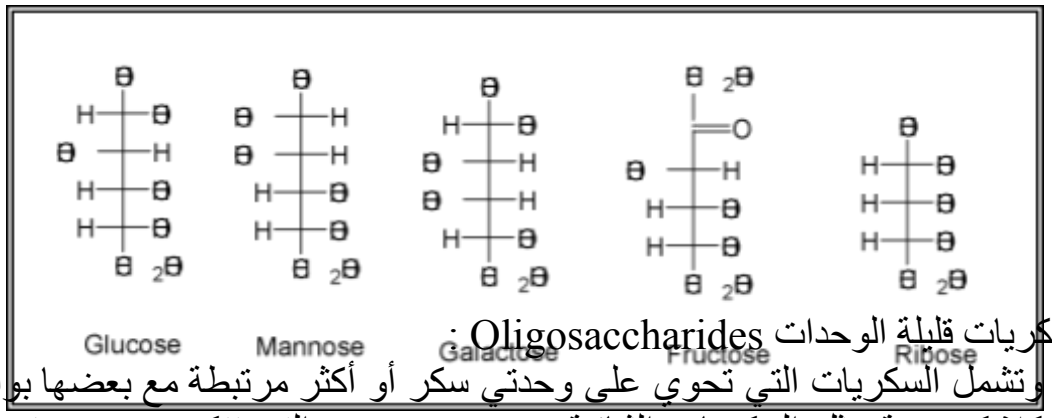
الكربوهيدرات Carbohydrates

الكربوهيدرات: هي مركبات الديهايدية أو كيتونية متعددة الهيدروكسيل و التي عند تحللها مائياً تعطي الديهايد أو كيتون كحولي متعدد الهيدروكسيل، صيغتها العامة $(CH_2O)_n$ حيث n تتراوح من ثلاث إلى عدة آلاف، ويمكن تصنيف الكربوهيدرات إلى:

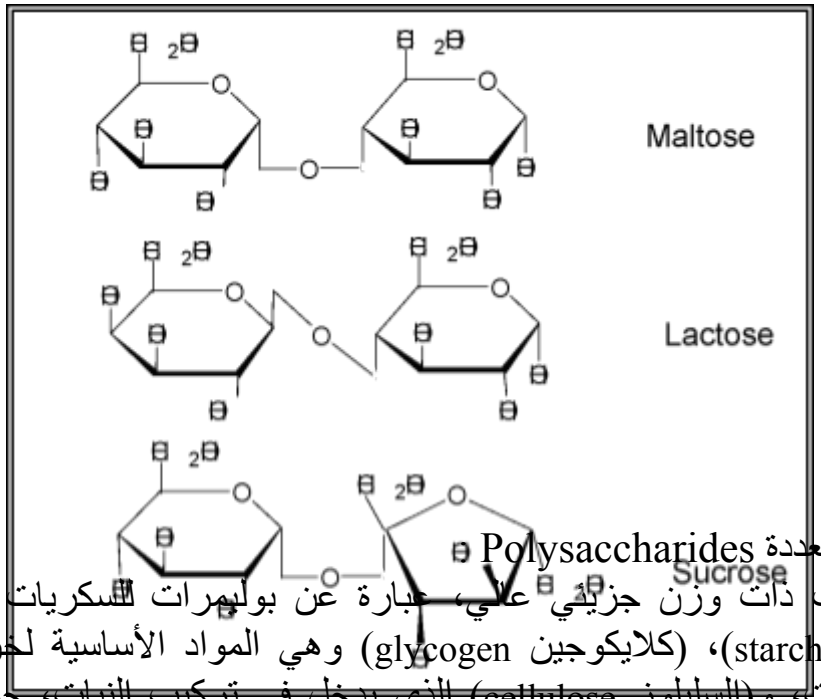
1) سكريات أحادية Monosaccharides :

وهي التي تتألف من جزيئه واحدة ولا يمكن تجزئتها إلى وحدات أصغر ومن أهمها:



2) السكريات قليلة الوحدات Oligosaccharides :

وتشمل السكريات التي تحوي على وحدتي سكر أو أكثر مرتبطة مع بعضها بواسطة آصرة كلايكوسيدية مثل السكريات الثنائية Disaccharides والتي تتكون من وحدتي سكر مرتبطة مع بعضها بآصرة كلايكوسيدية إيثرية (C-O-C) وأهم هذه السكريات:



3) سكريات متعددة Polysaccharides

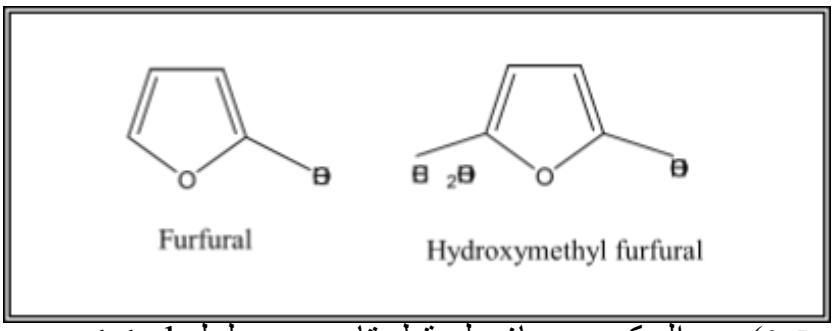
سكريات ذات وزن جزيئي عالي، عبارة عن بوليمرات للسكريات الأحادية ومن أمثلتها (النشا starch)، (كلايكوجين glycogen) وهي المواد الأساسية لخزن الطاقة في الحيوان والنبات، و(السليلوز cellulose) الذي يدخل في تركيب النبات، جميع السكريات المتعددة غير مختزلة بسب وزنها الجزيئي الكبير بالرغم من احتواءها على مجموعة OH الحرة.

الكشوفات الخاصة بالكربوهيدرات:

1) كشف مولش Molisch's Test :

هو كشف عام لجميع المركبات السكرية يعتمد على سحب جزيئات الماء من المركب السكري بواسطة حامض قوي مثل حامض الكبريتيك حيث يتكون مركب الفورفورال

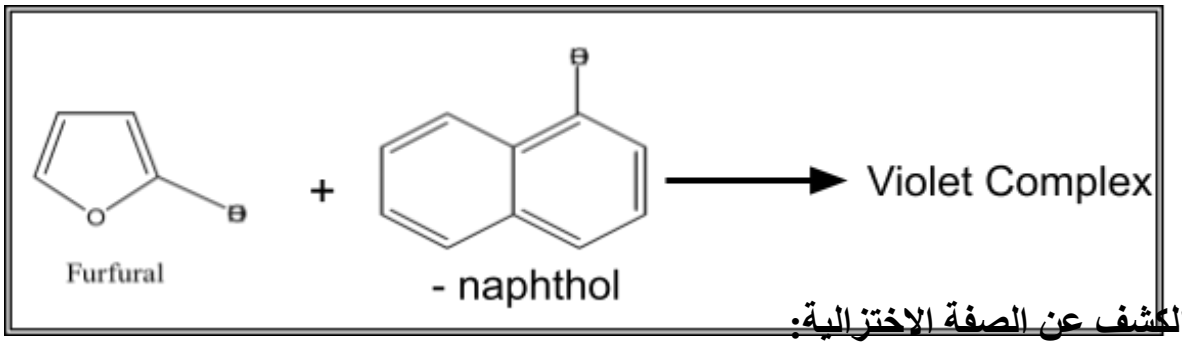
(Furfural) إذا كان السكر خماسي أو يتكون مشتق الفورفورال إذا كان السكر سداسي ، بعد ذلك يتحد الفورفوال مع محلولα-naphthol ليكون معقد يظهر بشكل حلقة بنفسجية.



طريقة العمل:

يؤخذ (0.5ml) من السكر ويضاف له قطرتان من محلول α-naphthol ويمزج جيداً، ثم تمسك الأنبوبة بصورة مائلة ويضاف (2ml) تقريباً من حامض الكبريتيك المركز تدريجياً وعلى جدران الأنبوبة، نلاحظ تكون حلقة بنفسجية تفصل بين الطبقتين المائية و العضوية.

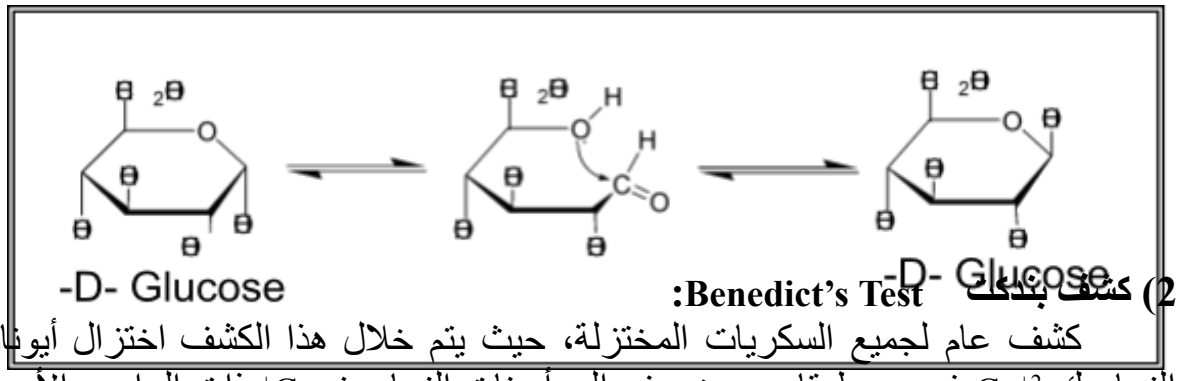
ملاحظة : يحضر محلول α-naphthol بإذابة 1 غم من α-naphthol في 100 مل من الأيثانول .



الكشف عن الصفة الاختزالية:

تمتلك السكريات بصورة عامة الصفة الاختزالية كالالديهايدات والكيتونات حيث تحتوي على مجموعة كربونيل حرة، تقل الصفة الاختزالية كلما زادت عدد وحدات السكر فمثلاً السكريات الثنائية أقل قوة اختزالية من السكرات الأحادية، وهكذا بالنسبة للسكريات المتعددة لا تعتبر مختزلة من الناحية العملية بالرغم من احتوائها على مجموعة كربونيل حرة طرفية ولكن لكبر الجزيئة تقل الصفة الاختزالية و تكاد تنعدم.

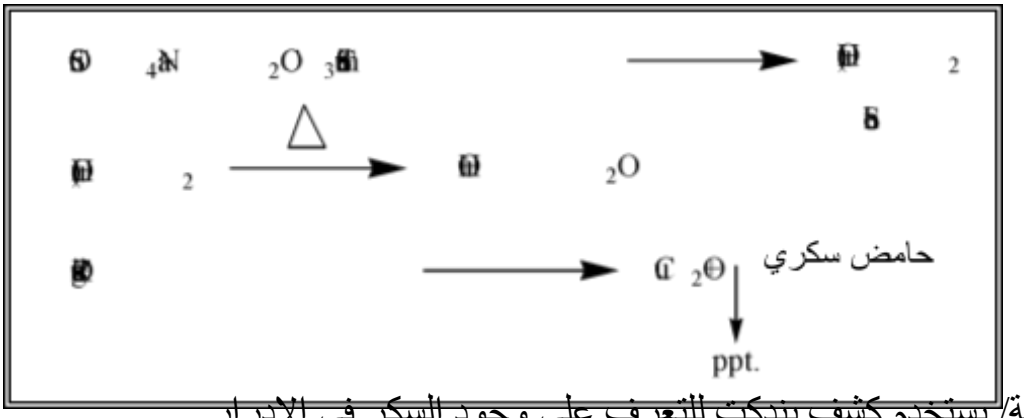
إن الشكل الالديهايدي والكيتوني المفتوح في المحلول السكري والذي تجري عليه عملية التأكسد يكون بنسبة (1%) فقط والباقي (99%) يكون بشكل حلقي:



2) كشف بندكت Benedict's Test:

كشف عام لجميع السكريات المختزلة، حيث يتم خلال هذا الكشف اختزال أيونات النحاسيك Cu^{+2} في محيط قاعدي ضعيف إلى أيونات النحاسوز Cu^{+} ذات الراسب الأصفر

المحمر وهذا يعتمد على نوع السكر حيث يمكن تلخيص التفاعلات التي تحدث في أثناء الكشف كما يلي:



ملاحظة/ يستخدم كشف بندكت للتعرف على وجود السكر في الإدرار.

طريقة العمل:

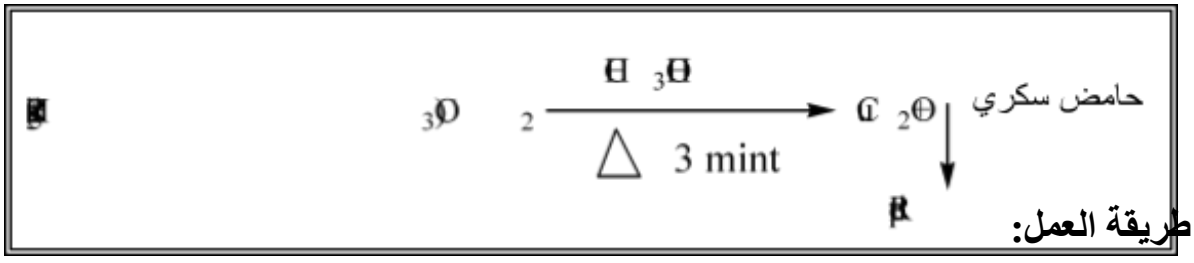
يؤخذ (0.5ml) من المحلول السكري في أنبوبة اختبار ويضاف لها (1ml) من محلول كاشف بندكت، يرج المحلول جيداً ثم توضع الأنبوبة في حمام مائي مغلي لمدة خمس دقائق، تبرد الأنبوبة ونلاحظ الراسب المتكون.

ملاحظة/ جميع السكريات تعطي كشف موجب مع محلول كاشف بندكت عدا السكروز لا يعطي الكشف لعدم احتواءه على مجوعة اختزالية حرة.

تحضير الكاشف : تذاب 173 غم من سترات الصوديوم مع 100 غم من كاربونات الصوديوم في 800 مل من الماء المقطر ، يرشح المحلول ثم يضاف إلى الراشح 17.3 غم من كبريتات النحاس المذابة في 100 مل من الماء المقطر بعدها يكمل الحجم إلى 1000 مل .

3) كشف بارفوريد Barfoed's Test :

كشف خاص بالسكريات الأحادية، حيث تتأكسد السكريات الأحادية فقط في المحاليل الحامضية الضعيفة الحاوية على أيونات النحاسيك والتي تتحول إلى نحاسوز بشكل راسب أحمر يظهر في قاع الأنبوبة بعد تبريدها. بما أن عملية الاختزال في الوسط الحامضي الضعيف تحدث بصعوبة لذا فالسكريات الأحادية فقط بإمكانها اختزال أيون النحاسيك، وبالتالي نستطيع بواسطة هذا الكشف التمييز بين السكريات الأحادية والثنائية ضعيف الاختزال (لفترة التسخين دوراً مهماً في تحديد إيجابية الكشف وذلك بزيادة فترة التسخين يمكن للسكريات الثنائية أن تعطي نتيجة موجبة للكشف أيضا بسبب تحللها المائي في الوسط الحامضي إلى وحدات أصغر). والتفاعل العام هو



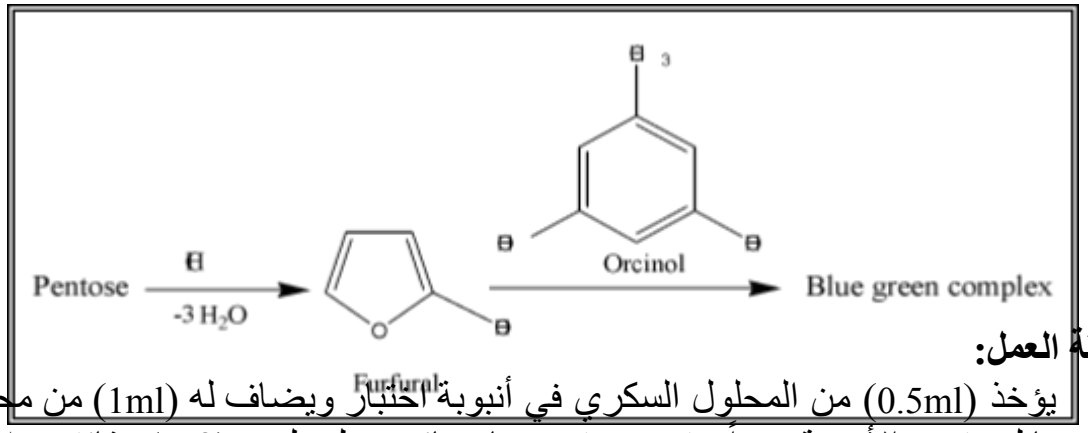
طريقة العمل:

يؤخذ (0.5ml) من المحلول السكري في أنبوبة اختبار ثم يضاف لها (1ml) من محلول كاشف بارفويد، ترج الأنبوبة جيداً ثم توضع في حمام مائي مغلي لمدة ثلاث دقائق فقط ونلاحظ الراسب الأحمر المتكون.

تحضير الكاشف : تذاب 13.3 غم من خلات النحاس في 200 مل من الماء المقطر ، يرشح المحلول ثم يضاف إلى الراشح 1.8 مل من حامض الخليك الثلجي .

4) كشف بايل Bial's Test :

كشف خاص بالسكريات الخماسية مثل Ribose و Xylose واللذان يتفاعلان مع حامض الهيدروكلوريك المركز ليكونان الفورفوال والذي بدوره يتحد مع الاورسينول مكوناً معقد أخضر مزرق، أما السكريات السداسية فإنها تكون مع الحامض مركب الهيدروكسي مثيل فورفوال والذي بدوره يتحد مع الاورسينول مكوناً معقد ذو لون بني .



طريقة العمل:

يؤخذ (0.5ml) من المحلول السكري في أنبوبة اختبار ويضاف له (1ml) من محلول كاشف بايل، ترج الأنبوبة جيداً وتوضع في حمام مائي مغلي لمدة (3-5) دقائق ويلاحظ تكون اللون الأخضر المزرق.

ملاحظة: في حالة استعمال كميات كبيرة من السكريات الخماسية يتكون لوناً أزرق بنفسجي.

تحضير الكاشف : يذاب 1.5 غم من الاورسينول في 500 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز ، يضاف بعدها 1 مل من محلول 10% كلوريد الحديديك .

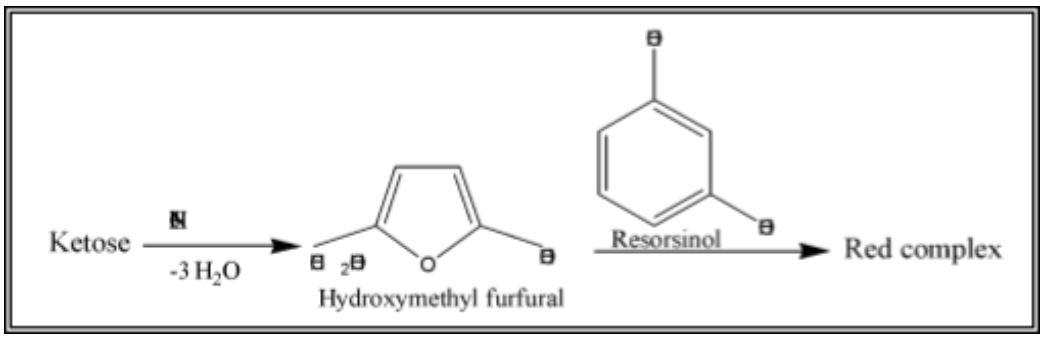
5) كشف سلفانوف Seliwanoff's Test :

كشف خاص بالسكريات الكيتونية، حيث تعطي السكريات الكيتونية لون وردي أو بصلي عند تسخينها مع محلول كاشف سلفانوف. تتفاعل هنا السكريات الكيتونية مع حامض HCl (3M) لتكون مشتق الفورفوال الذي يتفاعل بدوره مع الريسورسينول ليعطي معقد لونه وردي أو بصلي مع ملاحظة الاهتمام بوقت التسخين جيداً.

طريقة العمل:

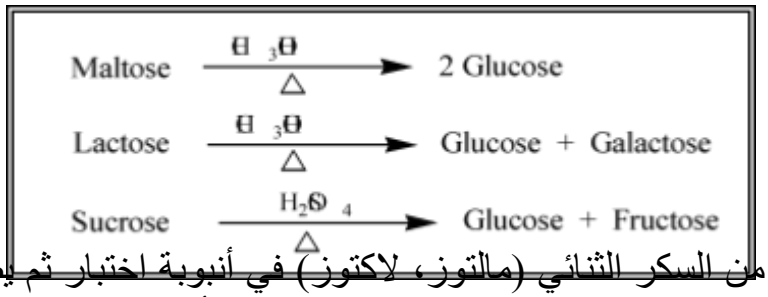
يؤخذ (0.5ml) من المحلول السكري في أنبوبة اختبار ويضاف له (1ml) من محلول كاشف سلفانوف ثم نسخن الأنبوبة لمدة (3-5) دقائق في حمام مائي مغلي ويلاحظ ظهور اللون البصلي.

تحضير الكاشف : تذاب 0.05 غم من مادة الريسورسينول في 100 مل من حامض HCl (3M) .



6) كشف السكريات الثنائية Disaccharides Test:

تعد كل من المالتوز واللاكتوز والسكروز من أهم السكريات الثنائية العديمة اللون والتي تكون ذائبة في الماء وحلوة المذاق ونشطة بصرياً، تتحلل هذه السكريات مائياً إلى سكريات أحادية بواسطة حامض معدني مخفف وحرارة أو باستخدام الأنزيمات، يعتبر السكروز هو السكر الثنائي الوحيد الذي لا يمتلك الصفة الاختزالية لعدم احتواءه على مجموعة الكربونيل الحرة. يتحلل المالتوز واللاكتوز باستخدام حامض الخليك أما السكروز فيتحلل بواسطة استخدام حامض الكبريتيك.



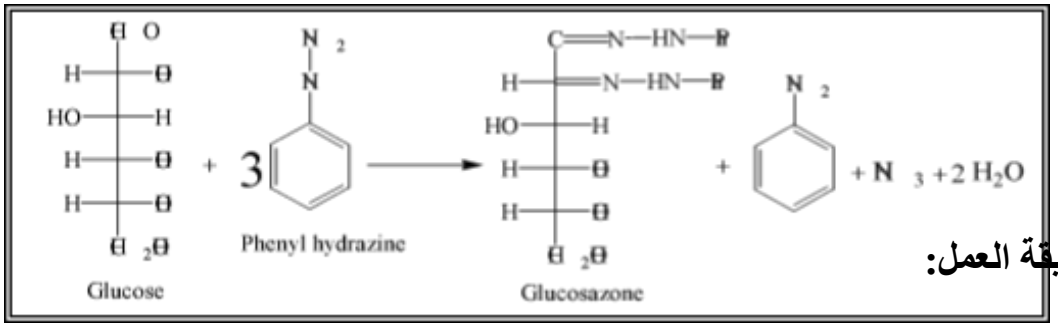
طريقة العمل:

أ- يؤخذ (3ml) من السكر الثنائي (مالتوز، لاكتوز) في أنبوبة اختبار ثم يضاف لكل واحدة منها عشر قطرات من حامض الخليك المركز وتسخن الأنبوبة لمدة (15) دقيقة في حمام مائي مغلي، يبرد المحلول بعد ذلك ويقسم إلى قسمين يجري عليهما كشف بندكت وكشف بارفويد (مع التسخين في حمام مائي مغلي لمدة 5-15 دقيقة).

ب- يؤخذ (3ml) من محلول السكروز في أنبوبة اختبار ويضاف له ثلاث قطرات من حامض الكبريتيك المركز ثم توضع الأنبوبة في حمام مائي مغلي ولمدة (5) دقائق، بعد ذلك يبرد المحلول ويعادل بـ (10%) هيدروكسيد الصوديوم ثم يقسم إلى ثلاث أقسام وتجرى عليها كشف بندكت وبارفويد وسلفانوف.

7- كشف الاوزازون Osazone Test :

المركبات (ومن ضمنها السكريات) التي تحوي جذر الالديهايد أو الكيتون الحر (مجموعة اختزالية حرة) تتحد مع مركب الفنيل هيدرازين لتكون مشتقات بلورية صفراء لها أشكال هندسية مختلفة ودرجات انصهار melting point معينة يمكن تشخيصها تحت المجهر الضوئي بسهولة، يعتبر هذا الاختبار كشفاً مميزاً للسكريات المتشابهة في بعض الاختبارات السابقة، فعلى سبيل المثال لا يمكن تمييز سكر الكلوكوز عن سكر الكالكتوز إلا عن طريق اختبار شكل البلورات الهندسية. إن السكروز هو السكر الوحيد الذي لا يعطي هذا الاختبار لعدم احتواءه على المجموعة الاختزالية الحرة. إن بلورات السكريات الأحادية ماعدا الكالكتوز تكون غير ذائبة في المحلول الساخن عكس بلورات المالتوز واللاكتوز تكون ذائبة ولكنها تترسب عند ترك الأنابيب تبرد، والتفاعل العام لهذا الكشف هو:



طريقة العمل:

1- يؤخذ حوالي (2ml) من المحلول السكري في أنبوبة اختبار ويضاف له كمية زائدة من كاشف الفنيل هيدرازين (مزيج من 3 غم من خلات الصوديوم البلورية + 3 غم من الفنيل هيدرازين). توضع الأنبوبة في حمام مائي مغلي (بعد الرج الجيد لإذابة الكاشف) لمدة نصف ساعة.
2- بلورات السكريات الأحادية سوف تنفصل في المحلول الساخن بسرعة بعد مرور عشر دقائق تقريباً.
3- عند انقضاء فترة التسخين (30 دقيقة) دون انفصال البلورات فهناك احتمال وجود سكريات ثنائية (مالتوز أو لاكتوز) وفي هذه الحالة نبرد ببطء (ترك الأنبوبة تبرد تدريجياً) فنلاحظ عند ذلك تكون البلورات بشكل واضح.
4- نضع البلورات على شريحة زجاجية slide ونفحص أشكالها بعناية تامة تحت المجهر ونسجل ملاحظاتنا.

السكريات المتعددة Polysaccharides :

مركبات عديمة الطعم والرائحة تتكون من عدد كبير من سلاسل وحدات السكريات الأحادية وهذه السلاسل قد تكون متفرعة مثل الكلايكوجين أو مستقيمة مثل السليلوز.

8) كشف اليود Iodine Test :

يعتمد هذا الكشف على حدوث عملية الامدصاص لليود على سطح النشا أو الدكسترين معطياً لوناً أزرق للنشا وبنفسجي في حالة الدكسترين، وتحدث هذه العملية بدرجة حرارة الغرفة، لأن الحرارة العالية لا تساعد على الامدصاص بسبب تهيج الجزيئات، ويتأثر هذا الكشف بما يلي:
أ- الحرارة: حيث يختفي اللون عند ارتفاع درجة الحرارة ويرجع بالتبريد.
ب- وسط التفاعل (pH): حيث لا يصح إجراء هذا الكشف إلا في وسط حامضي أو متعادل، ولا يصلح في الوسط القاعدي بسبب تفاعل اليود الحر مع القاعدة مكوناً أملاح الأيوديد والأيودات وحسب التفاعل التالي:

$$3I_2 + 6\,NaOH \longrightarrow 5\,NaI + NaIO_3 + 3\,H_2O$$

ولكن عند إضافة حامض HCl يرجع اليود الحر ثانية لحدوث التفاعلات التالية (نلاحظ عودة اللون ثانية):

$$NaIO_3 + HI \longrightarrow HIO_3 + NaI \qquad 6$$

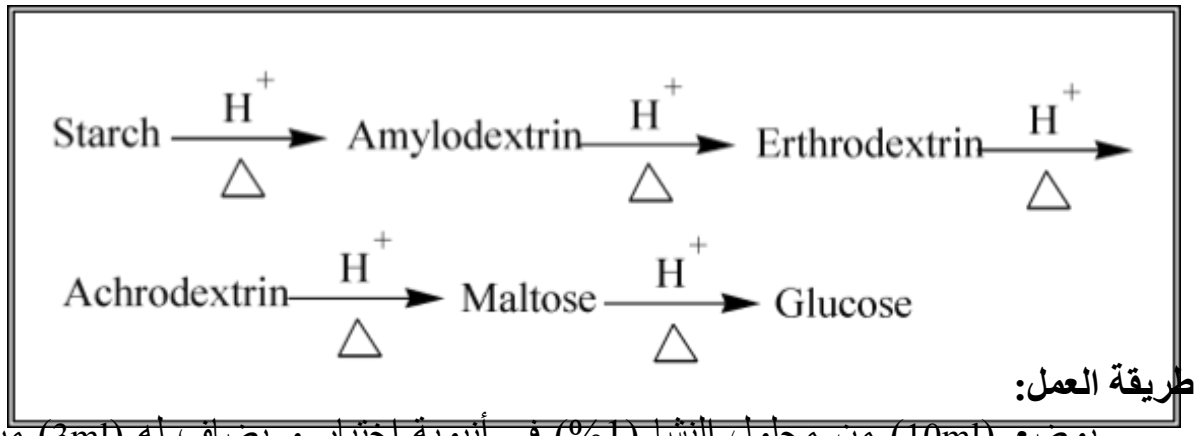
$$5\,NaI + 5\,HCl \longrightarrow HI + 5\,NaCl$$

طريقة العمل:

تضاف (3-5) قطرات من محلول اليود إلى (1ml) من محلول النشا في أنبوبة اختبار فيلاحظ ظهور اللون الأزرق، عند التسخين سوف يختفي اللون ويظهر ثانية بالتبريد. وباستمرار عملية التسخين والتبريد سوف نصل إلى مرحلة تسخن فيها الأنبوبة فيختفي اللون وعند تبريدها لا يظهر اللون مرة أخرى وهذا يحدث بسبب تبخر اليود بصورة كلية.

9) التحلل المائي للنشا بواسطة الحامض :

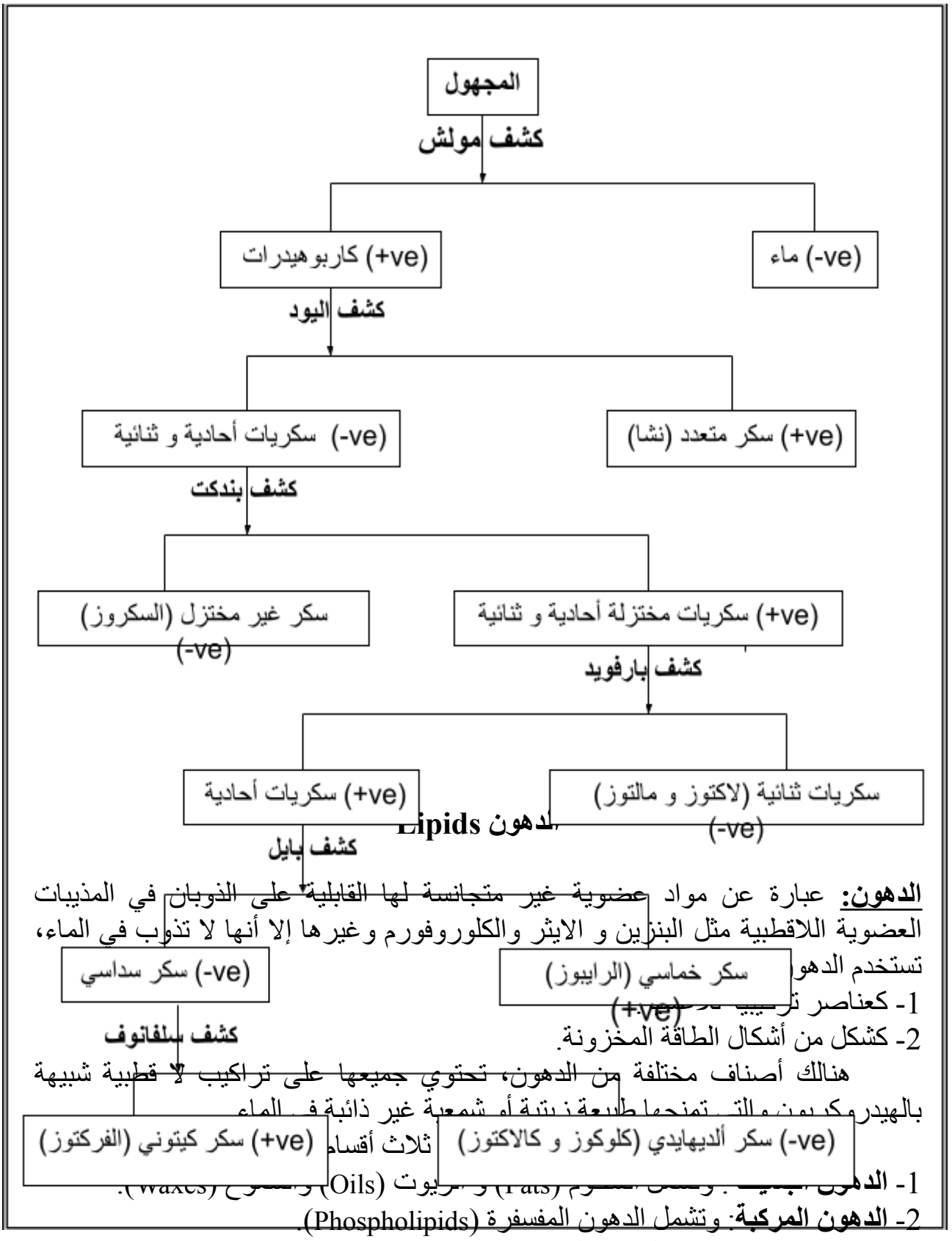
تحدث عملية تحلل النشا تدريجياً باستخدام حامض HCl حيث يحدث تفاعل تحلل متسلسل محفز بالحرارة وكما يلي:



طريقة العمل:

يوضع (10ml) من محلول النشا (1%) في أنبوبة اختبار و يضاف له (3ml) من حامض (2N)HCl، ترج الأنبوبة جيداً ثم توضع في حمام مائي مغلي ويتم سحب (1ml) من مكونات الأنبوبة كل ثلاث دقائق أي خلال الأوقات (0، 3، 6، 9، 12، 15) دقيقة، يقسم الـ(1ml) المسحوب إلى قسمين يجري على الأول كشف اليود وعلى الثاني كشف بندكت بعد معادلة الحامضية وتسجل النتائج التي يتم الحصول عليها في ورقة الحسابات.

السكر	كشف بندكت	كشف اليود
1- Starch	(-) غير مختزل	(+) لون أزرق
2- Amylodextrin	(-) غير مختزل	(+) لون بنفسجي
3- Erthrodextrin	(-) غير مختزل	(+) لون أحمر نبيذي
4- Achrodextrin	(-) غير مختزل	(+) لون أصفر بني
5- Maltose	(+) مختزل	(-) أصفر بلون اليود
6- Glucose	(+) مختزل	(-)أصفر بلون اليود



الدهون Lipids

الدهون: عبارة عن مواد عضوية غير متجانسة لها القابلية على الذوبان في المذيبات العضوية اللاقطبية مثل البنزين و الايثر والكلوروفورم وغيرها إلا أنها لا تذوب في الماء، تستخدم الدهون

1- كعناصر تركيبية

2- كشكل من أشكال الطاقة المخزونة.

هنالك أصناف مختلفة من الدهون، تحتوي جميعها على تراكيب لا قطبية شبيهة بالهيدروكربون والتي تمنحها طبيعة زيتية أو شمعية غير ذائبة في الماء.

ثلاث أقسام

1- **الدهون البسيطة**: وتشمل الشحوم (Fats) و الزيوت (Oils) والشموع (Waxes).

2- **الدهون المركبة**: وتشمل الدهون المفسفرة (Phospholipids).

والدهون السكرية (Glycolipids).

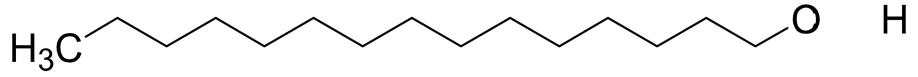
والدهون الإسفنجية (Sphingolipids).

3- **الدهون المشتقة**: وتشمل الكولسترول (الستيرويدات) والفيتامينات الذائبة بالدهون.

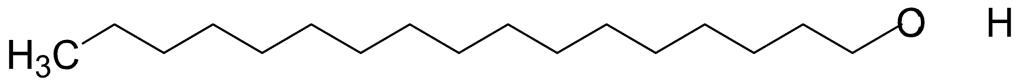
الأحماض الدهنية Fatty acids :

هي عبارة عن مركبات أو حوامض كاربوكسيلية اليفاتية طويلة السلسلة تدخل في تركيب الدهون البسيطة والمركبة حيث تعتبر اللبنة الأساس في بناء عدة أصناف من الدهون، تتميز الأحماض الدهنية باحتوائها على سلسلة هيدروكاربونية طويلة منتهية بمجموعة كربوكسيل قد تكون هذه السلسلة مشبعة أو غير مشبعة. تختلف الأحماض الدهنية بعضها عن البعض الآخر في طول سلسلتها وفي عدد وموقع أواصرها غير المشبعة. ومن أمثلة الأحماض الدهنية:

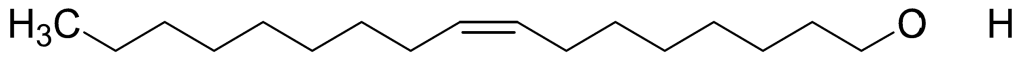
1- Palmitic acid 16:0



2- Stearic acid 18:0



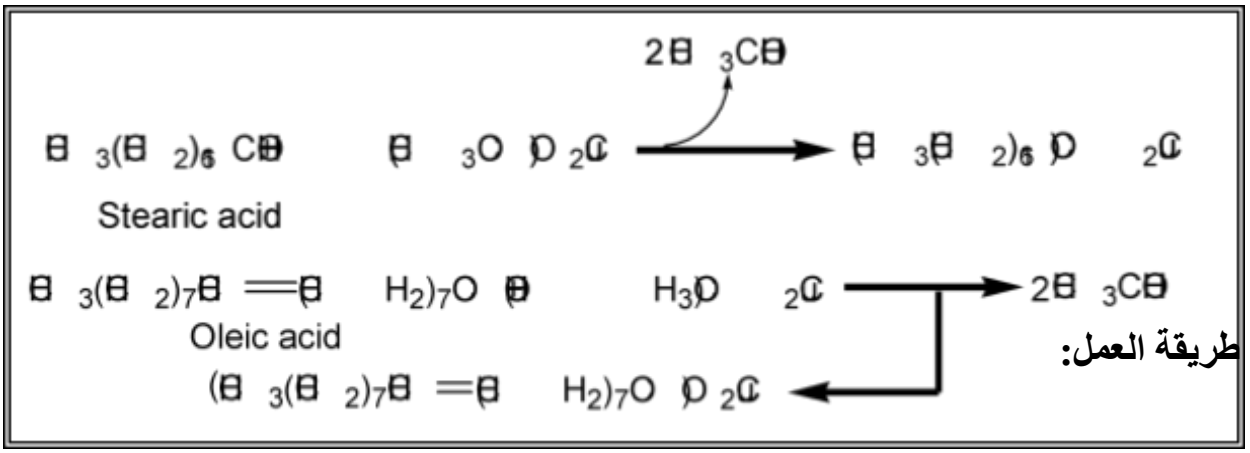
3- cis Δq Oleic acid 18:1



<u>الكشوفات الخاصة بالدهون :</u>

1) كشف اللاتشبع (بواسطة خلات النحاس):

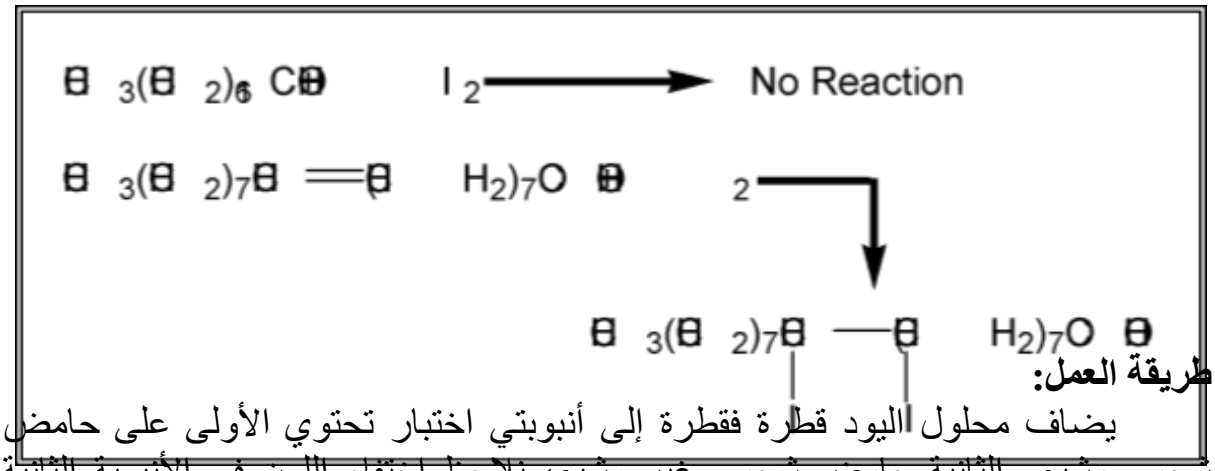
الكليسيريدات المتعادلة (Triglycerides) ليس لها القابلية على التفاعل مع محلول خلات النحاس، ولكن الأحماض الشحمية الحرة المشبعة تتفاعل مع هذا المحلول لتنتج راسب أخضر مزرق (في الطبقة المائية السفلى)، بينما الأحماض الشحمية غير المشبعة تعطي مع محلول خلات النحاس أملاح النحاس الخضراء اللون والذائبة في طبقة البترولیوم إيثر وبذلك يمكن بسهولة التمييز بين الأحماض الشحمية المشبعة وغير المشبعة بواسطة هذا التفاعل.



يؤخذ (1ml) من الحامض الدهني غير المشبع ويوضع في أنبوبة اختبار وتؤخذ أنبوبة اختبار أخرى ويوضع فيها (1ml) من الحامض الدهني المشبع، يضاف لكلا الأنبوبتين عشر قطرات من محلول (10%) خلات النحاس فنلاحظ:
أ- ظهور محلول أخضر في الأنبوبة الأولى في الطبقة الأيثرية العليا.
ب- ظهور راسب أخضر مزرق في الطبقة المائية السفلى للأنبوبة الثانية.
ملاحظة/ تجنب الرج الشديد للأنبوبة لمنع تكوين مستحلب ثقيل.

2) كشف اليود Iodine Test:

تكون الأحماض الشحمية الموجودة في الشحوم الحيوانية مشبعة تماماً بينما تلك الموجودة في الزيوت النباتية تحتوي على واحدة أو أكثر من الأواصر المزدوجة، إن إضافة اليود إلى الأواصر المزدوجة في الأحماض الدهنية غير المشبعة يؤدي إلى تشبعها واختفاء لون محلول اليود بينما يظهر لون اليود عند أضافته إلى الأحماض الدهنية المشبعة.



طريقة العمل:

يضاف محلول اليود قطرة فقطرة إلى أنبوبتي اختبار تحتوي الأولى على حامض شحمي مشبع والثانية حامض شحمي غير مشبع، نلاحظ اختفاء اللون في الأنبوبة الثانية تدريجياً إلى أن تتشبع الأواصر المزدوجة ويظهر لون اليود ثانية، بينما يظهر لون اليود في الأنبوبة الأولى من أول قطرة تضاف.

3) الكشوفات الخاصة بالكولسترول:

عندما تعامل الستيرويدات التي تحتوي على أواصر غير مشبعة في ظروف غير مائية مع حوامض قوية فإنها تتفاعل لتعطي نواتج بألوان مميزة، واعتماداً على ظروف التجربة فإن الألوان الناتجة تظهر اختلافات كبيرة من مركب إلى أخر، بالإضافة إلى أن الميكانيكية التي يجري بها التفاعل تكون معقدة إلى حد ما.

أ- كشف سالكوفسكي Salkowski Test :

اختبار مهم يستخدم للكشف عن الكولسترول يعتمد على تكون ألوان مميزة و واضحة عند معاملة الكولسترول مع حامض الكبريتيك المركز، ولكي يتم هذا الكشف بنجاح يجب أن تكون الأوعية الزجاجية المستخدمة في التجربة جافة (غير رطبة) بالإضافة إلى أن المحاليل المستخدمة يجب أن تكون غير مائية.

طريقة العمل:

يؤخذ (1ml) من الكولسترول المذاب بالكلوروفورم ويضاف له نفس الحجم من حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 ،يرج المحلول جيداً ثم يترك لحين انفصاله على شكل طبقتين، الطبقة العليا تكون ملونة باللون الأحمر بينما تتخذ الطبقة السفلى لوناً أخضر (أخضر مصفر).

ب- كشف ليبرمان- بورخارد Liberman- Burchards Test :

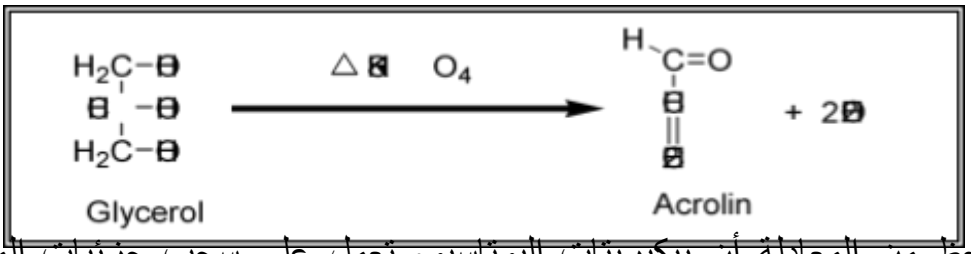
كشف آخر خاص بالكولسترول، يستخدم في هذا الكشف حامض الخليك اللامائي مع حامض الكبريتيك المركز واللذان يضافان إلى الكولسترول، حيث يلاحظ ظهور لون وردي يتغير إلى البنفسجي ثم إلى الأخضر المزرق كدليل على حدوث التفاعل، كما أنه من الممكن بواسطة قياس كثافة اللون تحديد كمية الكولسترول بصورة تقريبية (تقدير كمي).

طريقة العمل:

يؤخذ (1ml) من محلول الكولسترول (5%) المذاب بالكلوروفورم في أنبوبة اختبار نظيفة وجافة ثم يضاف له (1ml) من حامض الخليك اللامائي، بعد ذلك تضاف قطرتان من حامض الكبريتيك المركز، تمزج محتويات الأنبوبة بحذر ثم تترك لعدة دقائق مع متابعة اللون الذي يتكون.

4) كشف الأكرولين Acrolin Test :

اختبار مهم خاص بالكليسيرول ، حيث يفقد الكليسيرول جزيئتان من الماء بالتسخين مع مادة مجففة (نازعة للماء) ويتحول إلى مادة متطايرة ذات رائحة نفاثة تشبه رائحة الدهن المحروق (الديهايد غير مشبع) يسمى بالأكرولين (Acrolin) ، هذا الكشف مميز للكليسيرول سواء كان حر أو متحد مع الأحماض الدهنية.



يلاحظ من المعادلة أن بيكبريتات البوتاسيوم تعمل على سحب جزئيات الماء من الكليسيرول بالتسخين ويتحول إلى الأكرولين.

طريقة العمل:

توضع كميات متكافئة من الكليسيرول وبيكبريتات البوتاسيوم في أنبوبة اختبار جافة، تسخن الأنبوبة بعناية في البداية وبعد ذلك بشدة مع متابعة التغير الذي يحدث في محتويات الأنبوبة.

5) تزنخ الدهون Rancidity :

اصطلاح يطلق على الدهون التي تركت معرضة للهواء بدرجة الحرارة الاعتيادية وأصبح لها طعم ورائحة كريهة بسبب احتوائها على الحوامض الشحمية المتطايرة، حيث يحدث تغيير في الصفات الفيزياوية والكيمياوية للدهون. هنالك نوعين من التزنخ أو تنتج الزناخة عن طريقين مختلفين هما:

1- زناخة التميؤ Hydrolytic rancidity:

وهي تحلل الدهون بفعل أنزيمات أو كائنات مجهرية مسببة تحرر حوامض شحمية ذات سلسلة قصيرة متطايرة (Volatile fatty acids VFA) لها روائح غير مرغوب بها كما يحدث في الزبد ويساعد على حدوث ذلك كل من الرطوبة والحرارة.

ب- زناخة التأكسد Oxidative rancidity:

يحدث هذا النوع من الزناخة بشكل خاص في الزيوت الحاوية على حوامض شحمية غير مشبعة، حيث تتأكسد تلك الحوامض وتتحول إلى مركبات ذات سلسلة قصيرة من الكيتونات والالديهايدات والحوامض الشحمية المتطايرة مما تسبب إعطاء الرائحة الخاصة بها. (الأوكسجين، الضوء، الحرارة والرطوبة) كلها عوامل تساعد على حدوث هذا النوع من الزناخة.

طريقة العمل:

يحضر آنيا محلول مكون من إضافة قطرتين من (1%) فينولفثالين إلى (2ml) من (0.5%) هيدروكسيد الصوديوم ، بعد ذلك توضع في أنبوبتي اختبار دهن قديم ودهن جديد ويضاف لكل أنبوبة من هاتين الأنبوبتين المحلول المحضر سابقاً (قطرة- قطرة) وتتم متابعة الألوان المتكونة في كلا الأنبوبتين.

6) تقدير القيمة الحامضية للدهون (الرقم الحامضي):

نتيجة للخزن قد تتعرض الدهون إلى التزنخ وبنوعيه تزنخ التأكسد أو تزنخ التحلل مؤدياً إلى تحرر الأحماض الدهنية، ونتيجة لهذا فإن كمية الأحماض الدهنية الموجودة في الدهون تعطي مؤشر كبير حول عمر ونوعية الدهن.

<u>رقم الحامضية (The acid value):</u> هو عدد ملغرامات هيدروكسيد البوتاسيوم اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الحرة والموجودة في واحد غرام من الدهن.

طريقة العمل:

ضع (2ml) من الزيت (زيت الزيتون بتركيز 12%) في دورق مخروطي وأضف إليه قطرتين من دليل الفينولفثالين، بعد ذلك سحح مع (0.1N) من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH لحين ظهور اللون الوردي الفاتح وسجل حجم القاعدة النازلة من السحاحة.

<u>-: الحسابات</u>

حساب وزن الدهن بالنموذج المأخوذ .

$$\frac{12}{X} \quad \frac{100}{2}$$

$$\therefore X = 0.24\ g\ (\text{weight of oil in the sample})$$

2. حساب وزن القاعدة KOH

$$N = \frac{wt.}{M.wt.} * \frac{1000}{V_m}$$

$$0.1 = \frac{wt.}{56} * \frac{1000}{V_m}$$

نضرب(M x 1000) لتحويله إلى وحدة المليغرام.
الوزن M يمثل عدد ملغرامات KOH اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الحرة الموجودة في (0.24g) من الدهن.

M	0.24
X	1

∴ X= mg

عدد ملغرامات هيدروكسيد البوتاسيوم اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الحرة الموجودة في غرام واحد من الدهن.

7) رقم التصوبن The saponification value:

هو عدد ملغرامات هيدروكسيد البوتاسيوم اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الناتجة من التحلل الكامل لواحد غرام من الدهون. حيث أنه عند التصعيد مع القاعدة هيدروكسيد البوتاسيوم KOH فإن استرات الكليسيرول تتحلل لتعطي الكليسيرول وأملاح البوتاسيوم للأحماض الدهنية (الصابونيات).
رقم التصوبن يعطي معلومات مهمة حول طبيعة الأحماض الدهنية الموجودة في الدهون.

طريقة العمل:

زن بدقة (1gm) من الدهن في بيكر نظيف وأذبه بحوالي (3ml) من مذيب مناسب، أنقل محتويات البيكر كاملة إلى دورق مخروطي سعة (250ml) بغسل البيكر عدة مرات بكميات قليلة من المذيب المستخدم. أضف (25ml) من هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي وبتركيز (0.5mol/L). حضر في نفس الوقت دورق مخروطي آخر يحتوي جميع مكونات الدورق الأولى عدا الدهن. اجري عملية التصعيد للدورقين ولمدة (30) دقيقة وبعد ذلك برد الدورقين بتركهما فترة من الوقت في درجة حرارة الغرفة ، أخيراً سحح ضد حامض HCl بتركيز (0.5mol/L) وبوجود دليل الفينولفثالين.

الحسابات:

إن الاختلاف في القراءة بين الدورقين يعطي عدد المليلترات من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH المطلوبة لصوبنة (1gm) من الدهن.
الوزن الجزيئي للقاعدة هيدروكسيد البوتاسيوم KOH يساوي(56) وبما أن ثلاث جزيئات من الحامض الدهني تزاح من Triglyceride، إذن

$$\text{Saponification Value (S)} = \frac{3 * 56 * 1000}{\text{Average molecular weight of Fat}}$$

$$\therefore \text{Average molecular weight of Fat} = 3 * 56 * 1000 / S$$

الأحماض الأمينية Amino Acids

هي مركبات عضوية تمتلك مجموعتين فعالة أو أكثر إذ تحتوي على مجموعة حامضية (مجموعة الكربوكسيل COOH) ومجموعة قاعدية (مجموعة الأمين NH_2)، لذلك تسلك الأحماض الأمينية سلوك حامض ضعيف وقاعدة ضعيفة أي ما يسمى بالسلوك الامفوتيري Amphoteric. يوجد حوالي 20 حامض أميني تعتبر الوحدات البنائية الأساسية لجزيئات البروتينات الموجودة في الأنسجة الحية منها ثمانية (للشخص البالغ) أساسية لا يستطيع الجسم تصنيعها بصورة كافية، لهذا يجب أن يحصل عليها من الغذاء أو عن طريق الأدوية. تتميز الأحماض الأمينية بأنها مواد بلورية تختلف عن بعضها من ناحية الطعم فمنها ما هو حلو مثل الكلايسين ، الألنين ، السيرين و البرولين ، وبعضها عديم الطعم مثل التربتوفان ، والبعض الآخر مر مثل الأرجنين ، وكذلك لها (أي الأحماض الأمينية) درجة انصهار عالية. جميع الأحماض الأمينية تذوب في المذيبات القطبية مثل الماء والايثانول بينما لا تذوب في المذيبات اللاقطبية مثل البنزين والهكسان والايثر ، تمتاز جميع الأحماض الأمينية باستثناء الكلايسين بأنها نشطة بصرياً إذ تحتوي على ذرة كربون غير متناظرة. دائماً تكون الأحماض الأمينية بشكل Zwitter ion عندما تكون pH مساوية إلى pI، حيث تعرف الأخيرة بأنها pH التي تكون فيه مجموع الشحنات السالبة مساوية إلى مجموع الشحنات الموجبة أي أن محصلة الشحنة تساوي صفر.

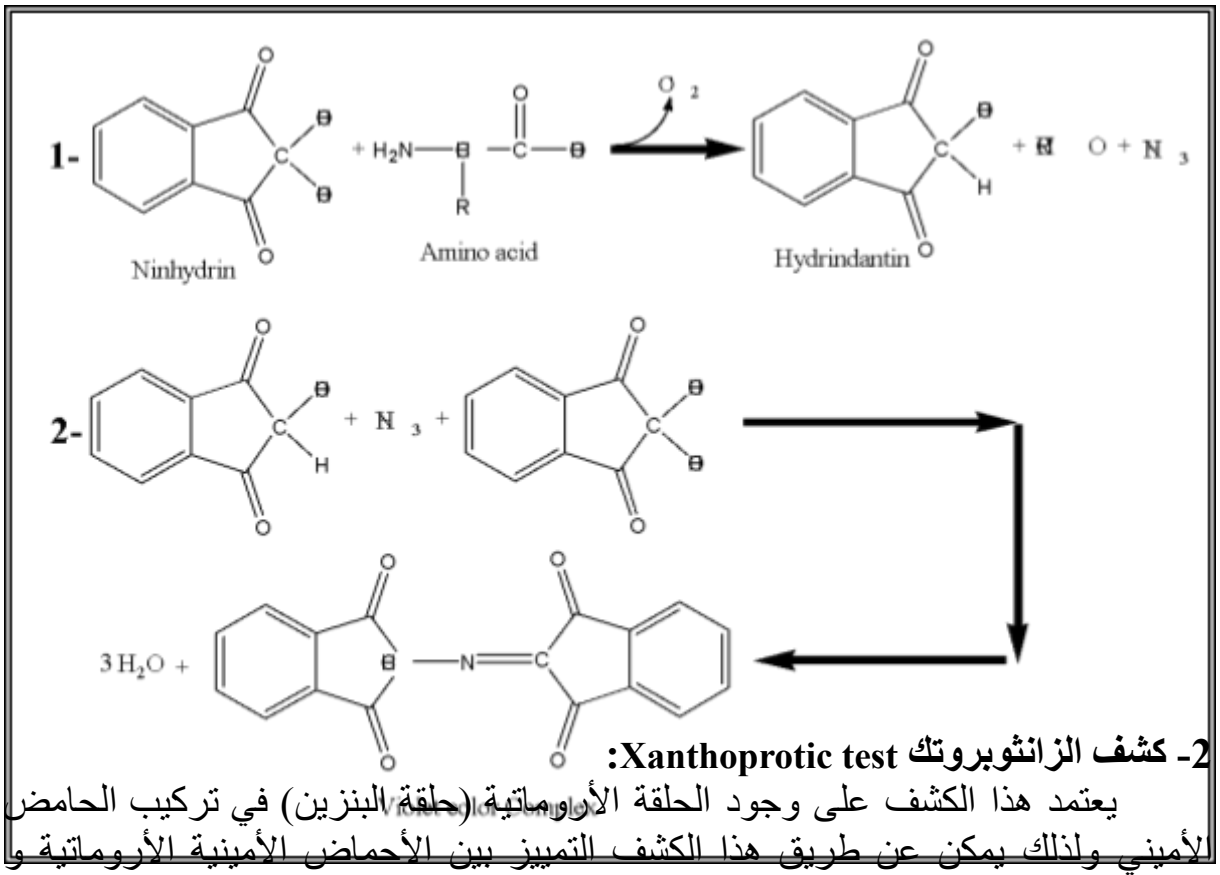
نظراً لكون الأحماض الأمينية تختلف في تركيبها الكيمياوي لذلك فإنها تختلف في بعض التفاعلات وتتشابه في تفاعلات أخرى ومن هذه التفاعلات ما يسمى بالتفاعلات اللونية وأهمها :

1- كشف النهايدرين Ninhydrin reaction:

كشف عام عن جميع الأحماض الأمينية و البروتينات وهو كشف شديد الحساسية حيث تعطي الأمينات والأمونيا كشف موجب معه أيضا ولكن دون أن تؤدي إلى تحرير CO_2. يعتمد التفاعل على وجود مجموعة الأمين ومجموعة الكربوكسيل الحرة حيث يعتبر محلول النهايدرين مادة مؤكسدة قوية جداً يعمل على أكسدة الحامض الأميني منتجاً ألديهايد (RCHO) وثاني أوكسيد الكربون (CO_2) والامونيا (NH_3) و النهايدرين المختزل المسمى hydrindantin والذي يتفاعل بدوره مع الأمونيا المتحررة بوجود جزيئه ثانية من النهايدرين مكوناً معقد أزرق أو بنفسجي اللون. من الممكن استخدام هذا الكشف في التقدير الكمي للأحماض الأمينية حيث أن كمية CO_2 المتحررة يمكن استعمالها لتقدير كمية الحامض الأميني.

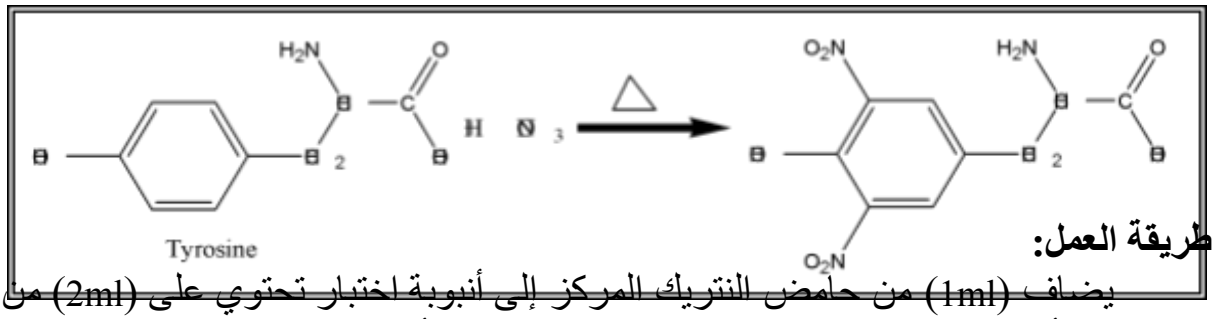
طريقة العمل:

يؤخذ (1ml) من الحامض الأميني ويوضع في أنبوبة اختبار، تضاف بعد ذلك (10) قطرات من محلول (0.2%) ننهايدرين، ترج الأنبوبة جيداً ثم توضع في حمام مائي مغلي لمدة خمس دقائق مع ملاحظة اللون المتكون.



2- كشف الزانثوبروتك Xanthoprotic test:

يعتمد هذا الكشف على وجود الحلقة الأروماتية (حلقة البنزين) في تركيب الحامض الأميني ولذلك يمكن عن طريق هذا الكشف التمييز بين الأحماض الأمينية الأروماتية و الاليفاتية. يتم هذا الكشف بتفاعل الحامض الأميني الأروماتي مع حامض النتريك المركز حيث يظهر لون أصفر يتحول إلى لون برتقالي عند إضافة قاعدة قوية مثل هيدروكسيد الصوديوم أو الأمونيا.



طريقة العمل:

يضاف (1ml) من حامض النتريك المركز إلى أنبوبة اختبار تحتوي على (2ml) من الحامض الأميني، بعد ذلك يسخن المحلول الموجود في الأنبوبة لمدة ثلاث دقائق في حمام مائي مغلي ثم تبرد الأنبوبة ويضاف لها (4ml) من القاعدة هيدروكسيد الصوديوم ((10N NaOH وتلاحظ التغيرات الحاصلة في المحلول أثناء التجربة.

3- كشف ميلون Millon test:

هذا الكشف خاص بالحوامض الأمينية التي تحتوي على مجموعة هيدروكسيل الاروماتية (مجموعة الفينول) لذا يعتبر خاص بالحامض الأميني التايروسين (Tyrosine) حيث يتكون محلول بلون أحمر نتيجة تفاعله أي (التايروسين) مع نترات الزئبقيك المذابة في حامض النتريك.

طريقة العمل:

يؤخذ (1ml) من الحامض الأميني التايروسين ويوضع في أنبوبة اختبار نظيفة ثم يضاف إليها (1ml) من محلول كاشف ميلون، ترج الأنبوبة جيداً ثم يسخن المحلول الموجود في الأنبوبة في حمام مائي مغلي لمدة ثلاث دقائق. فيلاحظ تكون راسب أحمر بني أو قرمزي دليل على الكشف.

تحضير الكاشف : يذاب محلول (15%) كبريتات الزئبقيك في (15% v/v) حامض الكبريتيك .

4- كشف هوبكنز-كول Hopkins - cole test:

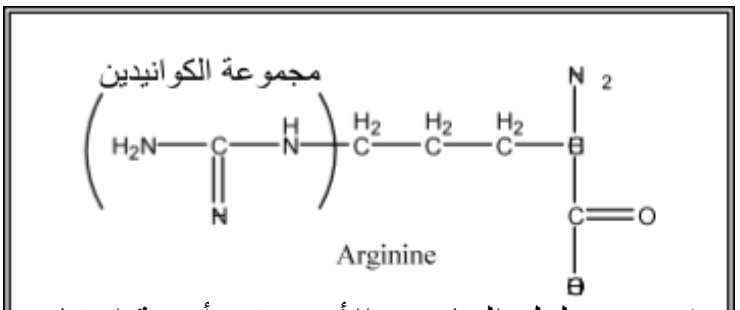
هذا الكشف خاص بالحامض الأميني التربتوفان (Tryptophan) لوجود مجموعة الأندول في تركيبه، حيث يظهر لون بنفسجي على شكل حلقة عند تفاعله (التربتوفان) مع حامض الكلايكوكسليك بوجود حامض الكبريتيك المركز.

طريقة العمل:

يضاف (1ml) من حامض الخليك الثلجي إلى (2ml) من محلول الحامض الأميني في أنبوبة اختبار نظيفة، ثم بعد ذلك يضاف تدريجياً (2ml) من حامض الكبريتيك المركز وعلى جدار الأنبوبة الداخلي لتتكون طبقتين تفصل بينهما حلقة بنفسجية دلالة على وجود الحامض الأميني التربتوفان.

5- كشف ساكوكاجي Sakaguchi Test:

اختبار خاص يستخدم للكشف عن الحامض الأميني الآرجنين (Arginine) بسبب احتواءه على مجموعة الكوانيدين في تركيبه، حيث عند تفاعله مع محلول α-naphthol ثم معاملته مع عامل مؤكسد قوي مثل ماء الكلور (هايبوكلوريت الصوديوم) سوف يتكون محلول بلون أحمر.

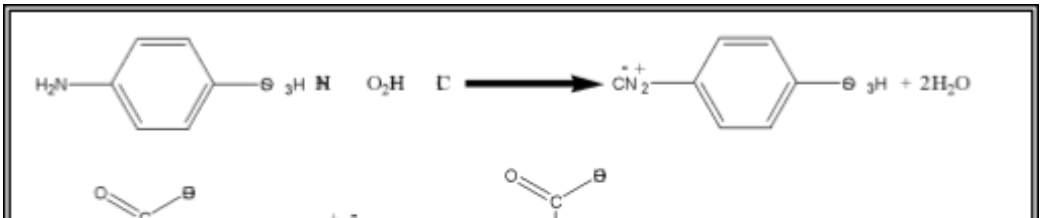


طريقة العمل:

يوضع (1ml) من محلول الحامض الأميني في أنبوبة اختبار ويضاف إليه (10) قطرات من القاعدة هيدروكسيد الصوديوم (40%) ثم تقطر في الأنبوبة قطرتين من محلول α-naphthol، ترج الأنبوبة جيداً ثم يضاف إليها (3) قطرات من ماء الكلور وتتم ملاحظة اللون المتكون.

6- كشف باولي Pauly's test :

يستخدم هذا الاختبار للكشف عن الأحماض الأمينية الهستدين والتايروسين والتي لها القابلية على الارتباط مع أملاح الدايازونيوم لتكوين مركبات الآزو ذات الألوان القوية والمميزة، لا يتم التفاعل بنجاح إلا بظروف باردة لهذا يستخدم حمام ثلجي لإنجاز التفاعل.



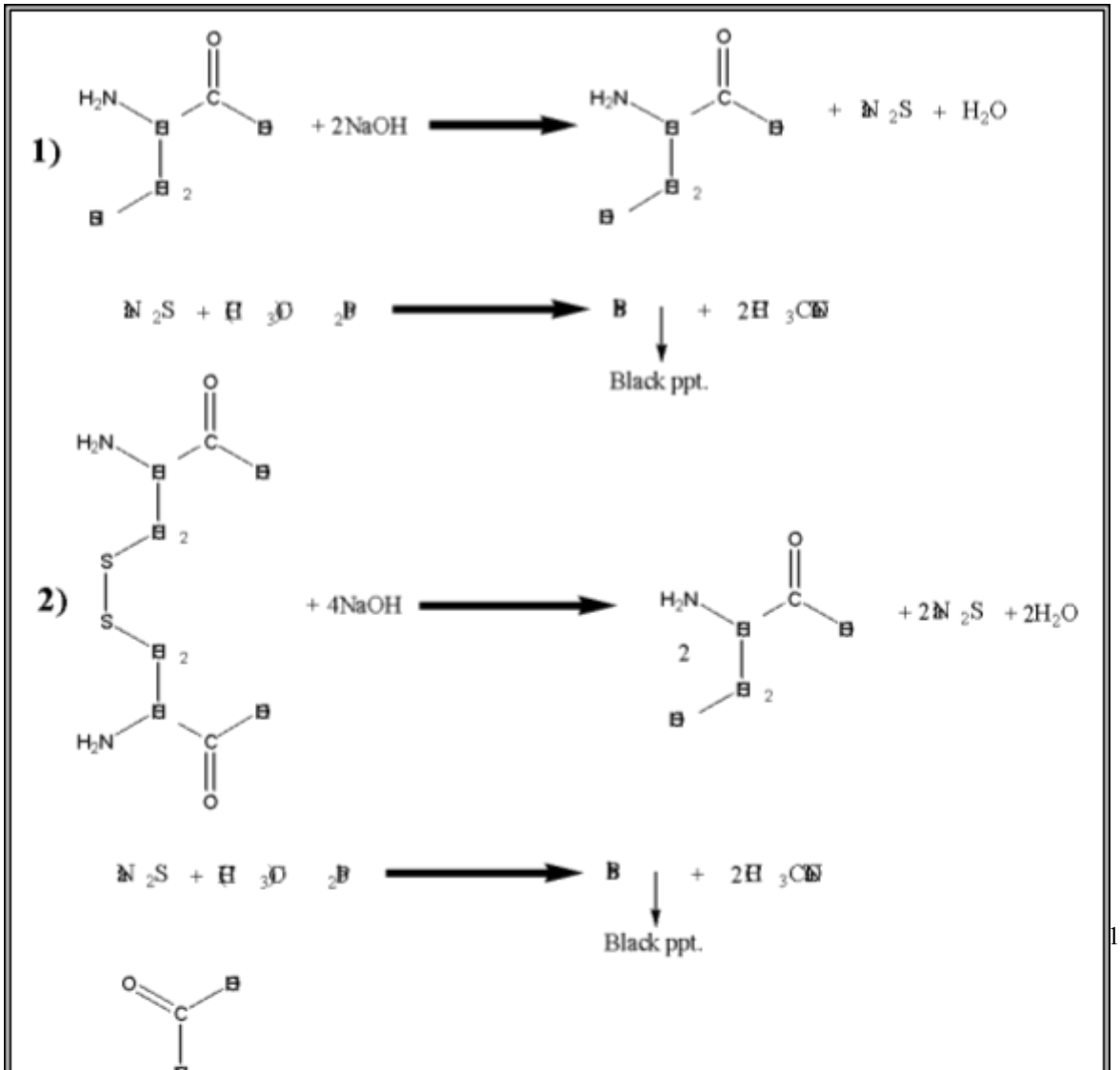
طريقة العمل:

يمزج (1ml) من حامض السلفانلك (Sulphanilic acid) مع (2ml) من محلول الحامض الأميني في أنبوبة اختبار ،تبرد الأنبوبة جيداً و يضاف لها بعد ذلك (1ml) من نتريت الصوديوم (5%) $NaNO_2$ ، توضع الأنبوبة في حمام مائي ثلجي لمدة ثلاث دقائق ويضاف لها بعد ذلك (2ml) من القاعدة كربونات الصوديوم (1%) Na_2CO_3 ليصبح المحلول قاعدياً ويلاحظ اللون المتكون.

حامض السلفانيلك : يحضر بتركيز 1% بالإذابة في (1N HCl .

7- كشف كبريتيد الرصاص للسستين والسستاين:

عند معاملة الأحماض الأمينية السستين والسستاين مع قاعدة قوية مثل هيدروكسيد الصوديوم فإنه سوف يتكون مركب كبريتيد الصوديوم والذي يتم الكشف عنه بعد ذلك بترسيبه من المحلول القاعدي بشكل راسب أسود من كبريتيد الرصاص وذلك بإضافة محلول خلات الرصاص، وكما يحدث في المعادلات التالية:



طريقة العمل:

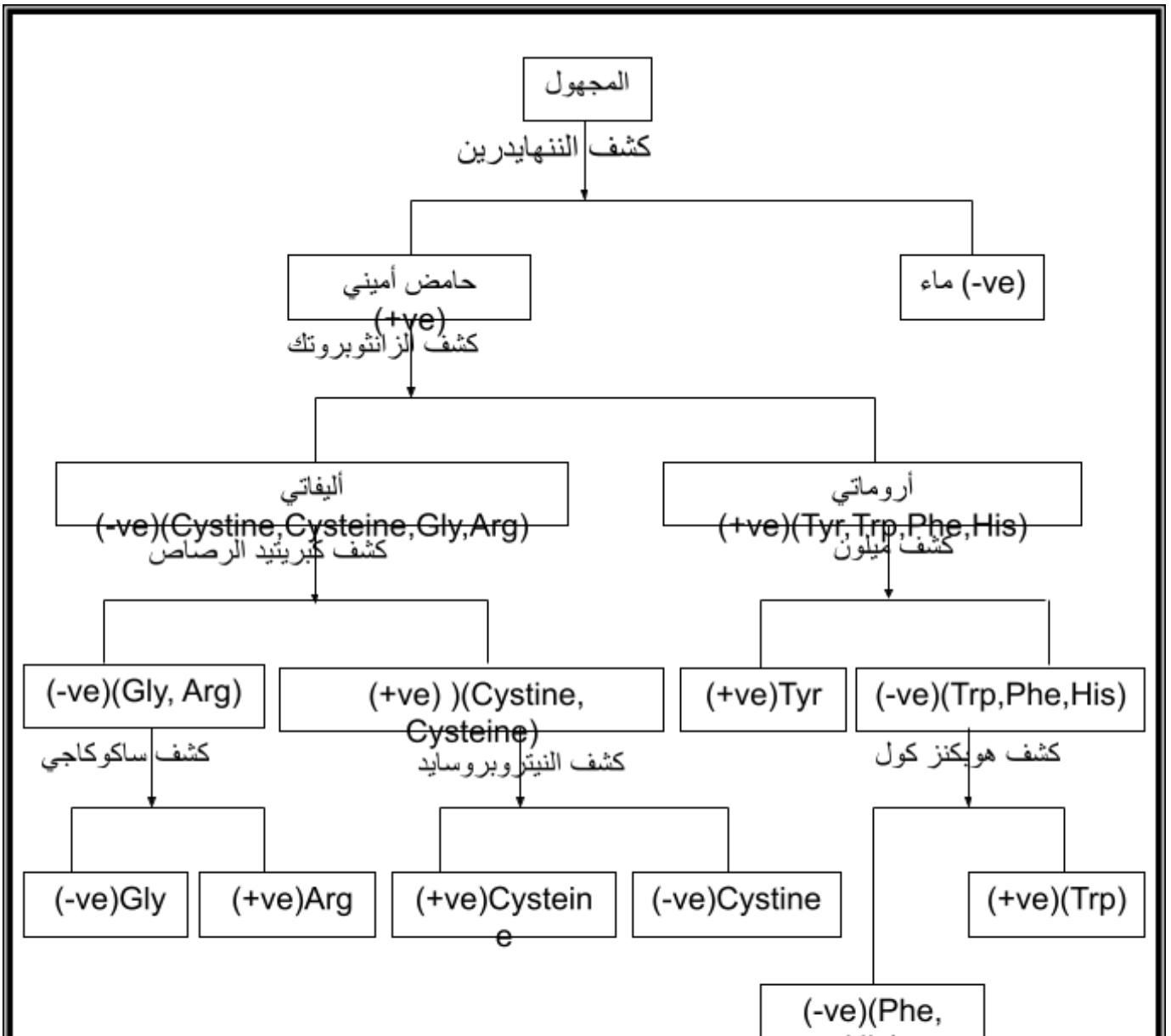
يؤخذ (1ml) من الحامض الأميني ويوضع في أنبوبة اختبار ويضاف له (1ml) من محلول هيدروكسيد الصوديوم، تسخن الأنبوبة في حمام مائي مغلي لمدة دقيقتين ويضاف لها بعد ذلك (5) قطرات من محلول خلات الرصاص وتلاحظ التغييرات التي تحصل للمحلول داخل الأنبوبة.

8- كشف النيتروبروسايد The Nitroprusside test:

تتفاعل في هذا الكشف مجموعة الثايول (SH) الموجودة في الحامض الأميني السستين مع نايتروبروسايد الصوديوم $[Na_2Fe(CN)_5NO]$ بوجود زيادة من الأمونيا لتعطي محلول بلون أحمر. ولهذا فإن الكشف خاص بالحامض الأميني السستين (Cysteine) لتمييزه عن السستاين (Cystine).

طريقة العمل:

يضاف في أنبوبة أختبار نظيفة و جافة (0.5 ml) من نايتروبروسايد الصوديوم المحضر حديثا إلى (2 ml) من محلول الحامض الأميني ثم يضاف بعد ذلك إلى محتويات الأنبوبة (0.5 ml) من القاعدة هيدروكسيد الأمونيوم (الامونيا) مع ملاحظة اللون المتكون .



جدول يوضح الأحماض الأمينية العشرين
في جسم الإنسان

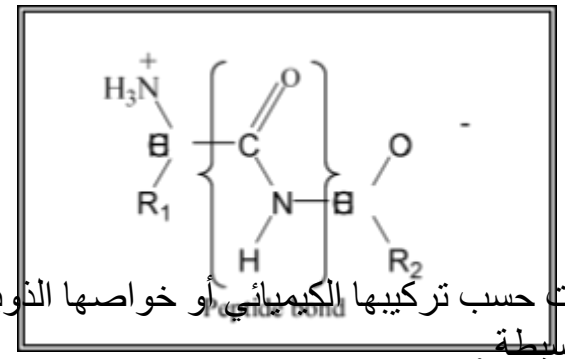
Alanine Ala	Proline Pro	Asparagine ASn	Arginine Arg
Valine Val	Tryptophan Trp	Glutamine Gln	Lysine Lys
Leucine Leu	Glycine Gly	Cysteine Cys	Histidine His
Ileucine Ile	Serine Ser	Aspartic acid Asp	
Phenylalanine Phe	Threonine Thr	Glutamic acid Glu	
Methionine Met	Tyrosine Tyr		

جدول يوضح الأحماض الأمينية العشرين
. الموجودة في جسم الأنسان

البروتينات Proteins

البروتينات : مركبات عضوية معقدة ذات أوزان جزيئية عالية تتكون من عدد كبير من الأحماض الأمينية و التي ترتبط مع بعضها بواسطة الأواصر الببتيدية ، تتكون البروتينات من عناصر أساسية هي الكربون والنيتروجين والأوكسجين والهيدروجين وعناصر أخرى مثل الكبريت والفسفور والحديد ، تشكل البروتينات المكون الأساسي للأنسجة الحيوانية و النباتية تركيباً و وظيفة فهي تقوم بتحفيز التفاعلات الكيميائية الحياتية كانزيمات كما تنظم هذه التفاعلات كهورمونات ، إضافة إلى ذلك فهي توجد ضمن مكونات جدران الخلايا و كذلك أجزاء الخلايا (النواة ، المايتوكندريا ..... الخ) .

لا توجد الأحماض الأمينية بكميات متساوية في البروتينات ولا تحوي جميع البروتينات على جميع الأحماض الأمينية العشرين .



تصنف البروتينات حسب تركيبها الكيميائي أو خواصها الذوبانية إلى :

1. البروتينات البسيطة .
2. البروتينات المقترنة .
3. البروتينات المشتقة .

كما أن البروتينات تمتلك أربعة تراكيب بنائية هي :

1. التركيب الأولي Primary structure :- ويمثل عدد وتسلسل الأحماض الأمينية في السلسلة الببتيدية ، وتكون المسؤولة عن هذا التركيب الأواصر الببتيدية فقط .
2. التركيب الثانوي Secondary structure :- وهو التواء أو انطواء السلسلة الببتيدية على امتداد محور واحد (بشكل حلزوني) والأواصر المسؤولة عن تثبيت هذا التركيب هي الأواصر الهيدروجينية بصورة رئيسية .
3. التركيب الثلاثي Tertiary structure :- وهو الشكل الذي تكون فيه سلسلة البروتين منطوية بشدة ، حيث تحصل فيه التفافات للبناء الثانوي على أكثر من محور للسلسلة المكونة لجزئ البروتين والتي تعطي للبروتين الشكل الذي يحدد وظيفته .
4. التركيب الرباعي Quaternary structure :- وهو عدد وحدات البروتين التي ترتبط مع بعضها لتكوين الصيغة الفعالة للبروتين أو هو التركيب الذي تكون فيه سلاسل متعدد الببتيد المنفردة لبروتين قليل القطع مثل الهيموغلوبين متراصة سوية وهذه السلاسل قد تكون متشابهة أو مختلفة .

أما أهم الأواصر التي تشترك في تثبيت جزئ البروتين فهي :

1. الأواصر الببتيدية .
2. الأواصر الهيدروجينية .
3. الأواصر الكبريتية (ثنائية الكبريت).
4. التاصر بين المجاميع الكارهة للماء.
5. الأواصر الأيونية .
6. قوى فاندرفال.

ذوبانية البروتينات :

تختلف البروتينات من حيث قابلية ذوبانها في المحاليل فهي بصورة عامة قليلة الذوبان في الماء والمذيبات القطبية ولكنها تكون محلول غروي مع الماء الذي له لزوجة خاصة (هنالك بعض البروتينات سهل الذوبان في الماء مثل الألبومين والبعض الأخر لا يذوب في الماء مثل الكيراتين) .

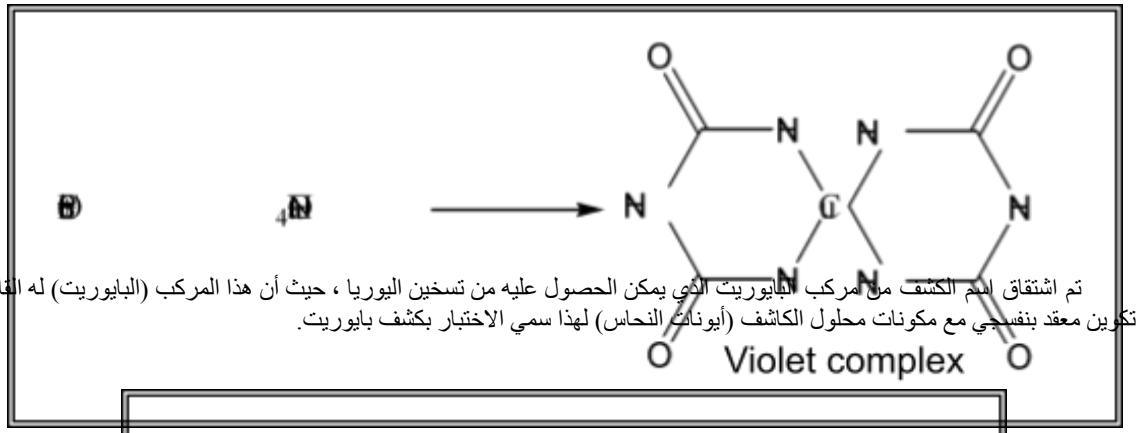
تعتمد ذوبانية البروتينات على أربعة عوامل رئيسية تؤثر في تركيب البروتين وهي :

1. **الأس الهيدروجيني pH** :- تتأثر درجة ذوبانية البروتينات كثيراً بقيمة pH نظراً لسلوكها الأمفوتيري ، حيث تكون درجة الذوبان على أقلها عند نقطة التعادل الكهربائي وتزداد كلما كانت في حالة تغير عن هذه النقطة أما بزيادة الحامضية أو بزيادة القاعدية وتكون بهيئة أيونات سالبة أو موجبة ويستفاد من هذه الخاصية كثيراً في فصل البروتينات التي لها pI مختلفة عن بعضها البعض.
2. **الحرارة** :- عملية التسخين تؤدي إلى تغيير في الشكل الرباعي والثلاثي والثنائي للبروتين (تركيب البروتين) مما تسبب فقدانه لفعاليته الحيوية وهذا ما يسمى بالمسخ . حيث يحدث ترسيب للبروتين من المحلول الذائب فيه عند تعرضه للتسخين الشديد .
3. **التركيز الأيوني** :- عند إضافة محلول متعادل وبتركيز واطئ مثل (0.9 %) من ملح الطعام فان قابلية ذوبان البروتين قليل الذوبان تزداد وهذا التأثير يدعى بالتمليح الداخلي (Salting-in) أما في حالة إضافة تراكيز عالية من الأملاح المتعادلة فأن البروتينات تترسب من محاليلها المائية وهذه الحالة تدعى بالتمليح الخارجي (Salting-out) .
4. **شحنة المذيب** :- تترسب البروتينات من محاليلها المائية بإضافة مذيبات قطبية تختلط مع الماء مثل الكحول والأسيتون حيث يحدث في هذه الحالة عملية مسخ للبروتين مما يؤدي إلى تكتله وترسبه.

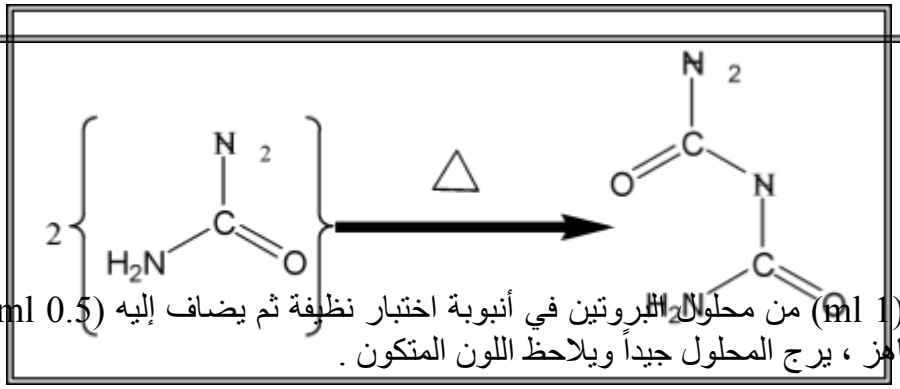
الكشوفات العامة للبروتينات :

1- كشف بايوريت :

هو كشف لجميع البروتينات و الببتيدات التي تتألف من ثلاث أحماض أمينية أو **أكثر** (أي تحتوي اثنين أو اكثر من الأواصر الببتيدية) حيث يتكوم معقد تناسقي بنفسجي اللون بين أيونات النحاس الموجودة ضمن محتويات محلول الكاشف وبين ذرات النيتروجين الموجودة في الأواصر الببتيدية للبروتين .



تم اشتقاق اسم الكشف من المركب البايوريت الذي يمكن الحصول عليه من تسخين اليوريا ، حيث أن هذا المركب (البايوريت) له القابلية على تكوين معقد بنفسجي مع مكونات محلول الكاشف (أيونات النحاس) لهذا سمي الاختبار بكشف بايوريت.



طريقة العمل :

يوضع (1 ml) من محلول البروتين في أنبوبة اختبار نظيفة ثم يضاف إليه (0.5 ml) من محلول البايوريت الجاهز ، يرج المحلول جيداً ويلاحظ اللون المتكون .

تحضير كاشف بايوريت : يذاب 3 غم من كبريتات النحاس المائية مع 9 غم من ترترات الصوديوم-البوتاسيوم في 500 مل من محلول (0.2N NaOH) . يضاف بعد ذلك 5 غم من يوديد البوتاسيوم ويكمل الحجم إلى واحد لتر بواسطة محلول (0.2N NaOH) .

2- الترسيب باستخدام الحرارة :

للبروتينات خاصية الترسيب بالحرارة حيث يحصل لها عملية مسخ وتجلط ، وان هذا النوع من الترسيب هو غير رجوعي أي لا يمكن إذابة الراسب مرة أخرى بالتبريد .

المسخ Denaturation :- هي عملية تغيير بالشكل الثلاثي للبروتين والذي يؤدي إلى فقدانه لوظيفته الأساسية وتحدث عملية المسخ بعدة عوامل منها الحرارة والحوامض القوية والقواعد القوية .

طريقة العمل :

يؤخذ (2 ml) من محلول البروتين في أنبوبة اختبار وتسخن على النار مباشرة إلى أن يتكتل البروتين ويترسب .

3- الترسيب باستخدام الحوامض المركزة :

1. **الترسيب باستعمال كاشف هلر (حامض النتريك) :-** حيث يؤخذ (1 ml) من محلول البروتين في أنبوبة اختبار ثم يضاف له ببطء قطرات من حامض النتريك المركز إلى أن يتكون الراسب. هذا النوع من الترسيب يكون غير رجوعي لأنه يؤثر على الشكل الثلاثي للبروتين .

2. **الترسيب باستخدام حامض H_2SO_4 وحامض HCl :-** نكرر نفس التجربة السابقة ولكن باستخدام حامض H_2SO_4 وحامض HCl ، هنا الترسيب يكون من النوع الرجوعي .

4- الترسيب بواسطة أملاح العناصر الثقيلة (الأيونات الموجبة):

البروتينات عادة تكون مشحونة بشحنة سالبة عند pH=7 أو أكثر من ذلك ، عملية إضافة الفلزات التي تحمل شحنة موجبة (العناصر الثقيلة) يؤدي إلى معادلة هذه الشحنات وبالتالي جلب البروتينات إلى نقطة التعادل الكهربائي وترسيبها ، إن الترسيب بهذه الطريقة له أهمية مميزة إذ أنه في حالة التسمم بواسطة إحدى هذه الأملاح فيمكن استخدام البيض أو الحليب كترياق (antidote) والذي يرسب الفلز الثقيل ويحول دون امتصاصه داخل الجسم .

طريقة العمل :

يؤخذ (2 ml) من محلول البروتين في أنبوبة اختبار نظيفة ويضاف له عدة قطرات من محلول تركيزه (0.1M) من العناصر الثقيلة (كبريتات النحاس ، كلوريد الحديديك ، خلات الرصاص) إلى أن يتكون الراسب ، يضاف بعد ذلك زيادة من محلول العناصر الثقيلة حيث يلاحظ ذوبان الراسب مرة ثانية (علل ذلك).

5- الترسيب بواسطة الكواشف القلويدية (الأحماض المعقدة):

تعتبر حوامض التانيك والبكريك والتنكستك والسلفوسالسليك هي من أكثر الكواشف القلويدية التي تستطيع ترسيب البروتينات من محاليلها ، هذه الحوامض تحمل شحنات سالبة كبيرة والتي لها القابلية على معادلة الشحنات الموجبة للبروتينات وتكوين أملاح غير ذائبة ، لهذا فأن هذه الكواشف تعمل بصورة كبيرة عند pH حامضي والذي تكون فيه البروتينات مشحونة بشحنة موجبة .

طريقة العمل :

تضاف قطرات من محلول تركيزه (20%) من الكواشف القلويدية إلى (2 ml) من محلول البروتين في أنبوبة اختبار نظيفة إلى أن يتكون الراسب ، يضاف بعد ذلك زيادة من محلول الكواشف القلويدية وتتم ملاحظة ماذا يحدث للراسب .

6- الترسيب باستخدام المذيبات العضوية :

تضاف عدة قطرات من الكحول (الايثانول) إلى (2 ml) من محلول البروتين في أنبوبة اختبار نظيفة إلى أن يتكون الراسب . (الترسيب هنا غير رجوعي) .

7- الترسيب بواسطة الأملاح المتعادلة (التمليح الخارجي Salting-out):

باستخدام تراكيز عالية من الأملاح المتعادلة تحدث عملية ترسيب للبروتين بسبب مزاحمتها له (أي البروتين) على جزيئات الماء ، قابلية الترسيب بالأملاح المتعادلة تعتمد على نوع الملح وتركيز الملح ونوع البروتين ، هذه الطريقة في ترسيب البروتين لها أهمية كبيرة خصوصاً في فصل البروتينات في التطبيقات البيولوجية .

طريقة العمل :

يضاف (1 ml) من كبريتات الأمونيوم إلى (1 ml) من محلول البروتين في أنبوبة اختبار نظيفة ، تعاد التجربة مرة ثانية باستخدام كلوريد الصوديوم وثالثة باستخدام كبريتات المغنيسيوم وتسجل النتائج التي يتم الحصول عليها .