الأنبوب بحالة هدوء مدة 7 دقائق ملاحظ ظهور الراسب.

بعد ظهور الراسب خذ جزءاً منه إلى أنبوب اختبار آخر، وأضف إليه عدة ميللي لترات من الماء المقطر ولاحظ انحلال الراسب من جديد نتيجة انخفاض تركيز المذيب العضوي الذي استخدم في ترسيب البروتين.

3-3-1 تفاعلات الترسيب غير العكوسية

a. الترسيب بوساطة الحموض المعدنية المركزة

المبدأ: تعد عملية ترسيب البروتينات من محاليلها باستخدام الحموض المعدنية المركزة من التفاعلات غير العكوسية وتؤدي إلى تخريب البنية الفراغية الفعالة للبروتين. وتفسر هذه الظاهرة بأن الحموض المعدنية المركزة تؤدي إلى سحب جزيئات الماء المحيطة بجزيئات البروتين وتعديل شحناتها السالبة وتؤدي إلى ترسيب البروتينات إضافة إلى تغيير تركيبها. هذا وإن الراسب المتشكل بتأثير الحموض المعدنية المركزة لايذوب من جديد بالماء. إلا أن الراسب المتشكل بهذه الطريقة يذوب بإضافة كميات زائدة من حمض كلور الماء وحمض الكبريت ولا يذوب بزيادة من حمض الآزوت. أما حمض الفوسفور المركز فإنه لايرسب البروتينات.

مواد التجربة

- محلول بروتيني (ألبومين أو محلول بروتين بياض البيض).
- حمض كلور الماء المركز، حمض الكبريت المركز، وحمض الفوسفور المركز.

طريقة العمل

خذ أربعة أنابيب جافة وضع كل منها 2ml من المحلول البروتيني. ثم أضف إلى الأنابيب 1ml من جميع الحموض المركزة : الكبريت والآزوت، وكلور الماء، والفوسفور. انتبه لإضافة الحموض ببطء بعد إمالة الأنبوب وعلى جداره الداخلي.

اترك الأنابيب الأربعة على حاملها تستقر لمدة من الزمن، ولاحظ تشكل حلقات بيضاء اللون في كل من الأنابيب الثلاثة الأولى وذلك عند السطح الفاصل بين السائلين وعدم تشكل مثل هذه الحلقة في الأنبوب الحاوي حمض الفوسفور المركز. سخن هذه الأنابيب بحذر وهدوء ولاحظ اصفرار الحلقة.

اترك هذه الأنابيب تبرد وخضها بحذر ثم أضف إلى **الأول** زيادة من HCl وإلى **الثاني** زيادة حمض الكبريت وإلى **الثالث** زيادة من حمض الآزوت .لاحظ مايحدث للراسب، سجل النتائج.

ملاحظات: 1- يستخدم اختبار الترسيب بإضافة حمض الآزوت المركز للكشف السريع عن وجود البروتينات في المحاليل البيولوجية كالبول مثلاً.

2-لاترسب البروتينات بتأثير القلويات المركزة ولكن تركيبها الطبيعي يتغير عند الارتفاع الكبير في درجة الـ pH ويحصل لها تحلل مائي جزئي.

b. الترسيب بوساطة الحموض العضوية

المبدأ: تعد أيضاً عملية ترسيب البروتينات بالحموض العضوية من التفاعلات غير العكوسة المؤدية إلى تشوه البنية الثلاثية الأبعاد الفعالة للبروتينات ومن ثم اختفاء فعاليتها البيولوجية المستخدمة لهذا الغرض نذكر: ثلاثي كلور حمض الخل وكبريت حمض الصفصاف Sulfosalicilic Acid.

مواد التجربة

1- محلول بروتيني (بياض البيض أو بروتين نباتي...).

2- محلول ثلاثي كلور حمض الخل 20%. CCl_3COOH

3- محلول كبريت حمض الصفصاف 20%. $C_6H_3(OH)(COOH)SO_3$

طريقة العمل

خذ ثلاثة أنابيب نظيفة وجافة وضع في كل منها 2ml محلولا بروتينيا.

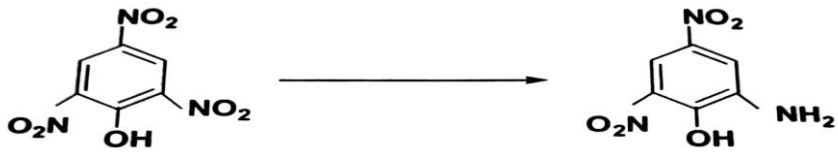
أضف في الأنبوب **الأول** 1ml ثلاثي كلور حمض الخل، **والثاني** 1ml كبريت حمض الصفصاف، **والثالث** 1ml ماء.

امزج الأنابيب جيداً ولاحظ ظهور راسب من البروتين. سجل ملاحظاتك.

ملاحظة: يعمل ثلاثي كلور حمض الخل على ترسيب البروتينات فقط من محاليلها دون أن يؤدي ذلك إلى ترسيب نواتج تفككها في المحلول. كما لا تتأثر الحموض الأمينية بهذه المعاملة. لذلك يستخدم ثلاثي كلور حمض الخل للفصل الكامل للبروتين من السوائل البيولوجية مثل مصل الدم، وتبقى عندها نواتج تفكك البروتين في المحلول بعد الترشيح.

c. الترسيب بوساطة الكواشف القلويدية

المبدأ: تحمل البروتينات شحنات موجبة في الأوساط الحمضية، أي عندما تكون الـ pH أقل من نقطة التعادل الكهربائي pI، بذلك فإن إضافة بعض الأيونات السالبة تؤدي إلى معادلة شحناتها الموجبة وإعطاء نواتج تترسب في المحلول. ولهذا فالبروتين هنا يتشوه وهو غير قابل للعكس. ومن أشهر الكواشف القلويدية المستخدمة لهذه الغاية : حمض البكريك (حمض المر) والتانينات (العفصات).



حمض البيكريك (المر) **حمض بيكراميك**

يرجع حمض البيكريك إلى البيكراميك ذي اللون الأحمر عند تسخينه مع البروتين في وسط قلوي (يتم هذا التفاعل مع مرجعات أخرى كالغلوكوز). أما التانينات (العفصات) فتتفاعل مع البروتينات الذوابة مؤدية إلى ترسبها على شكل تانات البروتين. أما البروتينات غير الذوابة (اللامنحله) كجلود الحيوانات فتحولها إلى أكثر تماسكاً.

مواد التجربة

1- محلول بروتيني (زلال البيض 1%)

2- محلول تانيك مشبع.

3- حمض خل 1%.

4- حمض بيكريك 1%.

5- مسحوق كربونات الصوديوم.

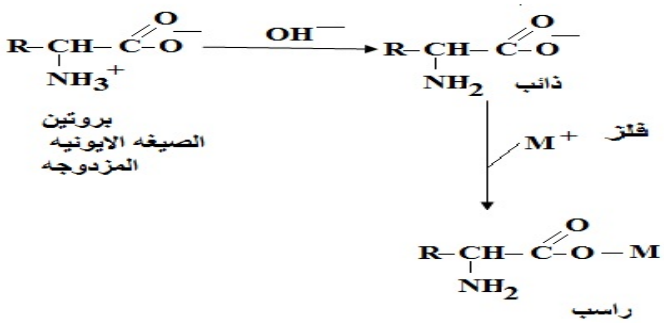
طريقة العمل

- ضع في أنبوب اختبار جاف ونظيف 2ml محلولا بروتينيا ثم 0.5ml مسحوق كربونات الصوديوم. أضف 2 قطرة محلول حمض البيكريك إلى اللون الأحمر.
- ضع في أنبوب اختبار جاف ونظيف 2ml محلولاً بروتينياً ، ثم أضف قطرتين من محلول تانين مشبع وقطرتين محلول حمض الخل. لاحظ الراسب الأصفر الرمادي المتشكل.

ملاحظة: أضف حمض الخل ليزيد من الشحنة الموجبة على البروتين فيزيد بذلك من قابلية تفاعله مع الشوارد السالبة للكاشف.

d. الترسيب بوساطة أملاح المعادن الثقيلة

المبدأ: تؤدي إضافة أملاح المعادن الثقيلة (أملاح الرصاص والنحاس والزئبق والفضة والزنك وغيرها من المعادن الثقيلة) إلى ترسيب البروتينات في محاليلها. وتعد عملية الترسيب هذه من التفاعلات غير العكوسية المؤدية إلى تشوه البنية الفراغية الفعالة للبروتين، ومن ثم إخفاء فعاليته البيولوجية. ويعتمد ذلك على عوامل عدة أهمها درجة الـ pH. ففي الوسط القلوي عموماً تحمل البروتينات شحنات سالبة ، وبذلك تؤدي إضافة تلك الشوارد الثقيلة الموجبة الشحنة إلى تعديل شحنة البروتين، ومن ثم إلى ترسبه لانعدام التنافر بين الجزيئات البروتينية المتجاورة. والبروتين المترسب في هذه الحالة يكون مصحوباً بتغيرات (أو تشوهات) في التركيب الطبيعي للبروتين أي في التركيب الثانوي والثالثي.



تختلف البروتينات في تفاعلها مع أملاح المعادن الثقيلة نظراً لاختلافها هي من حيث تركيبها في المحاليل ودرجة تميهها أي درجة وجود الغشاء المائي حول جزيئاتها. وعلى الرغم من أن ترسب أيونات المعادن الثقيلة للبروتينات يفسر بمعادلتها للشحنات الكهربائية التي يحملها البروتين، فإن هذا التفسير ليس كافيا في كل الحالات. يذوب الراسب المتشكل أحياناً بزيادة تركيز العامل المرسب (كالنحاس والرصاص) ولكنه لايذوب بزيادة تركيز بعض الأيونات المرسبة الأخرى كالفضة والزئبق، وربما يعود ذلك إلى تشكل معقدات تساندية ذوابة مع شوارد النحاس والرصاص. وتستعمل تفاعلات ترسيب البروتينات بوساطة شوارد المعادن الثقيلة في الإسعافات الأولية عند التسمم بهذه الأملاح من أجل إقلال سميتها وذلك بإعطاء المصاب كميات كبيرة من بروتينات البيض أو الحليب.

مواد تجربة

1- محلول بروتين بياض البيض.
2- محلول كبريتات النحاس 5%.
3- محلول خلات الرصاص 2%.
4- محلول نترات الفضة 2%.

طريقة العمل

خذ خمسة أنابيب وضع في كل منها 2ml من بياض البيض. أضف لكل أنبوب 3ml من المحاليل الآتية: **للأول** كبريتات النحاس، **وللثاني** خلات الرصاص **وللثالث** نترات

الفضة **وللرابع** كلور الزئبق **وللخامس** ماء. وبعد ظهور الراسب في الأنابيب الأربعة الأولى أضف إلى كل منها زيادة من محاليل الأملاح ولاحظ انحلال الراسب واختفاء العكارة في الأنبوبين الأولين وعدم انحلاله في الأنبوب الثالث والرابع الحاويين نترات فضة وكلور الزئبق.

e. الترسيب بوساطة الحرارة

المبدأ: تزداد درجة انحلالية البروتينات في المحاليل المائية مع ازدياد درجة الحرارة ضمن مجال محدد وثابت. هذا المجال يقع بين 0–40° م (باستثناء بعض البروتينات التي تشذ عن هذه القاعدة). وبدءاً من الدرجة 40° م تصبح أغلب البروتينات غير ثابتة إلى حد كبير وتبدأ بالتشوه مع انخفاض الانحلالية بشكل عام عند درجة الحموضة المعتدلة. ولذلك فإن طرائق تجزئة البروتينات تتم بشكل عام على درجات حرارة محصورة بين 0 – 40° م أو عند درجات أخفض للمحافظة على فعاليتها البيولوجية. ومع ذلك فإنه توجد بعض الاستثناءات حيث إن بعض البروتينات تكون أكثر ثباتاً ويكون لها انحلالية أعظمية في درجة حرارة وسطها الخلوي العادي. إن أغلب الجزيئات البروتينية لاتحتفظ بفعاليتها البيولوجية إلا ضمن حدود ضيقة من درجات الحرارة كما أشرنا أعلاه. وتعريض الجزيئات البروتينية إلى درجات حرارة مرتفعة أو إلى العوامل الأخرى التي ذكرناها سابقاً بسبب التغير في البنية الأصلية للبروتين يطلق عليه اسم التشوه أو التمسخ Denaturation والذي ينعكس سلباً على انحلالية البروتينات الكروية. وإن أغلب البروتينات تتخرب عند التسخين إلى مافوق ال50 – 60° م ، كما ان بعضا منها يتخرب عندما يبرد إلى مادون 10 – 15° م. إن تشكل خثرة بيضاء غير ذوابة في أثناء تسخين بياض البيض يعد مثالاً واضحاً ومعبراً عن التخريب بوساطة الحرارة. والتخريب الحراري للبروتينات يكون على الأغلب غير عكوسياً، يشذ عن هذه القاعدة بعض البروتينات التي تبدي حالة التخريب الحراري العكوسي. وأهم مثال لهذه البروتينات نذكر إنزيم الريبونيوكلياز Ribonuclease الذي يفقد فعاليته بالتسخين والذي يستعيدها بشكل سريع بعد التبريد. وقد تبين للمختصصين في هذا المجال أن إنزيم الريبونيوكلياز يتحمل درجة

حرارة تصل إلى 90° م . إن إضافة الركازة إلى الإنزيم وهو ذو طبيعة بروتينية، ترفع درجة تحمله للحرارة 10° م عن المعتاد قبل أن يتشوه.

لاتؤثر الحرارة على البنية الأولية للبروتينات ولكنها تعمل على تخريب البنية الثانوية لها. وتتعلق سرعة التخريب الحراري (الترسيب الحراري) للبروتينات بدرجة حموضة الوسط وبوجود المركبات المتشردة فيه، فعملية تخثر الجزيئات البروتينية تجري بسرعة وبدرجة عالية عند نقطة تعادلها الكهربائي. أما في حالة انزياح درجة حموضة الوسط عن نقطة التعادل الكهربائي سواء إلى الجانب الحمضي أم إلى الجانب القلوي، فإن ذلك يؤدي إلى إعاقة ترسيب البروتينات. أما في الأوساط الحمضية القلوية القوية (درجات الـ pH المتطرفة) فإن ترسيب البروتينات لايتم من الناحية العملية. فعند إضافة الحموض تكون جزيئات البروتينات مشحونة ايجاباً، وعند إضافة القلويات تكون مشحونة سلباً، إلا أن إضافة بعض المركبات المتشردة مثل كلوريد الصوديوم تسرع وتسهل ترسيب البروتينات حتى في الأوساط الحمضية. ويمكن تفسير ذلك من خلال معادلة الشحنات الكهربائية للجزيئات البروتينية ونزع التمية والتقاء الدقائق البروتينية المشوهة وترسبها.

مواد التجربة

1- محلول بياض البيض 1%.
2- محلول حمض الخل بتركيزين : 1% و15%.
3- هيدروكسيد الصوديوم 10%.
4- محلول كلوريد الصوديوم المشبع.

طريقة العمل

خذ خمسة أنابيب جافة ونظيفة ورقمها. ثم ضع في كل منها 1ml من المحلول البروتيني، ونفذ الخطوات الآتية:

- سخن الأنبوب **الأول** حتى الغليان ولاحظ تعكر المحلول البروتيني، لكن دون أن يظهر الراسب في الأنبوب.

- أضف إلى بروتين الأنبوب **الثاني** قطرة أو قطرتين فقط من محلول حمض الخل 1%، وسخن حتى الغليان ثم لاحظ ترسب البروتين بسرعة في قعر الأنبوب، وذلك لأن جزيئة البروتين تكون في هذه الحالة معتدلة كهربائياً تقريباً ودرجة حموضة المحلول البروتيني تكون قريبة من نقطة التعادل الكهربائي للبروتين.
- أضف إلى الأنبوب **الثالث** نحو 10 قطرات من محلول حمض الخل 15% وسخن حتى الغليان، ولاحظ عدم تشكل راسب، وذلك لأن جزيئة البروتين تملك في هذه الحالة عدداً كبيراً من الشحنات الموجبة مما يعيق عملية الترسيب.
- أضف إلى الأنبوب **الرابع** عدة قطرات 5 – 10 من محلول هيدروكسيد الصوديوم وسخن حتى الغليان ولاحظ أيضاً عدم ظهور راسب، وذلك لأن جزيئة البروتين تكون في هذه الحالة أيضاً مشحونة بعدد كبير من الشحنات السالبة ممايعيق ترسيب البروتين.
- أضف إلى الأنبوب **الخامس** 4 –5 قطرات من محلول حمض الخل 15% و6 –8 قطرات من محلول كلوريد الصوديوم وسخن حتى الغليان ولاحظ تشكل راسب بسرعة، فسر ذلك؟

ملاحظة: من الناحية العملية يستخدم الترسيب الحراري للبروتينات من أجل فصل مزيج من البروتينات بعضها عن البعض، وذلك لأن جزيئات المزيج البروتيني المختلفة لاتترسب جميعها في درجة حرارة واحدة.

4-11 الطبيعة المذبذبة للبروتينات Amphoteric Nature of Proteins

المبدأ: تحتوي البروتينات شحنات موجبة وسالبة نتيجة وجود المجموعات الكربوكسيلية والأمينية الإضافية على جذور بعض الحموض الأمينية الداخلة في تركيب البروتينات. ونتيجة لوجود تلك الشحنات فإن البروتينات تسلك سلوك الحموض عند تفاعلها مع القواعد، وتسلك سلوك القواعد عند تفاعلها مع الحموض. وهذا مايعرف بالطبيعة المذبذبة للبروتينات.

إن الشحنات الكهربائية التي تحملها البروتينات تختلف تبعاً لنوع البروتين، وتختلف أيضاَ باختلاف درجة الحموضة pH . إن زيادة الحموضة أو إضافة الحموض للبروتينات تؤدي إلى معادلة شحناتها السالبة، فتصبح البروتينات موجبة الشحنات في الوسط الحمضي. أما إضافة القلويات فتعادل الشحنات الموجبة وتكتسب البروتينات بذلك شحنات سالبة في الوسط القلوي.

مواد التجربة

1- محلول بروتيني.
2- هيدروكسيد الصوديوم 0.1N
3- 0.1N HCl
4- دليل فينول فتالين 1%: أذب 1g من المادة في نصف لتر كحول، ثم أضف ماء مقطرا حتى يصبح الحجم 1لتر مع التحريك المستمر والترشيح في حال ظهور راسب. مجال التغير [8.2-10] pH .
5- دليل أحمر الكونغو 0.1%: يحضر بالإذابة في الماء ومجال الـ [3,5.2] pH هذا الدليل أزرق في الوسط الحمضي، وأحمر في الوسط القلوي.

طريقة العمل

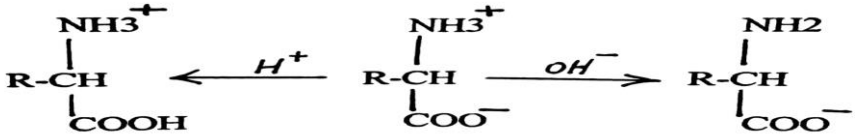
- مدد مستخدماً الماء المقطر قطرة واحدة من حمض كلور الماء إلى 5% في أنبوب اختبار. خض المحتويات جيداً وخذ منها قطرة واحدة إلى أنبوب اختبار ثان. وأضف إليها 3ml من الماء المقطر، وقطرة من دليل أحمر الكونغو فيتكون لون أزرق. أضف إلى محتوى الأنبوب قليلاً من المحلول البروتيني. حرك المحتويات ولاحظ تغير اللون إلى الأحمر. فسر ذلك!
- أضف نقطة واحدة من محلول هيدروكسيد الصوديوم إلى 5ml ماء مقطرا في أنبوب اختبار. خض الأنبوب جيداً وخذ منه قطرة واحدة إلى أنبوب اختبار آخر ، وأضف فوقها 3ml ماء مقطرا وقطرة واحدة من دليل الفينول فتالين فيتلون المحلول باللون

الوردي. أضف إلى محتوى الأنبوب قليلا من المحلول البروتيني. حرك المحتويات جيداً ولاحظ زوال اللون. فسر ذلك!

تحديد نقطة التعادل الكهربائي

المبدأ: نظراً للطبيعة المذبذبة للبروتينات فإن ذوبانها يتأثر بدرجة حموضة الوسط. يتناقص الذوبان إلى الحد الأدنى عند نقطة التعادل الكهربائي للبروتين. تعرف نقطة التعادل الكهربائي للبروتين ، بأنها درجة الـ pH الموجود فيها البروتين والتي يتساوى عندها عدد الشحنات الموجبة والسالبة على جزيء البروتين بحيث يصبح وكأنه لايحمل شحنات كهربائية، وتكون فيها قابلية ذوبان البروتين ذات حد أدنى وتخثره سهلاً. تحتوي البروتينات حموضا أمينية حمضية وأخرى قلوية قاعدية. ولذلك تسلك مسلك المواد المذبذبة، فالبروتينات قادرة على اعطاء وقبول البروتونات H^+.

في الوسط الحمضي، حيث توجد زيادة من البروتونات ، تكتسب جزيئات البروتين شحنة موجبة ، وفي الوسط القلوي توجد زيادة من أيونات الهيدروكسيل OH^- تكتسب جزيئات البروتين شحنة سالبة. وعند درجة حموضة معينة حيث يتساوى عندها عدد الشحنات الموجبة والسالبة ، تكون شحنة جزيئات البروتين الإجمالية (الصافية) تساوي الصفر.



الشكل(11-6): شحنة الحمض الأميني بالوسط الحمضي والقلوي.

ومن الناحية العملية يمكن تحديد نقطة التعادل الكهربائي (pI) لأي بروتين من خلال معايرة المجموعات الحمضية بقلوي قياسي (نظامي) ومعايرة المجموعات القلوية بحمض قياسي (نظامي) مع متابعة تغيرات الـ pH في كلا النوعين من المعايرة . وبرسم منحن معايرة المجموعات الحمضية بدلالة تغيرات الـ pH ورسم منحن معايرة المجموعات القلوية بدلالة تغيرات الـ pH نحصل على منحنيين يتلاقيان بنقطة لاتكون فيها جزيئات البروتين

مشحونة، وتقابل pH نقطة التعادل الكهربائية. كما يمكن من منحنيات المعايرة معرفة ثوابت تأين مجموعة الكربوكسيل ومجموعات الأمينو.

البروتين	pI	البروتين	pI
ببسين	أقل من 1	اينسولين	5.3
كيزين الحليب	4.55	جلايادين القمح	6.5
ألبومين البيض	4.6	هيموغلوبين الدم	6.7
جيلاتين	4.8	سايتوكروم c	10.6

التجربة

رقم خمسة أنابيب اختبار ، وأضف إليها بالماصة المدرجة أو من السحاحة الحجوم المدونة في الجدول أدناه، من حمض الخل أولاً ثم من خلات الصوديوم. أضف بعد ذلك محلول الجيلاتين ورج جيداً. أضف بعد ذلك محلول الجيلاتين وحرك جيداً ثم أضف الكحول الإيتيلي.

رقم الأنبوب	ml حمض الخل 0.1M	خلات صوديوم 0.1M	محلول الجيلاتين	كحول ايتيلي
1	2.7	0.3	1	5
2	2.1	0.9	1	5
3	1.5	1.5	1	5
4	0.9	2.1	1	5
5	0.3	2.7	1	5

رج الأنابيب بسدها بالإبهام وقلبها حتى تمزج المحتويات جيداً. راقب درجة الترسب أو التعكر في الأنابيب جميعها بعد بضع دقائق وحدد في أيها حدث ترسيب أعظمي. ثم احسب pH فيه باستخدام معادلة هندرسن هاسيلبالخ (حيث pka = 4.7 لحمض الخل). بذلك تكون حصلت على نقطة التعادل الكهربائي للجيلاتين.

ملاحظة: يمكن إجراء التجربة على الكيزين ، عندها لانحتاج إضافة الكحول.

5-11 التقدير الكمي للبروتينات، طريقة كيلداهل Kjeldahel

تقتضي كثير من التحاليل تقدير البروتينات كمياً في بعض المواد أو الأنسجة أو السوائل. أكثر طرق التحليل استخداماً هي الطرق الكيميائية والطرق الطيفية الضوئية.

وتعد طريقة كيلداهل Kjeldahel لتقدير الآزوت (النيتروجين) أكثر الطرق شيوعاً، حيث تحتوي البروتينات نحو 16% نيتروجين يجري تحويله إلى أمونيا، ثم تقدر الأمونيا الناتجة ومنها يمكن حساب كمية البروتين.

أما في طريقة التحليل الطيفي الضوئي Spectrophotometric Methods فيجري تحويل البروتينات إلى مشتقات ملونة تتناسب شدة ألوانها طرداً مع تركيز البروتين. حيث يجري تقدير ألوان تلك المشتقات بأجهزة التحليل الطيفي الضوئي ومقارنتها مع شدة الألوان الناتجة من محاليل بروتينية معلومة التراكيز.

ومن أكثر تلك الطرق شيوعاً طريقة بايوريت التي سبق ذكرها والتي تعتمد على تفاعلات الروابط الببتيدية. وطريقة فولين Folin التي تعتمد على تفاعلات حمضي التيروسين والتربتوفان الموجودين في البروتينات.

وسنشرح طريقة كيلداهل نظراً لأهميتها الكبيرة في التحاليل الغذائية والزراعية عموماً.

يتم تقدير النيتروجين بطريقة كيلداهل بالغليان الطويل (الهضم) مع حمض الكبريت 98% فيتحول نيتروجين الحموض الأمينية إلى كبريتات الأمونيوم. وبعد اكتمال عملية

الهضم تجري عملية تقطير، تطرد فيها الأمونيا من كبريتات الأمونيوم بإضافة هيدروكسيد الصوديوم مع التسخين ويتم استقبالها في كمية محددة وزائدة من محلول حمضي كحمض كلور الماء. يجري تقدير الأمونيا بطريقة المعايرة الرجوعية Back titration حيث تعاير بعد نهاية عملية التقطير الكمية الزائدة من الحمض بمحلول قلوي قياسي. ومن الفرق بين كمية الحمض الكلية والكمية الزائدة إذ يعرف ماتفاعل منه مع الأمونيا. التفاعلات الآتية توضح ذلك:

الهضم:

$$\text{Protein} + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4$$

التقطير:

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \rightarrow 2NH_3 + 2H_2O + Na_2SO_4$$

$$NH_3 + \underline{HCl}\ (\text{كمية زائدة منه}) \rightarrow NH_4Cl$$

المعايرة الرجوعية:

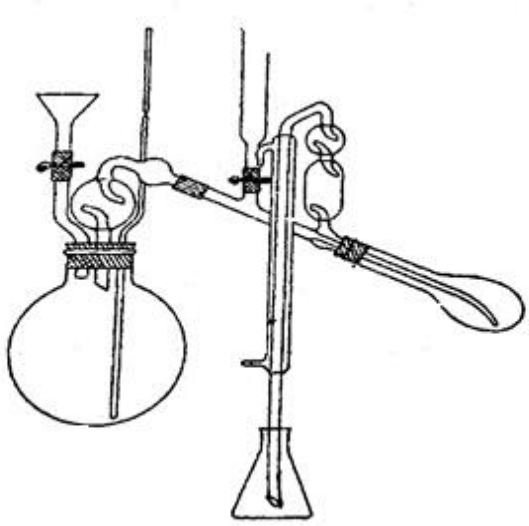
$$\underline{HCl}\ (\text{الزيادة منه}) + \underline{NaOH} \rightarrow NaCl + H_2O$$

محلول قياسي

توجد طريقتان لكيلداهل تعتمدان على المبدأ نفسه تسمى الأولى بالطريقة الكبرى Macro Kjeldadel وفيها يكون وزن العينة في حدود بضع غرامات وتستغرق عملية الهضم والتقطير فيها بضع ساعات.

أما الطريقة الصغرى Micro Kjeldahel فيكون فيها وزن العينة أقل من 0.5g وهي أكثر حساسية من الأولى وتستغرق وقت أقصر في عمليتي الهضم والتقطير. توجد بضعة أجهزة زجاجية لإجراء طريقة التحليل وسنستخدم إحداها في هذه التجربة لتقدير البروتين في عينة من دقيق القمح (الطحين) بالطريقة الصغرى .

تفقد أجزاء جهاز مايكرو كيلداهل وتوصيلاته قبل البدء بالتجربة حسب الشكل(11-7) .



الشكل(11-7): أحد أجهزة مايكرو كيلداهل.

مواد التجربة:

1- دقيق القمح

2- مسحوق كبريتات البوتاسيوم ، وبلورات من كبريتات النحاس.

3- حمض الكبريت المركز.

4- حمض كلور الماء 0.1N

5- محلول هيدروكسيد الصوديوم 40% ، محلول قياسي منه 0.1N

6- أحمر الميتيل أو فينول فتالين.

تقدير نسبة البروتين في دقيق القمح .

1- زن على ورقة ترشيح صغيرة وإلى أقرب mg ميللغرام عينة من الدقيق بحدود 200-300mg

2- اطو ورقة الترشيح بحذر حيث لا يفقد منها شيء ثم ضعها في دورق الجهاز . أضف نحو ربع غرام من كبريتات البوتاسيوم وبضع بللورات من كبريتات النحاس وذلك للمساعدة في عملية الهضم ورفع درجة الغليان.

3- أضف للدورق نحو 5ml حمض الكبريت المركز وسخن الناتج في خزانة الغازات أو على حامل دوارق كيلداهل الخاص بالهضم بحيث تسحب الغازات الناتجة بالتفريغ المائي أو الهوائي. ارفع الحرارة حتى الغليان واستمر في الغليان (مع التحريك الخفيف من آن لآخر) لمدة ساعة على الأقل ليكون الناتج بعدها رائقاً وعديم اللون أو أزرق خفيفا. وإلا يضاف قليلاً من حمض الكبريت المركز ويستمر الغليان حتى يصبح المحلول رائقاً عديم اللون ثم يترك الدورق ليبرد.

4- ثبت الدورق في مكانه من جهاز التقطير . وأضف إليه ماء مقطرا باحتراس حتى يصبح مستوى المحلول في الدورق أعلى بقليل من نهاية أنبوب البخار المار فيه.

5- تأكد من كفاية الماء بالدورق، توليد البخار (من ثلث إلى نصف سعته ماء)، وأضف إليه عدة نقاط من دليل أحمر الميثيل للتأكد من أنه حمضي التأثير، فإذا لم يكن كذلك أضف إليه بضع نقاط من حمض الكبريت المركز ليصبح لونه أحمر. أشعل اللهب تحت دورق توليد البخار ثم افتح الماء للجريان في المكثف .

6- ضع 10ml من محلول حمض كلور الماء 0.1N في دورق مخروطي (ارلينماير) وضعه تحت المكثف لتنغمر نهاية المكثف في المحلول الحمضي.

7- ضع نحو 15ml من محلول هيدروكسيد الصوديوم 40% في مكانها فوق دورق التقطير، وقبل أن يبدأ الغليان في دورق توليد البخار، افسح المجال لمحلول الصودا بالنزول إلى دورق التقطير ثم أغلق السدادة وضع قليلاً من الماء المقطر مكان الصودا واسمح لها بالنزول للدورق وأغلق السدادة بإحكام.

8- استمر بالتقطير بعد غليان الماء في دورق توليد البخار لمدة عشر دقائق على الأقل أو حتى يتضاعف حجم المحلول تقريباً في الدورق المخروطي.

9- أنزل مستوى الدورق المخروطي واغسل نهاية المكثف الخارجية بقليل من الماء المقطر تستقبلها في الدورق المخروطي نفسه، ثم استمر بالتقطير بعد ذلك لمدة دقيقتين تقريباً.

10-افتح السدادة التي نزل منها محلول هيدروكسيد الصوديوم لفتح الجهاز على الضغط الجوي، وأطفئ اللهب تحت دورق البخار، وأغلق مجرى الماء الداخل للمكثف.

11-عاير محتويات الدورق المخروطي بمحلول قياسي من هيدروكسيد الصوديوم 0.1N بوجود دليل الفينول فتالين أو أحمر الميتيل.

12-أعد تجربة الهضم والتقطير مستخدماً ورقة ترشيح من دون عينة فتحصل على الشاهد. أجر المعايرة للشاهد ولاحظ أنه إذا كانت الكيمياويات نقية وخالية من النيتروجين، فإن نتيجة معايرة الشاهد تكون مساوية لنتيجة معايرة 10ml من حمض كلور الماء مباشرة بهيدروكسيد الصوديوم القياسية.

13-الحسابات:

بفرض أن V_2 حجم هيدروكسيد الصوديوم اللازم في معايرة الشاهد.

V_1 حجم هيدروكسيد الصوديوم اللازم في معايرة العينة.

N نظامية هيدروكسيد الصوديوم.

فيكون: NV_2 عدد ميللي مكافئات HCl في10ml منه.

NV_1 عدد ميللي مكافئات الحمض الزائدة (التي لم تتفاعل مع الأمونيا).

$N(V_2-V_1)$ عدد ميللي مكافئات الحمض التي تفاعلت مع الأمونيا الناتجة عن العينة.

$N(V_2-V_1)$ = عدد ميللي مكافئات الأمونيا.

ولما كان كل ميللي مكافئ من الأمونيا يحتوي 14mg نيتروجين فإن :

$14\ N(V_2-V_1)$ = كمية النيتروجين بوحدة mg في العينة.

لحساب كمية البروتين نضرب كمية النيتروجين بمعامل يختلف حسب نسبة النيتروجين في البروتين وهي نسبة تتراوح بين 15 و18 بمتوسط قدره 16% .

وعندها يكون المعامل البروتيني = $100 \div 16 = 6.25$

احسب النسبة المئوية للبروتين في دقيق القمح علما بأن المعامل البروتيني للقمح = 5.7 وليس 6.25 .

ملاحظة : يمكن إجراء التحليل بطريقة كيلداهل الكبرى عند توفر الأدوات. حيث تجرى التجربة على مرحلتين: تجرى أولاً عملية الهضم ومن ثم التقطير والمعايرة.

6-11 الرحلان الكهربائي Electrophoresis

إذا طبقنا على المركبات المشحونة كالبروتينات والحموض الأمينية، تيارا كهربائيا مستمر فإن المركبات الحاوية شحنات موجبة تتجه باتجاه القطب السالب Cathode ، في حين المركبات الحاوية شحنات سالبة تتجه باتجاه القطب الموجب Anode. أما المركبات المتعادلة فلا تتجه إلى أي من القطبين. هذا هو الأساس في فصل المركبات بطرق الرحلان الكهربائي. ويمكن اختصار إحدى طرق الرحلان المسماة الرحلان الكهربائي النطاقي Zone Electrophoresis.

تعتمد طريقة الرحلان الكهربائي النطاقي على وضع عينة من محلول البروتينات المراد فصلها بشكل نطاق أو شريط في منتصف حامل مسامي صلب هو عبارة عن قطعة مستطيلة من خلات السيللوز أو من ورق ترشيح معين. يتم إشباع الحامل بمحلول منظم ذي pH معين، يغمر طرفاه في وعائين منفصلين يحتويان المحلول المنظم. تكتسب البروتينات نتيجة لذلك شحنات موجبة أو سالبة تبعاً لأنواع حموضها الأمينية وتبعاً لدرجة الـ pH. يوصل الوعاءان بمصدر كهربائي يعطي تياراً مستمراً بفرق توتر عال بين 200 و 5000 فولت، يشكل أحد الوعاءين القطب الموجب والوعاء الآخر القطب السالب. يمرر التيار الكهربائي لمدة محددة فتتحرك البروتينات باتجاه أحد القطبين وتزداد الحركة عكساً مع الوزن الجزيئي للبروتين. أما البروتينات المتعادلة كهربائياً فتبقى في مكانها وبذلك تنفصل البروتينات عن بعضها اعتماداً على مدى هجرتها في هذا الحقل الكهربائي. تحدد أماكن البروتينات المنفصلة برش الحامل في نهاية التجربة بأحد الكواشف التي تعطي نواتج ملونة كالنينهايدرين.

الفصل الثاني عشر

اختبارات الإنزيمات Enzyme Tests

من المعلوم أن البروتينات تتكون من عدد كبير من الحموض الامينية التي ترتبط فيما بينها بروابط ببتيدية تنشأ من ربط مجموعة الكروبوكسيل من حمض أميني مع مجموعة الأمين – الفا من حمض اميني آخر. والإنزيمات مواد بروتينية تملك الصفات الفيزيائية والكيميائية المميزة للبروتينات، التي تختلف تبعاً لعدد الحموض الأمينية المكونة لها وترتيب تلك الحموض في سلسلتها الببتيدية وطبيعة المراكز الفعالة في كل إنزيم.

الإنزيمات عوامل مساعدة حيوية تسرع التفاعلات الكيميائية الحيوية ضمن الظروف الطبيعية للكائنات الحية ، من خلال تخفيضها لطاقة التنشيط اللازمة لحدوث التفاعل. الإنزيمات بروتينات ذات تخصص نوعي دقيق في أغلب الحالات ، فالإنزيم يسرع تفاعلاً واحداً أو على الأكثر مجموعة متماثلة من التفاعلات، وبهذا تختلف عن العوامل المساعدة غير الحيوية. يمكن فصل الإنزيمات من الخلايا وتنقيتها والحصول على معظمها بشكل متبلور عالي الفعالية. وبذلك يمكن القول إن الفعالية الإنزيمية والتخصص النوعي يكمنان في التركيب البروتيني الخاص بالإنزيم. غير أن كثيراً من الإنزيمات تحوي بالإضافة إلى الجزء البروتيني Apoenzyme جزءاً آخر ضرورياً لعمل الإنزيم يدعى العامل المشارك Cofactor.

12-1 اختبارات الكشف عن انزيمات بيولوجية

12-1-1 الكشف عن ألدهيد اكسيداز الموجود في الحليب

مبدأالاختبار

يعتمد على رؤية زوال لون أزرق الميتيلين MC الذي يرتبط مع الهيدروجين المحذوف من الركازة بمشاركة ألدهيد اكسيداز، ويحفز ألدهيد اكسيداز تفاعل حذف الهيدروجين

من الألدهيدات المختلفة مثل الفورم ألدهيد، الذي ينقل الهيدروجين إلى الـ FAD الذي يعد مرافق للإنزيم السابق وبعدها إلى المستقبل النهائي للأكسجين وفق المعادلة:

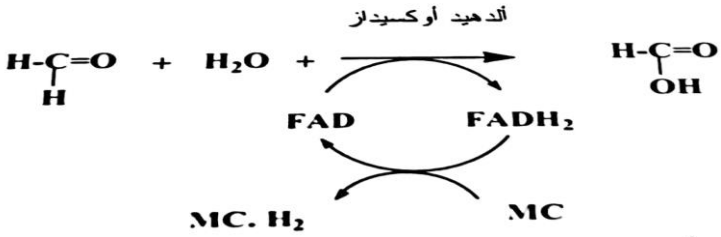
ألدهيد اكسيداز

$$HCHO + H_2O + FAD \xrightarrow{\text{-------}} HCOOH + FADH_2$$

ألدهيد أكسيداز

$$FADH_2 + O_2 \xrightarrow{\text{---------}} FAD + H_2O_2$$

عند إضافة مستقبل اصطناعي إلى الهيدروجين في الظروف اللاهوائية يتشكل المختزل للمستقبل $MC.H_2$ بدون لون.



عند خض الأنبوب الذي يحوي محلول أزرق ميتيلين العديم اللون فيظهر اللون من جديد.

$$MC.H_2 + O_2 \rightarrow MC + H_2O_2$$

مواد التجربة

- محلول فورم ألدهيد 0.4%
- محلول أزرق الميتيلين 0.01%
- حليب طازج

طريقة العمل

نأخذ أنبوبي اختبار، ونضع في كل منهما 5ml حليبا طازجا، نضيف إلى الأنبوب الأول 1ml ماء مقطراً، وإلى الأنبوب الثاني الحجم نفسه 1ml من الفورم ألدهيد. نضيف لكل من الأنبوبين 1ml من محلول أزرق الميتيلين. تمزج محتويات الأنبوبين ونضيف إلى كل منهما 4 قطرات من دهن الفازلين (لحفظ المزيج السائل من تماسه مع اكسجين

الهواء) يوضع الأنبوبان في حمام مائي في درجة $37^{o}C$ خلال قرابة 10 دقائق. ثم نقارن اللون في العينات ، يخض الأنبوب من جديد فيلاحظ تحول اللون من جديد.

12-1-2 الكشف السريع عن الكولين استيراز

مبدأ الاختبار

يعتمد اساس الطريقة على تغير لون الكاشف ثنائي بروم سولفو فتالين من أزرق إلى أخضر وأصفر) يحدث تحرر حمض الخل في أثناء حلمهة أسيتيل كولين استيراز.

كولين استيراز

$$(CH_3)_3N^+-CH_2CH_2COOCH_3 + H_2O \xrightarrow{\text{-----}} (CH_3)_3N^+-CH_2CH_2-OH + CH_3COOH$$

اسيتيل كولين كولين

مواد التجربة

- أشرطة ورق ترشيح مبللة بمحلول الركازة والكاشف (يتم حل 0.2g أسيتيل كولين–بروميد و 0.1g ثنائي بروم سولفوفتالين في 7ml ايتانول 98%).
- مصل دم.

طريقة العمل

يوضع في وعاء زجاجي نظيف نقطة من مصل الدم، ننزل عن طريق ملقط الشريط الورقي، فيتلون بلون أزرق، نسجل الزمن. يتم تغطية العينة بوعاء زجاجي آخر. يلاحظ زمن ظهور اللون الأصفر للورقة.

يتم تسجيل النتائج (زمن ظهور اللون الأصفر للكاشف على الورقة من لحظة وضعها على قطرة مصل الدم) ومقارنتها مع الحالة العادية التي تتأرجح بين 5 و 20 دقيقة، ثم استنتاج حول وجود الهيدرولاز المدروس في مصل الدم.

12-1-3 الكشف عن إنزيم البيروكسيداز في البطاطا والحليب

مبدأ الاختبار

يعتمد على التفاعل مع البنزيدين يتكاثف جزيء من ثنائي فينوكينون ثنائي ايمين مع بنزيدين غير مؤكسد ويتشكل معقد لونه يتراوح بين الأخضر والأزرق.

مواد التجربة

- محلول الماء الأكسجيني 10% حديث التحضير.
- محلول البنزيدين الكحولي 5%.
- عصير بطاطا: ويحضر ببرش البطاطا وهي رطبة ثم تعصر بقطعة قماش.

طريقة العمل

يؤخذ أنبوبي اختبار ويوضع في **الأول** 1ml مصل حليب وفي **الثاني** 1ml عصير بطاطا. نضيف إلى كل من الأنبوبين 5 قطرات من محلول البنزيدين الكحولي، وأضف الماء الأكسجيني قطرة قطرة حتى نلاحظ اللون المميز. دون نتائجك في جدول، يشار إلى اللون المميز دليلا على التفاعل.

المادة	كشف الإنزيم	الركازة (المانح)	المستقبل	دليل التفاعل	النتيجة

12-2 حركية التفاعلات الإنزيمية – معادلة ميكاليس منتن

درس العالمان ميكاليس – منتن Michaelis – Menten عام 1913 حركية التفاعل الإنزيمية عند ثبات تركيز الإنزيم وتغيير تركيز مادة التفاعل [S] التي يعمل عليها، ووجد أن سرعة التفاعل الإنزيمي V تزداد طردياً في البداية مع زيادة تركيز مادة التفاعل ثم تصبح الزيادة غير طردية حتى تقترب سرعة التفاعل في التراكيز العالية من السرعة القصوى V_{max} ، وتثبت عندها تقريباً.

ترتبط سرعة التفاعل الإنزيمي V بتركيز مادة التفاعل [S] و السرعة القصوىV_{max} بالمعادلة المعروفة باسم **معادلة ميكاليس منتن** التي تتضمن ثابت ميكاليس منتن K_m وتعطى المعادلة بالشكل الرياضي:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

نلاحظ من المعادلة أن $K_m = [S]$ وذلك عندما $V = (1/2)\ V_{max}$.

وحدة قياس K_m تستنتج من المعادلة فتكون mol/lit .

نلاحظ أيضاً ان قيمة ثابت ميكاليس تعبر عكساً عن مدى الارتباط أو الالفة بين الإنزيم ومادة التفاعل، أي بزيادة K_m نستقرئ بأن هناك ارتباطا قويا بين المادة والإنزيم. فتركيز قليل من مادة التفاعل يكفي للوصول بالتفاعل إلى نصف السرعة القصوى.

الدراسة بينت أن كلا من السرعة القصوى وثابت ميكاليس منتن غير ثابت تماماً لكل إنزيم حيث تتغير تبعاً لنوع مادة التفاعل والـ pH ودرجة الحرارة.

تم اشتقاق صيغ أخرى لمعادلة ميكاليس منتن، من أهمها معادلة لاينويفر–بيرك Lineweaver–Burk هي:

$$\frac{\mathbf{1}}{\boldsymbol{V}} = \frac{\boldsymbol{K_m}}{\boldsymbol{V_{max}}}\frac{\mathbf{1}}{[\boldsymbol{S}]} + \frac{\mathbf{1}}{\boldsymbol{V_{max}}}$$

تشتق المعادلة بأخذ مقلوب معادلة ميكاليس وإعادة ترتيبها، بحيث تصبح مقارنه بمعادلة مستقيم $y = ax + b$. على اعتبار أن:

محور العينات $y = 1/V$

ومحور السينات $X = 1/[S]$

وميل المستقيم $a = K_m/V_{max}$

وتقاطع المستقيم الناتج مع محور العينات $b = 1/V_{max}$

من الجدير بالذكر أن هذه المعادلة أسهل في التطبيق والتعامل في الحسابات مع الخط المستقيم أسهل من المنحني. تعرف قيمة ثابت K_m من البياني وهي نقطة تقاطع المستقيم مع السينات حيث $1/V = 0$ العينات، $-1/K_m = 1/[s]$.

12-3 مقارنة تأثر الإنزيمات والحفازات غير البيولوجية

هدف الاختبار مقارنة بين تأثير α اميلاز اللعاب وحمض كلور الماء في حلمهة النشا.

مبدأ الاختبار

تمتلك الإنزيمات فعالية حفز عالية، وتأثير خاص، وقدرة على تسريع التفاعلات في ظروف سهلة خلافاً عن الحفازات غير البيولوجية (مثل المعادن، الحموض، ...).

تقوم هذه الطريقة على دراسة حلمهة النشا، ثم تحديد زوال الركازة (مادة التفاعل) وهي النشا عن طريق التفاعل مع محلول اليود، أو عن طريق ازدياد الناتج المالتوز الذي يمكن الكشف عنه بوساطة كاشف فهلنغ (ظهور راسب أحمر من أكسيد النحاسي).

يستخدم اليود كاشفا عن النشا، والدكسترينات التي تشكل معه معقدات ملونة، يعطي أميلوز النشا مع اليود لوناً أزرق، ومع الغليكوجين لوناً أحمر أرجوانياً، ويرتبط لون اليود مع الديكسترينات بالوزن الجزيئي للديكسترينات ويتراوح اللون بين البني والأصفر، على اعتبار أن اللون هو لون اليود بني ولايرجع إلى لون المعقد.

يعطي المالتوز نتيجة ايجابية مع كاشف فهلنغ مثل السكريات الثنائية المختزلة وذلك بسبب إمكانية اختزال الكربونات في وسط قلوي Cu^{2+} الموجودة في محلول فهلنغ على شكل مركبات معقدة مع الطرطرات حتى أكسيد النحاسي الأحمر الذي يظهر على شكل راسب.

وكلما كانت سرعة الحفز أكبر كان زوال اللون الأزرق أسرع ويزداد تفاعل فهلنغ على المالتوز.

مواد التجربة

- محلول نشاء 1% في كلوريد الصوديوم 0.3% حديث التحضير.
- محلول اليود في يوديد الصوديوم.
- كاشف فهلنغ.
- محلول HCl 10%.

- اللعاب الممدد: يتم الحصول عليه بالمضمضة بالماء والتخلص من بقايا الطعام، ثم نضع ماء مقطرا نحو 20ml بالفم، ونحتفظ بالماء نحو دقيقتين وإخراج السائل مع اللعاب إلى بيشر زجاجي ثم نرشح المحلول من خلال قمع فصل يحوي القطن، نستخدم الرشاحة (ناتج الفلترة) في الاختبار.

طريقة العمل

نأخذ ثلاثة أنابيب اختبار: نضع في **الأول** 1ml ماء، وفي **الثاني** 1ml حمض كلور الماء، وفي **الثالث** 1ml لعابا ممددا.

نضيف إلى كل من الانابيب الثلاثة 5ml محلول نشاء. نخلط المزيج باستخدام قضيب زجاجي.

ونضع في الأنبوب الأول والثالث في حمام مائي بدرجة $38\ ^oC$ ، والأنبوب الثالث في حمام مائي يغلي لمدة ربع ساعة بعدها يتم تبريد الأنابيب. ناخذ 5 قطرات من كل أنبوب إلى أنابيب أخرى ونضيف قطرتين من محلول اليود ونقارن لون العينات.

من أجل تحديد المالتوز نأخذ 3ml من كل أنبوب ، ثم نضيف 1ml من كاشف فهلنغ ونسخن المزيج حتى الغليان. نلاحظ ظهور راسب أحمر من أكسيد النحاسي.

نظم النتائج في جدول كالآتي:

الحفاز	مادة التفاعل	ناتج التفاعل	مادة التفاعل	الناتج	الملاحظة

12-4 دراسة الخواص الحركية للإنزيمات

حركية التفاعلات الإنزيمية يدرس سرعة التفاعلات الإنزيمية بدلالة الطبيعة الكيميائية للمواد المتفاعلة (الركائز، وتركيز الإنزيمات) بظروف درجة الحرارة ، تركيز المكونات، الـ pH الوسط ...الخ.

تظهر دراسة حركية التفاعلات الإنزيمية أنه ليس هناك اختلاف للإنزيمات فقط عن الحفازات غير البيولوجية، وإنما أيضاً الطبيعة البروتينية للإنزيمات وتنوع الشروط التي يتعلق بها تحديد فعالية أي إنزيم. يتم قياس فعالية الإنزيم عن طريق قياس سرعة التفاعل، ويتم ذلك إما عن طريق تلاشي الركازة او ازدياد الناتج . تسمح استخدام طرق التحليل الكيفية لمواد التفاعل والنواتج عن الكشف عن وجود الإنزيمات في المواد البيولوجية. ويعطي التحليل الكمي إمكان تحديد كمية الإنزيم أو فعاليته في العينة المدروسة.

حركية التفاعلات الإنزيمية α – اميلاز اللعاب

مواد التجربة

- محلول النشا 1% حديث التحضير.
- محلول اليود في يوديد البوتاسيوم.
- لعاب ممدد (سبق تحضيره).
- محلول منظم من سترات – فوسفات 0.1M مولار بقيم pH مختلفة [5.6, 6.4, 6.8, 7.2, 8.0] pH. يحضر المحلول المنظم سترات – فوسفات 0.1M مولار [5 , 8] pH بالشكل الآتي: 0.2M مولار من $Na_2HPO_4.H_2O$ بحل 35.61g من الملح في ماء مقطر في حوجلة سعة لتر.

  0.1M من محلول حمض الليمون (بحل 21.01g من الحمض في ماء مقطر في حوجلة سعتها لتر).

pH	$(Na_2HPO_4.2H_2O)$ ml	(حمض الليمون 0.1M) ml
5.6	5.6	4.2
6.4	6.9	3.1
6.8	7.7	2.3
7.2	8.7	1.3
8.5	9.7	0.3

12-4-1 علاقة سرعة التفاعل الإنزيمي بكمية الإنزيم

مبدأ الاختبار

تحديد سرعة حلمهة النشا بكمية الإنزيم المضافة من α – اميلاز اللعاب.

طريقة العمل

يتم حل اللعاب المخفف في الماء في 20، 40، 80، 160 مرة ، نأخذ اربعة أنابيب اختبار ونضع في كل منها 1ml من محلول اللعاب.

نضيف إلى الأنابيب من السحاحة 4ml من محلول النشا وننقلهم بسرعة إلى حمام مائي بدرجة 38°C ، ونسجل زمن بداية التفاعل بعد كل 2 دقيقة.

تؤخذ 2 قطرة من كل عينة ونضيف إليها قطرة من محلول اليود في يوديد البوتاسيوم. تعطي العينة في البداية لوناً أزرق بعد ذلك يتراوح اللون البنفسجي والأحمر وفي النهاية الأحمر.

يلاحظ خلال 0.5 دقيقة من بداية التفاعل حتى ظهور اللون الأحمر مراحل تشكل الاريترو ديكسترينات من النشا.

بعد ذلك نرسم منحنياً بيانياً يمثل محور العينات سرعة التفاعل (مقلوب زمن ظهور الاريترو ديكسترينات) وعلى محور السينات تركيز إنزيم الاميلاز.

12-4-2 علاقة سرعة التفاعل الإنزيمي بدرجة الحرارة

مبدأ الاختبار

تحديد سرعة حلمهة النشا بإنزيم α – اميلاز اللعاب وارتباطها بدرجة الحرارة.

طريقة العمل

يوضع في أنبوبي اختبار خمس قطرات من محلول اللعاب ونسخن دقيقتين في حمام مائي ثم نبرد.

نضع في أنبوبين آخرين 5 قطرات من اللعاب دون تسخين، ثم نضع في جميع الأنابيب 10 قطرات من محلول النشا ، ونضع الأنبوب الأول والثاني في حمام مائي بدرجة 38^oC ونضع الأنبوب الثالث في بيشر يحوي ماءا وجليدا أو ثلج لمدة 3 دقائق.

نضيف إلى كل أنبوب قطرة من محلول اليود في يوديد البوتاسيوم ونقارن الألوان التي تظهر وفق الجدول.

الإنزيم	الركازة	اللون مع اليود	درجة الحرارة

12-4-3 علاقة سرعة التفاعل الإنزيمي بدرجة pH الوسط

أ- سرعة الحلمهة تحت تأثير الإنزيم α – اميلاز

مبدأ الاختبار

يعتمد مبدأ الاختبار على مقارنة سرعة الحلمهة تحت تأثير الإنزيم α – اميلاز عند قيم مختلفة لـ pH ، وفي النتيجة التوصل إلى القيمة المثالية لـ pH عمل الإنزيم.

طريقة العمل

نأخذ خمسة أنابيب ونضع في كل منها 10 قطرات من المحلول الموقي سترات فوسفات قيم pH [5.6, 6.4, 6.8, 7.2, 8.0].

نضيف إلى جميع الأنابيب 5 قطرات من محلول النشا، بعدها نضع الأنابيب في حمام مائي بدرجة 38^oC .

بعد دقيقتين نأخذ قطرة من كل أنبوب وتوضع في أنابيب أخرى ونضيف قطرة من محلول اليود. يسجل زمن ظهور اللون الأحمر (مراحل تشكل الاريترو ديكسترينات) من العينات الخمس.

تنظم النتائج في جدول ثم يتم رسم منحن بياني فيه تكون الـ pH على محور السينات ، ويمثل محور العينات الزمن اللازم لحلمهة النشا حتى تشكل الاريترو ديكسترينات بوحدة الدقائق.
نستنتج من البياني الـ pH المثالية لعمل إنزيم α – اميلاز اللعاب.

ب– سرعة حلمهة النشا تحت تأثير α – اميلاز

مبدأ الاختبار

يقوم على مقارنة سرعة حلمهة النشا (يكشف عن ناتج حلمهة النشا بأخذ عينة وإضافة اليود في يوديد البوتاسيوم إليها) تحت تأثير α – اميلاز اللعاب قبل وإضافة فينيل ثيو البولة وبعدها، شوارد الكلور Cl^- وشوارد النحاس Cu^{2+}.

مواد التجربة

- محلول النشا 0.5%.
- محلول كلوريد الصوديوم 1%.
- محلول كبريتات النحاس 1%.
- محلول اليود في يوديد البوتاسيوم.
- محلول اللعاب المحضر من التجربة السابقة يمدد بالماء 10 مرات.

طريقة العمل

خذ أربعة أنابيب اختبار ويسكب في كل منها 2ml : **الأول** ماء مقطر، وفي **الثاني** محلول كلوريد الصوديوم، وفي **الثالث** محلول كبريتات النحاس، وفي **الرابع** محلول فنيل ثيو البولة.

يضاف بعدها 4ml من محلول النشا وقطرة من محلول اللعاب الممدد.

يتم خلط محتويات الأنابيب بالرج ثم توضع في حمام مائي عند درجة الحرارة $38^{o}C$. ويسجل زمن بداية التحضين.

يؤخذ من العينات بعد كل دقيقتين قطرة واحدة ويضاف قطرة محلول اليود. يسجل زمن ظهور اللون الأحمر (مراحل تشكل الاريترتو ديكسترينات عند إجراء التفاعل مع اليود في كل من الأنابيب) وتنظم النتائج في جدول.

الإزيم	مثبطات ومنشطات فعالية الإنزيم	مادة التفاعل	زمن تشكل اريترو ديكسترينات (الدقيقة)

12-5 التحديد الكمي لفعالية الإنزيمات

تستخدم طرق عديدة وحديثة في تحديد فعالية الإنزيم (الأجهزة الطيفية الضوئية، البولاروغراف، المانومترية، الكروماتوغرافيا وطرق أخرى ...). وذلك بزوال الركازة أو ناتج التفاعل. وفي بعض الأحيان لايمكن قياس كمية الإنزيمات بالقيم المطلقة (بالميلي غرام أو بالمولات)، لذلك كان من الملائم التعبير عنها بالوحدات الاصطلاحية.

الفعالية الجزيئية للإنزيم، وهي عدد جزيئات مادة التفاعل التي يحولها جزيء واحد من الإنزيم إلى نواتج خلال دقيقة واحدة.

12-5-1 فعالية إنزيم α – اميلاز اللعاب

مبدأ الاختبار

يقوم على تحديد أقل كمية من الاميلاز (عند أكبر تمديد للعاب)، التي تفكك كل النشا المضاف بشكل كامل. يعبر عن فعالية الاميلاز بكمية محلول النشا 0.1% الذي يفكك 1ml من اللعاب غير المنحل عند الدرجة من الحرارة 38°C خلال 30 دقيقة.

إن فعالية إنزيم اميلاز اللعاب في الحالة العادية تساوي 160–320. ويعبر عن فعالية الاميلاز بـ ' A 38° /30 . وتستخدم هذه الطريقة بشكل واسع لتحديد فعالية اميلاز كل من الدم والبول.

ملاحظة: المقصود بـ ' A 38°/30 فعالية إنزيم الاميلاز عند الدرجة 38، وزمن الحضن 30 دقيقة.

مواد التجربة

- محلول نشاء 0.1%.
- محلول يود 0.1% في محلول من يوديد البوتاسيوم 0.2%.
- لعاب ممدد 9:1

طريقة العمل

نسكب 1ml ماء مقطر في عشرة أنابيب اختبار.

نضيف إلى الأنبوب **الأول** 1ml لعاب ممدد في 10 مرات.

يتم خلط محتويات الأنبوب الأول عدة مرات، ثم نأخذ بوساطة ماصة 1ml من مزيج هذا الأنبوب وتسكب في الأنبوب **الثاني** مع الخلط جيداً، ونأخذ 1ml من المزيج وتسكب في الأنبوب **الثالث**، وهكذا حتى الأنبوب العاشر. ونفرغ 1ml من الأنبوب العاشر.

نضيف إلى جميع الأنابيب 1ml وترج الأنابيب وتوضع في منظم حراري عند 38°C لمدة 30 دقيقة.

بعد الانتهاء من عملية الحضن تبرد الأنابيب بماء الصنبور، ثم نضيف قطرة واحدة من محلول اليود 0.1% ، وتمزج محتويات الأنابيب.

عند تفاعل السائل في الأنابيب مع اليود يتلون المحلول بلون مائل للاصفرار، وردي ، بنفسجي.

يلاحظ الأنبوب الذي لونه أصفر ، الذي يدل على أن حلمهة النشا فيه تمت بشكل كامل ونجري الحسابات وتوضع في جدول.

الحسابات: يلاحظ الأنبوب الذي تمت فيه حلمهة النشا بشكل كامل ونحسب فعالية إنزيم الاميلاز عن طريق كمية اللعاب غير الممدد في هذا الأنبوب وفق التناسب التالي:

A ml من اللعاب تفكك 2ml محلول نشاء

1ml من اللعاب تفكك x ml محلول نشاء

حيث A كمية اللعاب غير الممدد.

مثال: بفرض أن اللون المائل للصفرة في الأنبوب الرابع ، إذ اللعاب ممدد فيه 160 مرة.

كل 1/160 ml من اللعاب تفكك 2ml نشاء $x = ([2x1.\ 60)/1 = 320$

كل 1ml من اللعاب غير الممدد x نشاء

x = 320 ml محلول نشاء 0.1% ومن ثم فعالية إنزيم اميلاز اللعاب ($A\ 38^{o}/30'$) تساوي 320 .

حلمهة النشا بوجود إنزيمات اللعاب عند تمديد اللعاب بتراكيز مختلفة.

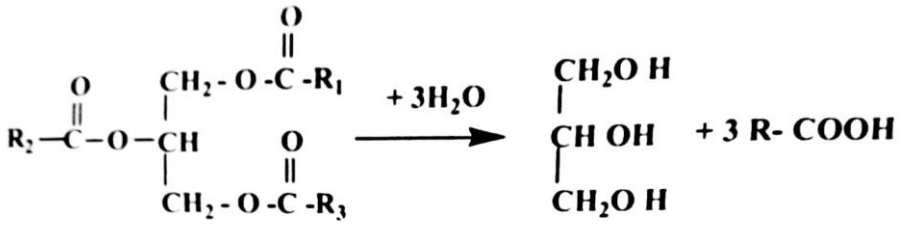
لعاب ممدد					
	1:20	40:1	1:80	1:160	1:320
الأنابيب					
لون المحلول مع اليود	1	2	3	4	5
النتائج					

لعاب ممدد					
	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
الأنابيب					
لون المحلول مع اليود	1	2	3	4	5
النتائج					

12-5-2 إنزيم الليباز

تصنف إنزيمات الليباز تحت إنزيمات الحلمهة ويسرع حلمهة الدهون الغليسيريدات إلى الغليسيرين وحموض دسمة.

تتثبط إنزيمات الليباز بالزنك والنحاس والزئبق واليود ، وتنشط بأيونات المغنزيوم ويمكن متابعة فعالية الإنزيم بمعايرة مجموعة كربوكسيلية حرة.



مواد التجربة

- زيت عباد الشمس أو زيت القطن (مادة التفاعل).
- ليباز القمح المطحون (الإنزيم).
- محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1M .
- فينول فتالين.
- ايتانول: ايتر (1:1).
- محلول واق منظم فوسفات pH= 7.4 ويتكون من: 800ml محلول $0.066M\ NaHPO_4$ مولار ، و 200ml من محلول $0.066M\ KH_2PO_4$ مولار.

طريقة العمل

يؤخذ في دورق A التجربة 3g من زيت عباد الشمس، يضاف إليها 2ml محلول فوسفاتي يخلط المزيج، ويضاف 1g من من إنزيم الليباز و 3ml ماء مقطر ثم يغلق الدورق وتجرى التجربة في في حرارة الغرفة.

يؤخذ في دورق B الشاهد 3g من زيت عباد الشمس، يضاف إليها 2ml محلول فوسفاتي، يخلط المزيج جيداً. يضاف 1g من إنزيم الليباز المسخن مدة دقيقتين (الإنزيم مثبط بالتسخين قبل إضافته)، و3ml ماء مقطرا، وتجرى التجربة في درجة حرارة الغرفة.

يؤخذ في كل مرة 1ml من محلول الدورق A ويوضع في دورق جديد وبعد مرور مدة زمنية معينة 5 دقائق من لحظة إضافة الإنزيم.

يضاف إلى الدورق الأول A مقدار 10ml من مزيج الكحول الايتيلي – الايتر ويمزج جيداً .

يعاير الدورق بمحلول هيدروكسيد الصوديوم المحضر مع إضافة قطرتين من الفينول فتالين.

يكرر الاختبار بعد 15 دقيقة مع الدورق الثاني B . وهكذا يقارن اختبار التجربة مع اختبار الشاهد.

يعبر عن نشاط إنزيم الليباز النباتي بعدد ميللي لترات محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1M مولار المستهلكة لمعادلة الحموض الدهنية في أثناء حلمهة غرام واحد من المادة الدسمة (زيوت أو دهون).

$$\mathbf{x} = \frac{(a-b).n}{w}$$

a حجم NaOH المستهلك لمعايرة التجربة. b حجم NaOH المستهلك لمعايرة الشاهد.

n عيارية NaOH. w وزن مادة الدسم بالغرامات.

12-5-3 إنزيم الكاتلاز

مبدأ الاختبار

يوجد إنزيم الكاتلاز تقريباً في جميع الخلايا النباتية والحيوانية، يوجد في درنات البطاطا وفي أوراق بعض النباتات كالكرنب. ويتركز في كريات الدم الحمراء وفي كلى الحيوانات الثديية وكبدها. يفكك إنزيم الكاتلاز فوق أكسيد الهيدروجين (الماء الأكسجيني) إلى أكسجين وماء.

$$2H_2O \xrightarrow{\text{Catalase}} 2H_2O + O_2$$

يحلل مول واحد من إنزيم الكاتلاز خمسة ملايين مول من الماء الأكسجيني في الدقيقة الواحدة عند الدرجة صفر مئوية، ويمكن استخدام فوق أكاسيد الألكيل ROOH بدلاً من فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 ، وتثبيط أيونات النحاس Cu^{2+} إنزيم الكاتلاز.

يتأثر نشاط إنزيم الكاتلاز كغيره من الإنزيمات بالعوامل الآتية:

تركيز الإنزيم، درجة الحرارة، تركيز مادة التفاعل (الماء الأكسجيني) ودرجة الـ pH ، زمن التفاعل، والمثبطات.

يتابع نشاط الكاتلاز بقياس تركيز الماء الأكسجيني المتبقي بعد انتهاء التجربة بالمعايرة بمحلول برمنغنات البوتاسيوم حسب التفاعل:

$$2KMnO_4 + 5H_2O_2 + 3H_2SO_4 \rightarrow 5O_2 + 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 8H_2O$$

نعاير أولاً تجربة الشاهد التي لم يضف إليها الإنزيم، ثم تعاير كمية مماثلة قد تم إضافة الإنزيم إليها لتسريع التفاعل خلال مدة محددة من الزمن.

يعبر الفرق بين المعايرتين عن كمية الماء الأكسجيني التي حللها الإنزيم في تلك المدة.

مواد التجربة

- حمض الكبريت 1N .
- محلول H_2O_2 (0.24%) في محاليل منظمة عند PH 3, 5, 7, 9.
- تحضير المستحضر الإنزيمي: يعقم طرف الإصبع بقطعة قطن مبللة بالكحول، بعد جفاف الإصبع يثقب الجلد بإبرة معقمة ويضغط على الإصبع ويجمع الدم في ماصة شعرية 0.2ml . يضاف الدم إلى دورق يحتوي 100ml ماء مقطرا ومبردا بالثلج.

12-5-3-1 تأثير تركيز الإنزيم

1. يوضع في ستة دوارق الكميات الآتية من المستحضر الإنزيمي :

2, 4, 6, 7, 8, 9ml

في الدوارق المرقمة على الترتيب. ويترك الأنبوب السابع دون إضافة الإنزيم. نظم النتائج في جدول.

حجم المادة V	رقم الدورق						
	1	2	3	4	5	6	7
حجم H_2O_2	10	10	10	10	10	10	10
حجم الإنزيم	2	4	6	7	8	9	–
حجم H_2SO_4	5	5	5	5	5	5	5
ماء مقطر	8	6	4	3	2	1	10
حجم $KMnO_4$ المستهلك	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	V_6	V
تركيز H_2O_2	$[H_2O_2]_1$	$[H_2O_2]_2$					$[H_2O_2]$
v مولر/دقيقة سرعة التفاعل							

2. يضاف حسب الجدول لكل دورق 10ml من محلول فوق أكسيد الهيدروجين pH=7.

3. يضاف لكل دورق 5ml حمض كبريت بعد مرور خمس دقائق من إضافة H_2O_2 لإيقاف نشاط الإنزيم.

4. تعاير محتويات الدوارق بمحلول برمنغنات البوتاسيوم حتى ظهور اللون الوردي الخفيف ويسجل الحجم المستهلك في الجدول.

5. يطرح مايستهلكه كل دورق من الدوارق الستة من استهلاك الشاهد رقم 7.

6. يحسب تركيز $[H_2O_2]$ في الدوارق جميعها.

7. تحسب سرعة التفاعل الإنزيمي في الدوارق جميعها وفق العلاقة:

$$v = \frac{[H_2O_2] - [H_2O_2]_1}{5}$$

8. يرسم الخط البياني الذي يربط سرعة التفاعل الإنزيمي وتركيز الإنزيم.

$[H_2O_2]$ تركيز الماء الأكسجيني الكلي (الشاهد).

$[H_2O_2]_1$ تركيز الماء الأكسجين في الدورق الأول بعد مرور خمس دقائق من نشاط الإنزيم (المتفاعل).

ملاحظات: يعطى تركيز الماء الاكسجيني $[H_2O_2] = 10^{-3}\ V_{KMnO4}$ ، حيث V_{KMnO4} حجم البرمنغنات المستهلك في المعايرة. ويحسب كالآتي:

باستخدام قانون المعايرة والأخذ بعين الاعتبار تفاعل الأكسدة والارجاع حيث إن 5mol ماء اكسجيني تتفاعل تماماً مع 2mol البرمنغنات (انظر معادلة التفاعل) فيصبح قانون المعايرة

$$2(NV)_{MnO4} = 5(NV)_{H2O2}$$

$$(NV)_{MnO4} = 2.5\ (NV)_{H2O2}$$

كمية البرمنغنات $KMnO_4$ = $(NV)_{KMnO4} = 0.01\ V$ mol ~ كمية الماء الأكسجيني

$$= 2.5 \text{ x}0.01 \text{ x}V_{KMno4}$$

$$[H_2O_2] = \frac{n}{\text{حجم كلي } V} = \frac{2.5x0.01V}{25} = 0.001\ V_{KMnO4}$$

مثال: بفرض أن الشاهد استهلك 2ml من برمنغنات البوتاسيوم للمعايرة فيكون تركيز الماء الاكسجيني $[H_2O_2]_0 = 0.001\text{x}2 = 0.002$ M

وإذا استهلك الدورق الأول 1.5ml عنها بنفس الطريقة

$$[H_2O_2]_0 = 0.001\text{x}1.5 = 0.0015$$

من ثم تصبح سرعة التفاعل الانزيمي:

$$v = \frac{0.002 - 0.0015}{5} = 0.0001\ M/min$$

12-5-3-2 تأثير درجة الحموضة pH

يوضع في ثمانية دوارق مخروطية الكميات الآتية:

الأول والثاني 25ml من H_2O_2 في pH = 3.

الثالث والرابع 25ml من H_2O_2 في pH = 5.

الخامس والسادس 25ml من H_2O_2 في pH = 7.

السابع والثامن 25ml من H_2O_2 في pH = 9.

التاسع والعاشر 25ml من H_2O_2 في pH = 11.

يضاف 2ml إنزيم إلى الدوارق 1, 3, 5, 7, 9 ثم يضاف بعد خمس دقائق 5ml من حمض الكبريت إلى كل دورق لوقف التفاعل.

يضاف إلى الدوارق الشواهد 2, 4, 6, 8, 10 بعد إضافة الحمض 2ml من الإنزيم.

يعاير H_2O_2 المتبقي في كل دورق بمحلول برمنغنات البوتاسيوم حتى اللون الزهري الفاتح ويسجل الحجم المستهلك.

يحسب تركيز فوق أكسيد الهيدروجين في الدوارق جميعها.

تحسب سرعة التفاعل الإنزيمي v مقدرة بالمولار/دقيقة.

$$v = \frac{[H_2O_2] - [H_2O_2]_5}{5}$$

$[H_2O_2]_5$ التركيز المتبقي من الماء الأكسجيني بعد مرور خمس دقائق على نشاط الإنزيم.

يرسم البياني الذي يبين العلاقة بين سرعة التفاعل الإنزيمي على محور العينات ودرجة الـ pH على محور السينات، واستنتاج قيمة الـ pH لعمل الكاتلاز.

حجم المادة V	رقم الدورق									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
حجم H_2O_2	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
حجم H_2SO_4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
حجم الإنزيم	2	–	2	–	2	–	2	–	2	–

ماء مقطر	3	5	3	5	3	5	3	5	3	5
حجم $KMnO_4$ المستهلك	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	V_6	V_7	V_8	V_9	V_{10}
تركيز H_2O_2										
v مولر/دقيقة سرعة التفاعل										

12-5-3-3 تأثير درجة الحرارة

يوضع في عشرة دوارق 25ml من محلول مادة متفاعلة ذي pH = 7

1) يوضع الدورقان 1 و 2 (شاهد) في حمام مائي بدرجة 15°C
2) يوضع الدورقان 3 و 4 (شاهد) في حمام مائي بدرجة 20°C
3) يوضع الدورقان 5 و 6 (شاهد) في حمام مائي بدرجة 30°C
4) يوضع الدورقان 7 و 8 (شاهد) في حمام مائي بدرجة 40°C
5) يوضع الدورقان 9 و 10 (شاهد) في حمام مائي بدرجة 50°C
6) يضاف 2ml من المحلول الإنزيمي إلى الدوارق 1, 3, 5, 7, 9 .
7) يضاف 2ml من المحلول الإنزيمي إلى الدوارق 2, 4, 6, 8, 10.
8) يضاف إلى الدوارق كلها بعد مرور خمسة دقائق من إضافة الإنزيم 5ml حمض كبريت لإيقاف التفاعل.

	رقم الدورق									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
درجة الحرارة °C	15	15	20	20	30	30	40	40	50	50

حجم H_2SO_4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
حجم الإنزيم	2	–	2	–	2	–	2	–	2	–
حجم H_2O_2	2	–	2	–	2	–	2	–	2	–
ماء مقطر	–	4	–	4	–	4	–	4	–	4
حجم $KMnO_4$ المستهلك	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	V_6	V_7	V_8	V_9	V_{10}
تركيز H_2O_2										
v مولر/دقيقة سرعة التفاعل										

9) يعاير حجم H_2O_2 المتبقي في كل دورق بمحلول برمنغنات البوتاسيوم حتى اللون الزهري الخفيف. ثم يحسب تركيز H_2O_2 في جميع الدوارق.

10)يرسم المنحن الذي يربط بين سرعة التفاعل الإنزيمي بدلالة درجة الحرارة.

12-5-3-4 تأثير تركيز مادة التفاعل S (H_2O_2)

نرقم ثمانية دوارق ويضاف إليها المواد:

5ml H_2O_2 ذي pH=7 للدورقين 1 و 2

2.5ml H_2O_2 ذي pH=7 و 2.5ml ماء مقطر للدورقين 3 و 4

1.25ml H_2O_2 ذي pH=7 و 3.75ml ماء مقطر للدورقين 5 و 6

رقم الدورق								
المادة ml	1	2	3	4	5	6	7	8
حجم $[H_2O_2]$	5	5	2.5	2.5	1.25	1.25	1	1
حجم الماء	–	2	2.5	4.5	3.75	5.75	4	6
حجم الإنزيم	2	–	2	–	2	–	2	–
حجم H_2SO_4	5	5	5	5	5	5	5	5
V_{KMnO4} المستهلك	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	V_6	V_7	V_8
H_2O_2المتفككة								

أ- يضاف 2ml من الإنزيم إلى الدوارق ذات الأرقام الفردية 1, 3, 5, 7, وتترك ذات الأرقام الزوجية دون إضافة إنزيم.

ب- يضاف إلى الدوارق كلها بعد مرور خمسة دقائق من إضافة الإنزيم 5ml حمض كبريت لإيقاف التفاعل.

ت- تعاير جميع الدوارق بمادة البرمنغنات ويسجل الحجم المستهلك لكل دورق.

ث- يحسب التركيز المتبقي في الدوارق التي تحوي إنزيم بعد خمس دقائق من النشاط الإنزيمي ويرمز له $[S]_i$.

ج- تحسب سرعة التفاعل الإنزيمي في الدوارق التي تحوي الإنزيم وهو التركيز مقدراً بوحدة المولار M من $[H_2O_2]$ الذي حلله الإنزيم خلال دقيقة، وتقدر السرعة بوحدة (مولار/لتر) وتحسب من العلاقة الآتية:

$$v = \frac{[S] - [S]_i}{5}$$

ح- يرسم منحني ميكاليس منتن لقيم السرعة v و تركيز الركازة S.

خ- تحسب القيمتان $1/v$ على محور العينات و$1/S$ على محور السينات ، ويرسم بياني لاينويفر بيرك، ثم تستنتج قيم ثابت ميكاليس K_m و v_{max} .

ملاحظات:

- لاتحتاج المعايرة باستخدام برمنغنات البوتاسيوم إلى دليل لأنها تتغير من اللون الزهري إلى عديم اللون.
- بعض المراجع تحسب تركيز الماء الاكسجيني بطريقة أخرى:

يكافئ 1ml من $0.01M\ KMnO_4$ مقدار $0.17mg$ ميللي غرام H_2O_2 ، وذلك يعادل $5x10^{-6}M$ مولار:

$$m_{H2O2} = \frac{[KMnO_4].V.E}{1000} = \frac{[KMnO_4].V.\frac{M}{n}}{1000} = \frac{0.01x1.\frac{34}{2}}{1000}$$
$$= 0.17mg$$

$$[H_2O_2] = \frac{n}{V} = \frac{\frac{m_{H2O2}}{M}}{V} = \frac{\frac{0.17x10^{-3}}{34}}{1} = \frac{17.10^{-5}}{34}$$
$$= 5.10^{-6}mol/lit$$

- مولار = M = mol/lit.

12-5-3-5 تأثير المثبطات في نشاط إنزيم الكاتالاز

يؤخذ ثلاثة دوارق مخروطية ويضاف إلى كل دوارق الإضافات حسب الجدول:

المواد	رقم الدورق		
	1	2	3
H_2O_2	25	25	25
NaCN	-	1	-
ماء مقطر	1	-	3

إنزيم	2	2	–
$KMnO_4$ المستهلك			

1. يضاف إلى الدوارق الثلاثة بعد مرور خمس دقائق من إضافة الإنزيم 5ml حمض الكبريت. ثم يضاف 2ml إنزيم إلى الدورق الثالث.
2. تعاير محتويات الدوارق بمحلول البرمنغنات ويسجل الحجم المستهلك في معايرة الماء أكسجيني المتبقي.
3. تحسب سرعة التفاعل الإنزيمي في الدورقين الأول والثاني وتحسب نسبة التثبيط المئوية.

$$inhibition = \frac{V_2 - V_1}{V_1}$$

المصطلحات العلمية

A	
Absorbance	امتصاص ضوئي
Acid	حمض
Acid number	الرقم الحمضي
Activator	المنشط
Activate	نشط، فعال
Active center	مركز فعالة
Addition	ضم
Adenine	أدينين
Adenosine	أدينوزين
Adsorption	امتزاز ،ادمصاص
Aerobic	هوائي
Aerobic oxidation	أكسدة هوائية
Albumins	ألبومينات
Alcoholic fermentation	تخمر كحولي
Agent	عامل
Aldehydic end	نهاية ألدهيدية
Aldoses	الدوز سكر ألدهيدي
Amphoteric	متردد (متذبذب)
Amino Acids	حموض أمينية
Amylopectin	اميلوبكتين
Amylose	اميلوز
Anabolism	استقلاب
Anaerobic	لاهوائي
Anti-	مضاد
Antioxidants	مضاد أكسدة
Arachidonic acid	حمض الاراكيدونيك
Arginine	آرغينين (حمض أميني)
Ascorbic acid	حمض الاسكوربيك (فيتامين C)
Asparagine	اسبارجين
Aspartic acid	حمض الاسبارتيك
Atom	ذرة

B	
Biochemistry	الكيمياء الحيوية
Biosynthesis	اصطناع حيوي
Biotin	بيوتين (فيتامين)
Blank	شاهد (عينة)
C	
Carbohydrat	كربوهيدرات (سكريات)
Casein	كازئين (بروتين)
Calciferol	كالسيفيرول (فيتامين)
Cathode	القطب السالب
Cellulose	السيللوز
Centerfuge	جهاز طرد مركزي
Chromatografy	كروماتوغرافيا
Cholesterol	كوليسترول
Classification	تصنيف
Coefficient	معامل
Coenzyme	مرافق إنزيمي
Collagen	كولاجين
Complex	معقد
Component	مكون
Concentration	تركيز
Cytosine	سيتوزين
D	
Deoxy ribonucleic acid	الحمض النووي منقوص الأكسجين DNA
Deoxyribose	سكر ريبوز منقوص الأكسجين
Denaturation	تشوه البروتين (التمسخ)
Dextrin	ديكسترين
Dehydration	حذف الماء
Diglyceride	غليسيريد ثنائي
Dipeptide	ببتيد ثنائي
Disacchride	سكر ثنائي
Donor	مانح
E	
Electrolyte	كهرليت (إلكتروليت)

Endopeptiddase	انزيم إندوببتيداز
Enolase	اينولاز (انزيم)
Enzyme	إنزيم
Enzymes specificity	تخصص الإنزيمات
Ergosterol	ارغوستيرول
Essential amino acids	حموض أمينية ضرورية
F	
Fatty	دهن
Fat acids	حموض دهنية
Ferment	خميرة (انزيم)
Fructose	سكر فركتوز
Fumaric acid	حمض الفوماريك
Furan	فوران
Furfural	فورفورال
G	
Galactolipid	ليبيد سكري (غالاكتوليبيد)
Galactosaccharic acid	حمض الغالاكتوريك
Galactose	سكر غالاكتوز
Gelatin	جيلاتين (بروتين)
Globular protein	بروتينات كروية
Globulins	غلوبولينات (بروتينات كروية)
Glycoproteins	غليكوبروتين
Glucose	سكر الغلوكوز
Glutamic acid	غلوتاميك حمض أميني
Glutamine acid	غلوتامين حمض أميني
Glutathione	غلوتاثيون (ببتيد ثلاثي)
Glyceraldehyde	غليسير ألدهيد
Glycerides	غليسيريدات
Glycerol	غليسيرول (غليسيرين)
Glycine	غليسين حمض أميني
Glycogen	غليكوجين (سكر متجانس)
H	
Hemoglobin	هيموغلوبين
Hexokinase	هكسوكيناز (انزيم)
Hexose	هكسوز (سكر سداسي)

Histidine	هيستيدين (حمض أميني)
Hormones	هرمونات
Homopolysaccharides	سكريات عديدة متجانسة
Hydrocarbons	هيدروكربونات
Hydrogenation	هدرجة
Hydrolyses	حلمهة
Hydrophilic	محب للماء
Hydrophobic	كارة للماء
Hydroxyproline	هيدروكسي برولين
I	
Inactive	غير فعال
Indicator	دليل مشعر
Infrared	أشعة تحت الحمراء
Inhibitors	مثبطات
Insulin	انسولين
Iodine number	رقم يودي
Isoelectric point	نقطة التعادل الكهربائي
Isoleucine	ايزولوسين
L	
Lactic acid	حمض اللاكتيك (اللبن)
Lactam	لاكتام (شكل كيتوني)
Lactim	لاكتيم (شكل إينولي)
Lactose	لاكتوز (سكر الحليب)
Lauric acid	حمض اللاوريك (حمض دهني)
Lecithin	ليسيثين (دهن فوسفاتي)
Leucin	لوسين (حمض أميني)
Linoleic	حمض اللينوليك
Linolenic	حمض اللينولينيك
Lipase	الليباز (انزيم)
Lipids	ليبيدات
Lysine	اللايسين (حمض أميني)
M	
Maltase	مالتاز (انزيم)
Maltose	مالتوز (سكر الشعير)
Maximum velocity	السرعة القصوى

Messenger RNA	الحمض النووي الريبي الرسول
Methionine	ميثيونين (حمض أميني)
Mononucleotide	نيوكليوتيد احادي
Mannose	المانوز (سكر أحادي)
Monosaccharides	سكريات أحادية
Myoglopin	ميوغلوبين
N	
Ninhydrine	نينهيدرين
Nitration	نترجة
Nonessential amino acid	حموض أمينية غير ضرورية
Nucleases	انزيمات تحلل نيوكليوتيدات
Nucleoic acids	حموض نووية
Nucleoproteins	بروتينات نووية
Nucleosides	نيوكليوزيد (أساس + سكر)
O	
Oil	زيت
Oleic acid	حمض الأوليك
Oligosaccharides	سكريات قليلة التعدد (مركبة)
Optical density	كثافة ضوئية
Optimal pH	درجة الحموضة المثلى
Oxidant	مؤكسد
Oxidation	أكسدة
α Oxidation	أكسدة – الفا
β Oxidation	أكسدة – بيتا
Oxidoreductaes	انزيمات أكسدة والاختزال
P	
Palmitic acid	حمض النخيل (دسم)
Pantothenic acid	حمض البانتوثينيك
Pentose	سكر خماسي
Pepsin	انزيم ببسين
Peptidases	انزيم ببتيداز (تحلل البروتينات)
Peptides	ببتيدات
Peptone	ببتون
Peroxide	فوق أكسيد (بيرأوكسيد)
Phenyl alanine	فينيل آلانين (حمض أميني)

Phosphatidic acid	حمض الفوسفاتيديك
Phospholipids	فوسفوليبيد
Polynucleotide	متعدد النيوكليوتيد
Polypeptide	متعدد الببتيد
Proline	برولين حمض اميني
Proteines	بروتينات
Provitamin	مولد فيتامين
Purine	بورين (أساس آزوتي)
Pyran	بيران (حلقة سداسية غير متجانسة)
Pyrimidine	بيريميدين (أساس آزوتي)
Pyrolidine	بيروليدين
Pyruvic acid	حمض البروفيك
Q	
Qualitative analysis	تحليل كيفي
Quantative analysis	تحليل كمي
R	
Raffinose	سكر الرافينوز (معدد ثلاثي)
Reactive	فعال، نشيط
Reagent	كاشف
Ribonucleic acid	الحمض النووي الريبي RNA
S	
Sample	عينة
Saponification number	رقم التصبن
Saturated	مشبع
Simple proteins	البروتينات البسيطة
Spectrophotometer	جهاز التحليل الطيفي الضوئي
Spectrum	طيف
Serine	سيرين (حمض أميني)
Simple lipids	ليبيدات بسيطة
Sorbitol	سوربيت (سوربيتول)
Starch	نشاء
Stearic acid	حمض الشمع (الستياريك)
Steroids	ستيروئيدات
Substrate	ركازة (مادة التفاعل)
Sucrose	سكروز (سكر الطعام)

T	
Test	اختبار
Tetra saccharides	السكريات الرباعية
Thiamin	ثيامين (فيتامين B1)
Thin layer chromatography	كروماتوغرفيا الطبقة الرقيقة
Threonine	ثريونين (حمض أميني)
Threose	ثريوز (سكر ثلاثي)
Thymine (T)	الثايمين (أساس) آزوتي)
Tocopherol	توكوفيرول (فيتامين E)
Transmittance	النفاذية الضوئية
Triglyceride	غليسيريد ثلاثي
Trioses	سكرأحادي ثلاثي
Tripeptide	ببتيد ثلاثي
Trisaccharides	سكريدات ثلاثية
Trypsin	تربيسين (انزيم هضم البروتين)
Triptophan	تريبتوفان (حمض أميني)
Tyrosine	تيروزين (خمض أميني)
U	
Ultra violet	أشعة فوق بنفسجية
Unsaturated	غير مشبع
Uracil (U)	يوراسيل (أساس آزوتي)
V	
Valine	فالين (حمض أميني)
Velocity	سرعة
Vitamins	فيتامينات
W	
Water bath	حمام مائي
Wax	شمع
Z	
Zwitterion	شاردة ثنائية القطب

المراجع References

أولا – مـــراجع الجزء النظري

أ- المراجع العربية

1- Belitsz، H,D; وآخرون ;(2010); كيمياء الغذاء، ترجمة كلاوي، حسن، وآخرون، سلسلة الكتاب الجامعي، المركز العربي للتعريب والترجمة والتأليف والنشر، ومنظمة الصحة العالمية المكتب الأقليمي للشرق الأوسط، دمشق.

2- الأعسر، عبد المنعم محمد; (2011); أسس الكيمياء الحيوية المجلد الأول، الناشر المكتبة الأكاديمية; القاهرة.

3- أحمد، يونس; والهلالي، علي; (2010); الكيمياء الحياتية الجزء الأول والثاني; دار ابن الأثير للطباعة والنشر; جامعة الموصل.

4- آل فليح، خولة أحمد; مدخل إلى الكيمياء الحياتية; جامعة الموصل; (لايوجد تاريخ نشر).

5- تقنية البيئة; الكيمياء الحيوية; المؤسسة العامة للتعليم الفني والتدريب المهني (الادارة العامة لتصميم وتطوير المناهج); السعودية; (لايوجد تاريخ نشر ومؤلفين).

6- جبور، ابراهيم; غصون، شبيب; وعباس، شعبان (1998) ; الكيمياء الحيوية; مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية; جامعة تشرين.

7- حسن، طاهر;(1982); الكيمياء الحيوية; مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية; جامعة البعث.

8- حيدر، محمد; والنداف، علي; (2012); مبادئ الكيمياء الحيوية; مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية، جامعة تشرين.

9- الرحمون، عبد اللطيف; ومصري، محمود; (2010); الكيمياء الحيوية; مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية، جامعة البعث.

10- السيد، الشحات علي; وعلي، جلال الدين; (2009); الكيمياء الزراعية; دار الطباعة والنشر مركز التعليم المفتوح; جامعة عين شمس; القاهرة.

11- العبد الله، غازي ; وفرح، روبين; (2004)،الكيمياء العامة; مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية; جامعة تشرين.

12- كلاوي، حسن; وآخرون; (2010); كيمياء الغذاء; ترجمة المركز العربي للتعريب والآتيف والنشر، ومنظمة الصحة العالمية المكتب االأقليمي للشرق الأوسط; دمشق.

13- لحدو، رغداء; والمقداد ، ماهر; (2009); الكيمياء الطبية; مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية; جامعة حلب.

14- المظفر، سامي ; (2009); أساسيات الكيمياء الحياتية; دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة.

15- النجفي، طلال سعيد; (1987); الكيمياء الحياتية; جامعة الموصل.

ب - المراجع الأجنبية

1- Richard A. ; and Harvey, Denise R. (2010), Biochemistry (Lippincott's Illustrated Reviews) - Biochemistry_ 5th Edition - Williams & Wilkins, Printed in China.
2- Devlin, T.M. (2002) ; Textbook of Biochemistry with clinical correlations fifth edition ,Wiley-Liss, New York.
3- Linden, G. ; and Lorient, D. (1994), New ingredients in food processing Biochemistry and agriculture, Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington Cambridge CB1 6AH, England.
4- Koolman, J. ; and Roehm, K.H. (2005), Color Atlas of Biochemistry Second edition, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Germany.
5- Murray, R. K. ; Granner, D. K. ; Mayes, P.and Rodwell, V. (2003), Harper's Illustrated Biochemistry, McGraw-Hill Companies, USA.
6- Diouf, J., Biotechnologies for Agricultural Development, International conferences of ABDC-10 proceedings,© FAO 2011, Italy.
7- Sergey D. V., G.E. ,Z. ;and Larisa P. K. (2012) Biochemistry and Biotechnology Research and Development, Nova Science Publishers, Inc. New York.
8- Gumport, R. I.; Deis, F. H.; and Gerber N. C.(2002); Biochemistry, Fifth Edition; W. H. Freeman and Company,New York.

ثانيا- مـــراجع الجزء العملي

أ- المراجع العربية

1- أبو قويدر، سالم؛ (2004) ؛ الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزئية، الجزء العملي ؛ مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية – جامعة البعث.
2- حيدر، محمد ؛ (2009)؛ اختبارات وتجارب في الكيمياء الحيوية؛ مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية – جامعة تشرين.

3- شقيفة، علاء الدين؛ والأسمر، هالة؛ (2009)؛ الكيمياء الحيوية والمرضية، الجزء العملي؛ مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية – جامعة دمشق.
4- العبد الله، غازي؛ وفرح، روبين؛ (2004) ؛ الكيمياء العامة لطلاب الزراعة، الجزء العملي؛ مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية – جامعة تشرين.
5- عبد الكريم، كاملي؛ (لم يذكر تاريخ النشر) ؛ الكيمياء الحيوية، الجزء العملي؛ منشورات المدرسة العليا للأساتذة – العراق.
6- المؤسسة العامة للتدريب التقني والمهني؛ (1429) هـ ؛عملي الكيمياء الحيوية 164 كيح ؛ الأدارة العامة لتصميم وتطوير المناهج؛ منشورات المملكة العربية السعودية.
7- مصري، محمد محمود ؛ والرحمون، عبد اللطيف؛ (2010) ؛ الكيمياء الحيوية، الجزء العملي ؛ مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية – جامعة البعث.
8- المقداد، ماهر؛ ولحدو، رغداء؛ (2010)؛ الكيمياء الطبية ، الجزء العملي ؛ مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية – جامعة حلب.
9- محفوض، جمال؛ (2008) ؛ الكيمياء التحليلية 2؛ مديرية الكتب والمطبوعات – جامعة دمشق.

ب-المراجع الأجنبية

1- Suderman, H.J . (1982) ؛ Biological Chemistry: Laboratory Manuals I and II , University of Guelph؛ Canada.
2- Clark, J.M. and Switzer, R. L. (1977) ؛ Experimental Biochemistry, 2nd ed., Freeman and Company, London.
3- Switzer, R. L. and Garrity L. F. (1999) ؛ Experimental Biochemistry, 3th ed ؛ W. H. Freeman and Co , New York.
4- Hegyi, G. ؛ Kardos, J. (2013) ؛ Introduction to Practical Biochemistry؛ Eötvös Loránd University, Hungary.
5- Geetha Damodaran, K. (2011) ؛ Practical Biochemistry؛ Government Medical College,Thrissur, Kerala, India.
6- FOX, P.F. and McSweeney, P.L.H. (1998) ؛ Dairy Chemistry and Biochemistry, University College , Cork, Ireland.

اللجنة العلمية

أ. د. رويدة أبو سمرة
استاذ الكيمياء الحيوية في كلية الطب البشري - جامعة دمشق

أ.د. فايزة قبيلي
استاذ الكيمياء الحيوية في كلية الصيدلة - جامعة دمشق

أ. د. محمد نداف
استاذ الكيمياء الحيوية في كلية الزراعة - جامعة تشرين

حقوق الطبع والترجمة والنشر محفوظة

لمديرية الكتب والمطبوعات