منشورات جامعة دمشق
كلية العلوم

الكيمياء الحيوية

القسم العملي

الدكتور
احمد مالو
استاذ في كلية العلوم
جامعة دمشق

الدكتور
مروان البحرة
استاذ في كلية العلوم
جامعة دمشق

الدكتورة
هيفاء العظمة
استاذ في كلية العلوم
جامعة دمشق

هند بيطار
قائمة بالاعمال في كلية العلوم
جامعة دمشق

جامعة دمشق

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

المقـــــدمـــة

تتوافق معطيات هذا الكتاب مع المنهاج النظري في الكيمياء الحيوية البنيوية ، ويتضمن أحد عشر فصلا مختلفة بدرجة تعقيدها . يتعرض الكتاب الى طرق البحث في الكيمياء الحيوية والتحليل الكروماتوغرافي وطـرق جديدة في الفصل والتنقية ودراسة الصفات الفيزيائية والكيميائية اضافة الـى طـرق التعيين الكيفي والكمي للشحوم والسكاكر والحموض الامينيـة والبيتيـدات والبروتينات والانزيمـات والحموض النووية والفيتامينات والهرمونات ، بالاضافة لاستخلاص بعض المركبات الحيويـة ودراستها .

يتضمن الكتاب اضافة لما سبق أعمالا أكثر تعقيدا خصصت لطلاب الدراسات العليا . ويتضمن الكتاب عددا كبيرا من الرسوم والاشكال والمخططات والجداول بالاضافة الى الكواشف اللازمة .

المؤلفـون

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

منهاج مقرر الكيمياء الحيوية لطلاب العلوم الطبيعية

القسم العملي ـ عدد الساعات ٣ فصلية

١. طرق البحث في الكيمياء الحيوية

٢. التحليل الكروماتوغرافي

٣. الكشف الكيفي والتحليل الكمي للمركبات التالية :

الشـــحوم

الســـكاكر

الحموض الامينية والبروتينات

الحموض النووية

الفيتامينـــات

الهرمونـــات

٤. استخلاص ودراسة بعض المركبات الحيوية

Damascus University

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

الفصل الأول

طرق البحث في الكيمياء الحيوية

كتابة تقرير التجارب

لا يعني الحصول على نتائج دقيقة نهاية العمل بحد ذاته ، فالهام في العمل المخبري هو ايصال النتائج والافكار الى الآخرين بشكل واضح ومفهوم • يعد تقرير التجارب المخبرية تدريبا جيدا للعمل الاكثر دقة لانتاج المقال العلمي •

تسجيل النتائج

الدفتر العملي Practical book

يفضل تسجيل النتائج العملية على دفتر خاص أكثر من جمع أوراق في مصنف يمكن ضياع بعض صفحاته • يجمع في المصنف الرسوم والمخططات البيانية على أن يسجل عليها العنوان والتاريخ وكل ما هو ضروري • يكتب على الصفحة الاولى في الدفتر العملي والمصنف اسم المالك وعنوانه بشكل واضح وبالتفصيل •

يشار الى أهمية عودة الدفتر الى صاحبه بحالة سليمة لما يحتوي عليه من تسجيلات هامة • يترك عدد من الصفحات لجدول المحتويات والتي يسجل عليها عنوان التجربة وتاريخها ورقم صفحتها •

توجد طرق مختلفة لعرض العمل التجريبي ، وتشمل معظم أبحاث الكيمياء الحيوية على العديد من الابواب ، ويمكن في بعض الابحاث جمع بابين معاً ، كالطرق والنتائج أو النتائج والمناقشة حسب طبيعة البحث العملي .

المدخل Introduction

تملك كل التجارب عنوانا يجب وضعه في أعلى الصفحة مع التاريخ . يجب أن يكون العنوان مختصرا ويخبر عن موضوع التجربة ويفهم بوضوح .

يذكر الهدف بكلمات تبين كل الافكار التي تعطي تقريرا موجزا عن الهدف من التجربة .

المواد والاجهزة المستعملة Materials and apparatus used

يجب بيان الكواشف والادوات المستعملة ، مع توضيح الرسوم البيانية في حال استعمال أجهزة خاصة ، تجنب كتابة الكيماويات بالاسماء التجارية أو الشائعة التي هي غير مستحسنة .

التجربة او الطريقة Experiment or method

يوصف بهذا المقطع ماذا فعلت بالترتيب ويجب أن لا يكون نسخا من الكتاب العملي أو الجداول . يجب أن تكون صيغة الكتابة في الزمن الماضي وليست بصيغة المتكلم . تعطى التعليمات في كتابة التجربة في الكتاب العملي على النحو التالي :

« أضف خمس قطرات من المحلول المختبر الى ٢ مل كاشف بنديكت الى أنبوب اختبار وسخن لمدة خمس دقائق في حمام مائي غالٍ . لاحظ تغير اللون والراسب المتشكل » .

يجب عدم نسخ التعليمات السابقة بالكلمات ذاتها في الدفتر العملي ، ولكن يجب عرضها كما يلي :

« أضفنا خمس قطرات مـن المحلول المختبر الى ٢ مل كاشف بنديكت الـى أنبوب اختبار • وسخنا المحلول لمدة خمس دقائق في حمام مائي غالٍ • لاحظنـا تغيرات لـون الراسب •

يجب أن يكون وصف التجربة مختصرا وواضحا وبمعلومات كافية ليتسنى للآخرين اعادة ما فعلت •

النتـائج Results

يجب عرض النتائج بعد انجاز التجربة ، وهي شرح ماذا رأيت وليس كما ذكر في الكتاب • يجب أن تسـجل كل ملاحظاتـك وكل التفاصيـل يجب اعطاؤها في النتائج • لكتابة التقرير لا يكو نكافيا انجاز الاختبار الخـاص وتشكل راسـب أصفر • والمطلوب كتابـة ما هو لـون الراسب بالضبط : هـل هو أصفر فاتح ، أصفر ــ برتقالي ، ••• الخ ؟ ما هو شـكل الراسب : ثقيل ، خفيف ، هلامي ، أو حبيبي ؟ متى تشكل الراسب : فورا ، ببطء ، بالحـرارة ، أو بالبرودة ؟ يمكن رؤية هذه النقاط بوضـوح ، ولكن عادة لا تقدر قيمـة هذا الشيء • والهدف مما سبق تنبيه الطالب الى ملاحظة كل شيء في التجربة وتسجيله ، ليتدرب على عمل الابحاث في المستقبل ، ويكون ضروريا كتابة التقريـر لكل ما وجده أثناء تجاربه • عند العمل في الابحاث غالبا تأتي معظم الفوائد من الملاحظات غير المتوقعة ، التـي يجب تسجيلها بدقة ليتسنى للمجرب اعادة العمل •

المناقشة والاستنتاج Discussion and Conclusion

يجب أن لا تكون المناقشة اعادة للنتائج ، ولكن تعتمد على المناقشة المنطقية • مـن المفيـد غالبـا طرح الاسئلة في مدخل التجربة لترى بعـد ذلك كيف تمت الاجابة عن تلك الاسئلة في المناقشة •

يجب أن يكون الاستنتاج دقيقا ومعبرا عن جميع نقاط البحث •

الجداول والرسوم التوضيحية Tables and lustration

الجداول

من المناسب تلخيص النتائج التجريبية بشكل جدول أو مخطط حسب طبيعة المعلومات • كما يجب ترقيم الجداول بالتسلسل مع اعطائها عناوين اخبارية للمدلول • يفيد في بعض الحالات أيضا اعطاء تفاصيل مساعدة بالتعليق مباشرة تحت العنوان • يمكن التعبير عن الوحدات الموجودة في النتائج في أعلى كل عمود ، ولا تعاد كل مرة في كل سطر من الجدول • كما يجب تعديل الوحدات لتصبح أرقاما أحادية صحيحة مناسبة موجودة في الجدول • فمثلا ، يعبر عن التركيز لـ ٠٫٠٠٧٢ مولا/لترا بـ ٧٫٢ ميلي مولا/لترا تحت عنوان التركيز •

الرسوم التوضيحية

يعطي تزويد التقارير بملخصات الرسوم التخطيطية للاجهزة الخاصة ، والصور التي تظهر نتائج التحليل الكروماتوغرافي أو الرحلان الكهربائي أو المخطط المتبع لتنقية المنتج ، أهمية كبيرة لامكان نقل المعلومات بشكل أفضل من الكثير من الوصف الطويل • ويفضل دائما تمثيل المعلومات بشكل مخطط عوضا عن تسجيل أرقام كثيرة للمشاهدات على الجدول • ومن الاسهل أيضا استيعاب النتائج من المخطط أكثر من الجدول • فمثلا تعطي النقاط المناسبة على منحن بسيط بعض الافكار عن أخطاء التجربة العفوية • والاكثر من ذلك يري المخطط بوضوح الانقطاع في القياسات التي لا يمكن أن تظهر بسرعة في الجدول •

منحني الخط المستقيم

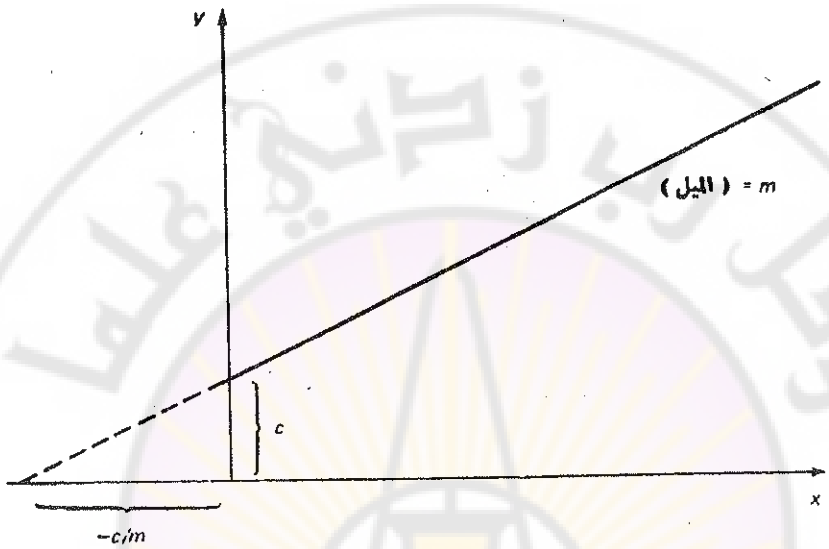
إذا كانت y تتعلق بـ x في حالات تشبه العلاقة :

$$y = m x + c ,$$

إذا رسمت قيم y مقابل x فيكون المنحني خطا مستقيما ، ميل الخط m ، والجزء المحصور على المحور y هو c ، شكل (١ ــ ١) •

يصادف في حالات كثيرة أن العلاقة بين x و y ليست بخطية ، ولكن من

الملائم غالبا معالجة المعلومات بشكل يؤهل الحصول على منحني الخط المستقيم • يمكن دراسة بعض الامثلة مثل قانون بير ــ لامبرت وحركيات الانزيمات •



الشكل (١ــ١) منحني الخط المستقيم (y = m x + c)

كيف يحضر المنحني

توجد في تجارب كثيرة كمية واحدة تتغير بانتظام مثل ، التركيز ، pH ، أو درجة الحرارة ويقاس تأثيرها في كمية أخرى • تدعى الكمية المعروفة بالمتحول المطلق ، والكمية غير المعروفة أو الكمية المقيسة بالمتحول التابع • جرت العادة عند رسم المنحني وضع المتحول المطلق على المحور الافقي x (محور السينات) والمتحول التابع على المحور العمودي (محور العينات) • وفيما يلي بعض التنويهات الصغيرة عن كيفية تحضير المنحني الواضح :

١• يعدل مقياس الرسم لتكون درجة الميل في المنطقة ٤٥° •

٢• يعطى المنحني عنوانا مختصرا وواضحا وتعنون المحاور بوضوح بالكميات والوحدات المناسبة •

٠٣ تستعمل أرقام بسيطة في مقياس الرسم (فمثلا يستعمل ١٠ ميلي مول/لترا ويفضل عن ٠٫٠١ مولا/لترا و ١٠٠٠٠ مكرومول/لترا) ٠

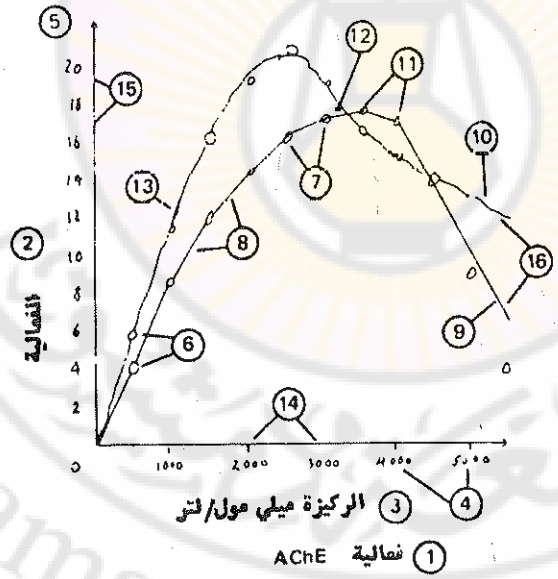
٠٤ تستعمل رموز محددة وواضحة [○ ٠ ● ٠ □ ٠ ■ ٠ △ ٠ ▲]
ولا يستعمل × ، + أو نقطة ٠ للاشارة لمكان النقاط المعينة تجريبيا ٠

٠٥ توضع بقدر الامكان فراغات متساوية بين النقاط ويجنب حشر النتائج مع بعضها أو ترك فراغات كبيرة بينها ٠

٠٦ يوصل بين النقاط بمنحنٍ مستمر وبسيط أو خط مستقيم ٠

٠٧ يجب أن يتوافق حجم الرمز مع احتمال الخطأ في القيم ٠

يري الشكل (١ ــ ٢) الاخطاء التي ارتكبت في تخطيط المنحني لو رجعنا الى الايضاحات المنوه عنها أعلاه ٠ فكر واستنتج الاخطاء الست عشرة الموجودة على الشكل قبل الرجوع الى تعداد هذه الاخطاء ٠



الشكل (١ــ٢) الاخطاء المرتكبة عند تخطيط المنحني

نعدد فيما يلي الاخطاء المرتكبة الست عشرة عند تخطيط المنحني :

١٠ المعلومات غير كافية في عنوان الشكل ، لا يستعمل أي اختصار ما لم ينوه عنه مسبقا ٠

٢٠ لم تعط وحدات الفعالية ٠

٣٠ ما هي الركيزة ؟

٤٠ الارقام على محور السينات كبيرة ، استعمل ميلي مولا/لترا ٠

٥٠ الارقام كثيرة على محور العينات ٠

٦٠ استعملت الرموز نفسها في المنحنيين ٠

٧٠ النقاط غير منتظمة الحجم ، يفضل استعمال الرموز دوائر حقيقية ٠

٨٠ يوصل بين النقاط بمنحن بسيط ولا يستعمل تتابع خطوط مستقيمة ٠

٩٠ يجب تتبع النقاط التجريبية عند رسم المنحني ٠

١٠٠ يجب أن لا يمتد المنحني وراء آخر نقطة تجريبية معينة ٠

١١٠ يجب أن لا تسير الخطوط ما بين الرموز ٠

١٢٠ هل هي بقعة أو وسخة أو نقطة ؟

١٣٠ يرسم المنحني البسيط بالادوات وليس باليد الطليقة ٠

١٤٠ يجب أن تكون علامات مقياس الرسم داخل المنحني ٠

١٥٠ لم تعط علامات مقياس الرسم ٠

١٦٠ ماذا تمثل المنحنيات ؟

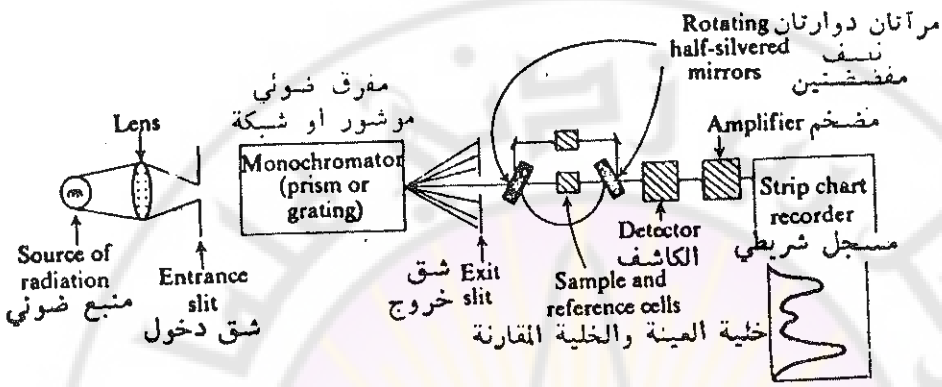
الاجهزة الطيفية المستخدمة في تحاليل الكيمياء الحيوية

يستعمل في مخابر الكيمياء الحيويةمقياس ضوئي طيفي (Spectrophotometer) ومقياس اللون الكهرضوئي (Photoelectric Colorimeter) .

المبـدأ النظـري :

يعتمد مبدأ هذه الاجهزة على اصدار أشـعة ضوئية تصطدم بجزيئات المركب الناتج عن تفاعل كيميائي بين المادة المـراد تحليلها وبين الكاشف الذي ينتج لونـا يعتمد عليه في تقدير تركيز المادة المتفاعلة التي أنتجت هذا اللون ٠

يصدر الجهاز أشعة ضوئية طول موجتها λ وسرعتها C والتي تصطدم بجزيئات المركب الملون فتمتصها جزئيا أو كليا • يتم تسجيل طيف الامتصاص بمساعدة المطياف الآلي • نورد فيما يلي مخططا يمثل مبدأ المطياف :



شكل (١ــ٣) يمثل مخطط لمبدأ المطياف

يعطي المنبع الضوئي تيارا مستمرا يمر في موحد اللون ، الحاوي موشورا أو شبكة تحلل الضوء الى طيف • يخرج من موحد اللون شعاع ضوئي أحادي اللون بطول موجة معين مفصول من مزيج الاشعة الضوئية • يمر الشعاع الضوئي خلال الخلية ، المكان التي تقابل فيه المادة • تختلف شدة الاشعاع I أحادي اللون الخارج من الخلية الحاوية على المادة ، مع شدة الاشعاع I_0 الخارج من الخلية الخالية أو المملوءة بمحلول المقارنة • تتم المقارنة بين شدة الاشعاع I و I_0 في الكاشف • تجري آليا قسمة الاشعاع I_0 على I ويعين المطياف شدة الامتصاص لكل طول موجة • تنظم المعطيات الناتجة بمساعدة مسجل آلي يسجل طيف الامتصاص •

تعطى الكثافة الضوئية D بدلالة اللوغاريتم العشري $\frac{I_0}{I}$ وتكتب حسب قانون لامبرت ــ بير العلاقة التالية :

$$D = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \qquad (1)$$

ε ـــ معامل الاطفاء الجزيئي المميز للمادة •

c ـــ التركيز مول/باللتر •

d ـــ طول مسار الشعاع في الخلية بالسم •

يلزم لاجراء أي تحليل تحضير ثلاثة محاليل :

محلول المقارنة Control . يحتوي على كل الكواشف المستعملة في التجربة ما عدا المادة المتفاعلة المنتجة للون •

المحلول المعياري Standard : محلول معروف التركيز بدقة ، تجرى عليه كل العمليات التي تجرى على التجربة المجهولة •

محلول المجهول : وهو المحلول المراد بحثه ومعرفة تركيزه •

تعطى شدة امتصاص المحلول المعياري E_s بالعلاقة :

$$E_s = K \cdot C_s \cdot t \qquad (٢)$$

K ـــ ثابت ، C_s ـــ تركيز المحلول المعياري ، t المسافة التي يقطعها الضوء في المحلول المعياري •

وتعطى شدة امتصاص المحلول المجهول E_u بالعلاقة :

$$E_u = K \cdot C_u \cdot t \qquad (٣)$$

C_u ـــ تركيز المحلول المجهول •

فإذا قسمنا العلاقة (٣) على العلاقة (٢) وحسبنا التركيز للمحلول المجهول نحصل على العلاقة :

$$C_u = C_s \cdot \frac{E_u}{E_s} \qquad (٤)$$

وهي علاقة تعطي تركيز أي مادة مجهولة التركيز بالمقارنة مع محلول معروف التركيز من المادة نفسها شريطة ادخال المادة في تفاعل كيميائي يعطي لونا ثابتا ، يمكن قياس شدته بالاجهزة الطيفية •

المحاليـل الواقيـة

المحلول الواقي هو المحلول الذي يقاوم تغير الـ pH عنـد اضافة حمض أو أساس • تستعمل هذه المحاليل بشكل واسع في تجارب حيوية كثيرة عند الحاجة الى pH ثابتـا •

يعتمد pH المحلول الواقي (معادلة هندرسون ـ هاسلبالش) علـى عاملين ، الاول قيمة pKa والثاني نسبة الملح الى الحمض • تخلط الكمية نفسها مـن الملح والحمض أو مع بعض الزيادة للحصول على pH يتراوح من ٤ ـ ١٠ • تركيـز شوارد الهدروجين والهدروكسيل منخفض جدا ويمكن تجاهله • يؤخذ فيما يلـي مثال على المحلول الواقي المكون من مزيج حمض الخل وخلات الصوديوم •

حمض الخل حمض ضعيف قليل التشرد ويكون تركيز حمض الخل غالبا تركيز الكمية نفسها الموضوعة في المزيج ، ويمكن كذلك عدّ تركيز شاردة الخلات تركيز خلات الصوديوم نفسه الموضوعة في المزيج لان الملح يتشرد بشكل كامل •

مثـال ١

ما هو pH المحلول الواقي المكون من مزيج ٥ مل محلول خلات الصوديوم ١ر٠ مولا/لترا و ٤ مل محلول حمض الخل ١ر٠ مولا/لترا ؟

$$\text{تركيز } CH_3COO^- = \frac{٥}{٩} \times ١ر٠ \text{ مولا/لترا}$$

$$\text{تركيز } CH_3COOH = \frac{٤}{٩} \times ١ر٠ \text{ مولا/لترا}$$

pKa لحمض الخل بالدرجة ٢٥°س = ٤ر٧٦ •

اذا :

$$pH = 4{,}76 + \log \frac{5}{4}$$

$$= 4{,}76 + (+ 0.097)$$

$$= 4{,}86 .$$

مثال ٢

كيف يتغير pH المحلول الواقي السابق عند اضافة ١ مل محلول H Cl ١ر٠ مولا/لترا ؟

تعني اضافة H Cl اضافة شاردة الهدروجين التي تتحد مع شاردة الخلات لاعطاء حمض الخل ٠ فتنقص كمية شاردة الخلات الموجودة في المحلول وتزيد كمية حمض الخل غير المتشرد ، مؤديا لتغيير نسبة ملح/حمض ومن ثم تغير في pH المحلول ٠

تركيز CH_3COO^- = $\frac{٥}{١٠}$ × ١ر٠ − $\frac{١}{١٠}$ × ١ر٠ = ٠٤ر٠ مولا/لترا

تركيز CH_3COOH = $\frac{٤}{١٠}$ × ١ر٠ + $\frac{١}{١٠}$ × ١ر٠ = ٠٥ر٠ مولا/لترا

pKa = ٧٦ر٤ اذا :

$$pH = 4,76 + \log \frac{0,04}{0.05}$$

$$= 4,76 + (-0,097)$$

$$= 4,66$$

يتناقص pH المحلول من ٨٦ر٤ الى ٦٦ر٤ ، فالتغير فقط ٢ر٠ من الوحدة ، بينما لو أضيفت كمية H Cl الى الماء المقطر ، فسيكون pH = ٢ ٠ اذاً المحلول الواقي يقاوم تغير pH المحلول عند اضافة الحمض ٠

قيمة الواقي β

تختلف المحاليل الواقية في المدى التي تقاوم فيه تغير pH ، بهدف مقارنة المحاليل الواقية المختلفة ٠ أدخل Van Slyke مصطلح قيمة الواقي ٠ يحصل على منحني المعايرة عند اضافة الحمض أو الاساس الى المحلول الواقي ٠ يعطى ميل هذا المنحني بـ dB/d (pH) ، يعني dB زيادة الحمض القوي أو الاساس المضاف مولا/لترا ، و d (pH) التغير في زيادة pH ٠ يرمز هذا الميل لقيمة الواقي β التي تكون عادة ايجابية بسبب dB السالبة عند اضافة الحمض مسببا تغيرا سالبا في

pH • يمكن من منحني المعايرة رؤية أن قيمة الواقي تكون أعظمية عند pKa ، ويستعمل في المحاليل الواقية بصورة عملية تغير pH المحلول الواقي عند قيمة pKa ± 1 .

الواقيات المستعملة في الابحاث الحيوية

يرد على الجدول (١ــ١) بعض المحاليل الواقية الشائعة والمستعملة في الابحاث الحيوية ، ويكون المدى المفيد لهذه الواقيات عند القيم :

$$pH = pKa \pm 1$$

يختار المحلول الواقي بحذر لتجنب تدخل شوارد نوعية عوضا عن الـ pH • يمكن للواقيات أن تظهر تفاعلات غير مرغوب فيها كالبورات ، والليمونات ، والفسفات ، والتريس •

الجدول (١ــ١) الواقيات المستعملة في الابحاث الحيوية

الحمض او الاساس	pKa	pKa	PKa
حمض الفسفور	٢ر١	٧ر٢	١٢ر٣
حمض الليمون	٣ر١	٤ر٨	٥ر٤
حمض الكربون	٦ر٤	١٠ر٣	—
غليسيل غليسين	٣ر١	٨ر١	—
حمض الخل	٤ر٨	—	—
حمض البربيتوريك	٣ر٤	—	—
تريس*	٨ر٣	—	—
HEPES +	٧ر٦	—	—

* تريس = N ــ ثلاثي هدروكسي ميتيل امينو الميتان .

+ HEPES = N ــ٢ــ هدروكسي ايتيل بيبرازين ــ N' ــ٢ــ ايتان سلفونات .

البـورات Borate

تشكل هذه المركبات ، كمثال ، معقدات مع عدد من المركبات كالسكاكر .

الليمونـات Citrate

تتحد هذه الشوارد بسرعة مع الكلسيوم لذلك لا تستعمل في حـال وجـود هـذا المعـدن .

الفسـفات Phosphate

يمكن أن تقوم بفعل مثبط انزيمي ، أو أيضا كمستقلب metabolile في بعض التجارب . تترسب المعادن الثقيلة بسرعة من المحاليل على شكل فسفات ، وتملـك سعة واقية ضعيفة نحو pH = ٧ر٥ .

التريـس Tris

يمكن استعمال هذا الواقي مع المعادن الثقيلة ولكـن يمكن أن يؤثر أيضـا كمثبط في بعض الانظمة . السيئة الرئيسة لهذا الواقي هـو تأثير درجة الحرارة التي غالبا ما تهمل مراقبتها . تريس الواقي مـع pH = ٧ر٨ بحرارة الغرفة لـه pH = ٨ر٤ بالدرجة ٤°س و pH = ٧ر٤ بالدرجة ٣٧°س ، وهكذا يزداد تركيز شوارد الهدروجين عشرة أضعاف عند تحضير المواد بالدرجة ٤°س الـى درجـة القياس بالدرجة ٣٧°س . كذلك يملك التريس الواقي سعة واقية ضعيفة عند الـ pH أخفض مـن ٧ر٥ .

واقيات الكهرل المذبذب Zwitterion buffers

تستعمل واقيات أخرى في الابحاث الحيوية مثل HEPES والتي نوقشت من قبل Good وزملائه عام ١٩٦٦ ؛ حيث كتب معايير استعمال الواقيات والتي تؤثر بالقرب من الاعتدال .

تجربة (١ـ١) على مزيج حمض الليمون ـ ليمونات البوتاسيوم كمحاليل واقية

المـواد اللازمـة	**١٠ طلاب**
١. محلول حمض الليمون ٢ر٠ مولا/لترا	٥٠٠ مل

٠٢ محلول هدروكسيد البوتاسيوم ٢ر٠ مولا/لتر ١ لترا

٠٣ سحاحة ٢٥ مل ١٠

٠٤ مقيـاس pH ٥

الطريقـة

ضع ٢٠ ميلي لترا محلول حمض الليمون ٢ر٠ مولا/لترا في كأس سعة ١٠٠ مل، وعاير بالقلوي ، سجل pH وخطط منحني المعايرة ٠ قس مـن نتائجك قيمة الواقي β لمختلف قيم pH وقدر المجال المفيد لسعة الواقي ٠

المزائـج الواقيـة

١٠ المحلول الواقي لمزيج الفسفات ـ والليمونات

يتألف من محلولين :

أ ٠ محلول ١ر٠ مولا أحادي هدرات حمض الليمون ، المحضر مـن ٢١ر٠١٨ غ

$$HOOC — CH_2 — \underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{COH}} — CH_2\ \ COOH\ .\ H_2O$$

ب٠ محلـول ٢ر٠ مـولا فسفات الصوديـوم الحامضيـة ، المحضـر مـن ٣٥ر٥٩٨ غ $Na_2HPO_4\ .\ 2\ H_2O$ ٠ بمزج حجوم مختلفة من هذا أو ذاك المحلـول يحصل على محاليل مع قيم لـ pH المختلفة ٠

pH	فسفات الصوديوم الحامضية (بالمل)	حمض الليمون (بالمل)	pH	فسفات الصوديوم الحامضية (بالمل)	حمض الليمون (بالمل)	pH	فسفات الصوديوم الحامضية (بالمل)	حمض اليمون (بالمل)
٢ر٢	٠ر٤٠	١٩ر٦٠	٤ر٢	٨ر٢٨	١١ر٧٢	٦ر٢	١٣ر٢٢	٦ر٧٨
٢ر٤	١ر٢٤	١٨ر٧٦	٤ر٤	٨ر٨٢	١١ر١٨	٦ر٤	١٣ر٨٥	٦ر١٥
٢ر٦	٢ر١٨	١٧ر٨٢	٤ر٦	٩ر٣٥	١٠ر٦٥	٦ر٦	١٤ر٥٥	٥ر٤٥
٢ر٨	٣ر١٧	١٦ر٨٣	٤ر٨	٩ر٨٦	١٠ر١٤	٦ر٨	١٥ر٤٥	٤ر٥٥
٣ر٠	٤ر١١	١٥ر٨٩	٥ر٠	١٠ر٣٠	٩ر٧٠	٧ر٠	١٦ر٤٧	٣ر٦٣
٣ر٢	٤ر٩٤	١٥ر٠٦	٥ر٢	١٠ر٧٢	٩ر٢٨	٧ر٢	١٧ر٣٩	٢ر٦١
٣ر٤	٥ر٧٠	١٤ر٣٠	٥ر٤	١١ر١٥	٨ر٨٥	٧ر٤	١٨ر١٧	١ر٨٣
٣ر٦	٦ر٤٤	١٣ر٥٦	٥ر٦	١١ر٦٠	٨ر٤٠	٧ر٦	١٨ر٧٣	١ر٢٧
٣ر٨	٧ر١٠	١٢ر٩٠	٥ر٨	١٢ر٠٦	٧ر٩١	٧ر٨	١٩ر١٥	٠ر٨٥
٤ر٠	٧ر٧١	١٢ر٢٩	٦ر٠	١٢ر٦٣	٧ر٣٧	٨ر٠	١٩ر٤٥	٠ر٥٥

٠٢ المزيج الواقي الفسفاتي

يتألف المزيج الواقي الفسفاتي من محلولين :

أ ٠ محلول ١/١٥ مولا من فسفات الصوديوم الحامضية (١١ر٨٧٦ غ $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$) ٠

ب٠ محلول ١/١٥ مولا من فسفات البوتاسيوم الحامضية ثنائية الهدروجين (يوجد في اللتر الواحد محلول ٩ر٠٧٨ غ KH_2PO_4) ٠

بمزج حجوم مختلفة من هذا أو ذاك المحلول يحصل على محاليل مع قيم الـ pH المختلفة :

pH	KH_2PO_4 (بالمل)	Na_2HPO_4 (بالمل)	pH	KH_2PO_4 (بالمل)	Na_2HPO_4 (بالمل)
٤ر٤٩	١٠ر٠٠	٠ر٠٠	٦ر٩٨	٤ر٠٠	٦ر٠٠
٤ر٩٤	٩ر٩٠	٠ر١٠	٧ر١٧	٣ر٠٠	٧ر٠٠
٥ر٢٩	٩ر٧٥	٠ر٢٥	٧ر٣٨	٢ر٠٠	٨ر٠٠
٥ر٥٩	٩ر٥٠	٠ر٥٠	٧ر٧٣	١ر٠٠	٩ر٠٠
٥ر٩١	٩ر٠٠	١ر٠٠	٨ر٠٤	٠ر٥٠	٩ر٥٠
٦ر٢٤	٨ر٠٠	٢ر٠٠	٨ر٣٤	٠ر٢٥	٩ر٧٥
٦ر٤٧	٧ر٠٠	٣ر٠٠	٨ر٦٧	٠ر١٠	٩ر٩٠
٦ر٦٤	٦ر٠٠	٤ر٠٠	٩ر١٨	٠ر٠٠	١٠ر٠٠
٦ر٨١	٥ر٠٠	٥ر٠٠	—	—	—

٠٣ محلول الخلات الواقي (٢ر٠ مولا ، pH = ٦ر٣ — ٨ر٥)

pH بالدرجة ١٨° س	حمض الخل محلول ٢ر٠ مول (بالمل)	خلات الصوديوم محلول ٢ر٠ مول (بالمل)
٦ر٣	٢٥ر٩	٧٥ر٠
٨ر٣	٨٠ر٨	٢٠ر١
٠ر٤	٢٠ر٨	٨٠ر١
٢ر٤	٣٥ر٧	٦٥ر٢
٤ر٤	٣٠ر٦	٧٠ر٣
٦ر٤	١٠ر٥	٩٠ر٤
٨ر٤	١٠ر٤	٩٠ر٥
٠ر٥	٠٠ر٣	٠٠ر٧
٢ر٥	١٠ر٢	٩٠ر٧
٤ر٥	٤٠ر١	٦٠ر٨
٦ر٥	٩٠ر٠	١٠ر٩
٨ر٥	٦٠ر٠	٤٠ر٩

٤. محلول الفسفات الواقي (١ر٠ مول ، pH = ٨ر٥ ـ ٠ر٨)

pH	ماء (بالمل)	NaH_2PO_4 محلول ٢ر٠ مولا (بالمل)	Na_2HPO_4 محلول ٢ر٠ مولا (بالمل)
٨ر٥	حتى ٢٠٠	٩٢ر٠	٨ر٠
٦ر٠	حتى ٢٠٠	٨٧ر٧	١٢ر٣
٦ر٢	حتى ٢٠٠	٨١ر٥	١٨ر٥
٦ر٤	حتى ٢٠٠	٧٣ر٥	٢٦ر٥
٦ر٦	حتى ٢٠٠	٦٢ر٥	٣٧ر٥
٦ر٨	حتى ٢٠٠	٥١ر٠	٤٩ر٠
٧ر٠	حتى ٢٠٠	٣٩ر٠	٦١ر٠
٧ر٢	حتى ٢٠٠	٢٨ر٠	٧٢ر٠
٧ر٤	حتى ٢٠٠	١٩ر٠	٨١ر٠
٧ر٦	حتى ٢٠٠	١٣ر٠	٨٧ر٠
٧ر٨	حتى ٢٠٠	٨ر٥	٩١ر٥
٨ر٠	حتى ٢٠٠	٥ر٣	٦٤ر٧

٥. محلول غليسيل ـ غليسين الواقي

يؤخذ للتحضير محلول ٢٥ر٠ مولا و ٠ر٠٧ مول غليسيل ـ غليسين (pH = ٧ر٥) تحل الوزنة المحسوبة (٣٣ غ و ٩ر٢٤ غ الموافقة) في ٥٠٠ مل ماء المقطر . تقاس pH المحلول بمقياس pH ذي المسرى الزجاجي ، يضاف بعد ذلك على دفعات صغيرة محلول قلوي ٢ مولا . حتى تصبح قيمة دليل الهدروجين بالقرب من القيمة المطلوبة ، يضاف بالتدريج محلول ٢ر٠ مولا قلويا حتى القيمة المطلوبة بدقة . يتمم الحجم بالماء حتى اللتر عند الوصول الى pH المطلوب .

٦. محلول تريس ـ غليسين الواقي (pH = ٨ر٦)

يحل ٠ر٦ غ ثلاثي هدروكسي ميتيل أمينو الميتان (تريس) و ٨ر٢٨ غ غليسين في الماء المقطر ويتمم حتى اللتر .

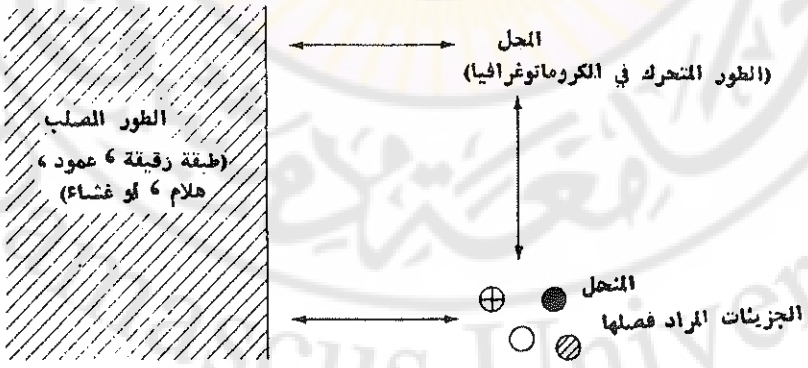
يستعمل هذا المحلول بعد تمديده خمس مرات لتزويد أوعية الرحلان الكهربائي .

□ □ □

الفصل الثاني

طـرق الفصـل
التحليـل الكروماتوغرافي

يشكل فصل الجزيئات مـن المركبات الحيوية قسما هامـا في أعمال الكيمياء الحيوية ، حيث يغلب فصل دقائق أحد الجزيئات مـن مزيـج مـن المركبات ذات الخواص المتشابهة • ولهذا السبب لا تفي الطـرق الاعتيادية في الكيمياء العضوية بهذا الغرض • وتستخدم الطرق الطبيعية التي تفصل الجزيئات على أساس الفرق الصغير في خواصها • يجب تجنب طـرفي pH ، ودرجـة الحرارة ، والمحـلات العضوية ، واستعمال كواشف الاكسدة والارجاع ، عند العمـل مـع الجزيئات المفصولة من المركبات الحية ، لوجود مخاطرة بسبب فقدان الحالة الطبيعية (تمسخ denaturation) وبالتالي ضياع الفعالية الحيوية • تستخدم الطرق التجريبية التي



شكل (٢ــ١) يعتمد اساس طرق الفصل في الكيمياء الحيوية على ثلاثة عناصر

وضعت في هذا الفصل الشروط اللطيفة ، وتستعمل الاختلافات النافعة في خواص الجزيئات الطبيعية ، كالحجم ، والشكل ، والكتلة ، والشحنة ، والانحلال ، وخواص الامتزاز . تعتمد الطرق الموضحة على الشكل (٢ـ١) والجدول (٢ـ١) على درجات الاختلاف بين ثلاثة عناصر عند فصل مزيج : الطور الصلب ، والمحل ، والمنحل .

توضح الطرق الواردة المبدأ النظري والعملي لفصل الجزيئات ، ولكن لا تتصرف كل المركبات تماما كالمتنبأ به في الاساس النظري .

جدول (٢ـ١) طرق الفصل الشائعة

الطريقة	خواص المنحل النافعة في الفصل	الطور الصلب	المحل
التحال Dialysis	الحجم والشكل	غشاء نصف نفوذي	الماء
الترشيح الهلامي Gel - filtration	الحجم والشكل	هلام مائي	عادة مائي
كروماتوغرافيا الامتزاز Adsorption Chromatography	الامتزاز	الماص عادة مركبات لاعضوية	لا قطبي
كروماتوغرافيا الفاصلة Partition Chromatography	الذوبان	دعامة خاملة	مزيج محلات قطبية ولا قطبية
كروماتوغرافيا التبادل الشاردي Ion exchange Chromatography	تشارد (تأين)	مَطرِق Matrix يحتوي زمر شاردية	واقٍ مائي
رحلان كهربائي على خلات السلولوز Cellulose acetate electrophoresis	الشحنةالكهربائية	دعامة خاملة	واقٍ مائي
رحلان كهربائي على هلام ـ بولي اكريل اميد Polyacrylamide-gel electrophoresis	الشحنةالكهربائية والحجم	دعامة خاملة مع مسامات	واقٍ مائي

الكـروماتوغرافيا
Chromatography

تجربة العمود الكروماتوغرافي The practice of Column Chromatography

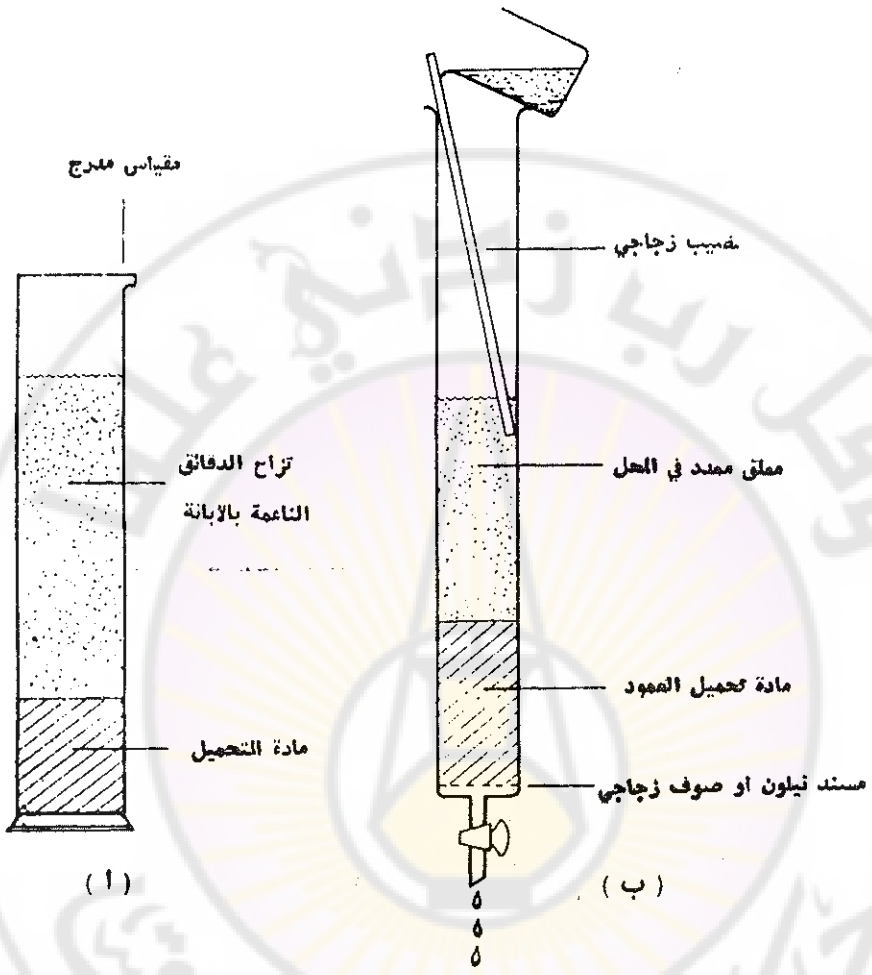
تستعمل بشكل واسع في أعمال الكيمياء الحيوية طـرق فصل المركبات عـلى العمود الكروماتوغرافي. يجب عند استعمال الانماط المختلفة للفصل الكروماتوغرافي الاخذ ببعض التحفظات عند تحضير العمود .

الاعمدة الكروماتوغرافية : تصنع الاعمدة الكروماتوغرافية عادة من الزجاج . تعطي الاعمدة الطويلة تحليلا جيدا للمكونات ، وتفضـل الاعمـدة العريضة عند التعامل مع كميات كبيرة من المواد . يبين الشكل (٢ـ٢) الاجهزة الضرورية اللازمة للعمود الكروماتوغرافي .

تحضير المواد : يستعمل عدد كبير من المواد في الفصل الكروماتوغرافي والتي تحتاج الى التوازن مع المحل قبل تحضير العمود ، ويسمح التوازن بالترسيب لإبانة الدقائق الناعمة الباقية والمعلقة شكل (٢ـ٣ـأ) ؛ حيث تتناقص سرعة تدفق المحـل خلال العمود ويمكن أن تتسبب في سده اذا تركت هذه الدقائق الناعمة ولم تطرح. كما يحتاج بعضها الى المعالجات المسبقة. فمثلا تحتاج بعض مواد الترشيح الهلامي الى الانتفاخ ، ويحتاج الماز absorbent الـى التنشيط بالتسخين أو بالمعالجـة الحمضية ، ويحول راتنج التبادل الشاري بالغسل الى شكل الشوارد الملائمة .

السكب في العمود : يملأ نحو ثلث العمود الكروماتوغرافي بالمحل ثم يسكب المحل مع المادة ببطء وبحذر مع استعمال قضيب زجاجي كما في الشكل(٢ـ٣ـب)، لمنـع تشـكل الفقاعـات الهوائيـة في داخـل العمـود ، يسـمح بترسـب المعلق وطرح الزائد من المحل . يجب لمنع تشكل الطبقات تحريك المادة المحملة على السطح بالقضيب الزجاجي قبل ادخال الدفعة الجديدة من المادة ، وتعاد هذه العملية حتى الحصول على الارتفاع المطلوب . بعد غسل العمود بأكمله بالمحل ، يسمح

الشكل (٢ـ٢) الاجهزة الضرورية اللازمـة للعمود الكروماتوغرافي



شكل (٢ـ٣) تحضير العمود الكروماتوغرافي

بتفريغ المحل خلال العمود حتى يصل لسطح المادة ، ثم يوضع قرص من ورق الترشيح على سطح الماز لتجنب تخرب الطبقة السطحية عند تحميل العينة •

تحميل العينة : تحل العينة أولا في المحل وقد يعمل لها تحال • يضغط في معظم التجارب محلول العينة المركز ويحمل فوق سطح الماز • ثم يفتح

الصنبور حتى يمس مستوى تقعر المحلول قمة عمود الماز • يوصل خزان المحل بقمة العمود ويحافظ على سرعة تدفق المحل بتغير ضغط الخزان •

الشطف : تأتي الخطوة التالية وهي إزاحة المواد من العمود بالشطف بمحلل مناسبة • يتدخل في تحسين إزاحة الجزيئات المرتبطة علاقة المحل مع المواد الكروماتوغرافية أكثر من علاقته مع المركبات المحملة على العمود • يملك العمود سعة خاصة من كمية المواد التي يمكن تحميلها •

يمكن لتحسين الازاحة تحميل ٥٠٪ من سعة العمود الكلية والفصل عادة كاف • يفضل لتحسين الشطف ولتحليل الذرات الافضل ، عدم تحميل العمود أكثر من ١٠٪ من سعته الكلية •

يعتمد الشطف الاكثر استعمالا لإزاحة الجزيئات المختلفة من العمود على تغيير pH المحل أو قوته الشاردية أو قطبيته • يمكن تحقيق ذلك بتغير تدريجي لخواص المحل • وهكذا تشطف المركبات بالزيادة التدريجية للقوة الشاردية ، أو pH ، أو قطبية المحل • تدعى هذه الطريقة بالشطف المتدرج gradient elution • ويمكن التحكم بها بتغيير قطر الخزان شكل (٢ــ٤) •

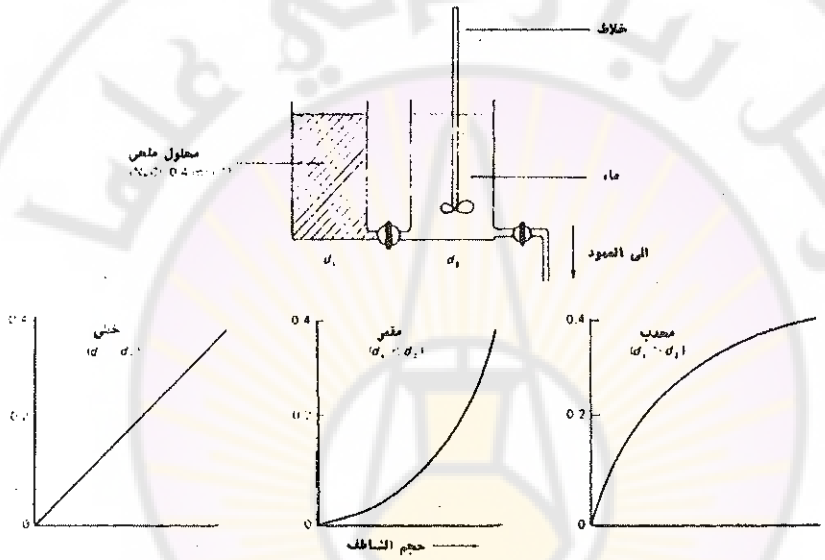
جمع الاجزاء وتحليلها : The Collection and analysis of fractions

يجمع الفائض عن العمود في مجموعة أنابيب اختبار ، يدويا ، أو آليا باستعمال مجمع الاجزاء الآلي كولكتور Collector • يجمع الجهاز حجما معينا أو وزنا معينا أو قطرات معينة من الفائض في أنبوب اختبار قبل أن ينتقل أنبوب آخر الى مكانه• يحلل كل جزء وتحدد مركباته •

يكشف عن وجود البروتين أو الحمض النووي في كل جزء بقياس الامتصاص الضوئي عند ٢٨٠ نانومترا أو ٢٦٠ نانومترا •••

الكروماتوغرافيا الامتزازية

الكروماتوغرافيا الامتزازية هي من أقدم لاشكال الكروماتوغرافية واستعملت لأول مرة عام ١٩٠٣ من قبل عالم النبات الروسي Tswett في فصل أصبغة النباتات • وقد تم نسيانها لعدة سنوات ثم استعملت من جديد من قبل



شكل (٢ــ٤) شطف العمود الكروماتوغرافي بزيادة تركيز المحلول الملحي

Kuhn and Lederer لفصل الكاروتينات واليصفور Xantophyll ثم تطورت هذه الطريقة بسرعة كبيرة .

تمتز المركبات فوق العمود ويحصل توازن بين الجزيئات المرتبطة مع العمود وتلك الحرة في المحلول .

التجربة ٢-١ : فصل اصبغة الاعشاب على كربونات الكلسيوم

المبدا : يمكن ببساطة توضيح مبدأ الكروماتوغرافيا الامتزازية بفصل أصبغة الاعشاب على عمود كربونات الكلسيوم . يستخلص العشب بمحل عضوي وتوضع قطعة طبشور في كأس يحتوي على الخلاصة المركزة . فيرتفع السائل في الطبشور بفعل الخاصة الشعرية . تظهر أصبغة الاعشاب على شكل شرائط ملونة واضحة على الطباشير . الكلوروفيل بلون أخضر ، مركبات اليصفور بلون أصفر ، الكاروتينات بلون برتقالي .

المواد اللازمة	١٠
١. اعشاب	—
٢. جرن مع مدقة	٥
٣. طباشير بيضاء بسيطة	٥
٤. كأس ٥٠ مل	٥
٥. اسيتون أو ايتانول	١٠٠ مل

طريقة العمل

قطع الأعشاب الى قطع صغيرة بالمقص واستخلص الاصبغة بسحقها بجرن بورسلان يحتوي على الاسيتون أو الايتانول . حضر خلاصة مركزة قدر الامكان للحصول على النتيجة الافضل . رشح أو ثفل الخلاصة ، ضع ٥ مل من السائل الاخضر القاتم في كأس ، ثم ضع قطعة طباشير بشكل عمودي في مركز الكأس . تظهر بعد فترة من الوقت عصابات ملونة تحدد من ألوانها .

التجربة ٢-٢ : فصل اصبغة اوراق النباتات بالكروماتوغرافيا الامتزازية

يشبه المبدأ الوارد في التجربة السابقة . يلفت الانتباه الى أن البنزن مركب عالي السمية يجب استعماله بحذر وتحت ساحبة الهواء .

المـواد اللازمـة	١٠
١. عمود كروماتوغرافيا (٢٠×١ سم)	٥
٢. أوراق السبانخ الطازجة	—
٣. الومـين (alumina)	١٠٠ غ
٤. كربونات الكلسيوم	٢٠٠ غ
٥. سكروز (منخول بمنخل ناعم)	٢٠٠ غ
٦. كبريتات الصوديوم (اللامائية)	١٠٠ غ
٧. ايتر البترول (درجة الغليان ٦٠ — ٨٠° س)	١ لتر
٨. ميتـانول	٥٠٠ مل
٩. بنـزن	٥٠٠ مل
١٠. مطحنـة	٥

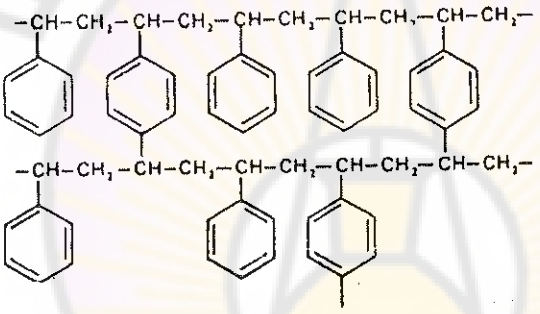
طريقـة العمـل

الاستخلاص : جنس أوراق السبانخ باستعمال المطحنة ، ثم استخلصها بالنقع بمزيج من ايتر البترول ، الميتانول ، البنـزن (٤٥ : ١٥ : ٥) • رشـح ، واغسـل الرشاحة أربع مرات بالماء للتخلص مـن الميتـانول • تجنب الخضخضة العنيفة للابتعاد عـن تشكل المستحلبات • جفف بكبريتات الصوديوم اللامائية ، رشـح لإزاحة الراسب الصلب ، كثف الرشاحة حتى عدة ميلي لترات بالتبخير الحذر تحت سـاحبة الهـواء •

تحضير العمود : حضر ملاط مواد العمود في ايتر البترول وحمل العمود بالألومـين (٥ سم) ، كربونات الكلسيوم (٧ سم) ، والسكروز (٧ سم) ، احشـر قرصا من ورق الترشيح بين كل ماز • يمكن تطبيق المص اللطيف للمساعدة على التحميل • اغسل العمود بعدة حجوم من محلول الشطف ؛ مزيج البنـزن وايتـر البتـرول (٤:١) •

فصل الاصبغة وشطفها : عندما تجف قمة العمود بشكل تقريبي ، أضـف الخلاصة واشطف بالمحل • اذا كانت سرعة التدفق بطيئة جـدا ، طبق ضغطا لطيفا على قمة العمود • اجمع الاجزاء وارسم طيف الامتصاص لكل ذروة لونية •

كروماتوغرافيا التبادل الشاردي Ion exchange chromatography



يمكن تعريف كروماتوغرافيا التبادل الشاردي على أساس فصل المركبات على مَطرق (matrix) غير منحل يحتوي على شوارد غير ثابتة قادرة على التبادل مع الشوارد الموجودة في الوسط المحيط ٠

مطرق التبادل الشاردي : صنع أدامز وهولمز (Adams and Holmes) أول مادة تبادل شاردي عام ١٩٣٥ بتكاثف الفينول ، وحمض السلفونيك ، والفورم ألدهيد لتشكل راتنج غير منحل ٠ ثم صنعت راتنجات أخرى بشكل واسع من المركبات العطرية ٠ وأخيرا صنع مبادل شاردي من بلمرة ثنائي ڤينيل البنزن والسترين شكل (٢ـ٥) ٠

شكل (٢ ـ ٥) مطرق التبادل الشاردي لبولي سترين
ويشكل الروابط المستعرضة ثنائي ڤينيل البنزن

تدخل الزمر المتشردة بالحلقات العطرية بالتفاعلات الكيميائية المناسبة ٠ يعطي التحكم بنسبة كمية ثنائي ڤينيل البنزن والسترين درجة الروابط المستعرضة بين سلاسل بولي سترين ٠ تنتفخ كل راتنجات المبادلات الشاردية عندما توضع بتماس مع الماء ٠ يمكن التحكم بالروابط المستعرضة بعناية لانتاج تأثير شبكة جزيئية يتم الفصل عليها ٠

تعد راتنجات التبادل الشاردي مثالية لفصل الجزيئات الصغيرة كالحموض الامينية ، وغير ملائمة للجزيئات الكبيرة كالبروتينات ، التي لا تستطيع النفوذ بين

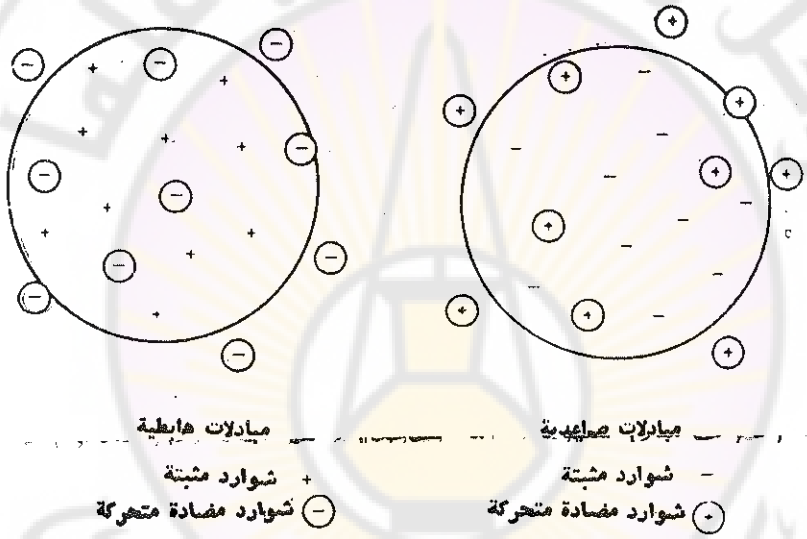
روابط الراتنج المتقاربة • تفصل لهذا السبب الجزيئات الضخمة على مستبدلات السلولوز والدكستران وهي ألياف تكون معظم الزمر الوظيفية على سطحها •

الزمر المتشردة : Ionizable groups

مركبات التبادل الشاردي إما أن تكون صاعدية anionic أو هابطية Cationic ، بالاعتماد على طبيعة إلفتها إما الى الشوارد السالبة أو الشوارد الموجبة • كمثال ، مركبات التبادل الصاعدية تبدل الشوارد الموجبة ، وهكذا تحمل الشحن على المطرق (matrix) شكل (٢ـ٦) •

مبادلات هابطية — **مبادلات صاعدية**

+ شوارد مثبتة — **− شوارد مثبتة**



(−) شوارد مضادة متحركة — **(+) شوارد مضادة متحركة**

شكل (٢ـ٦) مركبات التبادل الصاعدية والهابطية

يمكن فضلا عن ذلك تقسيم هذين النمطين الى مركبات تحتوي على زمر قوية التشرد ، مثل SO_3H — ، N^+R_3 — ، والى زمر ضعيفة التشرد ، مثل $— COOH$ ، $— OH$ ، و $— NH_2$.

يتشرد راتنج التبادل الشاردي القوي بشكل كامل ويوجد مشحونا بعيدا عن قيم pH الطرفية :

$$— NR_3OH \rightleftarrows — N^+R_3 + OH^-$$

$$— NR_3OH \rightleftarrows — N^+R_3 + OH^-$$

تحتوي مركبات التبادل الشاردي الضعيفة من جهة أخرى على زمر يعتمد تشردها على pH ، ويمكن استعمالها فقط بسعة أعظمية بمجال pH ضيق :

$$— COOH \rightleftarrows — COO^- + H^+$$

$$— NH_3^+ \rightleftarrows — NH_2 + H^+$$

تملك الراتنجات الحاوية زمر الكربوكسيل سعة أعظمية نحو pH = ٦ ، بينما الزمر الامينية تكون فعالة عند قيم pH أخفض من ٦ .

تحتوي راتنجات التبادل الشاردي السلولوزية على البوليمر زمرا ضعيفةالتشرد عوضا عن الزمرة OH — .

يبين الجدول (٢ــ٢) الزمر المتشردة الشائعة مع رمزها المختصر المناسب .

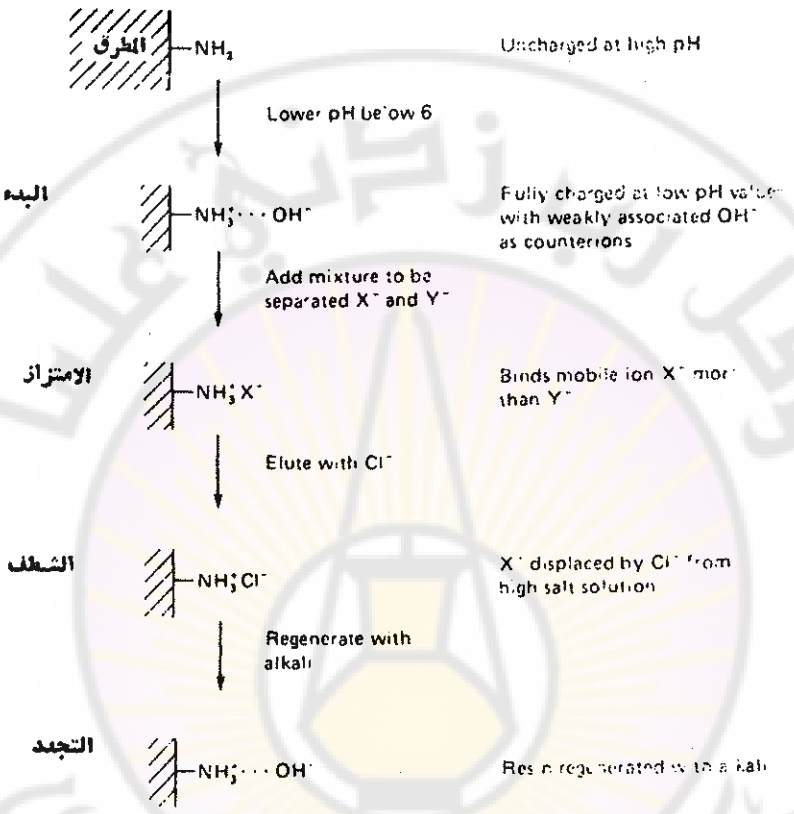
جدول (٢ــ٢) الزمر المتشردة المرتبطة مع السلولوز

الصيغة	الزمر المتشردة	الرمز المختصر	PK
مبادلات صاعدية Anion exchangers			
$— CH_2 - SO_3 H$	سلفو ميتيل	SM	٢ر٥
$—CH_2 - COOH$	كربوكسي ميتيل	CM	٣ر٥
$— PO_3 H_2$	فسفو	P	٦ر٠
مبادلات هابطية Cation exchangers			
$— CH_2 - CH_2 - N < \begin{matrix} C_2H_5 \\ C_2H_5 \end{matrix}$	ثنائي ايتيل امينو ايتيل	DEAE	٩ر٥
$— CH_2 - CH_2 - N^+ < \begin{matrix} C_2H_5 \\ C_2H_5 \\ C_2H_5 \end{matrix}$	ثلاثي ايتيل امينو ايتيل	TEAE	١٠ر٠

توازن التبادل الشاردي Ion exchange equilibria

تتوضح الطريقة النموذجية لوصف وظيفة مواد التبادل الشاردي في الشكل

(٢ــ٧) • يحتوي راتنج التبادل الصاعدي anion exchange على زمرة أمينية والتي تستعمل للفصل بين شحنتين سالبتين x^- و y^- .



شكل (٢ــ٧) مراحل كروماتوغرافيا التبادل الشاردي

يمكن أن يقدر تركيز الزمر المتشردة الموجودة على الراتنج من ٦ ــ ١٠ مولاً لترا ، لذلك تملك هذه المواد سعة تبادل عالية •

شطف الشوارد المرتبطة Elution of bound ions

يمكن إزاحة الشوارد المرتبطة بتغير pH المحلول الواقي • فمثلا ، ينقل pH البروتين نحو نقطة تعادله الكهربائي • فتتناقص الشحنة الصافية للجزيئة الضخمة

marco molecule ويكون ارتباطها غير طويل . ينجز الفصل ببقاء البروتينات المشحونة على العمود . يمكن إزاحة الشوارد الباقية بالتناوب بتغير pH المحلول أو بزيادة القوة الشاردية للمحلول الواقي أو بالمحلول المتدرج الذي درس فيما سبق .

تحضير مواد المبادلات الشاردية Preparation of the ion exchange materials

يسمح أولا للراتنجات أو السكاكر كثيرة التعدد المستبدلة Substituted polysaccharides بالانتفاخ في الماء المقطر ، وتزاح الدقائق الصغيرة كما شرح سابقا . يمكن أن يحتوي الراتنج التجاري وبخاصة المبادل المهبطي على الحديد أو أي معدن ثقيل آخر الذي يزاح بالغسيل بحمض كلور الماء (٢ ــ ٤ مولا/لترا) .

يحصل على المبادل الشاردي بعد ذلك بالشكل الشاردي اللازم بالغسيل بالمحلول الموافق ، وهكذا يحصل على شكل H^+ راتنج المبادل المهبطي بغسل المادة بحمض كلور الماء وبعد ذلك بالماء حتى الاعتدال . يحضر بشكل مشابه شكل Na^+ بغسل الراتنج بكلور الصوديوم أو هدروكسيد الصوديوم ومن ثم الماء كما سبق .

تكون الخطوة الاخيرة قبل تحضير العمود موازنة المادة بتحريكها بالمحلول الواقي ، ويجب عدم ارتباط شوارد المحلول الواقي مع الراتنج .

التجربة ٢ــ٣ : امتصاص كلور الصوديوم على راتنج التبادل المهبطي

المواد اللازمة	١٠
١. راتنج حمضي قوي	٣٠ غ
٢. راتنج حمضي ضعيف	٣٠ غ
٣. محلول كلور الصوديوم (١٠ غ/لترا)	١٠٠ مل
٤. محلول هدروكسيد الصوديوم (١١ر٠ مولا/لترا)	٢٠٠ مل
٥. عمود كروماتوغرافي (٢٠ سم × ١ سم)	١٠

الطريقـة

حضر عمود يحتوي على ٥ غ راتنج حمضي قوي بشكل H^+ ، واغسل بالمـاء المقطر حتى يصبح pH الغسالة هو نفسه للماء المقطـر • أضف عندما تصبح قمـه العمود عادة جافة ١٠ مل محلول ١٠ غ/لتر كلور الصوديوم واسمح للمحلول يمر عبر العمود • اشطف بـ ٥٠ مل ماء عندما يصبح التقعر تماما فوق قمـة الراتنج • عايـر محلول الشطف بمحلول ١ر٠ مول/لتر هدروكسيد الصوديوم واحسـب نسبة شوارد الصوديوم المستبدلة •

أعد التجربة باستعمال راتنـج التبادل الشاردي الضعيف وفسر ما يجـري بنتائجـك •

التجربة ٢ـ٤ : فصل الحموض الامينية بكروماتوغرافيا التبادل الشاردي

المـواد اللازمـة	١٠
١. عمود كروماتوغرافي (٢٠ سم × ٥ر١ سم)	٥
٢. راتنج حمض قوي	٣٠ غ
٣. محلول حمض كلور الماء (٤ مولات/لترا)	١ لتر
٤. محلول حمض كلور الماء (١ر. مولا/لترا)	٤ لتر
٥. صـوف زجاجـي	ـ
٦. مزيج حموض امينية (يحل حمض الاسبارتيك ، والهيستيدين والليزين في ١ر. مول/لتـر HCl ليصبح التركيز النهـائي من كل واحد ٢ مغ/مل)	١٠ مغ
٧. محلول الـ تريس الواقي ـ HCl (٢ر. مولا/لترا ، pH=٥ر٨)	٣ لتر
٨. هدروكسيد الصوديوم ١ر. مول/لتر	٢ لتر
٩. اقماع فصل (٥٠٠ مل)	١٠
١٠. محلول الخلات الواقي (٤ مولات/لترا ، pH = ٥ر٥)	٢٥٠ مل
١١. كاشف النينهيدرين (يحل ٢٠ غ نينهيدرين و ٣ غ هدريـن دانتين في ٧٥٠ مـل مـن Methyl Cellosolve واضـف ٢٥٠ مل محلول الخلات الواقي) يحضـر حديثـا ويحفظ في زجاجة عاتمة .	١ لتر

١٢. Methyl Cellosolve (ايتر احادي ميتيل ايتيلين غليكول)	١ لتر
١٣. ايتانـول (٥٠٪ حجما/حجما)	١ لتر
١٤. نينهيدرين (٢ غ/لترا في الاسيتون)	١٠٠ مل
١٥. فرن ١٠٥° س	١

طريقـة العمـل

تحضير العمود : Preparation of the Column

حرك بلطف الراتنج بمحلول ٤ مولات/لترا H Cl حتى الانتفاخ التام (١٥ ـ ٣٠ مل/غ راتنجا جافا) . اترك الراتنج ليهدأ . ومن ثم أبن الحمض . أعد الغسيل بمحلول ٠ر١ مولا/لترا H Cl ، أعـده لهذا المحلول وحضر العمود كمـا وصف سـابقا .

شطف الحموض الامينية Elution of amino acids

حمل بحذر محلول ٢ر٠ ميلي لترا مزيج حموض أمينية الى قمة العمود ، افتح الصنبور واسمح للعينة لتمر خلال الراتنج.أضف ٢ر٠ ميلي لترا H Cl ، اسمح له بالمرور خلال العمود كما سبق،أعد العمل مرتين.حمل أخيرا ٢ ميلي لترا من محلول ٠ر١ مولا/لترا H Cl الى قمة عمود الراتنج ثم صل العمود بخزان يحتوي علـى ٥٠٠ مل محلول ٠ر١ مولا/لترا H Cl . اضبط ارتفاع الخزان ليعطي سرعة تدفق نحو ١ ميلي لترا/بالدقيقة واجمع أربعين إنبوبا بحجم ٢ ميلي لتر.اكشف عن وجود الحموض الامينية في كل خمسة أنابيب بالوقت نفسه بحمل عينة مـن كـل أنبوب علـى ورق الترشيح : اغمس (أو بـخ) ورقـة الترشيح بمحلول النينهيدرين في الاسيتون وسخن بالفرن بالدرجة ١٠٥° س . تظهر اذا كانت الحموض الامينيـة موجودة في هذه الانابيب بقع زرقاء على ورقة الترشيح . عند شطف أول حمض أميني ، أزح خزان محلول ٠ر١ مولا/لترا H Cl واسمح لمستوى الحمض في العمود ليهبط تماما الى قمـة الراتنج . مـرر ٢ ميلي لتر محلول ٢ر٠ مولا/لترا محلولا واقي تريس ـ H Cl (pH =٨ر٥) خلال العمود ، صـل العمود بخزان يحتوي

على هذا المحلول الواقي واستمر بالشطف حتى ازاحة الحمض الاميني الثالث من العمود .

كشف الحموض الامينية Detection of amino acids

عدل pH كل أنبوب حتى القيمة خمسة باضافة عدة قطرات من الحمض أو القلوي . أضف ٢ مل من محلول النينهيدرين الواقي وسخن على حمام مائي مدة ١٥ دقيقة. برد الانابيب لحرارة الغرفة،ثم أضف ٣ ميلي لتر محلول ٥٠٪ حجما/حجما غولا ايتيليا واقرأ الشدة الضوئية عند ٥٧٠ نانومترا بعد ١٠ دقائق ليستقر . جهز المحاليل الفارغة والمعيارية . واحسب كمية الحموض الامينية في كل جزء من الحجم المشطوف .

بأي نظام تنشطف الحموض الامينية ولماذا ؟ يعطي الجدول (٢-٣) قيم pK و pH الشحنة الصافية لثلاثة حموض أمينية .

جدول (٢-٣) قيم pK و pH الشحنة الصافية لثلاثة حموض امينية

الحمض الاميني	pK_1	pK_2	pK_3	نقطة التعادل الكهربائي
حمض الاسبارتيك	٢ر٠	٣ر٩	١٠ر٠	٢ر٩
الهيستيدين	١ر٨	٦ر٠	٩ر٢	٧ر٦
الليزين	٢ر٢	٩ر٢	١٠ر٨	١٠ر٠

الكروماتوغرافيا الفاصلة (التجزئة) Partition Chromatography

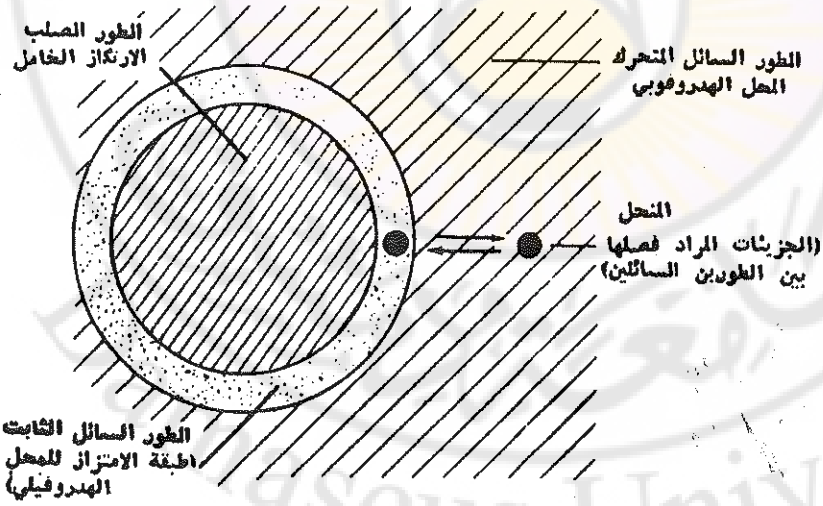
تفصل المركبات التي تنحل بسرعة في السوائل العضوية وضعيفة الانحلال في الماء بالكروماتوغرافيا الامتزازية absorption Chr. ، بينما تفصل المركبات المتشردة والمنحلة في الماء بكروماتوغرافيا التبادل الشاردي ion exchange Chr. . تشغل الكروماتوغرافيا الفاصلة الوسط بين الكروماتوغرافيا الامتزازية

وكروماتوغرافيا التبـادل الشاردي ، وتنفصل بسـرعة بكروماتوغرافيا الفاصلة المركبات التي تنحل في كل من الماء والمحلات العضوية .

تتوزع عندما تخضخض المركبات بين محلين غير ممتزجين بشكل غـير متساوٍ بين الطورين ، وبالتوازن ، تصبح نسبة تركيز المركبات في كلا المحلين ثابتـة . وتعرف هذه النسبة بمعامل الفصل Partition Coefficient (a)

$$\frac{\text{تركيز x في المحلول ١}}{\text{تركيز x في المحلول ٢}} = a$$

يشغل الماء عادة أحد محلات الكروماتوغرافيا الفاصلة ، والذي يتمسك بطـور الارتكاز الثابت ، والذي يكون بشكل عمود أو طبقـة رقيقـة للمواد الخاملة . يتكون الطور الآخر المتحرك ، من سائل عضوي مشبع بالماء ويتدفق أبعد من الطور الثابت . تنفصل مكونات المزيج اذا كان معامل الفصل بين المحلات مختلفا بصورة كافيـة شـكل (٢ـ٨) .

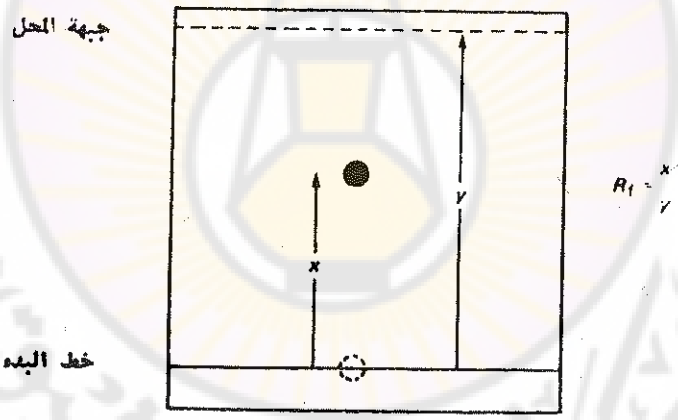


شكل (٢ـ٨) مبدأ كروماتوغرافيا الفاصلة سائلا ـ سائلا

نظرية الكروماتوغرافيا الورقية

يستعمل السلولوز بشكل صفائح ورقية ليؤمن وسط الارتكاز الحقيقي ومكان امتزاز الماء بين أليافه ليشكل الطور الهدروفيلي الثابت • أول من استعمل ورق الترشيح كطور للارتكاز كان كل من Consden ، Gordon ، و Martin عام ١٩٤١ ومنذ ذلك الوقت ظهرت أعمال ضخمة وكتب تظهر تقنية الكروماتوغرافيا الورقية •

يقطر المزيج على الورقة ، تجفف ، ثم يسمح بتدفق المحلول على الورقة الكروماتوغرافية • تحدد جبهة المحلول ، وتجفف الورقة ، يجعل مكان بقع المركبات الموجودة في المزيج منظورا باجراء تفاعل صباغي مناسب • تعرف نسبة المسافة التي يقطعها المركب الى المسافة التي يقطعها المحلول بقيمة R_f ، وتتعلق بنظام المحل والورق المستعمل وتركيز المنحل ، ودرجة الحرارة و pH الوسط شكل (٢-٩) •



شكل (٢-٩) معنى قيمة R_f في الكروماتوغرافيا الورقية

تحضير العينة Preparation of the Sample

من الملائم عند بحث المركبات الحيوية إزالة الاملاح من العينة قبل اجراء التحليل الكروماتوغرافي ومن الافضل انجاز ذلك بوساطة ديال كهربائي electrodialysis أو التحليل الكهربائي electrolysis •

يسبب وجود زيادة الاملاح في الكروماتوغرام الى اتساع البقع مما يؤدي الى تغيير في قيمة R_f • ويمكن أيضا أن يؤثر في التفاعلات الكيميائية المستعملة في الكشف عن مركبات المزيج •

تحمل العينة (١٠ ــ ٢٠ مكرولترا) بوساطة ماصة صغرية الى الورق الكروماتوغرافي •

اختيار الورق Choice of Solvent

يستعمل غالبا في الاغراض التحليلية الورق الكروماتوغرافي واتمان رقم ١ (Whatman No 1) • يستخدم لفصل كميات كبيرة من المواد ورق سميك واتمان رقم ٣ (Whatman 3 MM) ، ويلائم الفصل السريع واتمان ٤و٥ (Whatman No 5 and 5) ، حيث تكون البقع أقل تحديدا • تكون وفي جميع الحالات سرعة التدفق أكبر في الوعاء الحاوي الورق المشبع بالمحلول الواقي • يمكن أيضا الحصول تجاريا على ورق التبادل الشاردي •

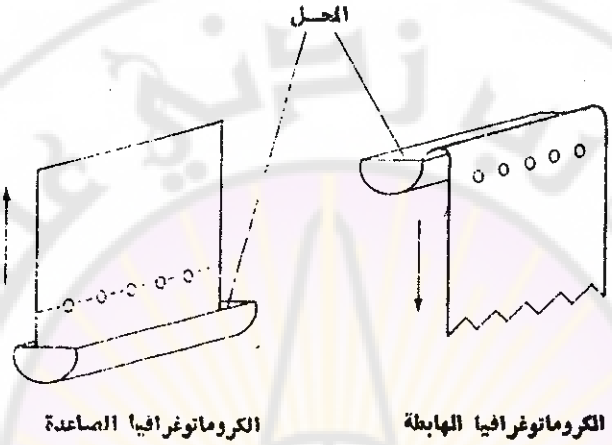
اختيار المحل Chioce of Solvent

يعتمد اختيار المحل كما في اختيار الورق بشكل واسع على التجربة ، ويعتمد على المزيج المبحوث • فاذا تحركت المركبات بالقرب من جبهة المحلول ، فهي كثيرة الانحلال ، بينما اذا تراكمت بالقرب من الاصل في المحلول B يعني أن انحلالها غير كاف • يكون المحل الموافق لفصل مزيج من A و B ، عند انتشار قيم R_f لمركبات المزيج على طول الورقة • يمكن أيضا أن تكون قيمة pH هامة في الفصل • يحتوي كثير من المحلات على حمض الخل أو الامونيوم لتأمين الوسط الحمضي أو الاساسي •

الجهاز

يتألف الجهاز بالضرورة من صفيحة ورقية ترتكز على اطار ، أحد طرفيها متصل بحوض مملوء بالمحل• يمكن في الكروماتوغرافيا الصاعدة ascending Chr. لف الورقة بشكل اسطوانة تثبت بلاقط ورقي وتقف في المحل • يشمل هذا الترتيب

وعاء محكم السد مبطنا بورق مشبع بالمحل لتأمين ضغط جـوي مشبع وثابت في حرارة الغرفة الثابتة • يسبب عدم تساوي درجة الحرارة جريان المحل غير المتساوي وتغيرا في قيم الـ pH شكل (٢ــ١٠) •



شكل (٢ــ١٠) الكروماتوغرافيا الورقيـة الصاعدة

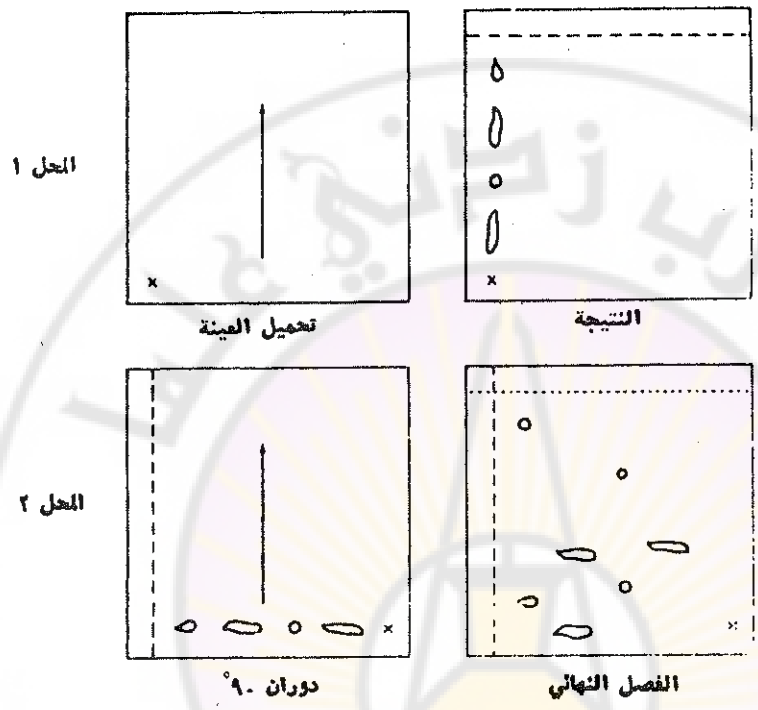
الكروماتوغرافيا النازلـة Descending

تلائم الكروماتوغرافيا النازلة المركبات التي قيم R_f متشابهة وهكذا تبتعـد قطرات المحل الى قعر الورقة ، معطية فصلا أكثر اتساعا • طبعا في هـذه الحـالة لا تقاس قيمة R_f ، وتقارن المسافة بالرجوع الى مركبات معيارية ، كالغلوكوز في حـالة السـكاكر :

$$R_f = \frac{\text{المسافة التي قطعها المركب} \times}{\text{المسافة التي قطعها الغلوكوز}}$$

يغلب استخدام الكروماتوغرافيا الصاعدة لإمكان اجراء الفصل على بعدين • يفصل المزيج من المحل الاول الاكثر تطايرا ، وبعد التجفيف تدار الورقة ٩٠ درجة وينجز الفصل في المحل الثاني • يمكن بعـد تعيين المكـان في المخطط الحاصل ،

تحديد هويـة المركبات بمقارنة مواضعها بمخطط لمركبات معروفة في الشـروط نفسـها شـكل (٢ـ١١) .



شكل (٢ـ١١) فصل مزيج على ورق الكروماتوغرافيا على بعدين

اظهـار البقـع Detection of Spots

أغلب المركبات عديمة اللون ويمكن جعلها مرئيـة بتفاعلات خاصة . يطبـق الكاشف الذي يعطي تفاعلا ملونا يحـدد المكان ببـخ الورقة أو غمسها بسرعة في الكاشف في محل طيار . ومن المفيد أيضا رؤيـة بعض المركبات بالاشعة فـوق البنفسجية على شكل بقع عاتمة ضد خلفية متألقة . وتظهر بعض المركبات تألقـا خاصا تحت الاشعة فوق البنفسجيه .

التجربة ٢ـ٥ : التعرف على سكر الحليب بالكروماتوغرافيا الورقية

المبـدأ : يرسب بروتين الحليب بثلاثي كلور حمض الخـل ، يثفل ، وتؤخذ

الطبقة الطافية للكروماتوغرافيا • يستعمل أنيلين مع ثنائي فنيل أمين لإظهار السكاكر الذي يعطي سلسلة من الالوان مع معظم السكاكر يساعد في تعيينها •

المـــواد	١٠
١. ادوات من اجل الكروماتوغرافيا النازلة	٥
٢. ورق كروماتوغرافيا واتمان رقم ١	١٠ صفائح
٣. محل كروماتوغرافي (ايزوبروبانول : ماء ، ٤:١)	٣ لتر
٤. كاشف يعين المكان انيلين ــ ثنائي فنيل امين يحضر حديثا بمزج ٥ حجوم محلول ١٠ غ/لترا انيلين مع محلول ٥ حجوم محلول ١٠ غ/لترا ثنائي فنيل امين ؛ في الاسيتون ، مع حجم واحد حمض الفسفور ٨٥٪ . احذر فالكاشف سام .	ــ
٥. فرن ١٠٠° س	٣
٦. محاليل سكرية معيارية (١٠ غ/لترا في محلول ١٠٪ حجما/لحجم ايزوبروبانول) . رامنوز ، لاكتوز ، ريبوز ، حمض غلوكورونيك ، كسيلوز ، غلوكوز امين ، فروكتوز ، غلوكوز .	١٠ مل
٧. مجفف شعر او نافخ هواء .	٥
٨. بخاخ .	٣
٩. حليب .	٥٠ مل
١٠. ثلاثي كلور حمض الخل (١٠٠ غ/لتر) .	٥٠ مل

الطريقة :

ترسيب البروتين Deproteinization

أضف ٢ ميلي لترا حليبا و ٣ ميلي لترا ماء مقطر واخلطهما بشدة،ثم أضف ٥ ميلي لترا محلول ثلاثي كلور حمض الخل (١٠٠ غ/لترا) • خضخض محتويات الانبوب واتركه ليهدأ لعدة دقائق ، أزح الراسب الناتج بالتثفيل ، واستعمل السائل الطافي الصافي للكروماتوغرافيا •

الكروماتوغرافيا :

خذ ورقتي كروماتوغرافيا واتمان رقم ١ وارسم بواسطة قلم الرصاص خطا على بعد ٨ سم من الطرف . حمل النماذج التالية على احدى الصفيحتين على أبعاد ٤ سم وجفف البقع بتيار هواء ساخن .

١. ٥ مكرولترات لاكتوز .
٢. ١٠ مكرولترا خلاصة الحليب .
٣. ١٠ مكرولترات لاكتوز (١٠ غ/لترا) .
٤. ١٠ مكرولترا خلاصة الحليب + ٥ مكرولترات لاكتوز (١٠ غ/لترا) .
٥. ٥ مكرولترات غلوكوز (١٠ غ/لترا) .
٦. ٥ مكرولترات غالاكتوز (١٠ غ/لترا) .

قطر محاليل السكاكر المعيارية على طول الصفيحة الثانية ، وقص نهاية كلتا الصفيحتين بالمقص على شكل منشاري لمساعدة تدفق المحل بعيدا عن الطرف شكل (٢-١٠) . اترك الورقة الكروماتوغرافية خلال الليل مع المحل في وعاء الفصل اسحبها في صباح اليوم التالي وجففها في تيار هواء بارد . بخ الورقتين بالكاشف المحضر حديثا أنيلين ثنائي فنيل أمين وجففهما في الدرجة ١٠٠°س . قس المسافات التي قطعتها السكاكر عن خط البدء وعين قيم R_g .

التجربة ٢-٦ : فصل الحموض الامينية بالكروماتوغرافيا الورقية على بعدين

المبدأ : يلزم تحضير مخطط الحموض الامينية المعيارية على بعدين عند دراسة الحموض الامينية والبروتينات . يتفاعل النينهيدرين مع جميع « الحموض الامينية ليعطي لونا بنفسجيا . تتفاعل مركبات أخرى اذا كانت موجودة كالامينات الاولية والثانوية الاليفاتية وبعض مركبات الآزوت المتغايرة اللاعطرية . تتفاعل الحموض الايمينية كالبرولين وهدروكسي برولين لتعطي لونا أصفر .

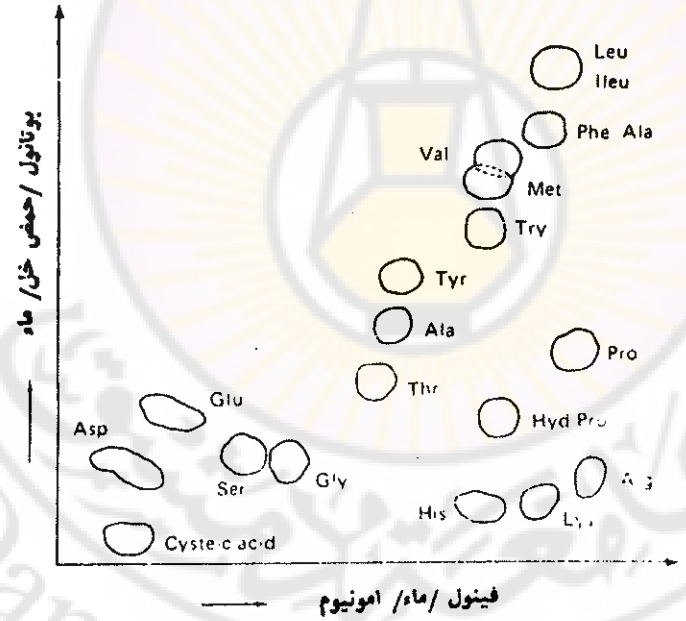
المواد	١٠
١. ادوات من أجل الكروماتوغرافيا الورقية على بعدين .	٥
٢. ورق كروماتوغرافيا واتمان رقم ١ (٢٠ سم × ٢٠ سم) .	٢٠
٣. المحل ١. (بوتانول : حمض خل ثلجي : ماء . ١٢:٣:٥) .	٤ لترات

٤. المحل ٢. (فينول–ماء) . اضف ١٢٥ ميلي‌لترا ماء الى ٥٠٠غ فينول ، اغلق الوعاء واتركه لليوم التالي . يجب الحذر لان الفينول يسبب حروقا بالغة للبشرة . اضف قبل الاستعمال بضع قطرات محلول ٨٨ر. امونيوما الى المحل واخلطه جيدا . — ٢٥٠٠ غ

٥. كاشف النينهيدرين (حل ٢ر. غ في ١٠٠ مل اسيتونا قبل الاستعمال) . —

٦. فرن ١٥٠° س . ٥

٧. حموض امينية معيارية. حضر حجوما صغيرة من محاليل ١٠غ/لترا في ١٠٪ حجما/لحجم ايزوبروبانول . يحتاج احيانا لإضافة قطرة من حمض او قلوي لتحويل المركب الى محلول: الانين ، حمض الاسبارتيك ، سيستئين H Cl ، سيستين ، حمض الغلوتاميك ، غليسين ، هيستيدين H Cl ، هدروكسي برولين ، لوسين ، ايزولوسين ، ليزين H Cl ، ميتيونين ، اورنيتين H Cl ، فنيل الانين ، برولين ، سيرين ، تريونين ، تربتوفان ، تيروزينيل ثالين . ١٠ مل



شكل (٢–١٢) فصل مزيج حموض امينية بالكروماتوغرافيا الورقية على بعدين الورق المستعمل واتمان رقم ١

الطريقة :

تفحص خريطة الحموض الامينية المقدمة على الشكل (٢ـ١٢) • اختر أربعة حموض أمينية ذات قيم R_f المختلفة ، وقطر ٢٠ مكرولترا من كل واحد الى زاوية صفيحة الكروماتوغرافيا الورقية واتمان رقم ١ • جفف البقعة بتيار هواء وعلق الصفيحة على اطار معدني • أعد ذلك حتى تحصل على مزيج جميع الحموض الامينية على صفائح الكروماتوغرافيا الورقية • وأخيرا نقط مزيجا يحتوي على جميع الحموض الامينية على صفيحة الكروماتوغرافيا الورقية • يجب وضع كل حمض أميني في مزيجين مختلفين بهدف اثبات هويته •

ضع الاطار بحيث ينغمر الطرف الذي فيه البقعة في المحل الاول واسمح له بالجريان معظم النهار • اسحب الاطار في المساء وجففه بهواء بارد • رتب الاطار بحيث ينغمر الطرف الثاني في المحل الثاني واسمح له بالجريان خلال الليل شكل (٢ـ١٩) • جفف الاوراق كما سبق وأزح الاطار عنها • اغمس بسرعة (أو بخ) كل ورقة في كاشف النينهيدرين وعلقها في الخزانة ليتبخر الاسيتون • تظهر الالوان بالتسخين بالدرجة ١٠٥° س مدة ٢ـ٣ دقيقة • قارن تائج مخططات الحموض الامينية مع الشكل (٢ـ١٢) •

كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography

وصف ازمايلوف وشرايبر (Izmailov and Schraiber) فصل خلاصة نباتيه على طبقة رقيقة من الألومين alumina عام ١٩٣٨ ، وبعد مضي عشرين سنة أمكن تجاريا الحصول على معدات تحضير كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة •

يرتكز مبدأ فصل المركبات بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على وسائط تشبه كثيرا طريقة الكروماتوغرافيا الورقية • بالاضافة الى ضم أصبغة تألقية Fluorescent dyes الى الوسائط تساعد على تعيين البقع • يعتمد الفصل على مبدأ الامتزاز ، أو التبادل الشاردي ، أو الكروماتوغرافيا الفاصلة partition chro. أو الترشيح الهلامي gel filtration والتي تعتمد على طبيعة الوسائط المستخدمة • تنجز الطريقة بسرعة كبيرة وخلال ساعة • تتشكل بقع متراصة جدا تحمل لذلك

المركبات بتراكيز أخفض من الكروماتوغرافيا الورقية • يمكن تعيين بعض المركبات المفصولة بالبخ الأكال Corrosive sprays وبدرجات حرارة مرتفعة والتي يتعذر بالطبع اجراؤها مع الورق الكروماتوغرافي •

انشاء الطبقة الرقيقة Production of thin layer

تتأثر قيمة R_f بسمك الطبقة ويكون الفصل أفضل عندما يكون سمك الطبقة أقل من ٢٠٠ مكرون وكحد أقصى ٢٥٠ مكرونا • تتوافر في الاسواق آلات فرش جيدة تشكل طبقة رقيقة حسب الحاجة ، اذا استعملت بشكل جيد • تمزج أحيانا كبريتات الكلسيوم مع الماز لتأمين ارتباط الطبقة بالصفيحة والعمل السريع عند خلط الماز بالماء • تختار مواد الطبقة الرقيقة طبعا حسب المشكلة المراد بحثها ، ومن المفيد استعمال هلام السيليس Silica gel لفصل مجموعة واسعة من المركبات •

الاظهار Development

يجب التأكد من جعل جو وعاء الفصل مشبعا تماما بالمحل وتختلف قيمة R_f من وعاء الى آخر • يمكن تأمين الاشباع باستعمال وعاء صغير ما أمكن مع تغطية جدرانه بالورق المشرب بالمحل • تترك الصفيحة بالوعاء مع اتباع التقنية التي سبق ذكرها •

تحدد مواضع المركبات كما في الكروماتوغرافيا الورقية بالبخ بالكاشف الموافق •

التجربة ٢ـ٧ : تحديد سكاكر عصير الفواكه باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة .

المواد اللازمة ١٠

١. صفائح رقيقة من هلام السيليس G (حضر روبة من هلام السيليس G في محلول خلات الصوديوم ٢ر. مولا/لترا وصب الروبة على الصفائح بسمك ٢٥٠. مكرونا μm . نشط الصفائح بالتسخين الى الدرجة ١٠٥° س لمدة ٣٠ دقيقة) . ١٠

٢. أوعيـة فصـل .	٥
٣. المحل (خلات الايتيل : ايزوبروبانول : ماء : بيريدين ، ٢٦ : ٢:٧:١٤) حجم يكفي لخمسة أوعية .	حجم ٥ اوعية
٤. عصير فواكه طازجة (ليمون ، برتقال ، كريفون ، انانـاس) .	٥ مل
٥. ايتانـول مطلـق .	١٠٠ مل
٦. كواشف مظهرة كما في التجربة (٢ـ٣) .	ـ
٧. فـرن بالدرجة ١٠٥° س .	٣
٨. مجفف شعر .	٥
٩. بخـاخ .	٥
١٠. محاليل سكاكر معيارية كما في التجربة (٢ـ٣) .	ـ

الطريقـة :

أضف ٣ مل ايتانول الى ١ مل عصير فواكه ، خضخض وثفل لإزاحـة البروتين الفاقد لبنيته الطبيعية . نقط باعتناء السائل الطافي على صفيحة الطبقة الرقيقة مـع بعض محاليل السكاكر المعيارية . ضع الصفيحة في الوعـاء المشبع بالمحل واتركها حتى يقترب المحل من قمة الصفيحة . علّم المكان الذي وصل اليـه المحل . جفف الصفيحة في تيار هواء بارد ثم حـدد مكان السكاكر كما في التجربة (٢ـ٣) . سجل ألوان السكاكر المتشكلة واحسب قيمة R_g لتحديد السكاكر الموجودة في عصـير الفواكـه .

التجربة ٢ـ٨ : فصل الشحوم Lipids بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة .

المبـدأ : الشحوم مركبات حيوية موجودة على شكل مزيج معقد وتقسـم الى عدة زمر (حسب طريقة الاستخلاص بالمحلات) . ويتم تحليل المركبات الموجودة في كل زمرة بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة . يختار المحل المناسب بالاعتماد على الشحوم المراد فصلها ، وبشكل عام تفصل الشحوم المعتدلة بالمحلات اللاقطبية والشحوم القطبية بالمحلات القطبيـة . يمكن استعمال عدة طرق معتمدة لفصـل الشحوم . يعتمد اختيار الماز على زمرة الشحوم والمحل المراد استخدامه . يستعمل

بشكل واسع هلام السيليس الذي يفصل المواد على أساس الكروماتوغرافيا الامتزازية والفاصلة .

تفصل الشحوم في هذه التجربة الى زمر بالاعتماد على قطبيتها وتشتمل على شواهد معيارية وسنبحث في بعض الامثلة الطبيعية كالزيوت والشحوم .

المواد اللازمة	١٠
١. صفائح طبقة رقيقة من هلام السيليس G	١٠
٢. اوعية فصل	٥
٣. المحل (ايتر البترول ، درجة الغليان ٦٠–٧٠° س : ايتر ايتيلي : حمض خل ثلجي ، ٨٠:٢٠:١) . حجم يكفي لخمسة اوعية .	حجم ٥ اوعية
٤. فحوم هدروجينية (نظامي هكساديكان ونظامي أوكتاديكان) .	٥ مل
٥. استرات الكولسترول (خلات الكولسترول ، زيتات الكولسترول ، وشمعات الكولسترول) .	٥ مل
٦. استر الفيتامين A (نخلات الفيتامين A) .	٥ مل
٧. ثلاثي اسيل الغليسرين (ثلاثي الزيتين ، ثلاثي الشمعين ، وثلاثي النخلين) .	٥ مل
٨. حموض دسمة (حمض الزيت، حمض النخل، حمض الشمع) .	٥ مل
٩. استرولات (كولسترول) .	٥ مل
١٠. زيوت طبيعية (زيت زيتون ، زيت سمك) .	٥ مل
١١. ٢َ ، ٧َ – ثنائي كلور فلورسين (٢غ/لترا في ٩٥٪ حجما/لحجم ايتانول) .	٢٠٠ مل
١٢. حمض كبريت (٥٠٪ حجما/لحجم) .	
١٣. فرن بالدرجة ١١٠° س .	٣
١٤. مصباح اشعة فوق بنفسجية .	٣

الطريقة

نظف الصفائح الزجاجية بالماء والصابون والماء المقطر ثم امسحها بقطعة قطن

Damascus University

مرطبة بالايتانول • صب روبة هلام السيليس المائيــة علــى الصفائح بسمك ٢٥٠ مكرونا mμ • نشط الصفائح بالتسخين الى الدرجة ١١٠°س لمدة ساعة ثم اتركها لتبرد • نقط ٢٠ــ٥٠ مكرولترا lμ من محاليل كل من الشحوم ١٪ وزنا/حجما في المحل • ضع الصفيحة في وعاء الفصل وانتظر وصول المحل الــى القرب مــن الطرف العلوي • جفف الصفيحة وحدد مواضع الشحوم بالبخ بمحلول ثنائي كلور الفلورسين ، وشاهد الصفيحة تحــت مصباح الاشــعة فــوق البنفسجية (٢٧٠ نانومترا) • تظهر الشحوم بشكل بقع خضراء متألقة على أرضية سوداء • يمكــن أيضا جعل البقع مرئية ببخ الصفيحة بمحلول ٥٠٪ حمض كبريت ثم التسخين الــى الدرجة ١١٠°س لمدة ١٠ دقائق • كن حذرا عند البخ بحمض الكبريت •

ما هو ترتيب الشحوم المنفصلة ولماذا ؟

الرحــلان الكهــربائي

Electrophoresis

المبــدأ

يحمل الكثير من الجزيئات الحيوية شحنات كهربائية ، تعتمد مغناطيسيتها على بنية الجزيئة وأيضا على pH ومكونات الوسط • تهاجــر الجزيئات المشحونة في المحلول الى المسرى المخالف في القطبية عند تطبيق الحقل الكهربائي ، وهو المبــدأ نفسه في الرحلان الكهربائي عند فصل الجزيئات مختلفة الشحن •

تعتمد حركة انتقال الجزيئات على لزوجة الوسط (η) ، وعلى الحجم والشكل (r) وشحنة الجزيئة (q) ، وبشكل رئيس على الزمر المتشردة الموجودة على سطح الدقائق ، وعلى اشارة الشحنة المحمولة علــى الزمر المتشردة ومغناطيسيتها والتي تختلف بالاعتماد على قوة التشرد و pH الوسط وعلى خواص الحالة • ولهذا يؤثر اختيار الوسط الملائم في فصل الجزيئات •

تقنية الرحلان الكهربائي

قدمت هذه التقنية من قبل السويدي الحيوي Tiselius منــذ ٤٠ سنة مضت •

يدال dialysed المحلول في محلول واقٍ وتتشكل حدود واضحة في الانبوب U بين محلول البروتين والمحلول الواقي •

يمكن إنقاص الحمل بوساطة التيارات الى حد أصغري اذا أنجز الرحلان الكهربائي على وسط ارتكاز مشبع بالمحلول الواقي • يتحقق نجاح الفصل إذا انفصل المزيج الى مناطق مختلفة وواضحة •

اوساط الارتكاز

بما أن ورق الترشيح رخيص الثمن وسهل الاستعمال فهو مناسب للعديد من التجارب ، وكان من أكثر المواد استعمالا ، أما في الوقت الحاضر فقد تم ادخال أوساط ارتكاز أخرى • عيب الورق الرئيس هو حدوث بعض الاختلاطات بين المناطق أثناء الامتزاز على جزيئات السلولوز •

تظهر خلات السلولوز cellulose acetate امتزازا أصغريا وتفصل المزيج الى مناطق منفصلة وواضحة • تشطف المركبات بسهولة وبمردود جيد ، ويحتاج الى كميات صغيرة من المواد • يمكن انجاز الفصل خلال ساعة بينما يحتاج الرحلان الكهربائي الورقي لمرور الليل • يستعمل هلام ــ الاغار Agar - gel لكونه شفافا في القياسات الضوئية • يستعمل في الرحلان الكهربائي المناعي لإمكان تحضيره على صفائح المجهر • يمتاز الاغار برخص ثمنه وسهولة تحضيره •

يحضر هلام ــ النشاء Starch - gel من حلمهة النشاء المتوافر تجاريا • تنفجر حبات النشاء بالتسخين لتشكيل الهلام • يعتمد حجم خلايا الهلام على كيفية التحضير ، ونوع النشاء المستعمل ، و pH الوسط ، وطبيعة المحلول الواقي • تنفصل الجزيئات في هلام ــ النشاء على أساس الحجم والشحنة • يعطي تحليل بروتينات بلازما الدم عددا كبيرا من العصابات •

يعد هلام بولي اكريل اميد Polyacrylamide - gel من أحدث المواد المستعملة في الرحلان الكهربائي • وهو شفاف يمكن تفرسه في الاشعة المرئية وفوق البنفسجية • تنفصل الجزيئات في هلام ــ بولي اكريل اميد على أساس حجم الجزيئات وشكلها وشحنتها •

المحلول الواقي

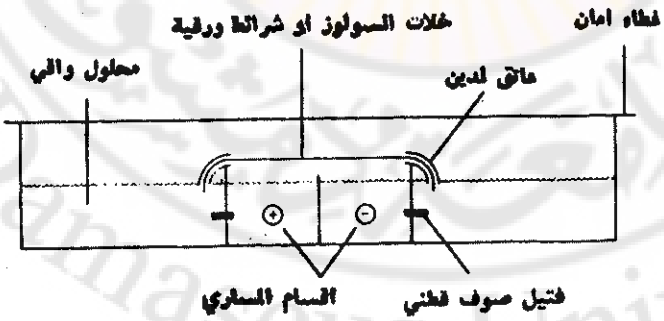
يجب انتقاء المحلول الواقي بعناية لتجنب تفاعله مع المركبات المبحوثة ، فمثلا تشكل البورات معقدات مع السكاكر • يختار pH المحلول الواقي بعد معرفة خواص المركبات المدروسة ، وبشكل عام يجرى الفصل في نقطة التعادل الكهربائي isoelectric point لأحد المركبات• يجب أن لا يسبب الـ pH المحلول تغيرات كيميائية أو فقدانا للحالة الطبيعية denaturation للجزيئات تحت الفحص •

الحقل الكهربائي

يستعمل الحقل الكهربائي ٢ ــ ٨ فولت / سم عند الفصل بحرارة الغرفة • واذا كانت قوة الحقل الكهربائي أكثر من ١٠ فولت/سم ، يسخن الجهاز وتضيع كمية من الماء بالتبخير ؛ فيتدفق المحلول الواقي من وعائه ليعوض الماء الضائع ، مما يسبب إزاحة المناطق ، كما يسبب التسخين الزائد فقدان البنية الطبيعية • يمكن استعمال قوة حقل كهربائي ١٠٠ فولت/سم للفصل السريع بمعدات خاصة •

اجهزة الرحلان الكهربائي

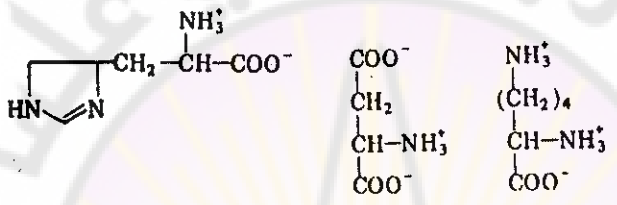
يرد مخطط جهاز الرحلان الكهربائي الافقي على الشكل (٢ــ١٣) • يتألف جهاز الرحلان الكهربائي من وعاءين يحويان محلولا واقيا ومن مسربين يتصل أحد هذين المسربين بالقطب الموجب لمنبع كهربائي والآخر بالقطب السالب •



شكل (٢ــ١٣) مخطط جهاز الرحلان الكهربائي الافقي

التجربة (٢ـ٩) : فصل الحموض الامينية بالرحلان الكهربائي الورقي .

تعتمد الشحن المحمولة على الجزيئات على pH الوسط ويمكن توضيح هـذه الحالة على ثلاثة حموض أمينيـة : حمـض الاسبارتيك ، الهيستيدين والليزين . لا يستعمل الرحلان الكهربائي بالتوتر المنخفض عادة لفصل المركبات منخفضة الوزن الجزيئي بسبب الانتشار ، ولكن توضيح العلاقة بين الشحن و pH الوسط مـع الحموض الامينية أسهل ممـا هـو عليـه في البروتينات أو الجزيئات الضخمـة الاخرى . يحمل الهيستيدين عنـد الـ pH ٧ر٦ شحنة صافيـة صفرا ، وحمض الاسبارتيك شحنة سالبة ، والليزين شحنة موجبة الجدول (٢ـ٥) .



الهيستيدين : الشحنة عند الـ pH = ٧ر٦ تساوي الصفر	حمض الاسبارتيك (ـ)	الليزين (+)

يمكن فصل هذه الحموض الامينية الثلاثة بسرعة بالرحلان الكهربائي .

المـواد اللازمـة	١٠
١. جهاز رحلان كهربائي افقي	٥
٢. جهاز تزويد القدرة Power pack	٥
٣. حموض امينية (حمض الاسبارتيك ، الهيستيدين ، الليزين ، ومزيج الحموض الثلاثة في محلـول واق تريـس ـ خـلات يحتوي على ١٠ غ/لترا غلوكوزا)	١٠ مل
٤. محلول واق تريس ـ خلات (محلول ٠ر٠٧ مول/لترا ، pH ٧ر٦) حجم يكفي لخمسة اوعية .	٥ حجوم
٥. كاشف النينهيدرين (يحل ٢ر٠ غ في ١٠٠ مل اسيتون قبـل الاستعمـال)	ـ
٦. شريط ورقي (١٠ سم × ٥ر٢ سم)	٦٠
٧. كاشف انيلين ـ ثنائي فنيل امين كما ورد في التجربة (٢ـ١٠)	ـ
٨. محلول واق ليموناتي (محلول ٠ر٠٧ مولا/لترا ، pH = ٣ر٠) حجم يكفي لخمسة أوعية .	٥ حجوم
٩. فـرن بالدرجة ١١٠° س	٥

الطريقة :

صب في كل قسم من قسمي المساري المحلول الواقي الى المستوى نفسه ، اضبط السوية بوضع ممص بينهما ، أزح الممص ، ثم ضع خمس قطع من ورق الترشيح كما في الشكل (٢ـ١٣) ، حمل بحذر خطا من مزيج الحموض الامينية الى اثنين منها متجنبا أطراف الورقة • حمل على كل واحدة من القطع الثلاث الباقية حمضا أمينيا واحدا ، ينجز الرحلان الكهربائي في آن واحد على القطع الخمس • رطب الورق من جهة كل مسرى لبضعة سنتيمترات واترك الباقي ليترطب حسب الخاصة الشعرية ، وافتح التيار الكهربائي فورا لتحقيق انتشار العينة الاصفري • أنجز الرحلان الكهربائي لمدة ٣ ساعات بقوة ٨ فولت/سم ، اقطع التيار ، واسحب القطع وجففها بالهواء ومن ثم بالفرن بالدرجة ١١٠°س • أظهر احدى قطع المزيج الحاوية الغلوكوز كما في التجربة (٢ـ٥) ، واغمس (أو بخ) بسرعة القطع الاربع الباقية بمحلول النينهيدرين المحضر حديثا • اترك القطع لتجف بالهواء للتخلص من الاسيتون ، واظهر الالوان بالتسخين لعدة دقائق بالفرن • حدد الحموض الامينية وقارن فيما بينها •

أعد التجربة مع محلول الليمونات الواقي ٠٫٠٧ مولا/لترا ، pH = ٣٫٠ ، وادرس النتائج بالاستعانة مع المعطيات الواردة في الجدول (٢ـ٣) ، وناقش وضع الغلوكوز •

التجربة ٢ـ١٠ : فصل بروتينات المصل بالرحلان الكهربائي على خلات السلولوز •

المبدأ

يوجد عدد ضخم من تطبيقات الرحلان الكهربائي في الطب ومخابر الكيمياء الحيوية ، ومن أحد الاختبارات التي تنجز غالبا دراسة تغيرات بروتينات المصل أثناء المرض • تكون الطريقة السريعة والملائمة لتحليل المصل هي طريقة الرحلان الكهربائي على خلات السلولوز الموضحة في التجربة التالية :

المواد اللازمة	
١• جهاز الرحلان الكهربائي الافقي	١٠
	٥

٢. جهاز تزويد بالقدرة Power pack ٥

٣. محلول الباربيتون الواقي Barbitone buffer (٠٧ر. مولا/ لترا ، pH = ٦ر٨) حجم يكفي لخمسة اوعية ٥ حجوم

٤. محلول تلوين البروتين Ponceau S protein stain (٢ غ/ لترا في محلول ٣٠ غ/لترا ثلاثي كلور حمض الخل TCA) ٢ لتر

٥. حمض خل (محلول ٥٪ حجما/لحجم) ٢ لتر

٦. مصـــل ٥ مل

٧. قطع خلات السلولوز (Oxoid Ltd) ١٠

٨. ورق واتمان (Whatman 3 MM) ١٠

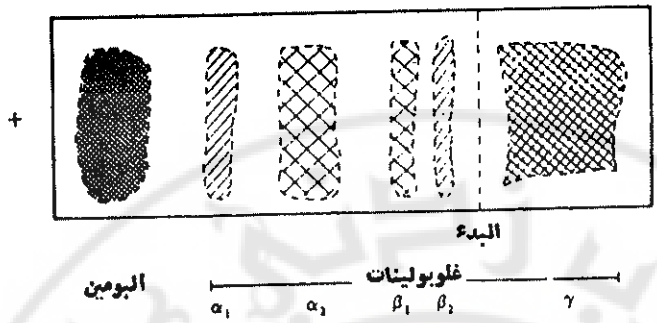
٩. ميثانول : ماء (٣ : ٢) ٥٠ مل

١٠. محلول الليمونات الواقي Citrate buffer (١ر. مولا/لترا ، pH = ٨ر٦) ٢٠ مل

الطريقـة :

رطب قطعة من خلات السلولوز (قياس ١٠ سم × ٥ر٢ سم) بوضعها في طبـق مسطح يحتوي على محلول واقٍ ، واسمح بتشرب المحلول من الاسفل بهز الطبق بلطف ، ثم اسحب القطعة بوساطة الملقط ، ونشفها بخفة بورق الترشيح ، وضعها في الجهاز • صل بين القطعة والمحلول الواقي بفتائل من ورق الترشيح • افتـح التيار واضبط شدته لتكون ٤ر٠ ميلي أمبيرا بالسنتيمتر وعلـى امتداد القطعة • حمل المصل على شكل خط بوساطة ماصة صغرية أو بأنبوب درجة الانصهار وعلى بعد ثلث القطعة من جهة المهبط • يتـم توجيه التحميل بوساطة مسطرة موضوعة عـلى طـول الوعـاء •

ينجز الرحلان الكهربائي بمدة ٥ر١ ـــ ٢ ساعة ، اقطع التيار وأزح القطعـة ، وشربها مدة ١٠ دقائق بمحلول Ponceau S • لا نحتاج للتسخين المسبق في هذه التجربة لان ثلاثي كلور حمض الخل TCA يثبت البروتينات من أجل التشرب • أزح الصباغ الزائد من القطعة بالغسيل مـرارا بمحلول حمض الخل ٥٪ • قـارن نموذج الرحلان الكهربائي الذي حصلت عليه مع النموذج الموضح على الشـكل (٢ـــ١٤) •



شكل (٢–١٤) فصل بروتينات مصل دم الانسان بوساطة
الرحلان الكهربائي على خلات السلولوز pH =٨٫٦)

أعد التجربة بعد ترسيب بعض البروتينات بالميتانول المبرد والجليد • يجب انجاز كل الخطوات بالدرجة صفر • اخلط ٢ مل مصلا مع ١ مل محلولا واقيا ليموناتي في أنبوب تثفيل • أضف ببطء مع الخضخضة الميتانول المائي المبرد – والجليد . اتركه مجمدا مدة ٣٠ دقيقة ، ثم ثفله عند ٣٠٠٠ g مدة ١٠ دقائق في مثفلة براد • أزح السائل الطافي وحل المترسب بـ ٢ مل محلولا ملحيا • أنجز الرحلان الكهربائي لكل من الرشاحة والراسب الذي حل وناقش النتائج •

التجربة (٢–١١) : الرحلان الكهربائي على هلام – بولي اكريل اميد .

المبدأ

بولي اكريل أميد • يحضر الهلام بوساطة بلمرة اكريل أميد ($CH_2 = CH . CO . NH_2$) وكمية قليلة من كاشف رابط عرضي ، ميتيلين ثنائي اكريل أميد (bis) $(CH_2 = CH . CO . NH_2)_2 . CH_2$ ، بوجود وسيط بيركبريتات الامونيوم • ويوجد أيضا رباعي ميتيل ايتيلين ثنائي أمين (TEMED) •

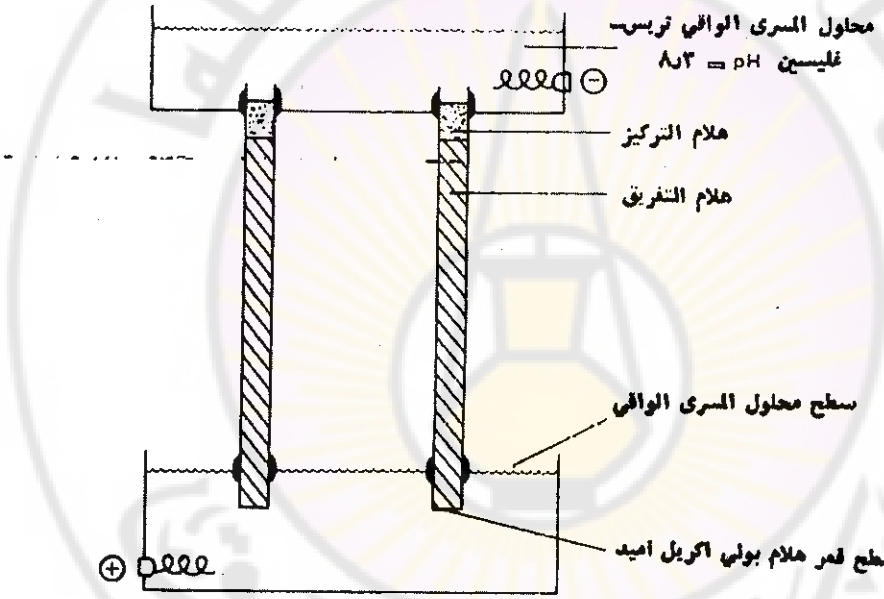
لبدء البلمرة وضبطها ، يسمح للمزيج الهلامي بالبلمرة في أنابيب مثبتة من

أسفلها بوساطة فنجان مطاطي • توضع طبقة من الماء فوق الهلام لتأمين سطح أفقي وأيضا لطرد الاكسجين الذي يثبط البلمرة •

يمكن تعديل حجم مسامات الهلام بتغيير تركيز أحادي الحد في المحلول الهلامي يناسب لفصل البروتينات ٥ر٧٪ أكريل أميد ، وتحتاج الجزيئات الاكبر مثل الحموض النووية الريبية الى هلام ذي مسامات أكبر أي ٥ر٢٪ أكريل أميد •

الجهاز

يرى الشكل (٢ــ١٥) تمثيل مخطط جهاز يستعمل من أجل الرحلان الكهربائي



شكل (٢ــ١٥) جهاز الرحلان الكهربائي على قضبان من بولي اكريل اميد

على قضبان هلام بولي اكريل أميد • يوجد فقط قضيبان لتوضيح الغرض • يجب أن تكون نسبة الهلام المكدس الى العصابة الحاوية تركيز العينة المراد فصلها كبيرة •وتكون حركة الرحلان الكهربائي لشوارد الغليسين أقل بكثير من حركة شوارد الكلور عند الفصل على الهلام ، وتكون حركة البروتينات وسطية تحتفظ بحدود واضحة بين هذه الشوارد • تسبق حدود المحلول الواقي الجزيئات المراد

فصلها ، وعند pH = ٩ر٨ تكون حركة الغليسين أكبر من حركة البروتين . ينضم أزرق بروموفينول الى أحد الهلامات كمميز . ويميز هـذا الصباغ الحدود بـين شوارد الغليسين وشوارد الكلور . تعطى طريقة الرحلان الكهربائي عصابات حادة ، يمكن رؤيتها في التجربة اللاحقة . وتسمى طريقة الفصل هـذه اسـم الرحـلان الكهـربائي القرصـي disc electrophoresis .

السـمية

أكريل أميد سام جدا ويشار الى ذلك على زجاجات الكاشف ، فيجب التعامل معه بحذر وتجنب ملامسة مواده للجلد .

المـواد اللازمـة **١٠**

محاليل التجهيز . حضر جميع المحاليل ما عدا A و B في اوعية معيارية سعة ١٠٠ مل مـع المـاء المقطر ، رشـح واحفظها بزجاجات بنية بالدرجة ٤°س

A. محلول التجهيز تريس : تريس ٦ غ ، غليسين ٨ر٢٨ غ ، مدده حتى ١ لترا بالماء (pH = ٣ر٨) — ١ لتر

B. محلول العمل تريس الواقي : مدد محلول التجهيز تريس بنسبة ١ الى ١٠ بالماء المقطر — ٤ لتر

C. تريس ٦ر٣٦ غ ، ١ مولا/لترا H Cl ٤٨ ميلي لترا ، TEMED ٢٣ر. ميلي لترا وماء حتى ١٠٠ ميلي لترا (pH = ٩ر٨) — ١٠٠ مل

D. تريس ٦٠ر. غ ، ١ مولا/لترا H Cl ٤٨ ميلي لتـرا ، TEMED ٤٦ر. ميلي لترا وماء حتى ١٠٠ ميلي لتـرا pH = ٦ر٧ اضبطه بمحلول Cl ؟ اذا احتاج الامر) — ١٠٠ مل

E. اكريل اميد ٢٨ غ ، ميتيلين ثنائي اكريل اميد (bis) ٧٤ر. غ ، ماء حتى ١٠٠ مل — ١٠٠ مل

F. اكريل اميد ١٠ غ ، bis ٥ر٢ غ ، ماء حتى ١٠٠ مل — ١٠٠ مل

G. ريبو فلافين ٤ غ ، ماء حتى ١٠٠ مل — ١٠٠ مل

H. سكروز (٤٠ غ/١٠٠ مل) — ١٠٠ مل

J. بيركبريتات الامونيوم Ammonium persulphate (١٤ر. غ/١٠٠ ميلي لترا) — ١٠٠ مل

محاليل العمل : حضر محاليل العمل بخلط محاليل التجهيز بالنسب التالية :

(i) محلول لتحضير شبكة ذات مسامات صغيرة : ١ جزءا من A ، ٢ جزءا من D و ١ جزءا من الماء ، pH = ٨ر٩ — ٤٠ مل

(ii) محلول لتحضير شبكة ذات مسامات كبيرة : ١ جزءا من C ، ٢ جزءا من F ، ١ جزءا من E و ٤ اجزاء من G ، pH = ٦ر٧ — ١٦ ملمتر

العينـات

مصل ، الالبومين ٥ مـغ/مل ، γ - غلوبلين ٢ مغ/مل، ترنسفيرين Transferrin ٢، مغ/مل(٢ مل من كل واحد) — ٢ مل

محاليل التلوين Staining solutions

اسود الاميد Amido black ١ غ/لترا في ٧٪ حجما/لحجم حمض خل	٥٠٠ مل
ازرق كوماسي Coomassie blue ٢ر٥ غ/لتـرا في ٢٠٠ غ/لتر TCA	٥٠٠ مل
حمض الخل ٧٪ حجما/لحجم	٣ لترات
صباغ Tracking (ازرق البروموفينول ١ر٠ غ/لترا)	—

الادوات اللازمة

جهاز الرحلان الكهربائي على هلام بولي اكريل اميد انابيب لتحضير اعمدة بولي اكريل اميد	٥
ضوء تالقي fluorescent .	٥
ابـر ومحاقن	٥

الطريقـة

ثبت الانابيب الزجاجية بوضعها على الفناجين المطاطية واحكم إغلاقها وحضـر الهلام كما هو مبين في الاسفل •

هلام الفصل (٧٪ بولي آكريل أميد) اخلط حجما من المحلول (J) (المحلول الحفاز) مع حجم من المحلول (i) (محلول المسامات الصغيرة) • واحمل الـى كل

أنبوب زجاجي ٩ر٠ ميلي لترا من المزيج • ثم أضف عدة قطرات من الماء بحذر على السطح المتشكل • واترك الهلام ليتبلمر مدة ٢٥ــ٤٠ دقيقة •

هلام التركيز Spacer gel (٥ر٢٪ بولي اكريل أميد) •

أزح الماء المغطي لأعمدة بولي اكرين أميد وصب طبقة بارتفاع ١٥ر٠ ميلي لتر من محلول المسامات الكبيرة فوق القمة • غط المحلول مجددا بالماء وضع الانابيب تحت ضوء تألقي حتى تكتمل بلمرة الهلام (٢٠ــ٥٠ دقيقة) • أخيرا غط الهلام بطبقة من (B) تريس الواقي المخفف pH = ٨ر٣ •

تحميل العينة

اخلط العينات التالية مع محلول (H) السكروز ٤٠٪ وزنا/لحجم وحملها فوق قمة الهلام تحت المحلول الواقي • أضف قليلا من أزرق بروموفينول الى أحد نماذج العينة لتعليم حدود الشوارد •

رقم الانبوب	العينة
١ و ٢	٥٠ مكرولترا مصلا
٣ و ٤	٥٠ مكرولترا البومينا (٥ مغ/ميلي لترا)
٥ و ٦	٥٠ مكرولترا γ ــ غلوبلينا (٢ مغ/ميلي لترا)
٧ و ٨	٥٠ مكرولترا ترنسفيرين (٢ مغ/ميلي لترا)

الرحلان الكهربائي

افصل الفناجين المطاطية من أسفل الانابيب ، وثبت هذه الانابيب في خزان المحلول الواقي ، وأنجز الرحلان الكهربائي بشدة تيار تعادل ٥ ميلي امبير لكل أنبوب حتى يصل أزرق البروموفينول الى الطرف الآخر من الانبوب •

التلوين

اقطع التيار الكهربائي ، أزح الهلام بادخال ابرة المحقن المليء بالماء المقطر بين

الهلام وجدران الانبوب ، وبحذر انزع الماء من المحقن مع تدوير الانبوب • اجمع كل عمود هلامي في أنبوب اختبار ولونه باضافة أسود الاميد أو ازرق الكوماسي• اغسل الزيادة مع الملون بنقـع العمود الهلامي في محلول ٧٪ حمض خل ، أعـد الغسيل حتى تتوضح المناطق البروتينية الملونة على أرضية صافية لعمـود الهلام • ارسم مخططا للفصل وقارن النتائج مع تلـك التي حصلت عليها بطريقة الرحـلان الكهربائي على خلات السلولوز في التجربة (٢ـ١٠) •

□ □ □

Damascus University

الفصل الثالث

الشـــــحوم

طرق فصل الشحوم

تفصل الشحوم عادة من النسج اللامائية (المجففة) بوساطة المحلات العضويـة المناسـبة (أغـوالا ، ايتـرات ، بنـزولا ، تولوينا ، بنزينا ، أسيتونا ، بيريدينا ، كلوروفورما ، رباعي كلور الكربون ، ايتر البترول وغيرها) .

يعتمد مبدأ فصل الشحوم على اختلاف انحلاليتها في مختلف المحلات فبعضها ينحل جيدا بالايتر ولكنه سيء الانحلال بالاسيتون (الفسفو ليبيدات مثلا) وغيرها ينحل جيدا بالبنزول ولكنه عديم الانحلال بالغول (الكولسترول والسريروزيدات وغيرها) . يتم استخلاص الشحوم الادخارية (كالزيت مثلا) بسهولة . أما الشحوم المرتبطة فان فصلها يتم بعد تفكيك الروابط البروتينية الشحمية ، وهذا يتم إمـا باستخدام عوامل حلمهة أو بغلي المصدر الحيوي المدروس مع الاغوال ، حيث يتم في الحالة الاخيرة فصل الشحوم دون تعرضها لتغيرات بنيوية .

معايرة كمية الشحوم العامة في المصادر الحيوية

أكثر طرق المعايرة العامة للشحوم هي طريقة ترك وزن معين مـن المادة الحيوية منقوعا في مزيج الكلوروفورم ـ ميتانول لفترة طويلـة . وتحسب كمية الشحوم النسبية من معرفة الفرق في وزن المادة قبل النقع وبعده . ويتـم تحديـد كميـة الشحوم في المادة إما بشكلها الجاف تمامـا أو بالشكل المجفف على الهواء ، وفي الحالة الاخيرة يتم تحديد كمية الماء الموجودة في المادة الحية بشكل موازٍ لمعايرة

الشحوم فيها وذلك لإجراء الحسابات ومعرفة تركيز الشحوم في المادة الجافة بشكل مطلق • وللحصول على معطيات يركن اليها يتم عادة اجراء تجربتين متوازيتين •

الادوات والمواد اللازمة

حاضنة كهربائية ، حمام مائي ، ميزان عادي ، ميزان تحليل دقيق ، ملوق بطول ١٥ سم ، حوجلة سعة ٢٥٠ مل ، هاون بورسلان بقطر ٩ سم ، مقياس مدرج سعة ١٠٠ مل ، وعاء تبلور ، كأس للوزن (علبة بأبعاد ٤ر٥ × ٧ر٥ سم) ، مجفف زجاجي ، ورق ترشيح مرصوص (كتيم) (بأبعاد ١٠×١٨ و ١٢×٢٠ سم) ، بذور (عباد الشمس ، لوز ، قطن وغيرها) ، ميتانول ، كلوروفورم •

طريقة العمل

يوزن ١ ــ ١ر٥ غ من البذور النباتية المدروسة ثم توضع في الهاون وتسحق جيدا وتنقل الى ظرف صيدلاني من ورق الترشيح (١٠×١٨ سم) المجفف في الدرجة ١٠٥°س والموزون بدقة (على الميزان التحليلي) • يوزن الظرف مع المادة الموجودة فيه على الميزان التحليلي نفسه ويحسب وزن المادة الحية من الفرق بين وزن الظرف المليء والفارغ • ويتعلق وزن المادة النباتية المأخوذ بحسب كمية الزيوت التي تحتوي عليها •

فمثلا يؤخذ من البذور الحاوية أكثر من ٥٠٪ زيتا كالخشخاش والجوز الهندي ، نحو ١ــ١ر٥ غ • ومن البذور الحاوية ٣٠ــ٥٠٪ زيتا نحو ٢ــ٢ر٥ غ وفي الحالات التي تقل فيها كمية الزيت عن ٣٠٪ يؤخذ نحو ٣ــ٣ر٥ غ من هذه البذور •

يوضع الظرف الحاوي على البذور المسحوقة في ظرف أكبر منه (مصنوع من ورق الترشيح ذات الابعاد ١٢×٢٠ سم) ويوضع هذا الاخير في حوجلة سعة ٢٥٠ مل ويصب فوقها ٣٥ ــ ٤٥ ميلي لترا من الميتانول وبعدها ٣٥ ــ ٤٥ ميلي لترا كلوروفورما • يخضخض محتوى الحوجلة ثم تسد بسدادة وتترك للجلسة القادمة في مكان مغلق •

بعد مرور أسبوع على العينة في وضعها السابق تؤخذ هذه العينة وتغسل ثلاث مرات بالكلوروفورم وتوضع في وعاء زجاجي تحت ساحبة الهواء ليجف

المحل تماما ثم توضع في مجفف لمدة ٢ر٥ ساعة بالدرجة ١٠٥°س ، ثـم تنقل الـى الكأس الخاص بالوزن وبعد التبريد لمدة ٤٥ دقيقـة في المجفف توزن . اذا ظهـر على الظرف الصيدلاني لون أصفر أو بني فهـذا دليل علـى تأكسد الزيوت التي كان استخلاصها سيئا وناقصا ، وفي هذه الحالة يجب اعادة المحل مع زيـادة حجم المحل المستخلص وزيادة فترة الاستخلاص (يتم عادة اجراء عدة تجارب متوازية ، مـن ٢ـ٣) .

يتم تحديد نسبة الرطوبة في المادة الحية المجففة على الهواء وذلك بتجهيز عينات خاصة موازية للتجارب السابقة ، حيث يؤخـذ في كأسين للوزن موزونة بدقـة ، نحو ١ غ من البذور المسحوقة توزن بدقة ٠ر٠٠٠٢ غ ، وبعد الوزن يترك الكأسان في الفرن الكهربائي لمدة ٤ـ٦ ساعات بالدرجة ١٠٥°س بعد رفع أغطيتها .

يغلق الكأسان بالاغطية وينقلان الى المجفف الزجاجي ويبردان لمدة ٤٥ دقيقة ثم يوزنان على الميزان نفسه . تعاد عملية التجفيف لمدة ساعتين ثم التبريد والوزن حتى يصبح الاختلاف في وزن العينة الواحدة بين التجفيفين لايتجاوز ٠ر٠٠٠٢ غ ، ثم تحسب نسبة الماء من المعادلة :

$$C = \frac{100 \times (a - a_1)}{a}$$

حيـث :

C ـ نسبة المـاء المئويـة .

a ـ كتلة الماده المدروسة قبل التجفيف .

a_1 ـ كتلة المادة المدروسة بعد التجفيف .

ترتب نتائج القياسات أثناء تحديد نسبة الماء بجدول على الشكل التالي :

وزن الكأس الفارغ (غ)	وزن الكأس مع العينة (غ)	وزن العينة	وزن الكأس بعد التجفيف الاول وبعد كل تجفيف	وزن العينة بعد كل عملية تجفيف	نسبة الماء المئوية

تحدد كمية المادة الشحمية بفرق الوزن في العينة قبل استخلاص الشحوم بالمحلات العضوية وبعده . يجب أن لا يبلغ الاختلاف بين تجربتين متوازيتين لمعايرة الشحوم أكثر من ١ ــ ٠ر١٥٪ .

تسجل النتائج في جدول كالتالي :

وزن الماده المجففة بالهواء مع الظرف قبل الاستخلاص (غ)	وزن الظرف الجاف الفارغ (غ)	وزن المادة المجففة بالهواء (غ)	كمية الماء ٪ نسبة الرطوبة	وزن الماده الجاف المطلق	وزن المادة مع الظرف بعد الاستخلاص (غ)	وزن المادة بدون الظرف بعد الاستخلاص (غ)	كمية الشحوم في المادة الجافة المطلقة (غ)

لحساب النسبة المئوية لكمية الشحوم في المادة المدروسة (محسوبة بالنسبة للوزن الجاف المطلق) من الضروري قبل كل شيء حساب الوزن الجاف بالهواء بالنسبة للوزن الجاف المطلق . فمثلا تبين أن المادة المدروسة تحتوي على ٤ر٣٪ ماء وأن وزن المادة في العينة المدروسة المجففة على الهواء يساوي ١ر٢٥ غ فهذا يدل على أن كمية الماء في العينة تساوي $\frac{١ر٢٥ \times ٤ر٣}{١٠٠}$ = ٠ر٠٥ غ . ومن هنا يكون الوزن الجاف المطلق مساويا ١ر٢٥ ــ ٠ر٠٥ = ١ر٢ غ يحسب بعد ذلك وزن المادة الدسمة المستخلصة من نقصان وزن العينة بعد الاستخلاص . فمثلا اذا كان الوزن الجاف المطلق قبل الاستخلاص ١ر٢ غ وبعد الاستخلاص ٠ر٤٢ غ فيكون وزن المادة الشحمية مساويا ١ر٢ ــ ٠ر٤٢ = ٠ر٨٧ غ . وانطلاقا من هذه النتائج تكون النسبة المئوية للشحوم في النوع النباتي المدروس (بالنسبة للوزن الجاف المطلق) مساويا :

$$C = \frac{١٠٠ \times ٠ر٧٨}{١ر٢٠}$$

طريقة الاستخلاص السريعة والمعايرة الكمية لشحوم النسيج العضلي
(طريقة كيلمان وليباسكوفسكي)

تتعرض الشحوم أثناء عملية استخلاصها من المصادر الحيوية الى الاكسدة والتفكك الذي يسبب تشكل نواتج ثانوية ، ولهذا يجب أن تتم عملية الاستخلاص بسرعة وبشروط تتعرض أثناءها الشحوم لأقل التأثيرات ضررا من ارتفاع درجة الحرارة وأكسجين الهواء والضوء والشوارد المعدنية وغيرها .

تستخدم طريقة الاستخلاص والتنقية في الشروط المخففة على نطاق واسع حاليا وبمردود جيد . يستخدم للاستخلاص مزيج الميتانول والكلوروفورم ، الذي يفكك معقدات البروتينات الشحمية (الليبوبروتينات) ويعطي بالوقت نفسه امكانية استخلاص الشحوم بشكل شبه تام . يتم الاستخلاص التام لشحوم النسج عندما يتم سحق النسيج الحي ومجانسته مع مزيج الميتانول والكلوروفورم بالنسبة التي تحقق تشكل نظام أحادي الطور مع الماء الذي يحتوي عليه النسيج . تؤدي اضافة زيادة من الكلوروفورم والماء ، الى تشكل نظام ثنائي الطور يمكن بسهولة فصل مكوناته . تحتوي طبقة الكلوروفورم على الشحوم المنحلة وتنعدم فيه عمليا الشوائب غير الشحمية . أما ضياع الشحوم في الطبقة المائية ـ الميتانولية فهو قليل جدا . يتم بهذه الطريقة استخلاص الشحوم من النسج الحيوانية والنباتية على السواء .

الادوات والمواد اللازمة

جهاز الرج ، ميزان عادي ، حمام مائي ، حاضنة كهربائية (أو مجفف زجاجي ذو صنبور ، يحتوي على خماسي أكسيد الفسفور) ، مفرمة لحمة ، زجاجات بلاستيكية أو زجاجية مجهزة بسدادات محكمة ، زجاجة وزن ، ملعقة وزن (ملوق) بطول ١٥ سم ، قضبان تحريك زجاجية ، مقاييس مدرجة سعة ١٠٠ و ٢٥٠ و ٥٠٠ مل ، قمع بوشنر بقطر ٨ سم ، حوجلة للتقطير تحت الفراغ (بونزن) ، مخلية هواء زجاجية ، قمع فصل سعة ٥٠٠ مل ، ميزان حرارة ، ورق ترشيح ، قطعة لحم مفرومة (نسيج عضلي) ، ميتانول ، كلوروفورم ، خلات الزنك (٢٪) .

طريقة العمل

يؤخذ وعاء زجاجي أو بلاستيكي مجهز بسدادة ويوضع فيه ٣٠ ــ ٤٠ غ من اللحم المفروم (النسيج العضلي) الموزون بدقة ٠١ر٠غ ٠ يصب فوقه ١٣٠ مل من الميتانول ثم يحرك ويخلط النسيج حتى تتشكل كتلة متجانسة في الوسط ٠ يضاف ٦٥ ميلي لترا كلوروفورما ويوضع الوعاء على الزجاج الميكانيكي لمدة ١٠ دقائق (١٦٠ ــ ١٧٠ درجة في الدقيقة) ٠ يضاف بعدها ٦٥ ميلي لترا كلوروفورما أخرى ويستمر بالرج لمدة ٥ دقائق ثانية ٠ ثم يضاف ٦٥ ميلي لترا من محلول خلات الزنك (٢٪) وتتابع عملية الرج لمدة نصف دقيقة ٠

يرشح محتوى الوعاء على ورقة الترشيح في قمع بوشنر مع خلخلة بسيطة ، يفضل أثناء عملية الترشيح ضخ تيار من الهواء الحاوي غاز الكربون والآزوت على النسيج العضلي الموجود على قمع بوشنر ٠ بعد انتهاء الترشيح يخفض الضغط وذلك لامتصاص المادة المحلة بشكل أعظمي ٠ يؤخذ النسيج العضلي الجاف وورقة الترشيح من قمع بوشنر وتعاد الى وعاء الاستخلاص ، وتعاد عملية الاستخلاص باستخدام ١٠٠ ميلي لترا كلوروفورما ولمدة ١٠ دقائق٠ثم يرشح فوق الحوجلة السابقة نفسها ، ويغسل الراسب المتبقي وقمع بوشنر ووعاء الاستخلاص بـ ٥٠ مل كلوروفورما تجمع مع الرشاحتين ثم ينقل المحلول كاملا الى قمع الفصل (سعة ٥٠٠ مل) وبعد الخضخضة وترك القمع ، ينفصل المحلول فيه الى طبقتين ، تنقل طبقة الكلوروفورم الى مقياس مدرج سعة ٥٠٠ مل لتحديد كمية المحلول ٠ يؤخذ حجم معين من هذا الكلوروفورم (يحتوي تقريبا على ٢٠٠ ــ ٣٠٠ ملغ من الشحوم) وينقل الى كأس الوزن المجفف حتى الوزن الثابت ، ويبخر على حمام مائي في الدرجة ٤٠ ــ ٥٠° س ٠

ينصح لحماية الشحوم من التأكسد أثناء التبخير اعطاء تيار من الآزوت ٠ يجفف الكأس مع الراسب ، حتى الوزن الثابت في مجفف زجاجي فوق خماسي أكسيد الفسفور أو في فرن كهربائي بالدرجة ١٠٥°س ٠

تحسب الكمية النسبية للمواد الدسمة (غ٪) في النسيج المدروس C ٠

$$C = \frac{a \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot m}$$

حيث :

a — كمية الشحوم في حجم الكلوروفورم المعرض للتبخير (غ) .
V — الحجم الكلي لطبقة الكلوروفورم بعد عملية الاستخلاص (مل) .
V_1 — حجم الكلوروفوم المأخوذ للتبخير (مل) .
m — وزن النسيج المأخوذ للاستخلاص (غ) .

تحسب (a) من الفرق في وزن الكأس قبل تبخير محلول الشحوم في الكلوروفورم وبعده .

من الثابت أن زيادة فترة الاستخلاص لا تؤدي الى زيادة كمية الشحوم المستخلصة . أما اجراء عملية استخلاص اضافية بوساطة ٢٠٠ مل كلوروفورم ولمدة ٣٠ دقيقة مع الخضخضة على الجهاز تؤدي الى زيادة ٥ر١٪ من الشحوم . وإن هذا الضياع في كمية الشحوم يعد تافها جدا في أغلب عمليات التحليل .

إن الطريقة المذكورة أعلاه تعطي نتائج جيدة (± ٢٨ر٠) ، والشروط المخففة للاستخلاص تجعل هذه الطريقة جيدة الاستخدام لدراسة بنية الشحوم المستخلصة وخواصها .

استخلاص وتفريق الدسم ، استخلاص المواد الدسمة من الحليب

الادوات والمواد اللازمة

أنابيب اختبار ، مقياس مدرج سعة ١٠ مل ، وعاء تبخير سعة ٥٠ مل ، حمام مائي ، كربونات الصوديوم (١٠٪) ، الايتر الايتيلي .

طريقة العمل

يؤخذ ٦ ميلي لترات من الحليب كامل الدسم ويضاف اليها ٢ مل من محلول كربونات الصوديوم ١٠٪ ، يحرك جيدا ثم يضاف اليها ٥ ميلي لترات من الايتر الايتيلي ثم يخضخض جيدا . بعد ترك الانبوب ليهدأ تصب طبقة الايتر في وعاء التبخير ويبخر حتى الجفاف على حمام مائي مسخن بشكل مسبق (يتم العمل

تحت ساحبة الهواء مع اطفاء جميع مصادر الحرارة واللهب) ، بانتهاء التبخر يتبقى في الوعاء مادة زيتية هي دسم الحليب .

تفاعلات الكشف الكيفي على الدسم والزيوت

الادوات والمواد اللازمة

زجاجة ساعة أو لوحة زجاجية ، زيت نباتي ، حمض الاوسميوم (١٪) .

طريقة العمل

توضع قطرة من الزيت النباتي على زجاجة ساعة وتضاف اليها قطرة من محلول حمض الاوسميوم (١٪) فتتلون قطرة الزيت بلون أسود . يمكن استخدام صباغ السودان III بدلا من حمض الاوسميوم وهو يلون الزيت بمختلف مشتقات اللون الاحمر . وهذه الكواشف تستخدم كمشعرات مكروكيميائية للزيوت والدسم حيث تؤخذ مقاطع من النسج الحية (الحيوانية أو النباتية) وتبلل بواحد من هذه الكواشف وتدرس تحت المجهر ، فيلاحظ تلون قطرات الزيت في هذه المقاطع بلون أسود أو أحمر .

كشف الفليسرين في الدسم (تفاعل الاكرولين)

الادوات والمواد اللازمة

أنابيب اختبار ، زيت نباتي ، شمع ، ورق ترشيح ، ثاني كبريتات البوتاسيوم اللامائية ، نترات الفضة (محلول ١٪) ، هدروكسيد الامونيوم (محلول ٥٪) ، محلول الفوكسين (كاشف شيف ، انظر الكواشف) .

طريقة العمل

تؤخذ في أنبوب اختبار عدة قطرات من الزيت (أو أي دسم آخر) وتضاف اليه خمسة أضعاف كميته من مسحوق ثاني كبريتات البوتاسيوم اللامائية . يسخن الانبوب بحذر ولكن بشدة (تحت ساحبة الهواء) حتى لحظة انطلاق الابخرة البيضاء الكثيفة . تشم بحذر شديد رائحة الاكرولين الكريهة . واذا غمرت في هذه الابخرة ورقة ترشيح مبللة بمحلول نترات الفضة النشادرية (كاشف تولانز) فان هذه الورقة ستسود نتيجة ترسب الفضة المعدنية . كما يمكن غمر ورقة ترشيح مبللة

بكاشف شيف عديم اللون في أبخرة الاكرولين المنطلقة فيلاحـظ بأن لونها يتحول الى الاحمر • إن التفاعلين السابقين اللذين يحدثان على ورقة الترشيح هما تفاعلان نوعيان لكشف الالدهيدات ـ الاكرولين في هذه التجربة •

يعاد الاختبار ولكن باستخدام الشمع بدلا من الزيت أو الدسم •

يستخدم تفاعـل الاكرولـين لكشف الغليسريـن في الشحوم ، حيث يتحول الغليسرين بالتسخين وبوجود المواد النازعـة للمـاء (ثاني كبريتات البوتاسيوم ، حمض البور أو كبريتات المغنزيوم) ، الى الاكرولين فاقدا جزيئي ماء وفق التفاعل :

$$\begin{array}{c} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} \xrightarrow[KHSO_4]{\text{تسخين}} \begin{array}{c} CH_2 \\ \| \\ CH \\ | \\ CHO \end{array} + 2\,H_2O$$

Glycerol Acrolein

أما الشحوم التي لا تحتوي على غليسرين (كالشموع والستيرولات وغيرها) فهي لا تعطي تفاعلا ايجابيا في كشف الاكرولين •

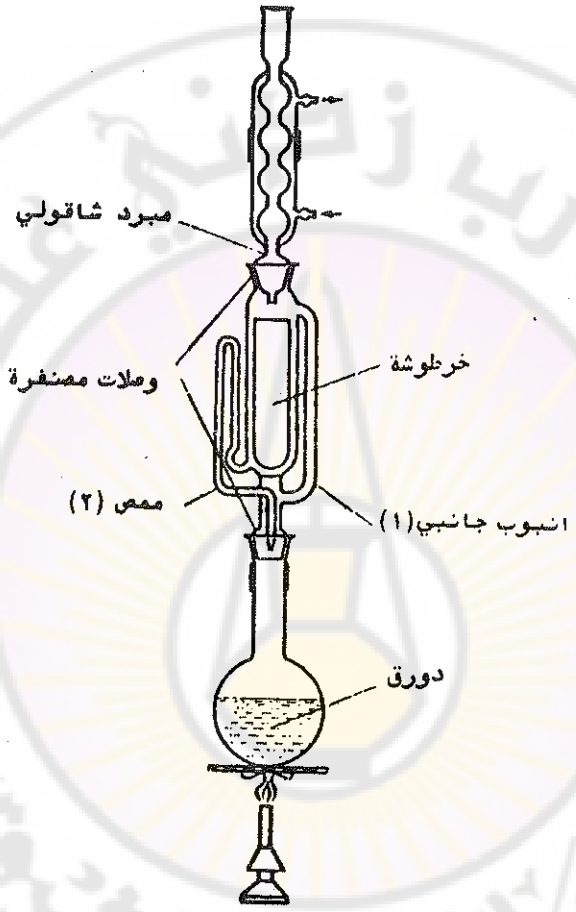
المعايـرة الكميـة للدسـم

(معايرة الشحوم الحرة بطريقة سوكسيليه)

يعتمد مبدأ هذه الطريقة الكلاسيكية على امكان عـدد من المحلات العضوية (الايتر الايتيلي ، ايتر البترول ذي درجـة الغليان أقل مـن ٦٠ درجـة مئويـة ، الكلوروفورم ، رباعي كلـور الكربون ، ثنائي كلور الايتان وغيرهـا) استخلاص الشحوم الحرة كميا من المادة النباتية أو الحيوانية الجافـة • وغالبا ما يستخدم في تفاعلات الاستخلاص الايتر الايتيلي ، وهو يجب أن يكون حـديث التقطير وجافا وخاليا من فوق الاكاسيد •

يحل الايتر الايتيلي الدسم (الغليسريـدات الثلاثيـة) والحموض الـدسمة والستيرولات والليسيتين والاصبغة (كالكلوروفيل مثـلا) والشموع والزيـوت

العطرية وغيرها . ونظرا لعدم التجانس هذا في الناتج فانه يسمى عادة « الـدسم الخـام » .



شكل (٣ـ١) جهـاز سـوكـلية

يبين الشكل (٣ـ١) جهاز سوكسليه . حيث تسخن الحوجلة مع المحل عـلى حمام مائي كهربائي ذي حلزون مغطى . يجب أن لا تزيد كمية المحل عن ثلاثة أرباع الحوجلة . أما المادة الحيوية المعرضة للاستخلاص فتوضع في القسم المتوسط بعد

جمعها في خرطوشة أو مغلف من ورقة الترشيح . يمرر تيار من الماء البارد عبر المبرد لتكثيف أبخرة المحل بشكل لايتعرق معه . كما يجب عدم تجمع الرطوبة على فوهات الجهاز المسنفرة والتي من الافضل حمايتها بوساطة قطع من ورق الترشيح.

يمكن معايرة كمية الشحوم في العينة المدروسة بطريقتين :

١ ــ الطريقة المباشرة (تبخير المحل من الحوجلة ويتبقى فيه راسب الشحوم المستخلصة .

٢ ــ بطريقة غير مباشرة (ينقص وزن العينة خلال عملية الاستخلاص نتيجة لفقدانها الشحوم بهذه العملية) .

فعند تطبيق الطريقة الاولى يبخر الايتر الموجود في الحوجلة والحاوي الشحم المستخلص (يتم التبخير في تيار من غاز الكربون أو الآزوت وذلك لمنع أكسدة الحموض الدسمة اللامشبعة) . يجفف الشحم المتبقي في الحوجلة إما بتيار من غاز خامل مسخن للدرجة ١٠٠° س ، أو في مجفف زجاجي تحت الفراغ . توزن الحوجلة الحاوية الشحم المستخلص والجاف ، ويكون الفرق بين وزنها قبل الاستخلاص ووزنها بعد الاستخلاص والتجفيف هو وزن المادة الشحمية المستخلصة .

أما تحديد كمية الشحوم بالطريقة الثانية ــ نقص وزن العينه الناجم عن الاستخلاص ، فهو أبسط من الطريقة الاولى وأكثر ثقة ، حيث لا يحتاج الى دراسة الشحم ذاته . وفيما يلي الخطوات المتبعة لتحديد الشحوم بهذه الطريقة .

الادوات والمواد اللازمة

جهاز سوكسليه ، ميزان تحليلي ، خزانة تجفيف كهربائية ، مجفف زجاجي ، ورق ترشيح منقى من الشحوم ، كأس للوزن (علبة) ، هاون بورسلان بقطر ٩سم، مادة أولية نباتية (بذور أو قلب الجوز أو غيرها) ، ايتر ايتيلي (جاف خال من فوق الاكاسيد) ، محلول برمنغات البوتاسيوم ٤٪ ، محلول هدروكسيد الصوديوم ٤٠٪ .

تنقية الايتر الايتيلي

يمزج ٥٠٠ ميلي لتر من الايتر مع ٥٠ ميلي لترا من محلول برمنغنات البوتاسيوم ٤٪ و ٥ ميلي لترات من محلول هدروكسيد الصوديوم أو هدروكسيد البوتاسيوم ٤٠٪. بعد التحريك الجيد يترك المزيج لمدة ليلة في الظلام، ثم ينقل الى قمع الفصل. ترمى الطبقة السفلية المائية أما الطبقة العلوية الايترية فتغسل ٥ـ٦ مرات بالماء المقطر بنسبة ١:٢ . يجفف الايتر الناتج بوساطة كبريتات الصوديوم اللامائية لمدة يوم كامل ثم يقطر ويحفظ في الظلام . يمكن التأكد من انعدام فوق الاكاسيد في هذا الايتر بوساطة التفاعل مع يود البوتاسيوم .

معايرة المواد الشحمية

يتم في العينة المجففة . اذا كان التجفيف قد أجري في خزانة التجفيف بالدرجة ١٠٠ ـ ١٠٥° س فان الحموض الدسمة غير المشبعة ـ أحد مكونات الزيوت النباتية ـ تكون قد تعرضت للاكسدة بدرجة كبيرة . ومن المعروف أن استخلاص الزيت النباتي المتأكسد من العينة عملية صعبة ، مما يسبب انخفاض نسبة الاستخلاص . ولهذا يتم تجفيف العينة فقط في خزانة تجفيف مع تفريغ الهواء وضخ تيار من غاز الكربون أو الآزوت .

يسحق نحو ٢ غ من العينة في هاون البورسلان حتى التجانس التام (تسهل عملية الاستخلاص في المادة الاولية المسحوقة عنه في المادة رديئة السحق) . تنقل المادة النباتية المسحوقة الى مغلف مصنوع من ورق الترشيح عديم الشحم . يجفف المغلف قبل عملية الاستخلاص حتى الوزن الثابت ويوزن بدقة على الميزان التحليلي . توضع المادة المدروسة في الظرف بعد وزنه ويوضع بدوره في القسم المتوسط من جهاز سوكسيله . يوضع عادة في الجهاز الواحد عدة ظروف تحتوي على عينات مختلفة . يجب أن يكون القسم المتوسط مليئا بالايتر بشكل مسبق وذلك حتى تكون المادة النباتية المدروسة محاطة كليا بالايتر ، ويمكن ايضا تبليل الظرف بشكل مسبق بالايتر مع الاخذ بعين الاعتبار أن جزءا من الشحوم سيتحول الى الشكل المنحل أثناء ذلك .

توصل أجزاء جهاز سوكسليه ثم يمرر تيار المـاء عبر المبرد ثم يوصل مصـدر التسخين • يجب أن يوضع جهـاز سوكسليه بشكل عمودي تمامـا • تتعلق فترة الاستخلاص بطبيعة المادة المدروسة وبدرجة سحقها وبوزنها وبسرعـة ملء القسم المتوسط بالايتر المتقطر من الحوجلة • فاذا كان الجهاز مثلا يعمل بسرعة يمتلىء معها القسم المتوسط ما بـين ١٠ ــ ٢٠ مرة بالساعة فيمكن أن يتم الاستخلاص التـام للشحوم ما بـين ٥ــ١٢ ساعـة • هـذا وفي بعض الاحيان يجب أن تستمر عملية الاستخلاص فترة أطول•وللتأكد من انتهاء عملية الاستخلاص،يمكن أن يسحب من القسم المتوسط بعد إيقاف عمل الجهاز ، وبوساطـة ماصة ، كمية قليلة مـن الايتر ووضعها على ورقة ترشيح • إن غياب التبقع بعـد جفاف الايتر دليل عـلى انتهاء الاستخلاص •

بعد انتهاء الاستخلاص يرفع الظرف الخالي من الشحوم مـن الجهاز ويجفف أولا على الهواء تحت ساحبة الهواء فوق قطعة مـن الزجاج ثـم وبعد تبخر الايتر يوضع في خزانة التجفيف بالدرجة ١٠٥° س حتى ثبات وزنه (في كأس الوزن) • يحتاج التجفيف الكامل عادة الى ٥ ساعات وتتم عملية الوزن على الميزان التحليلي•

يتم عادة تحديد نسبة الرطوبة في المادة المدروسة عـلى عينة مستقلة (كما مر سابقا) • ومن الافضل اجراء التجفيف في جهاز التجفيف تحت الفراغ مدة ٦ ــ ٧ ساعات بالدرجة ٧٠ ــ ٧٥°س ، ثم بابقائه في مجفف تحت الفراغ لمدة ٣٠ دقيقة• تحدد كمية الماء بالفرق في وزن العينة قبل التجفيف وبعده •

تحسب كمية المادة الشحمية بالنسبة المئوية لها في الوزن الجاف المطلق للمادة (معادلة الحساب صفحة ٦٧) •

تحديد ثوابت المواد الدسمة (القرائن)

تحديد درجة إشباع الدسم

تتعلق درجة عدم الاشباع في المـادة الـدسمة بكمية الحموض الدسمة غير المشبعة في بنيته • ان كل رابطة مزدوجة قادرة على ضم ذرتي هالوجين، ويتم تحديد درجة عدم الاشباع عادة بقرينة اليود • وتقيس قرينة اليود كمية غرامات اليود التي تنضم الى ١٠٠ غ من المادة الدسمة •

إن قرينة اليود واحدة من أهم القرائن الكيميائية للدسم (الزيوت) فهي تحدد درجة عدم الاشباع في هذه الزيوت وبالتالي امكان جفافها ومرارها وغيرها من التغيرات التي يمكن أن تطرأ على هذه الزيوت نتيجة الحفظ والمعالجة الغذائية والتكنولوجية .

بالاضافة الى اليود تتفاعل بقية الهالوجينات مع الرابطة المزدوجة كالكلور والبروم ولكن هذه الاخيرة تتفاعل بالاضافة لانضمامها للرابطة المزدوجة مستبدلة ذرات الهدروجين في الجذور الالكيلية المشبعة ضمن الجزيئات . بينما يتفاعل اليود في شروط معينة مع الروابط المزدوجة فقط .

$$-CH=CH- + ICl \longrightarrow -\overset{H}{\underset{I}{C}}-\overset{H}{\underset{Cl}{C}}-$$

$$ICl + KI \longrightarrow HCl + I_2$$

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

مقارنة عدم إشباع عدد من الدسم

الادوات والمواد اللازمة

ميزان ، سجاجة صغيرة ، أنابيب اختبار ، ماصة معايرة سعة ٣ مل ، كلوروفورم ، محلول اليود (٠٫٠٠١ نظامي) في الكلوروفورم ، مواد دسمة مختلفة (زبدة البقر ، زيت عباد الشمس ، مرغرين ٠٠) .

طريقة العمل

يوزن في عدد من أنابيب اختبار ٠٫٥ غ من كل من المواد الدسمة المختلفة ويصب فوق كل منها ٣ مل من الكلوروفورم ثم يعاير كل أنبوب بوساطة محلول اليود في الكلوروفورم ٠٫٠٠١ نظاميا وذلك حتى ظهور اللون الاحمر . يسجل حجم محلول اليود اللازم لكل معايرة ثم تصنف الدسم المستعملة حسب تزايد درجة الاشباع فيها .

في تفضيل هـدروكسيد البوتاسيوم على هـدروكسيد الصوديوم أن الاول يعطي بالتفاعل مع الحموض الدسمة صابونا بوتاسيوميا أسهل انحلالا في شروط التجربة.

الادوات والمواد اللازمة

ميزان تحليلي ، حوجلة سعة ٥٠ ميلي لترا وأخرى سعة ١٠٠ مل ، مقياس مدرج سعة ٢٥ ميلي لترا ، ماصة معايرة سعة ١ أو ٢ مل ، سحاحة ، مزيج ايتانول وايتر ايتيلي (بنسبة 1:1) ، محلول هدروكسيد البوتاسيوم ١ر٠ نظاميا في الايتانول ٩٦٪ ، زيت نباتي أو دسم حيواني .

طريقة العمل

يؤخذ وزن معين من الزيت النباتي أو الدسم الحيواني بوساطة الميزان وبطريقة اختلاف الوزن (انظر قرينة اليود) ، يتراوح ما بين ٢ــ ٣غ وتوضع في حوجلة سعة ٥٠ ــ ١٠٠ مل ويصب فوقها ١٠ ــ ١٥ ميلي لترا من مزيج الايتانول ــ ايتر ايتيلي (١ : ١) والمعدل بشكل مسبق (يعدل مزيج الايتانول والايتر باضافة قطرة فينول فتالئين له قبل اضافة الزيت ، ثم يصب فوقه على شكل نقاط محلول هدروكسيد البوتاسيوم ١ر٠ نظاميا في الايتانول حتى ظهور اللون الوردي الخفيف ، وبهذه الحالة يكون قد تم تعديل أية حموضة في الوسط المحل ناجمة عن غير المادة الدسمة المدروسة) .

بعد اضافة مزيج الايتانول ــ ايتر الى الزيت تضاف قطرة أو قطرتان اضافيتان من الفينول فتالئين ويحرك المزيج حتى تمام انحلال الزيت . (يجب ألا يكون لون المحلول ورديا ، بل شفافا مصفرا قليلا) .

تعاير الحموض الدسمة الحرة بوساطة محلول هدروكسيد البوتاسيوم ١ر٠ نظاميا في الايتانول وذلك بوساطة السحاحة وحتى ظهور اللون الوردي الخفيف مجددا وثباته لمدة ٣٠ ثانية .

تحسب قرينة الحموضة من المعادلة :

$$\text{قرينة الحموضة} = \frac{V \times 5{,}6}{a}$$

إن قرينة اليود واحدة من أهم القرائن الكيميائية للدسم (الزيوت) فهي تحدد درجة عدم الاشباع في هذه الزيوت وبالتالي امكان جفافها ومرارها وغيرها من التغيرات التي يمكن أن تطرأ على هذه الزيوت نتيجة الحفظ والمعالجة الغذائية والتكنولوجية .

بالاضافة الى اليود تتفاعل بقية الهالوجينات مع الرابطة المزدوجة كالكلور والبروم ولكن هذه الاخيرة تتفاعل بالاضافة لانضمامها للرابطة المزدوجة مستبدلة ذرات الهدروجين في الجذور الالكيلية المشبعة ضمن الجزيئات . بينما يتفاعل اليود في شروط معينة مع الروابط المزدوجة فقط .

$$-CH=CH- + ICl \longrightarrow -\overset{H}{\underset{I}{C}}-\overset{H}{\underset{Cl}{C}}-$$

$$ICl + KI \longrightarrow HCl + I_2$$

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

مقارنة عدم إشباع عدد من الدسم

الادوات والمواد اللازمة

ميزان ، سحاجة صغرية ، أنابيب اختبار ، ماصة معايرة سعة ٣ مل ، كلوروفورم ، محلول اليود (٠٫٠٠١ نظامي) في الكلوروفورم ، مواد دسمة مختلفة (زبدة البقر ، زيت عباد الشمس ، مرغرين ..) .

طريقة العمل

يوزن في عدد من أنابيب اختبار ٠٫٥ غ من كل من المواد الدسمة المختلفة ويصب فوق كل منها ٣ مل من الكلوروفورم ثم يعاير كل أنبوب بوساطة محلول اليود في الكلوروفورم ٠٫٠٠١ نظاميا وذلك حتى ظهور اللون الاحمر . يسجل حجم محلول اليود اللازم لكل معايرة ثم تصنف الدسم المستعملة حسب تزايد درجة الاشباع فيها .

تحديد قرينة اليود

الادوات والمواد اللازمة

ميزان تحليلي ، أنابيب اختبار ، ماصة معايرة سعة ١٠ مل ، دورق سعة ٢٥٠ ميلي لترا (عدد ٢) ، سحاحة ، مقياس مدرج سعة ١٠٠ مل ، زيت نباتي ، ايثانول، محلول اليود (٢ر٠ نظامي) في الايثانول ٩٦٪ (٢٥ر٤ غراما يودا يوضع في دورق معايرة سعة ١٠٠٠ مل ويحل بالايثانول) ، محلول تيو كبريتات الصوديوم (١ر٠ نظاميا) ، محلول النشاء (٥ر٠٪) .

طريقة العمل

يؤخذ في دورق جاف سعة ٢٥٠ ميلي لترا ذي فوهة مسنفرة وسدادة زجاجية مسنفرة ، وزن من الزيت المدروس . يقاس وزن المادة المدروسة على الميزان التحليلي بالشكل التالي : توزن زجاجة صغيرة تحتوي على الزيت ومجهزة بقطارة في غطائها ، ثم يؤخذ منها في الدورق المذكورة أعلاه نحو ٥ قطرات من الزيت ثم يعاد وزن الزجاجة مع سدادتها وبقية الزيت . ويكون الفرق بين الوزنين هو وزن الزيت المأخوذ لتحديد قرينة اليود .

يضاف للدورق ٢٥ ميلي لترا من الايثانول لحل العينة ، واذا كان انحلال الزيت سيئا فيمكن تسخين الدورق على حمام مائي لتسريع الانحلال .

يؤخذ في دورق ثانٍ سعة ٢٥٠ ميلي لترا ٢٥ ميلي لترا من الايثانول فقط (تجربة خالية) .

يصب في كل من الدورقين ــ العينة والخالية ٥ر١٢ ميلي لترا من السحاحة محلول اليود ٢ر٠ نظاميا في الايثانول ثم يمزج جيدا ويضاف بعدها ١٠٠ مل من الماء المقطر ويخفقان جيدا ويسدان .

بعد مرور ٥ دقائق يعاير محتوى الدورقين بوساطة محلول تيو كبريتات الصوديوم (١ر٠) نظاميا حتى ظهور اللون الاصفر الخفيف ثم يضاف ميلي لترا واحدا من محلول النشاء كمشعر ويستمر بالمعايرة حتى زوال اللون الازرق بكامله .

إن الفرق بين كمية تيو كبريتات الصوديوم اللازمة لمعايرة التجربة الخالية وتجربة العينة الزيتية هو الذي يعبر عن كمية اليود التي تم انضمامها الى الروابط المزدوجة في الزيت • تحسب قرينة اليود من المعادلة :

$$\text{العدد اليودي (غ)} = \frac{(V_1-V_2) \cdot 0{,}0127 \times 100}{a}$$

حيث

V_1 — حجم تيو الكبريتات اللازم لمعايرة التجربة الخالية (مل) •

V_2 — حجم تيو الكبريات اللازم لمعايرة العينة (مل) •

0,0127 — ما يقابل ١ مل من تيو الكبريتات (١ر• نظاميا) من اليود (غ) •

a — وزن الدسم الموجود في العينة (غ) •

إن الاختلاف في مجموعة تجارب على المادة نفسها يجب أن لا يزيد على أجزاء عشرية من قيم قرائن اليود الناتجة •

تحديد قرينة الحموضة

تحدد قرينة الحموضة درجة الحموضة في المادة الدسمة وتعرف بأنها عدد ميلي غرامات هدروكسيد البوتاسيوم اللازمة لتعديل الحموض الدسمة الحرة في ١ غ من المادة الدسمة المعنية •

تفيد قرينة الحموضة مع غيرها من المواصفات الكيميائية الفيزيائية في تحديد نوعية الزيوت فمثلا اذا كان الزيت معصورا من بذور ناضجة ، فان كمية الحموض الدسمة الحرة فيه تكون قليلة ، بينما تكون كمية هذه الحموض كثيرة في الزيت المستحصل من البذور الفجة • كما أن حفظ الزيت وتخزينه طويلا يؤدي الى تفكك الغليسريدات مما يسبب تراكم كمية أكبر من الحموض الدسمة الحرة فيه وبالتالي ازدياد قرينة حموضته وهو ما ينعكس سلبا على المواصفات النوعية له •

يعتمد مبدأ معايرة قرينة الحموضةعلى تعديل الحموض الدسمة الحرة الموجودة في الزيت بوساطة محلول ١ر• نظاميا من هدروكسيد البوتاسيوم • ويعود السبب

في تفضيل هـدروكسيد البوتاسيوم على هـدروكسيد الصوديوم أن الاول يعطي بالتفاعل مع الحموض الدسمة صابونا بوتاسيوميا أسهل انحلالا في شروط التجربة.

الادوات والمواد اللازمة

ميزان تحليلي ، حوجلة سعة ٥٠ ميلي لترا وأخرى سعة ١٠٠ مل ، مقياس مدرج سعة ٢٥ ميلي لترا ، ماصة معايرة سعة ١ أو ٢ مل ، سحاحة ، مزيج ايتانول وايتر ايتيلي (بنسبة ١:١) ، محلول هدروكسيد البوتاسيوم ١ر٠ نظاميا في الايتانـول ٩٦٪ ، زيت نباتي أو دسم حيواني .

طريقـة العمـل

يؤخذ وزن معين من الزيت النباتي أو الدسم الحيواني بوساطة الميزان وبطريقة اختلاف الوزن (انظر قرينة اليود) ، يتـراوح ما بين ٢ر ـ ٣غ وتوضع في حوجلة سعة ٥٠ ـ ١٠٠ مل ويصب فوقها ١٠ ـ ١٥ ميلي لترا من مزيج الايتانول ـ ايتر ايتيلي (١ : ١) والمعدل بشكل مسبق (يعدل مزيج الايتانول والايتر باضافة قطرة فينول فتالئين له قبـل اضافة الزيت ، ثم يصـب فوقه علـى شكل نقاط محلـول هدروكسيد البوتاسيـوم ١ر٠ نظاميا في الايتانـول حتى ظهور اللـون الوردي الخفيف ، وبهذه الحالة يكون قد تم تعـديل أية حموضة في الوسط المحل ناجمة عن غير المادة الدسمة المدروسة) .

بعد اضافة مزيـج الايتانول ـ ايتـر الى الزيت تضـاف قطـرة أو قطرتان اضافيتان من الفينول فتالئين ويحرك المزيج حتى تمام انحلال الزيت . (يجب ألا يكون لون المحلول ورديا ، بل شفافا مصفرا قليلا) .

تعاير الحموض الدسمة الحرة بوساطة محلـول هدروكسيد البوتاسيوم ١ر٠ نظاميا في الايتانول وذلك بوساطة السحاحة وحتى ظهور اللون الوردي الخفيف مجددا وثباته لمدة ٣٠ ثانية .

تحسب قرينة الحموضة من المعادلة :

$$\text{قرينة الحموضة} = \frac{V \times 5,6}{a}$$

حيث :

V — حجم هدروكسيد البوتاسيوم ١ر٠ نظاميا اللازم للمعايرة (مل) ٠

5,6 — عدد ميلي غرامات هدروكسيد البوتاسيوم المكافىء لـ ١ مل من محلوله ١ر٠ نظاميا ٠

a — وزن المادة الدسمة (الزيت) المأخوذ في العينة (غ) ٠

تحديد قرينة التصبن

قرينة التصبن هي عدد ميلي غرامات هدروكسيد البوتاسيوم اللازمة لتصبن جميع الحموض الدسمة الحرة والمرتبطة على شكل غليسريدات في ١غ من المادة الدسمة ٠

أما معايرة الحموض الدسمة الموجودة على شكل استرات فتحدد بوساطة قرينة الاسترة ، وتعرف قرينة الاسترة بأنها عدد ميلي غرامات هدروكسيد البوتاسيوم اللازمة لمعايرة الحموض الدسمة المرتبطة على شكل غليسريدات في ١ غ من المادة الدسمة وتحسب عادة من الفرق بين قرينتي التصبن والحموضة ٠

الادوات والمواد اللازمة

ميزان تحليلي ، حمام مائي ، حوجلة سعة ٥٠ ميلي لترا مجهزة بمبرد مرتد (عدد ٢) ، ماصة معايرة سعة ١ مل ، سحاحة عدد ٢ ، محلول هدروكسيد البوتاسيوم ٥ر٠ نظاميا في الايتانول ٩٦٪ ، حمض كلور الماء ٥ر٠ نظامي ، فينول فتالين ١٪ ٠

طريقة العمل

يؤخذ في حوجلة أولى سعة ٥٠ ميلي لترا مقدار ٥ر٠ غ من المادة الدسمة المدروسة وفي حوجلة ثانية ٥ر٠ مل من الماء ٠ يضاف الى كل من الحوجلتين وبوساطة السحاحة ١٥ ميلي لترا من محلول ٥ر٠ نظاميا من هدروكسيد البوتاسيوم في الايتانول ٩٦٪ ٠ تسد الحوجلتان بالمبردين الهوائيين وتسخنان على حمام مائي بدرجة الغليان لمدة ٣٠ ــ ٤٠ دقيقة مع التحريك المستمر ٠ يجب العمل على غليان المحلول ضمن الحوجلتين بهدوء شديد ٠

بانتهاء التصبن يضـاف الى كل من الحوجلتـين ٣ ــ ٤ قطرات من الفينول فتالئين ثم يعاير بمحلول حمـض كلور الماء ٥ر٠ نظاميا حتـى لحظة زوال اللون الوردي (وذلك لتحديد كمية القلوي الحر والذي لم يتفاعل مع غليسريدات المادة الدسـمة) ٠

تحسب قرينة التصبن من المعادلة :

$$\frac{(V_1 - V_2) \times 28{,}11}{a}$$

حيث :

V_1 ــ حجم H Cl نصف النظامي اللازم لمعايرة التجربـة الخاليـة (التي استخدم فيها الماء) محسوبة بـ (مل) ٠

V_2 ــ حجم H Cl نصف النظامي اللازم لمعايرة التجربة (مل) ٠

28,11 ــ عدد ميلي غرامات هدروكسيد البوتاسيوم المكافئة لـ ١ مل من محلوله ذي التركيز ٥ر٠ نظاميا (١ مل KOH ٥ر٠ نظاميا تكافىء ١ ميلي لترا H Cl ٥ر٠ نظاميا) ٠

a ــ وزن المادة الدسمة (غ) ٠

□ □ □

الفصل الرابع

السكاكر

السكاكر مركبات عضوية ألدهيدية أو كيتونية متعددة الزمر الهدروكسيلية . تلعب دورا عظيما في بناء الطاقة للجسم وتأمينها في مراحل النشاط الحيوي . تظهر السكاكر خواص ارجاعية بسبب وجود زمر ألدهيدية أوكيتونية ، وهي توجد في الجسم بشكل حر أو مرتبط (تشكل معقدات مع البروتينات) . تقسم السكاكر الى ثلاث فئات رئيسة :

١. سكاكر أحادية (غلوكوز ، غالاكتوز ، فروكتوز ، ريبوز ، ريبوز منقوص الاكسجين ...) ، وهي سكاكر بسيطة غير قابلة للحلمهة .

٢. سكاكر قليلة التعدد Oligo (سكروز ، لاكتوز ...) ، تعطي عند الحلمهة عدة بقايا سكاكر أحادية يتراوح عددها من ٢ ــ ٦ بقية سكر أحادي .

٣. سكاكر كثيرة التعدد Poly (غليكوجين ، نشاء ، سلولوز ، حمض هيالورونيك ، هيبارين ، كوندريتين حمض الكبريت ...) ، مؤلفة من عدد كبير من بقايا السكاكر الاحادية .

تقسم السكاكر الاحادية حسب طول السلسلة الكربونية الى : تريوزات ، تتروزات ، بنتوزات ، وهكسوزات .

يأتي المصدر الرئيس لسكاكر الجسم من الغذاء ذي المنشأ النباتي بشكل سكاكر كثيرة التعدد (كالنشاء والغليكوجين) ، وسكاكر قليلة التعدد (كالسكروز

واللاكتوز) ، تتحطم بتأثير أنزيمات الجهاز الهضمي متحولة الى سكاكر أحادية وبأشكال فسفورية تمتص خلال أغشية الامعاء الدقيقة ، تحمل مع تيار الدم الى الكبد وأنسجة الجسم كافة ، المكان الذي تصرف فيه لمختلف حاجات الجسم •

توجد طرق كثيرة لتحليل السكاكر يعتمد أغلبها على الخواص الارجاعية للسكاكر الاحادية ، أو على التفاعلات الملونة مع بعض الكواشف •

طرق تحليل السكاكر
باستعمال التفاعلات الملونة

تستعمل في الوقت الحاضر طرق كثيرة للكشف عن السكاكر وذلك بالاعتماد على كشف الزمر الوظيفية (وجود الزمر الغولية اضافة للزمرة الالدهيدية أو الكيتونية) أو بتفاعلها مع كواشف معينة لتعطي تفاعلات ملونة •

تعطي جميع السكاكر تفاعلات ملونة عند تفاعلها مع مركبات حلقية • يكشف بوساطة هذه التفاعلات عن وجود السكاكر ولو كانت بكميات قليلة في المركبات المعقدة •

الكواشف والمواد اللازمة

١• حمض كبريت مركز ، ٢• محلول α ــ النفتول محضر حديثا (٥٠ غ / باللتر في الغول الايتيلي) ، ٣• محلول التيمول ٥٪ ، ٤• محلول الانثيرون (٢ غ/ باللتر في حمض الكبريت المركز) •

٥• كاشف بنديكت : يحل ١٧٣ غ من (ليمونات الصوديوم) سيترات الصوديوم و ١٠٠ غ من كربونات الصوديوم اللامائية في نحو ٦٠٠ مل ماء ثم مدد المحلول الى ٨٥٠ مل •

يحل في وعاء آخر ١٧٫٣ غ من كبريتات النحاس في ١٠٠ مل ماء مدد الناتج الى ١٥٠ مل •

يصب محلول كبريتات النحاس فوق المحلول الاول ببطء مع التحريك تحصل على كاشف بنديكت •

٠٦ كاشف بارفويد : يحل ١٣٫٣ غ من خلات النحاس في نحو ٢٠٠ مل ويضاف ١٫٨ ميلي لترا حمض خل ثلجيا ٠

٠٧ حمض الخل الثلجي ، ٠٨ محلول فينيل هدرازين ، ٠٩ خلات الصوديوم ، ١٠٠ غول أميلي ٠

١١ ٠ كاشف الاورسينول : يحل ١٫٥ غ من الاورسينول في ٥٠٠ مل حمض كلور الماء المركز ٠ ثم تضاف ٢٠ قطرة من محلول $FeCl_3$ ١٠٠ غ/باللتر ٠

١٢ ٠ كاشف سيليفانوف : يحل ٠٫٥ غ/باللتر ريزورسينول في محلول ٣ مول/باللتر HCl ٠

٠١٣ محلول السكروز (١غ و ١٠غ/باللتر) ، ٠١٤ حمض كلور الماء المركز ، ١٥ ٠ هدروكسيد الصوديوم (٥ مول/باللتر) ٠

٠١٦ محلول اليود : يحل ٥ ميلي مول/باللتر في KI محلول ٣٠غ/باللتر ٠

١٧ ٠ سلولوز ، غليكوجين ، نشاء واينولين (١٠ غ/باللتر) ٠

١٨ ٠ كاشف فهلنغ : يتألف كاشف فهلنغ من محلولين يؤخذان بنسبة واحدة عند المعايرة :

المحلول I : يحل ٣٤٫٦٤غ كبريتات النحاس في ٥٠٠ مل ماء ٠

المحلول II : يحل ١٧٣غ من طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم (ملح روشل) و٥٠غ صود كاوية في ٥٠٠ مل ماء ٠

يؤكسد كل ١ مل من مزيج المحلولين (فهلنغ I و II) ٥مغ غلوكوز ٠

٠١٩ يود البوتاسيوم ، ٠٢٠ حمض كبريت ٢٥٪ ، ٠٢١ محلول ١٫٠ نظامي $Na_2S_2O_3$ يحضر بحل ٢٤٫٨ غ باللتر ٠

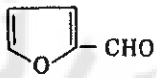
٠٢٢ مطبوخ النشاء : يحضر بحل ١غ من النشاء المنحل في ١٠ مل ماء بارد ، يضاف بالتدريج الى ٩٠ ميلي لترا محلولا مشبعا من كلور الصوديوم الغالي ، يسخن حتى الغليان ثم يبرد ٠

تفاعلات السكاكر العامة

١ ـ تفاعل موليش Molisch's test

يفكك حمض الكبريت المركز الروابط الغليكوزيدية ليعطي السكاكر الاحادية التي تتحول الى الفورفورال ومشتقاته نتيجة حذف الماء منها :

$$(C_5H_8O_4)_n \xrightarrow{H_2SO_4} n$$



الفورفورال

يتحدد الناتج مع سلفونات α ـ النفتول ليعطي معقدا بلون بنفسجي •

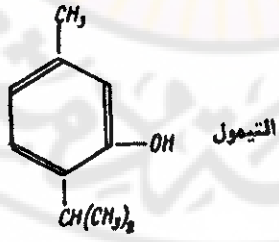
يعد هذا التفاعل عاما لجميع السكاكر والمركبات العضوية التي تعطي الفورفورال عند تفاعلها مع حمض الكبريت الكثيف •

طريقة العمل

يضاف الى قطرتين من محلول α ـ النفتول ٢ ميلي لترا من المحلول المراد بحثه• يصب بعد ذلك بحذر على جدران الانبوب بعد إمالته نحو ١ مل من H_2SO_4 المركز •لاحظ بدقة تغيرات اللون على السطح الفاصل بين الطبقتين •

أعد الاختبار باستعمال الماء عوضا عن المحلول السكري • يعود سبب تشكل اللون الاخضر الى فعل حمض الكبريت المركز في α ـ النفتول •

٢ ـ تفاعل التيمول Thymol's test



التيمول

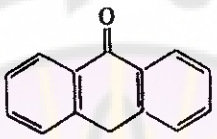
طريقة العمل

يضاف الى قطرتين من محلول التيمول ٥٪ في الغول ١ مل من المحلول المراد

بحثه • يصب بحذر على جدران الانبوب بعد امالته نحو ١ مل من حمض الكبريت المركز • لاحظ اللون الاحمر المتشكل على السطح الفاصل بين الطبقتين •

٣ ـ تفاعل الانثرون Anthrone reaction

تفاعل الانثرون هو اختبار عام لجميع السكاكر • ويعتمد المبدأ في هذا التفاعل كما ورد في تفاعل موليش ما عدا أن الفورفورال يتكاثف مع الانثرون ليعطي معقدا بلون أزرق مخضر •



الانثرون

طريقة العمل

يضاف الى خمس قطرات من المحلول المراد بحثه ٢ مل من كاشف الانثرون • يوضع الانبوب في حمام مائي ويلاحظ تغير اللون •

تفاعلات السكاكر المرجعة

٤ ـ تفاعل بنديكت Benedict's test

تفاعل بنديكت هو مبدأ تفاعل فهلنغ **Fehling's test** نفسه المعدل لانتاج محلول مفرد الذي هو أكثر ملاءمة للاختبار ويكون أكثر ثباتا من تفاعل فهلنغ •

طريقة العمل

يضاف الى ٥ قطرات من المحلول المراد بحثه ٢ مل من كاشف بنديكت • يسخن على حمام مائي غالٍ مدة خمس دقائق لاحظ لون الراسب المتشكل • اختبر حساسية كاشف بنديكت باستعمال محلول من الغلوكوز المخفف •

٥ ـ تفاعل بارفويد Barfoed's test

كاشف بارفويد هو محلول خلات النحاس في محلول حمضي ضعيف ويرجع فقط بالسكاكر الاحادية • يمكن حلمهة السكاكر الثنائية عند الغليان الطويل

لتعطي تفاعلا ايجابيا كاذبا • يتشكل نتيجة التفاعل بين الكاشف والسكاكر الاحادية المرجعة راسب أكسيد النحاسي بكمية قليلة بالمقارنة مع كاشف بنديكت وفهلنغ ، ومن المفضل ترك الانبوب فترة من الزمن للاحظة الراسب المتشكل في قعر الانبوب • يختلف كذلك لون اكسيد النحاسي المتشكل حيث يكون أحمر آجريا بينما يلاحظ في تفاعل بنديكت اللون البرتقالي ـ البني •

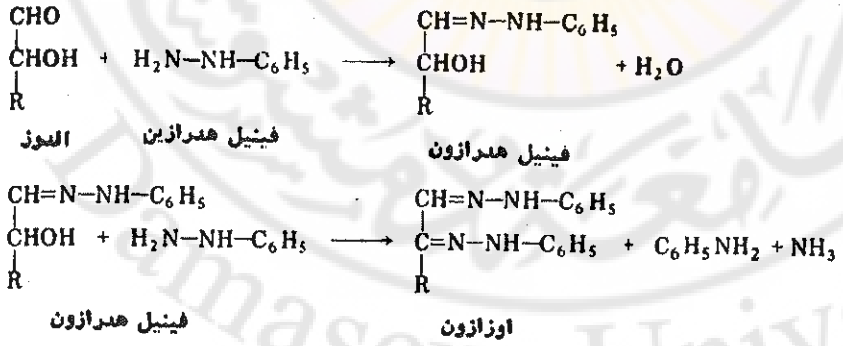
طريقة العمل

يضاف الى ١ ميلي لترا من المحلول المراد بحثه ٢ ميلي لترا من كاشف بارفويد ، يغلى المزيج لمدة دقيقة ويترك ليهدأ • ترجع السكاكر الاحادية الكاشف الى أكسيد النحاسي ، فيتشكل في قعر الانبوب راسب بلون أحمر ـ آجري • تجنب الغليان لفترة طويلة لمنع حلمهة السكاكر الثنائية •

٦ ـ تحضير الاوزازونات The preparation of osazones

تشكل المركبات التي تحتوي على الزمرة ـ CHOH ـ CO ـ مع فينيل هدازين الاوزازونات • تساعد بلورات الاوزازون على تعيين السكاكر المرجعة لان لها صفات ودرجة انصهار خاصة • يجب أثناء التفاعل معرفة الوقت التي تتشكل فيه البلورات ودرجة حرارة المحلول •

يتفاعل الفينيل هدرازين مع زمرة الكربونيل للسكر ليعطي فينيل هدرازون ، الذي يتفاعل بعد ذلك مع جزيئة ثانية من الفينيل هدرازين ليشكل الاوزازون :



يعطي كل من الغلوكوز والفروكتوز والمانوز الشكل نفسه من الاوزازونات ،

لان التوضعات على ذرات الكربون هي نفسها في المواضع ٣ ، ٤ ، ٥ و ٦ لكل هذه السكاكر . يشكل المانوز بالواقع بلورات بيضاء مع الفينيل هدرازين في حرارة الغرفة ، ولكن الاوزازون الاصفر ينفصل بالتسخين . يعطي الشكل (٤ــ١) مظهر بلورات الاوزازونات لسكاكر مختلفة كما ترى تحت المجهر .

شكل (٤ــ١) بلورات الاوزازونات كما ترى تحت المجهر

طريقة العمل

تضاف الى ٥ مل من محلول السكر المراد فحصه ١٠ قطرات من حمض الخل الثلجي لتحميض الوسط ، ثم تضاف ثلاث قطرات من محلول الفينيل هدرازين وبطرف سكين حادة خلات الصوديوم . يسخن المزيج على حمام مائي لمدة خمس دقائق مع التحريك من حين لآخر ، يرشح ، تسخن الرشاحة على حمام مائي مدة

قلوي حتى الاعتدال أو القلـوية الضعيفة للمحلـول • تجرى تفاعـلات الارجاع وتفاعل سيليفانوف على حاصل الحلمهة ، ويحضر الاوزازون من حاصل الحلمهة ، ثـم تحـدد السكاكر الاحادية الموجودة في حاصل الحلمهة بطريقة كروماتوغرافيا الطبقـة الرقيقـة •

١٠ ـ تفاعل اليود Iodine test

يشكل اليود معقدات امتزازية ملونة مع السكاكر كثيرة التعدد • يعطي النشاء لونا أزرق مع اليود ، بينما يعطي الغليكوجين وحاصل الحلمهة الجزئية للنشـاء لونا أحمر ـ بنيا •

طريقـة العمـل

يحمض المحلول السكري المراد بحثه بحمض كلور الماء الممدد ، ثم تضاف اليه قطرتان من اليود • يقارن اللون الحاصل مع الماء واليود •

التحليل الكمي للسكاكر

طريقة سريعة لتحليل السكاكر بشكل تقريبي

يعتمد مبدأ هذه الطريقة على خاصة تشكيل مركبات مختلفة الالوان باختلاف نسبة السكر في الدم أول البول باستعمال مسحوق كبريتات النحاس وكربونات الصوديـوم •

طريقـة العمـل

يسحق في هـاون بورسلان ١ غ كبريتات النحاس مـع ١٠ غ كربونـات الصوديوم اللامائية • يوضع في انبوب قليل من هذا المسحوق وعدة قطرات مـن البول ، ثم يسخن المزيج حتى الغليان •

يدل اللون الازرق على اختفاء السكر في البول ، واللون الاصفر المخضر على وجود السكر في البول بنسبة نحو ٥ر٠٪ (٥ غ/باللتر) ، واللـون الاخضر ١٪

(١٠ غ/باللتر) ، واللـون البني ـ المحمر ٢٪ (٢٠ غ/باللتر) ، واللون الاحمـر الشديد أعلى من ٢٪ (٢٠ غ/باللتر) ٠

تقدير السكاكر بطريقة الانثرون

تفاعل الانثرون طريقة سريعة ومناسبة لتيعـين الهكسوزات ، والدوبنتوزات وحمض هكسورونيك كل من الحرة أو الموجودة في السكاكر كثيرة التعدد ٠ يعطي لون المحلول الازرق ـ المخضر امتصاصا أعظميا عند ٦٢٠ نانومترا ، كذلك يمكن أن تعطي بعض السكاكر ألوانا أخرى٠ يعيق وجـود البروتين الحاوي كمية كبيرة من التربتوفان هذه الطريقة لانه يعطي في هذه الحالة لونا أحمر ٠

يعتمد التقدير على المركبات المجوثة ، وهي ثابتة لكل جزيئة خاصة ٠

طريقـة العمـل

يضاف الى ٤ مل من كاشف الانثرون ١ مل محلـول سكري خالٍ من البروتين ويخلط بسرعة (احذر من الحمض القوي) ٠ يوضع المزيج على حمام مائي غالٍ مدة عشر دقائق مع وضع قطعـة رخام على فوهة الانبـوب لمنع تبخر الماء ٠ يبرد الانبوب ويقرأ التقديرعند ٦٢٠ نانومترا ضد المحلول الخالي ٠

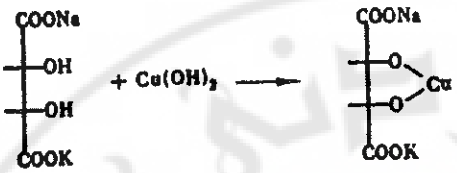
حضر منحنيات معيارية لمحاليل الغلوكوز والغليكوجين وقارن بينها ٠ تذكـر بأن الغلوكوز يوجد بشكل غليكوزيد ($C_6 H_{10} O_5$) في الغليكوجين بوزن جزيئي ١٦٢ وليس ١٨٠ ٠ تفحص نقاوة عدة نماذج من الغليكوجين التجاري ٠

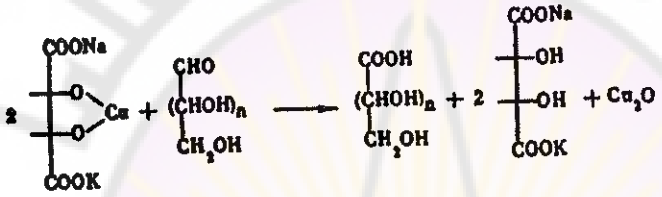
المواد اللازمة للتحليل

١٠ كاشف الانثرون (٢غ/باللتر في حمض الكبريت المركز) ٠
٢٠ غلوكوز (١ر٠ غ/باللتر) ٠
٣٠ غليكوجين (١ر٠غ/باللتر) ٠
٤٠ سكاكر أخرى بالتركيز نفسه اذا كانت مطلوبة ٠

طريقـة بيتران

تعتمد طريقة بيتران عـلى تشكيل راسب من اكسيـد النحاسي ووزن هـذا الراسب الناتج ، وذلك بتفاعل أكسدة الالدوزات مع كاشف فهلنغ :





تقود هذه الطريقة لنتائج غير دقيقة لان اكسيد النحاسي المنفصل يتأكسد عند معايرة السكاكر باكسجين الهواء .

تستعمـل في الوقت الحاضـر طرق أكثر دقة وسهـولة بالاعتماد على التحليل الحجمي لماكين وشورل ، والطريقة واحدة من أجل الغلوكوز الفروكتوز والسكر المنقلب ...

طريقـة العمـل

يصب في حوجلة ذات قاعدة سعة ٢٥٠ مل ، ١٠ مل من فهلنغ I و ١٠ مل من فهلنغ II (بدقة بوساطة ماصة معياريـة) ، ثم يضاف الى المزيج محلول أو وزن معين من السكر المراد تحليله ، ثم نضيف اليه ماء حتى الحجم ٥٠ مل . يسخن المزيج على نار هادئة حيث يبقى حجم السائل في الحوجلة ثابتا ، ولاضعاف التبخر يمكن وضع قمع على عنق الحوجلة .

تبرد الحوجلة بسرعة بالماء البارد حتى الدرجة ٢٥° س ، ثم يضاف الى المزيج ٣غ يود البوتاسيوم المنحل في ١٠ مل مـاء و ١٠ مل ٢٥٪ من حمض الكبريت .

يحرك المزيج بسرعة ويعاير بمحلول ١ر٠ نظاميا من $Na_2 S_2 O_3$ حتى يتحول اللون الاسمر الى الاصفر • يضاف ١٠ مل مطبوخ النشاء ١٪ وتتمم المعايرة حتى اختفاء اللون الازرق تماما ويبقى المحلول عاجيا • يعاد العمل السابق على تجربة مقارنة دون اضافة السكر • تحسب كمية تيوكبريتات التي لزمت لمعايرة السكر من الفرق بين التجربة الرئيسة وتجربة المقارنة (بالميلي لتر) • يعطي الجدول (٤ــ١) كمية السكر (بالميلي غرام) الموجودة في المحلول وذلك حسب كمية التيوكبريتات اللازمة •

يجب لتحليل السكروز (والنشاء) تحويله أولا الى سكر منقلب وذلك بحل ٥غ من السكر في ٥٠ مل من حمض كلور الماء ١ نظاميا ويسخن خلال ٣٠ دقيقة على حمام مائي (ولمدة ثلاث ساعات عند حلمهة النشاء) •

يبرد المزيج ويعدل بـ ١ نظاميا من Na O H يسدد الحجم حتى ٥٠٠ مل ، ثم تؤخذ منه أجزاء معلومة ويعاير بالطريقة السابقة •

ملاحظة : تأخذ تجربة المقارنة كمية أكبر من التيوكبريتات بسبب معايرة كل نحاس كاشف فهلنغ • وتأخذ تجربة السكر كمية أقل من التيوكبريتات بسبب معايرة فقط النحاس الباقي من كاشف فهلنغ لان الجزء الآخر تحول الى نحاسي •

[illegible] يعطي كمية السكر التي تقابل كمية تيوكبريتات

حجم ار. نظاميا من $Na_2S_2O_3$ بالمل	نحاسا مغ	غلوكوزا مغ	فروكتوزا مغ	غالاكتوزا مغ	مانوزا مغ	ارابينوزا مغ	كسيلوزا مغ	رامنوزا مغ
١	٦ر ٤	٣ر٢	٣ر٢	٣ر٦	٣ر١	٣ر٠	٣ر١	٣ر٢
٢	١٢ر ٧	٦ر٣	٦ر٤	٧ر٠	٦ر٣	٦ر٠	٦ر٣	٦ر٥
٢	١٩ر ١	٩ر٤	٩ر٧	١٠ر٤	٩ر٥	٩ر٢	٩ر٥	٩ر٩
٤	٢٥ر ٤	١٢ر٦	١٣ر٠	١٤ر٠	١٢ر٨	١٢ر٣	١٢ر٨	١٣ر٣
٥	٣١ر ٨	١٥ر٩	١٦ر٤	١٧ر٥	١٦ر١	١٥ر٥	١٦ر١	١٦ر٨
٦	٣٨ر١٢	١٩ر٢	٢٠ر٠	٢١ر١	١٩ر٤	١٨ر٧	١٩ر٤	٢٠ر٢
٧	٤٤ر ٥	٢٢ر٤	٢٣ر٧	٢٤ر٧	٢٢ر٨	٢١ر٩	٢٢ر٨	٢٣ر٧
٨	٥٠ر ٩	٢٥ر٦	٢٧ر٤	٢٨ر٣	٢٦ر٢	٢٥ر٢	٢٦ر٢	٢٧ر٢
٩	٥٧ر ٣	٢٨ر٩	٣١ر٨	٣٢ر٠	٢٩ر٦	٢٨ر٦	٢٩ر٦	٣٠ر٨
١٠	٦٣ر ٦	٣٢ر٢	٣٤ر٩	٣٥ر٧	٣٣ر٠	٣٢ر٠	٣٣ر٠	٣٤ر٤
١١	٧٠ر ٠	٣٥ر٧	٣٨ر٧	٣٩ر٤	٣٦ر٥	٣٥ر٤	٣٦ر٥	٣٨ر٠
١٢	٧٦ر ٣	٣٩ر٠	٤٢ر٤	٤٣ر١	٤٠ر٠	٣٨ر٨	٤٠ر٠	٤١ر٦
١٣	٨٢ر ٧	٤٢ر٤	٤٦ر٢	٤٦ر٨	٤٣ر٥	٤٢ر٢	٥٣ر٥	٤٥ر٢
١٤	٨٩ر ١	٤٥ر٨	٥٠ر٠	٥٠ر٥	٤٧ر٠	٤٥ر٦	٤٧ر٠	٤٨ر٨
١٥	٩٥ر ٤	٤٩ر٣	٥٣ر٧	٥٤ر٣	٥٠ر٦	٤٩ر٠	٥٠ر٦	٥٢ر٤
١٦	١٠١ر ٨	٥٢ر٨	٥٧ر٥	٥٨ر١	٥٤ر٢	٥٢ر٤	٥٤ر٢	٥٦ر٠
١٧	١٠٨ر ١	٥٦ر٣	٦١ر٢	٦١ر٩	٥٧ر٩	٥٥ر٨	٥٧ر٩	٥٩ر٨
١٨	١١٤ر ٤	٥٩ر٨	٦٠ر٠	٦٥ر٧	٦٢ر٦	٥٩ر٣	٦٢ر٦	٦٣ر٥
١٩	١٢٠ر ٨	٦٣ر٣	٦٨ر٧	٦٩ر٦	٦٥ر٣	٦٢ر٩	٦٥ر٣	٦٧ر٣
٢٠	١٢٧ر ٢	٦٦ر٩	٧٢ر٤	٧٣ر٤	٦٩ر٢	٦٦ر٥	٦٩ر٢	٧١ر٠
٢١	١٣٣ر ٥	٧٠ر٧	٧٦ر٢	٧٧ر٢	٧٣ر١	٧٠ر٢	٧٣ر١	٧٤ر٨
٢٢	١٣٩ر ٨	٧٤ر٥	٨٠ر١	٨١ر٢	٧٧ر٠	٧٤ر٠	٧٧ر٠	٧٨ر٦
٢٣	١٤٦ر ٢	٧٨ر٥	٨٤ر٠	٨٥ر١	٨١ر٠	٧٧ر٩	٨١ر٠	٨٢ر٤
٢٤	١٥٢ر ٦	٨٢ر٦	٨٧ر٨	٨٩ر٠	٨٥ر٠	٨١ر٨	٨٥ر٠	٨٦ر٢
٢٥	١٥٩ر ٠	٨٦ر٦	٩١ر٧	٩٣ر٠	٨٩ر٠	٨٥ر٧	٨٩ر٠	٩٠ر٠

الفصل الخامس

الحموض الامينية والببتيدات
تفاعلات الكشف الكيفي عن الحموض الامينية

التفاعلات الملونه

يعتمد مبدأ الكشف الكيفي على اختلاف الحموض الامينية بالجذر R تستعمل لهذا الغرض التفاعلات الملونة التي تعد حساسة ومتخصصة ، والتي تسمح بالكشف عن المقادير الصغيرة من هذا أو ذاك الحمض الاميني الداخل في تركيب السوائل الحيوية ؛ وتستعمل في حاصل حلمهة البروتينات بعض التفاعلات الملونة لتعيين الحموض الامينية كميا .

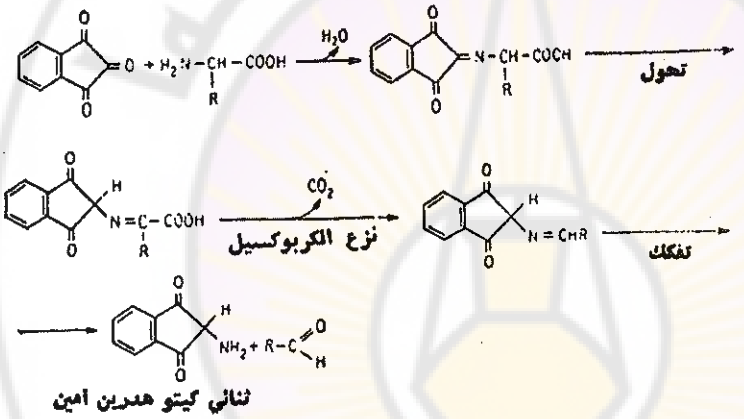
الادوات والمواد اللازمة

حمام مائي ، ميزان حرارة ، حمام ثلجي ، حامل أنابيب ، مقياس مدرج ١٠ مل ، ماصة مدرجة ١ مل و ٥ مل ، أنابيب اختبار ، تيروزين (بودرة) ، حمض الكبريت ٥ر٢٪ ، كاشف ميللون (الكواشف) ، الارجنين ١٠ر٠٪ ، هدروكسيد الصوديوم ١٠٪ ، a ـ النفتول ٢ر٠٪ في الغول ، هيبوبروميت الصوديوم (الكواشف) ، بولة ٤٠٪ ، حمض السلفانيليك ١٪ في حمض كلور الماء ٥٪ ، نتريت البوتاسيوم ٥ر٠٪ ، الهستيديس ١ر٠٪ ، كربونات الصوديوم ١٠٪ ، التربتوفان ٠٠٥ر٠٪ ، حمض الغليوكسيليك (الكواشف) ؛ كبريتات النحاس ٠٤ر٠ مول ، حمض كبريت مركز ، البرولين ٠١ر٠٪ ، النينهيدرين ١٪ في الاسيتون ٩٥٪ ، البرولين ٠١ر٠٪ في حمض الخل الثلجي ، الايزاتين ٠٣ر٠٪ في حمض الخل الثلجي ، الغليسين ٠١ر٠٪ ؛ محلول مائي

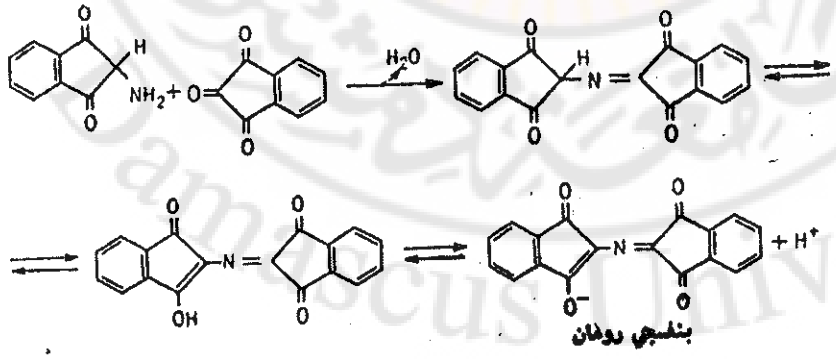
مقطر حديثا لاورتوفتاليك ثنائي ألدهيد (يحل ٢غ من أورتوفتاليك ثنائي ألدهيد في ٣٠٠ مل ماء مقطر ويقطر المحلول المائي) ، ميتيونين ٠٢ر٠٪ ، تتروبروسيد الصوديوم ١٠٪ ، هدروكسيد الصوديوم ٣ر١٤ نظامي ؛ مزيج حمض كلور الماء (١٩ر١ = d) وحمض الفسفور (٨٥٪) بنسبة ٩ : ١ ٠

١ ـ كشف الحموض الامينية (تفاعل النينهيدرين)

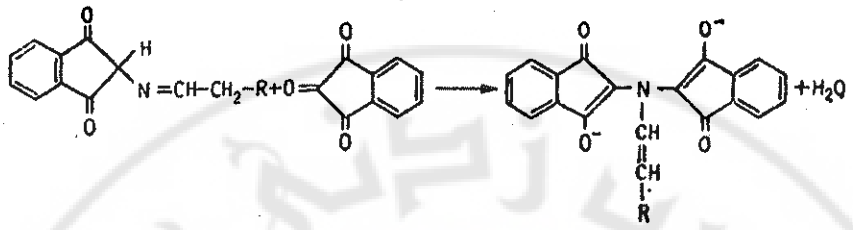
تتفاعل الحموض الامينية مع النينهيدرين لتعطي مركبا يطرأ عليه تحول داخلي، حيث تنزع منه زمرة الكربوكسيل ، ويتفكك الناتج الاخير ليعطي ألدهيدا وثنائي كيتوهدرين أمين ٠



يتكاثف ثنائي كيتوهدرين أمين مع جزيئة نينهيدرين جديدة ليعطي مركبا ملونا (بنفسجي رومان) وذلك نسبة للعالم الذي درس هذا التفاعل عام ١٩١٠ ٠



يجري التفاعل التالي مع المحلات العضوية (اسيتون ، ايتانول ، بيريدين) التي يحضر عادة منها محلول النينهيدرين :



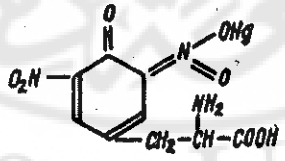
يعطي جذر الحمض الاميني عند تفاعله مع النينهيدرين ألوانا تتراوح بين الازرق والاحمر •

يستعمل في الوقت الحاضر تفاعل النينهيدرين بشكل واسع للكشف الكيفي والتحليل الكمي للحموض الامينية •

٢ ـ كشف التيروزين (تفاعل ميللون) Millon's reaction

يوضع في أنبوب اختبار بضع بلورات من التيروزين و ٥ ميلي لترات من محلول حمض الكبريت ٥ر٢٪ ويخضخض حتى تمام الانحلال ، ثم يضاف ١ ميلي لترا من كاشف ميللون • يخضخض المزيج ويترك بحرارة المختبر يتلون المحلول بعد فترة من الوقت بلون أحمر ـ دموي • يسرع ظهور اللون تسخين المزيج بلطف •

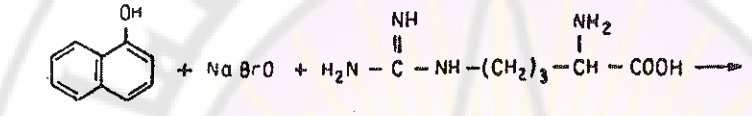
كاشف ميللون هو مزيج من نترات ونتريت وأكسيد الزئبق المنحلة في حمض الآزوت المركز • يعطي كاشف ميللون عند تفاعله مع الفينولات (حلقة التيروزين) مركبات الزئبق الملونة لنتروزو التيروزين ذات اللون الاحمر •



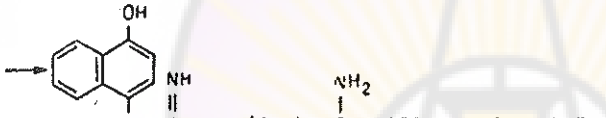
٢ ـ كشف الارجينين (تفاعل ساكاغوش) The Sakaguchi reaction

يوضع في أنبوب اختبار ٢ مل من محلول الارجينين ٠١ر٠٪ و ٢ مل محلول هدروكسيد الصوديوم ١٠٪ وعدة قطرات من محلول α ـ النفتول ٢ر٠٪ في الغول ٠ يخضخض المزيج جيدا ويضاف اليه ٥ر٠ ميلي لترا محلول هيبوبروميت الصوديوم ويخضخض من جديد ويضاف اليه بسرعة ١ مل من محلول البولة ٤٠٪ ، يظهر لون برتقالي ـ محمر ٠

آلية تفاعل الارجينين مع α ـ النفتول بوجود مؤكسد لم تفسر بعد بشكل كامل ٠ ولكن يمكن الاستفادة من المخطط التالي الذي يشرح في البدء تفاعل α ـ النفتول مع زمرة غوانيدين الارجينين بوجود مؤكسد :

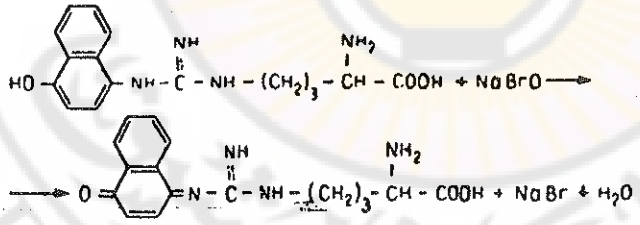


α ـ النفتول　　ارجينين



نفتيل ارجينين

يتشكل بعد ذلك نتيجة الاكسدة المستمرة لنفتيل الارجينين مركب شكل كينون الايمين :

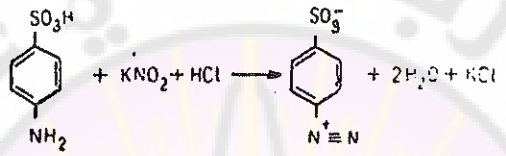


تتلون مشتقات كينون الايمين (في مثالنا نفتوكينون الايمين) التي استبدل فيها بهدروجين زمرة الايمينو جذر ألكيلي أو أريلي بلون أصفر ـ محمر ٠

يعطي تفاعل ساكاغوش لونا برتقاليا ـ محمرا سببه مشتقات نفتو كينون إيمين ومن المحتمل ظهور مركبات أكثر تعقيدا بسبب الاكسدة اللاحقة لزمرة NH ـ الباقية للغوانيدين ونواة البنزن لـ α ـ النفتول ٠

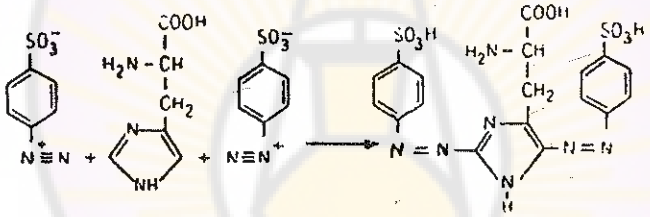
٤ ـ كشف الهستيدين (تفاعل باولي)

يوضع في أنبوب اختبار ١ مل من محلول ١٪ حمض السلفانيليك في حمض كلور الماء ٥٪ و ٢ مل من محلول ٥ر٠٪ نتريت البوتاسيوم ، يخضخض الانبوب بشدة ثم يضاف اليه بسرعة ٢ مل من محلول ١٠ر٠٪ هستيدين و ٦ مل محلول ١٠٪ كربونات الصوديوم • يظهر لون أحمر ـ كرزي واضح • يتحقق تفاعل تشكيل مركبات ديازو (الديأزة) عند تفاعل المحلول الحمضي لحمض السلفانيليك مع نتريت الصوديوم ليعطي حمض ديازوسلفونيك البنزن :



حمض السلفانيليك — حمض بارا ـ ديازو سلفونيك البنزن

يتشكل عند تفاعل مركب ديازو الاخير مع الهستيدين مركب بلون أحمر ـ كرزي :



الهستيدين — ٥٤٢ـ ثنائي ـ بارا ـ سلفو بنزن آزو الهستيدين

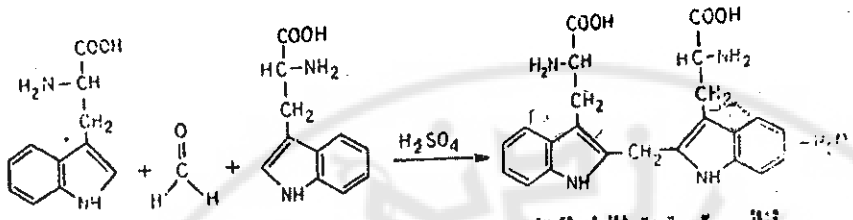
٥ ـ كشف التربتوفان (تفاعل هوبكينس ـ كولي)

يوضع في أنبوب اختبار ١ ميلي لترا محلول ٠٠٠٥ر٠٪ تربتوفان مع حجم مماثل من محلول حمض الغليوكسيليك (الكواشف) و ١٠ قطرات من محلول كبريتات النحاس ٠٤ر٠ مولا (II) ويخضخض المزيج • يضاف على دفعات صغيرة (عدة قطرات) ٢ ـ ٣ مل حمض كبريت مركز ، يبرد الانبوب بعد كل اضافة تحت صنبور الماء والافضل في حمام ثلجي • ويترك لمدة عشر دقائق في حرارة المختبر ومن ثم ٥ دقائق في حمام مائي غالٍ • يظهر لون أزرق ـ بنفسجي •

يتكاثف التربتوفان في هذا التفاعل مع الفورم ألدهيد الناتج عن تفاعل حمض

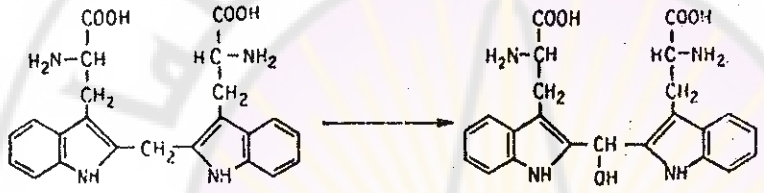
الغليوكسيليك مع حمض الكبريت المركز :

$$HOOC - CHO \longrightarrow CO_2 + H - CHO$$



ثنائي -٢- تربتوفانيل الميتان

يتأكسد ناتج التكاثف الاخير حتى ثنائي ـ ٢ ـ تربتوفانيل الكربينول :



ثنائي -٢- تربتوفانيل الكربينول

يتلون الاخير بوجود حمض معدني مشكلا ملحاً بلون أزرق بنفسجي .

٦ ـ كشف الميتيونين (مارك ـ كارتي وساليفان)

يوضع في أنبوب اختبار ٥ مل من محلول ٠٫٠٢٪ ميتيونين ويضاف اليه مع التحريك أولا ١ مل هدروكسيد الصوديوم ١٤٫٣ نظاميا ، ثانيا ٠٫٣ مل محلول نتروبروسيد الصوديوم ١٠٪ محضر حديثا . يسخن المزيج ١٠ دقائق على حمام مائي بالدرجة ٣٥ ـ ٤٠°س . يبرد لمدة دقيقتين في حمام ثلجي ثم تضاف اليه مع التحريك ٥ مل مزيج حمض كلور الماء وحمض الفسفور . يخضخض لمدة دقيقتين ويبرد تحت صنبور الماء لحرارة المختبر مدة عشر دقائق يظهر لون أحمر ـ بنفسجي واضح .

٧ ـ كشف الفليسين (تفاعل سيمرمان)

يضاف الى انبوب اختبار ٢ مل من محلول ٠٫٠١٪ الفليسين عند الـ pH = ٨٫٠ الحاصل باضافة محلول قلوي ١٠٪ ، و ٠٫٥ مل محلول مائي لاورتو ـ ثنائي

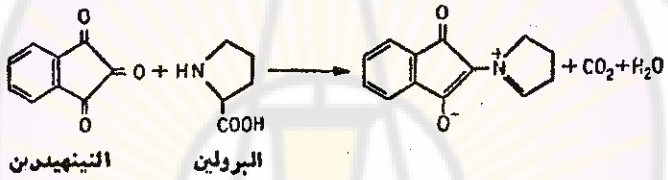
ألدهيد فتاليئيك • يتلون المزيج المتفاعل بسرعة بلون أخضـر ساطع • يترسب بعد عدة دقائق راسب أخضر •

٨ ـ كشف البرولين

يكشف عن الحموض الامينية بشكل واسع بتفاعل النينهيدرين والايزاتين التي تتفاعل بشكل مميز مع البرولين •

أ) تفاعل البرولين مع النينهيدرين •

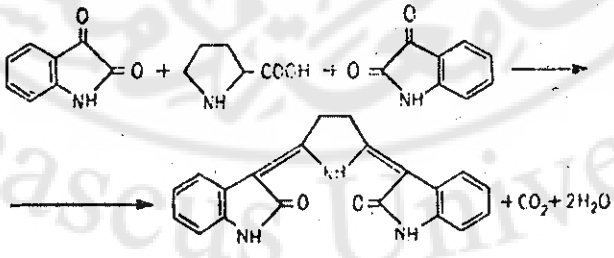
يضاف الى أنبوب اختبار ٣ مل محلـول ٠٫٠١٪ برولين وعـدة قطرات مـن محلول ١٪ نينهيدرين في الاسيتون ٩٥٪ • يخلط محتـوى الانبوب ويسخن على حمام مائي بالدرجة ٧٠°س لمدة خمس دقائق • يظهر لون أصفر واضح نتيجة تكاثف البرولين مع النينهيدرين :



ب) تفاعل البرولين مع الايزاتين •

يخلط في أنبوب اختبار (تحت ساحبـة الهواء) محلـول ٠٫٠١٪ برولينا في حمض الخل الثلجـي مع محلول ٠٫٠٣٪ ايزاتينا في حمض الخل الثلجـي • يظهر بسرعة لون أزرق •

يقترح الشكل التالي للتفاعل :



خـواص الحمـوض الامينيـة

تدرس بعض خواص الحموض الامينية الفيزيائية والكيميائية بعملي الكيميـاء العضوية كالانحلال ، وتشكيل الاملاح ، وتفاعلات الزمرة الكربوكسيلية والامينية وغيرها . وسيدرس في هـذا الفصل فقط التفاعـلات الكيميائية التي هي هامـة بالنسبة للكيمياء الحيوية والتي تتحقق في الحياة الطبيعية كتفاعل الحموض الامينية مع السكاكر .

الادوات والمواد اللازمة

حمام مائي ، ورق عباد الشمس ، أنابيب اختبـار ، محلول الفروكتوز ٥٪ في حمض البور ٥ر٢٪ ، حمض البور ٥ر٢٪ ، محلول الارجينين ٣٪ .

تفاعل الارجينين مع الفروكتوز

يؤخذ في أنبوبي اختبار ٢ مل محلـول ٥٪ فروكتوز في حمض البور ٥ر٢٪ . يضاف الى الانبوب الاول ٢ مل محلول ٣٪ أرجينين والى الثاني ٢ ميلي لترا مـاء مقطرا . يضاف الى أنبوب اختبار ثالث ٢ مل محلول ٣٪ أرجينين و ٢ مل محلول حمض البور ٥ر٢٪ . توضـع الانابيب الثلاثة في حمام مائـي غالٍ لعدة دقائق ، لاحظ ظهور الالوان واختلاف شدتها مع مرور الوقت .

تتفاعل α ـ زمرة الامين و δ ـ زمرة الغوانيديـن في الارجينين مع أكسجين الزمرة الكربونيلية لجزيئة الفروكتوز لتعطي في الانبوب الحاوي مزيـج الفروكتوز والارجينين لونا أحمر ـ بنيا .

تحليل الحموض الامينية الكمي

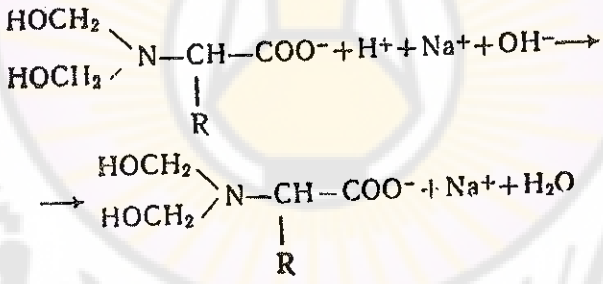
طرق تحليل الحموض الامينية الكمي كثيرة ومختلفة . احدى هذه الطـرق هي تفاعل الحموض الامينية المستخلصة مع النينهيدرين وقياس الكثافة اللونيـة بالمقياس اللوني ومقارنته مع الكثافة اللونيـة لمحلـول معياري متدرج التركيز (يحضر المحلول المعياري بحل الحمض الاميني بنسب معينة ثم يعالج بالنينهيدرين) . تعتمد الطريقة الثانية على قياس كمية غـاز ثنائي أكسيد الكربون المنطلق نتيجـة

تفاعل الحمض الاميني مع النينهيدرين • يمرر غاز ثنائي أكسيد الكربون المنطلق في حجم معين من محلول هدروكسيد الباريوم معروف المعيار • يعاير محلول هدروكسيد الباريوم غير المتفاعل مع ثنائي أكسيد الكربون بمحلول حمض كلور الماء معروف المعيار • ومن معرفة حجم هدروكسيد الباريوم المتفاعل مع ثنائي أكسيد الكربون تعرف نسبة الزمر الكربوكسيلية وبالتالي كمية الحمض الاميني •

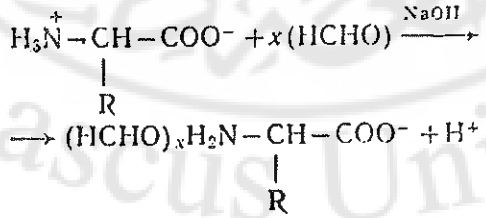
يمكن معايرة الزمرة الكربوكسيلية للحمض الاميني كميا بطريقة التحليل بوسط غولي قلوي الذي يخمد تشرد الزمرة الامينية • يجري العمل تماما كما في تحليل الحموض الكربوكسيلية حيث يعاير الحمض الاميني مباشرة بمحلول غولي قلوي معلوم المعيار ، واستعمل لمعايرة الحموض الامينية التحليل بوسط مائي ولكن السؤال هو كيف يتم إخماد تشرد الزمرة الامينية ؟

المعايرة بالفورمالين

استعمل لهذا الغرض محلول الفورمالين الذي يتفاعل مع الزمرة الامينية ليعطي N — ثنائي هدروكسي ميتيل الحمض الاميني الذي يعاير مثل غيره من الحموض الكربوكسيلية ·



يمكن كتابة تفاعل الفورم ألدهيد مع الزمر الامينية المتشردة على الشكل التالي :



طريقة فان ـ سليايك

يعين مجموع محتوى الحمض الاميني غالبا بطـرق تتعلق بتفاعلات الزمـرة الامينية • والطريقة المعروفـة والمنتشرة لوقـت طويل هـي قياس حجم الآزوت المنطلق ، نتيجة تفاعل الحمض الاميني مـع حمض الآزوتي لمـدة خمس دقائق • بتحقق في هذه الفترة فقط استبدال α ـ الزمرة الامينية مع طرد الآزوت الحر • يجب الاخذ بعين الاعتبار أثناء الحساب بأن نصف الآزوت المنطلق يأتي من الحمض الاميني والنصف الآخر من النتريت (حمض الآزوتي) • ومن معرفة حجـم الآزوت المنطلق تعرف نسبة محتوى α ـ الزمرة الامينية وبالتالي الحمض الاميني • يجري العمل بأجهزة خاصة اقترحها فان ـ سليايك •

استبدلت بالطريقـة السابقة لتعيين α ـ الآزوت الاميني طريقة تعرف تحـت اسم الطريقة النحاسية ، التي تعتمد على خاصة تشكيل الحموض α ـ الامينيـة معقدات منحلة مع شوارد النحاس (درجة الاكسدة + ٢) ، التي تعايـر بطريقـة يوديـة •

تستعمل بشكل واسع التفاعلات الملونة لتحليل الحموض الكمي في حاصـل حلمهة البروتينات وفي المستخلصات الطبيعية • يعـرف في الوقت الحاضر تفاعـل ملون أو أكثر من أجل أغلب الحموض الامينية الداخلة في تركيب البروتينات والتي يمكن بوساطتها تعيين وجود حمض أميني معين في مزيج يحتوي علـى الحموض الامينية الاخرى • ينتسب الـى تلـك التفاعلات تفاعـل ميللون (للكشف عـن التيروزين) ، تفاعل ساغاكوش (للكشف عن الارجينين) ، تفاعل هوبكينس ـ كولي (للكشف عن التربتوفان) • والتفاعلات الملونة في أغلب الاحيان غير متخصصة فمثلا تفاعل ساكاغوش يعطيه كل مشتقات الغوانيدين ، وتفاعل هوبكينس ـ كولي يعطيه عدد من مشتقات الأندول • لذلك لا تفيـد دائمـا التفاعلات الملونة في تحليـل الحموض الامينية كميا •

الطرق الحديثة المستعملة لفصل الحموض الامينية مستقلة وتعيينها كميـا هو الطرق الكروماتوغرافية •

تحليل الآزوت الاميني بطريقة نحاسية

الادوات والمواد اللازمة

ورق ترشيح ، دورق معياري سعة ٢٥ ميلي لترا عدد ٢ ، ماصات معيارية سعة ١ مل ، ٢ مل و ١٠ مل ، سحاحة سعة ٢٥ ميلي لترا و ٥٠ ميلي لترا ، قمع ترشيح ، دورق ذو قاعدة سعة ١٠٠ مل عدد ٤ ، مقياس مدرج سعة ١٠ مل ، محلول كلور النحاس II (يحل ٢٧ر٣ غ في ١ لترا ماء) ، محلول فسفات الصوديوم (يحل ٦٨ر٥ غ $Na_2HPO_4 . 12 H_2O$ في ١ لترا ماء أو يحل ٦٤ر٥ غ $Na_3PO_4 . 12 H_2O$ في ٥٠٠ مل ماء مقطر ومغلي لطرد CO_2 ، يضاف اليه ٧ر٢ غ Na OH ثم يتمم الحجم حتى اللتر) ، محلول البورات الواقي (يحل ٢٨ر٦ غ تترا بورات الصوديوم في ٧٥٠ ميلي لترا ماء ثم يضاف اليه ٥٠ ميلي لترا من محلول حمض كلور الماء ١ نظاميا يتمم الحجم حتى اللتر : pH = ٨ر٨) ، معلق فسفات النحاس (يمزج حجم واحد من محلول كلور النحاس II مع حجمين من محلول فسفات الصوديوم ثم يضاف حجمان من محلول البورات الواقي ، يحضر المعلق فقط قبل الاستعمال بالكمية اللازمة) ، محلول تيمول فتالئين ٥ر٢٪ في الغول الايتيلي ٥٪ ، محلول ١ر٠ نظاميا $Na_2S_2O_3 . 5 H_2O$ (يمدد هذا المحلول لتحضير ١٠ر٠ نظاميا ، تضبط دقة المحلول بالمعايرة بمحلول مقارنة ١٠ر٠ نظامي يود البوتاسيوم) ، نشاء ١٪ ، يود البوتاسيوم ١٠٪ ، حمض خل ثلجي ، هدروكسيد الصوديوم ٥ر٠ نظاميا ، غليسين ١٪ .

طريقة العمل

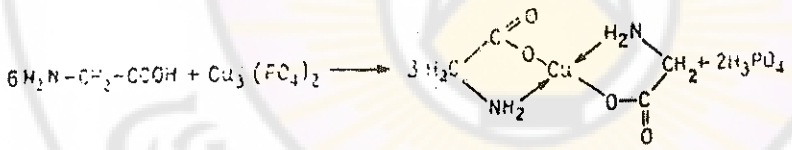
يؤخذ في دورق معياري سعة ٢٥ ميلي لترا ٢ مل من محلول الغليسين المراد بحثه (محلول الغليسين ١٪) ، وقطرتان فينول فتالئين . تضاف قطرة فقطرة من محلول هدروكسيد الصوديوم ٥ر٠ نظاميا حتى اللون أزرق ـ سماوي فاتح (pH المحلول = ١٠ر٢) .

يصب ١٠ مل من معلق فسفات النحاس مع التحريك وعند اختفاء الراسب تضاف من جديد ٥ مل من المعلق . يتمم الحجم في الدورق بالماء المقطر حتى العلامة ، يخضخض محتوى الدورق بقلبه عدة مرات ويرشح الزائد من فسفات النحاس فوق مرشح دقيق يعاد الترشيح للحصول على رشاحة صافية .

يؤخذ بوساطة ماصة معيارية ١٠ مل من الرشاحة السابقة الى دورق ذي قاعدة، يحمض باضافة ٤ر٠ ميلي لترا حمض خل ثلجي ومن ثم ٦ــ٨ مل من محلول ١٠٪ يــود البوتاسيوم ٠

يعاير اليود المتحرر بمحلول ١٠ر٠ نظامي $Na_2S_2O_3$ ٠ يضاف ١ــ٢ مل (٢٠ ــ ٤٠ قطرة) محلول النشاء لكل ١٠٠ مل محلول في اللحظة التي يصبــح لــون المحلول المعاير أصفر ــ تبنيا ٠ تستمر المعايــرة باضافة $Na_2S_2O_3$ حتى اختفاء اللون الازرق الناتج عن اضافة النشاء ٠ تؤخذ لدقة العمل تجربة خالية باعادة العمل السابق ولكن يؤخذ مكان محلول الغليسين الحجم نفسه ماء مقطرا ٠ تؤخذ كميــة $Na_2S_2O_3$ اللازمة للمعايرة من الفرق بين الكمية الذاهبة للتجربة الخالية والتجربة المجهولــة ٠

المبدأ النظري للمراحل الكيميائية عند تحليل الآزوت الاميني بطريقة نحاسية ٠ يتفاعل الملح الصودي للغليسين (أي أو حمض أميني آخر) مع معلق فسفات النحاس ليعطي المعقد النحاسي الازرق والمنحل جيدا لملح الغليسين (أو أي حمض أمينــي آخــر) :



يرتبط حمض الفسفور المتشكل مع محلول البورات الواقي ويجري التفاعــل حتــى النهايــة ٠

يبقى في الرشاحة بعد فصل فسفات النحاس الزائــدة فقــط ملــح النحاس للحمض الاميني (عدا ملح السيستين النحاسي II فهو غير منحل) ومن تعيين كميــة النحاس الباقية في الرشاحة يمكن تعيين محتوى الحمض الاميني ٠

عند اضافة حمض الخل الكثيف للرشاحة يطرد الحمض الاميني الاكثر ضعفا من ملحه النحاسي :

$$(H_2N—CH_2—COO)_2\,Cu + 2\,CH_3COOH \longrightarrow$$
$$2\,H_2N—CH_2—COOH + (CH_3COO)_2\,Cu$$

يتشكل حمض يود الهدروجين من تأثير الوسط الحامضي في يود البوتاسيوم الذي يرجع شوارد النحاس Ii الى يود النحاسي I غير المنحل ويود حر ٠

$$(2\,CH_3\,COO)_2\,Cu + 4\,HI \rightarrow 2CuI + 4\,CH_3\,COOH + I_2$$

تجري هذه المرحلة حتى النهاية بسبب يود النحاسي I غير المنحل ٠ تكافىء كمية اليود الحر المتحرر كمية ملح الحمض الاميني النحاسي ٠ يعين تركيز اليود الحر بمعايرته بمحلول هيبو سلفيت :

$$2\,Na_2S_2O_3 + I_2 \longrightarrow 2\,NaI + Na_2S_4O_6$$

تتراتيونات الصوديوم هيبوسلفيت الصوديوم

حسب معادلة التفاعل يوافق كل ٥ر٠ مولا يودا متحررا مول نحاس واحدا ، الذي بدوره يكافىء ٢٨ غ آزوتا أمينيا ٠ ومن جهة ثانية يتفاعل كل ٥ر٠ مولا يودا مع مكافىء غرامي واحد من هيبو سلفيت ٠ لذلك يوافق كل مكافىء غرامي واحد من هيبو سلفيت ٢٨ غ آزوتا أمينيا ٠ إذاً كل ١ مل من محلول هيبوسلفيت ١ر٠ نظاميا تقابل ٢٨ر٠ مغ آزوتا أمينيا ٠ حاصل ضرب حجم هيبوسلفيت ١ر٠ نظاميا اللازم للمعايرة (بعد حذف الكمية اللازمة للتجربة الخالية) بقيمة ٢٨ر٠ مغ نحصل على عدد الميلي غرامات من الآزوت الاميني الموجودة في الحجم المأخوذ ١٠ ميلي لترات للمحلول المجهول ٠ يجرى الحساب لكل حجم المحلول في الدورق المعياري ، تقارن كمية الآزوت الاميني الناتجة عن الحساب بكمية الآزوت الاميني المأخوذ في ٢ ميلي لترا لمحلول الغليسين المبحوث ٠

الكشف عن وجود الروابط الببتيدية في جزيئة الغراميسيدين

الادوات والمواد اللازمة

أنابيب اختبار ، أنبولة غراميسيدين ، هدروكسيد الصوديوم (١٠٪ ، ٣٠٪) كبريتات النحاس ١٪ ، بولة ٠

طريقـة العمـل

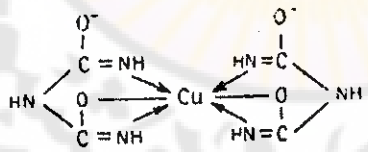
يصب محتوى أنبولة واحدة لمحلول الغراميسيدين في أنبوب اختبار ، تضاف اليه ثلاثة حجوم من محلول ٣٠٪ هدروكسيد الصوديوم ، يخضخض الانبــوب جيدا ثم يضاف اليه عدة قطرات من محلول ١٪ كبريتات النحاس ، يظهر بوضوح لون أزرق ــ بنفسجي الذي يؤكد وجود الببتيدات أو بالاحرى الرابطة الببتيدية — NH — CO — في جزيئة الغراميسيدين .

تعطي البولة تفاعل بيوريت بسهولة ، عند التسخين :

$$2\ H_2N - CO - NH_2 \longrightarrow NH_3 + H_2N - CO - NH - CO - NH_2$$

لتحقيق ذلك توضع عدة بلورات من البولة في أنبوب اختبار وتسخن بحذر على شعلة مصباح غاز . يبرد الانبوب ثم تضاف اليه عــدة قطرات مــن هدروكسيد الصوديوم ١٠٪ وعدة قطرات مــن محلول ١٪ كبريتات النحاس . يتشكل بعــد الخضخضة لون أزرق ــ بنفسجي .

يعود سبب ظهور اللون الى تشكيل معقد نحاسي . درس بليخان هذا التفاعل بالتفصيل ووضع صيغة معقد بيوريت مع النحاس على الشكل التالي :

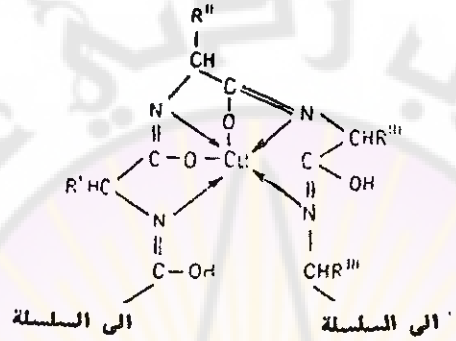


يعاني بيوريت في وسط قلوي تحولا اينوليا :

$$H_2N - CO - NH - CO - NH_2 \rightleftharpoons NH = \underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{C}} - NH - \underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{C}} = NH$$

تتفاعل جزيئتان من ثنائي الاينول مع هدروكسيد النحاس II لتعطي معقدا ، تتشكل فيه الروابط التساندية علـى حساب زوج الالكترونات الحرة لذرة كربون الزمـرة الايميديـة .

بنيت صيغة معقد النحاس بشكل مشابه مـع الزمر البيتيدية بشكلها الاينولي كما في الصيغة التالية :



يعطي المعقد من هذا الشكل غالبا لونا أحمر (الامتصاص الاعظمي في مجـال ٥٢٠ ــ ٥٣٥ ميلي مكرون) . تعطي المعقدات النحاسية عند اشتراك ذرتين أو ثلاث ذرات آزوت غالبا لونا بنفسجيا أو أزرق (الامتصاص الاعظمي في مجال ٥٤٠ ــ ٥٨٠ ميلي مكرون و ٦١٥ ــ ٦٧٠ ميلي مكرون علـى الترتيب) . لذلـك يتراوح اللون عند اجراء تفاعل بيوريت من الأزرق وحتى الاحمر ويغلب اللون البنفسجي .

□ □ □

الفصل السادس

البروتينـــات

تفاعلات كشف البروتينات الكيفي

تعتمد طرق الكشف الكيفي على شكلين من التفاعلات :

أ ٠ كشف الرابطة الببتيدية في الجزيئات البروتينية ،

ب٠ كشف جذور الحموض الامينية ٠

التفاعل النموذجي لكشف الرابطة الببتيدية في الجزيئات البروتينية هو تفاعل بيوريت ٠ وتوجد أعداد كبيرة من التفاعلات الملونة على جذور الحموض الامينية ، بحث بعضها سابقا ٠

الادوات والمواد اللازمة

رجاج ، مثفلة ، حمام مائي ، ميزان حرارة ، غلاية ، ورق ترشيح ، شاش ،دورق قاعدي سعة ٢٥٠ ميلي لترا ، مجموعة أنابيب اختبار زجاجية ، ماصات ، مقياس مدرج ١٠ مل ، كؤوس زجاجية سعة ١٠٠ و ٢٥٠ مل ، أقماع زجاجية ، ورق عباد الشمس ، بيض طازج ، لحم بقر طازج ، حليب ، طحين ، بيض دودة القز ، محلول كلور الصوديوم ١٠٪ ، محلول كبريتات الامونيوم المشبع ، محلول هدروكسيد الصوديوم (١٠٪ و ٣٠٪) ، محلول كبريتات النحاس ١٪ ، نينهيدرين ١٪ في الاسيتون ٩٥٪ ، محلول α ــ النفتول ٢ر٠٪ في الغول الايتيلي ، هيبوبروميت الصوديوم (الكواشف) ، كاشف ميللون (الكواشف) ، حمض الخل الثلجي ، حمض

الكبريت الكثيف ، حمض الآزوت الكثيف ، محلول الجيلاتين، حمض غليوكسيليك (الكواشف) ، فورم ألدهيد ٥ر٢٪ ، تتريت الصوديوم (٠٥ر٠٪ و ٥ر٠٪) ، حمض كلور الماء ٥٪ ، تترو بروسيد الصوديوم ٥٪ ، هدروكسيد الامونيوم المركز ، محلول بلومبيت الصوديوم (تضاف لكل ١ مل من خلات الرصاص قطرات من محلول قلوي حتى انحلال الراسب يتشكل في البدء هدروكسيد الرصاص) ، حمض البيكريك المشبع ، محلول تريس ـ غليسين الواقي pH = ٨ر٦ ، كربونات الصوديوم ٠

تحضير محاليل البروتينات لاجراء تفاعلات الكشف الكيفي

تحضير محلول بروتينات بيض الدجاج المركز

يفصل بروتين ثلاث بيضات عن الصفار يقدر متوسط وزن بروتين البيضة الواحدة بنحو ٣٣ غ ، فالناتج ١٠٠ مل محلول مركز من بروتينات بيض الدجاج ٠ يحتوي المحلول على ٨٨٪ ماء و ٢٪ سكاكر و ٥٪ مركبات معدنية و ١٠٪ تقريبا بروتينات ٠

تحضير محلول البومين البيض الممدد

يفصل صفار بيضة واحدة عن بياضها ، ويخلط البياض جيدا في دورق مع عشرة حجوم ماء مقطر ، يرشح المحلول خلال طبقتي شاش مرطبتين بالماء أو خلال قطعة نسيج كتاني مغسول ٠ يترشح محلول ألبومين البيض ويبقى في الراسب غلوبلين البيض ٠ يقدر تركيز الالبومين في بروتينات بيض الدجاج نحو ٦٪ ، فنسبة محلول الالبومين الممدد الحاصل نحو ٥ر٠٪ ٠

تحضير بروتينات اللحم

يوضع في كأس ٤٠ ـ ٥٠ غ لحما مفروما خاليا من الدهن ، يضاف اليه ٨٠ ـ ١٠٠ مل محلول كلور الصوديوم ١٠٪ ، يحرك المزيج مدة ١٥ ـ ٢٠ دقيقة ٠ يرشح خلال ورقة ترشيح مطواة أو خلال طبقتي شاش يكون لون السائل أحمر ٠ يوجد في المحلول بشكل رئيس ألبومين وغلوبلين العضلات ٠

تحضير بروتينات الحليب

يضاف لـ ٥٠ مل حليبا طازجا حجم مكافىء من محلول كبريتات الامونيوم المشبع • تنفصل بشكل راسب الغلوبلينات والكازئين ، يرشح خلال ورقة ترشيح مطواة محلول الالبومينات •

تحضير الالبومين النباتي

يمزج ٢٥ غ طحين القمح مع ١٠٠ مل ماء ويخضخض المزيج مدة ساعة بمساعدة رجاج • يثفل مزيج الطحين ويرشح السائل الطافي على ورقة ترشيح مطواة • الرشاحة سائل شفاف تحتوي على الاغلب على ألبومين حبوب القمح •

تحضير بروتينات بيض دودة القز

يسحق ١٠ غ من بيض دودة القز في هاون مبرد بمزيج الجليد الجاف والاسيتون أو الآزوت السائل • يضاف للناتج المتجانس ١٠ مل من محلول تريس ــ غليسين الواقي (pH = ٨ر٦) ، ويستمر بالسحق مدة عشر دقائق • تحمل الخلاصة الى أنابيب مثفلة مبردة وتثفل عند ١٥٠٠٠ دورة في وحدة تبريد لمدة ٢٠ دقيقة بالدرجة ــ ٤ وحتى الصفر سلسيوس • يحتوي السائل الطافي على نحو ٧٥ر٠٪ بروتينا • يمكن استعماله أيضا بعد تمديده من ٢ــ٣ مرات لفصل بروتينات الانسجة الحيوانية •

١٠ كشف الرابطة الببتيدية في جزيئات البروتينات (تفاعل بيوريت)

يضاف الى ١ــ٢ مل محلول البروتينات الممدد حجمان من محلول ٣٠٪ هدروكسيد الصوديوم ، يخضخض جيدا وتضاف اليه ثلاث قطرات من محلول كبريتات النحاس ١٪ • يخضخض من جديد • يظهر لون أحمر بنفسجي • يمكن تحقيق التفاعل عند كشف نسب قليلة من البروتينات • يضاف الى محلول البروتينات في القلوي ١ مل من محلول كبريتات النحاس ١٪ • تظهر بعد تركه فترة على الحد الفاصل بين الطبقتين حلقة بنفسجية •

بحثت آلية تفاعل بيوريت فيما سبق •

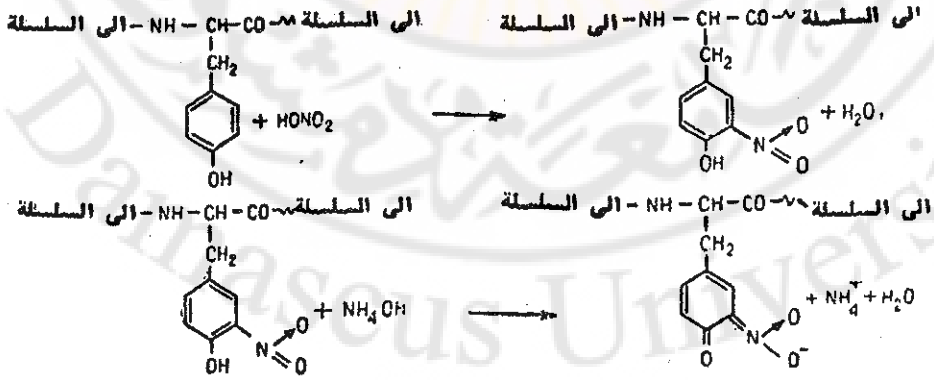
٢. تفاعل النينهيدرين

تضاف الى ٢ــ٣ مل محلول البروتينات الممدد ٣ــ٤ قطرات مــن محلول ١٪ النينهيدرين في ٩٥٪ محلول الاسيتون • يخضخض المزيج ويترك علــى حمام مائي بالدرجة ٧٠°س لعدة دقائق • يظهر لون أزرق ــ بنفسجي •

٣. تفاعل الكسانتوبروتين

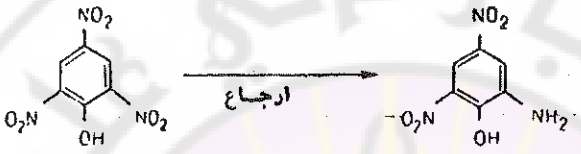
تضاف الى ١ مل محلول البروتينات من ٥ــ٦ قطرات حمض آزوت مركز حتى ظهور راسب أبيض أو عكر نتيجة تخثر البروتينات • يتلون الراسب والمحلول عند التسخين بلون أصفر زاهي • ينحل عنــد ذلك الراسب تقريبا بشكل كامل • يبرد المزيج وتضاف الى المحلول الحمضي بحــذر وبدون خضخضة الســائل قطرات زائدة من هدروكسيد الامونيوم المركز أو القلوي حتى الوسط القلوي • ينحــل الراسب المتشكل في البدء (الالبومينات الحمضية) ويتلون السائل بلون برتقالي زاهــي •

يجري تفاعل الكسانتوبروتين فقط عنــدما تحتــوي البروتينات علــى بقــايا الحموض الامينية العطرية (فينيل ألانين ، تيروزين ، تربتوفان) • مثلا لا يحتوي الجيلاتين على حموض أمينية عطرية لذلك فهو لا يعطي تفاعل الكسانتوبروتين • تتشكل نتيجة تفاعل النترجة بالجذور العطــرية للحموض الامينية مركبات النترو ذات اللون الاصفر • سبب تغير اللون الاصفر الى برتقالي في وسط قلوي ظهور زمرة كروموفور :



٤٠ التفاعل مع حمض البيكريك

يضاف الى ٢ مل محلول البروتينات المركز ٠٫٥ غ كربونات الصوديوم و ١ ميلي لترا محلولا مشبعا من حمض البيكريك ، يخضخض المزيج ويسخن على لهب المصباح عدة دقائق ٠ يتحول اللون الاصفر للمحلول بالتدريج الى لون أحمر بسبب ارجاع حمض البيكريك الى بيكر أمين :



يتحقق إرجاع حمض البيكريك الى بيكر أمين على حساب التحول الى زمر ثنائي كيتو بيبرازين ، التي تظهر نتيجة تكاثف الحموض الامينية في الجزيئات البروتينية عند الغليان في وسط قلوي ، وأيضا لحساب SH ــ البروتينات ٠ ويرجع حمض البيكريك بتأثير السكاكر الامينية والسكاكر الاحادية والمركبات الاخرى الداخلة في تركيب بعض البروتينات الطبيعية ٠ (لوحظت السكاكر في كثير من المركبات مع البروتينات والتي تدعى بالبروتينات السكرية) ٠

٥٠ تفاعل ساكاغوشي

يوضع في أنبوب اختبار ٢ــ٣ مل محلول البروتينات الممدد ، ويضاف اليه ١ مل محلول هدروكسيد الصوديوم ١٠٪ يتبع ذلك عدة قطرات محلول غولي لـ α ــ النفتول ٢٫٠٪ ٠ يخضخض الانبوب ويضاف اليه ٠٫٥ من محلول هيبو بروميت الصوديوم ٠ يظهر لون أحمر ــ برتقالي ٠ يفسر ظهور اللون نتيجة تفاعل α ــ النفتول بوجود مؤكسد بزمر غوانيدين الارجينين الموجودة في الجزيئة البروتينية ٠

٦٠ تفاعل ميللون

يضاف الى ٠٫٥ ــ ١ مل محلول بروتينات البيض المركز حجمان من كاشف ميللون ٠ يتخثر البروتين تحت تأثير ملح الزئبق وحمض الآزوت الموجودان في

الكاشف • تتشكل خثارة ذات لون أبيض • يتلون الراسب عند تسخين الانبوب على لهب المصباح بلون أحمر ــ آجري •

تعطي تفاعل ميللون كل البروتينات الحاوية بقية التيروزين • ولا تعطيه البروتينات غير الحاوية التيروزين (كالجيلاتين ، والبروتامين) •

٠٧ تفاعل ادامكيف

يصب في أنبوب اختبار عدة قطرات من محلول البروتينات المركز و ٢ مل من حمض الخل الثلجي ، المضاف اليه قليل من حمض الغليوكسيليك • يسخن المزيج بلطف حتى انحلال الراسب المتشكل • يبرد الانبوب مع المزيج ، بعد ذلك يميل الانبوب ٤٥° ويصب على جدرانه وبحذر ١ ميلي لترا حمض كبريت كثيفا بشكل لا يختلط فيه كلا السائلين ثم يترك ليهدأ • تظهر على السطح الفاصل بين السائلين حلقة بلون أحمر ــ بنفسجي • لا يعطي الجيلاتين هذا التفاعل لانه لايحتوي على التربتوفان ، يظهر اللون نتيجة تفاعل التربتوفان مع حمض الغليوكسيليك الذي يوجد غالبا في حمض الخل بشكل شوائب • ترتفع حساسية هذا التفاعل عند وجود كمية صغيرة من النحاس •

٠٨ تفاعل فوازين

يضاف الى أنبوب اختبار ٢ مل من محلول البروتينات الممدد وقطرة واحدة من محلول ٥ر٢٪ فورم ألدهيد • يخلط المزيج ويضاف اليه ٦ مل من حمض كلور الماء المركز والنقي (الكثافة لاتقل عن ١٧٥ر١) ، ثم يخضخض من جديد • يضاف بعد عشر دقائق مع خضخضة الانبوب ١٠ قطرات من محلول ٥ر٠٪ نتريت الصوديوم • يظهر لون أزرق ــ بنفسجي شديد •

يجري تفاعل فوازين فقط مع البروتينات الداخل في تركيبها التربتوفان • آلية هذا التفاعل تشبه آلية تفاعل هوبكينس ــ كول • يتكاثف في هذه الحالة التربتوفان مع الفورم ألدهيد •

٠٩ تفاعل باولي

يضاف الى ١ مل محلول حمض السلفانيليك ١٪ في محلول حمض كلور الماء

٥٪ ٢ مل محلول نتريت الصوديوم ٥ر٠٪ • يخضخض الانبوب بشدة ويضاف بسرعة أولا ٢ مل من محلول البروتينات الممدد ، وبعد خلط محتويات الانبوب يضاف ٦ من محلول كربونات الصوديوم ١٠٪ • يظهر لون أحمر ـ توتي • يشترط ظهور اللون وجود بقايا الهستيدين والتيروزين في الجزيئة البروتينية • تتفاعل بقية الهستيدين مع حمض سلفو ديازو البنزن •

١٠• التفاعل مع نترو بروسيد الصوديوم

يؤخذ في أنبوب اختبار ٣ مل محلول البروتينات الممدد ويضاف اليه حجم مساوٍ من محلول كبريتات الامونيوم المشبع و ٢ـ٣ قطرة محلول نترو بروسيد الصوديوم ٥٪ وعدة قطرات من محلول هدروكسيد الامونيوم حتى القلوية • يظهر عند وجود السيستئين في البروتين لون أرجواني •

١١• تفاعل كشف الرابطة الكبريتية

يصب في أنبوب اختبار ١ مل محلول البروتينات المركز ، ويضاف اليه ٢ ميلي لترا محلولا قلويا مركزا ومنظمات غليان ويغلى المزيج بحذر (لاحتمال تطاير السائل من الانبوب) • ينطلق في هذه الاثناء النشادر الذي يمكن ملاحظته برائحته أو بتلوين ورقة عباد الشمس الحمراء المرطبة بالماء باللون الازرق عند تقريبها من فوهة الانبوب (دون أن تلامس جدران الانبوب) • يتشكل راسب قليل ينحل بالغليان •

يقسم السائل القلوي الغالي الى قسمين : يضاف الى القسم الاول محلول خلات الرصاص ، يتشكل لون أصفر بني أو أسود • ويضاف الى القسم الثاني من ٢ـ٣ قطرة محلول نتروبروسيد الصوديوم المحضر حديثا يتشكل لون أحمر ـ بنفسجي •

تخضع البروتينات لحلمهة الرابطة الببتيدية تحت تأثير القلويات ، بالاضافة لحذف الزمرة الامينية لتعطي النشادر • وينزع أيضا الكبريت بشكل شوارد درجة أكسدتها + ٢ ، وذلك عند وجود حموض أمينية حاوية الكبريت (سيستين ، سيستئين) في جزيئة البروتين • يمكن ملاحظة تشكل شوارد الكبريت بالكشف

عن هذه الشوارد بمساعدة شوارد معدنية ، مثل شوارد الرصاص ، التي تشكل مع شوارد الكبريت كبريت الرصاص الراسب الاسود غير المنحل :

$$Pb(NO_3)_2 + 2NaOH \longrightarrow Pb(OH)_2 + 2NaNO_3$$
$$Pb(OH)_2 + 2NaOH \longrightarrow Na_2PbO_2 + 2H_2O$$
$$Na_2PbO_2 + H_2S \longrightarrow PbS\downarrow + 2NaOH$$

تتشكل شوارد الكبريت من كبريت الهدروجين في وسط شديد القلوية والتي يكشف عنها بنترو بروسيد الصوديوم كاشف شوارد الكبريت .

تحليل البروتينات كميا

تستعمل لتحليل البروتينات كميا طرق فيزيائية وكيميائية وحيوية . لا تستعمل الطرق الفيزيائية الا نادرا في تقدير وزن المجموعات البروتينية ، لان البروتينات تمتص رطوبة الهواء بشدة ، ويصعب طرد الماء من تركيبها بشكل كامل .

الطرق الفيزيائية الاكثر انتشارا لتحليل محاليل البروتينات كميا هي :

١ ــ طريقة قياس الانكسار .
٢ ــ طريقة المقياس اللوني .
٣ ــ طريقة المقياس الضوئي .
٤ ــ طريقة البيكنومتر وتستعمل بشكل نادر ، وهي تعتمد على حساب كثافة محلول البروتينات .

أبسط الطرق الكيميائية المستعملة لتحليل البروتينات كميا : التحليل الكمي للآزوت العام أو الآزوت البروتيني (بعد ترسيب البروتينات وفصلها عن المركبات الآزوتية المنحلة) . نحصل على نسبة البروتين بضرب قيمة نسبة الآزوت العام بالمعامل ٦٫٢٥ (وسطي محتوى الآزوت في البروتينات ١٦٪ ومن هنا ١٠٠ ÷ ١٦ = ٦٫٢٥) . تعطي الطريقة نسبة الآزوت البروتيني ومنها نحصل على نسبة البروتين المحضر المعطى . لا تعطي هذه الطريقة التقليدية نتيجة مطلقة .

تعتمد الطرق الكيميائية الاخرى في تحليل البروتينات على تحليل العناصر

الكمي كتحليل المعادن الموجودة في البروتينات أو تحليل نسبة وجود هذا الحمض الاميني أو الآخر .

مثـال : يحتوي الهيموغلوبين على ٣٤ر٠٪ حديدا . يعطي تحليـل نسـبة الحديد في المحضر إمكان حساب نسبة الهيموغلوبين ، إذا كـان المحضر المدروس لا يحتوي على مركبات أخرى تحتوي على الحديد غـير الهيموغلوبين . تستعمل هذه الطريقة فقط في حالات معينة .

الطريقة الكيميائية الاكثر انتشارا لتحليل البروتينات كميا هي طريقـة مقياس اللون «Colorimeter» . التي تعتمد على قياس شدة اللون الظاهر عن تفاعـل البروتينات مع هذا الكاشف أو غيره ، يتطلب ذلك بناء منحنٍ معياري لحسـاب تركيز البروتين . توجد طريقة حيوية لتحليل البروتينات كميـا تطبق فقـط عـلى البروتينات ، التي تظهر فعالية إنزيمية أو هرمونية . يمكن وضع تصور عـام عـن نسبة البروتين ، إذا قسنا درجة الفعالية الحيوية في المحضر المعطى . لا تعطي هذه الطريقة أيضا نتيجة مطلقة .

طريقة مقياس الانكسار لتعيين تركيز البروتينات في مصل الدم

الادوات والمواد اللازمة

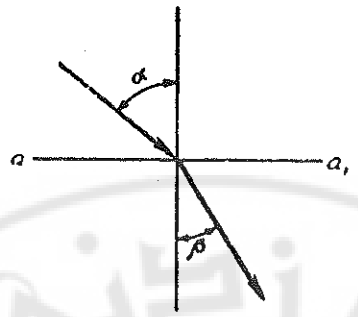
مقياس الانكسار Refractometer ، ورق ترشيح ، قطن ، قضبان زجاجية ، مزيج ايتر ــ غول (١:١) ، مصل الدم .

معامل الانكسار (أو دليل الانكسار) هو العلاقة بين جيب زاوية شعاع الضوء الساقط على جيب زاوية انكساره كما في الشكل (٦ــ١) .

يرمز لمعامل الانكسار كما هو معروف بالحرف n :

$$n = \frac{\text{Sin } \alpha}{\text{Sin } \beta}$$

يوجد تناسب طردي بين معامل الانكسار (n) وتركيز المـادة في المحلول . يمكن معرفة تركيز المادة في المحلول اذا عرفنـا معامل انكساره باستعمال جداول خاصـة .

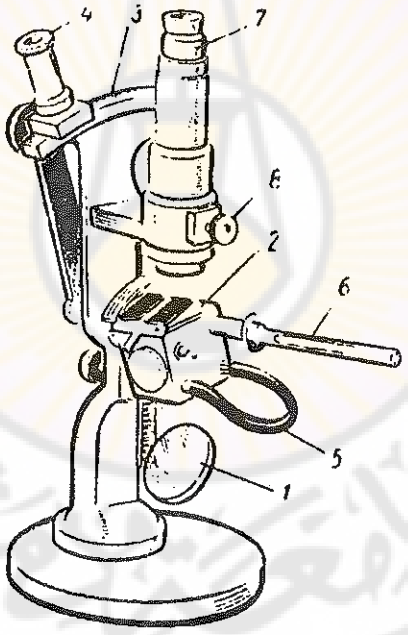


شكل (٦ـ١) انكسار شعاع الضوء عند مروره من وسط الى آخر

$a\ a_1$ — الحد الفاصل بين الوسطين

α — زاوية الشعاع الساقط

β — زاوية الانكسار



الشكل (٦ـ٢) الشكل العام لمقياس الانكسار

١ـ مرآة ، ٢ـ حجرة المواشير ، ٣ـ مدرج (سلم) ، ٤ـ عدسة مكبرة ؛ ٥ـ خرطوم وصل للمنظم الحراري ، ٦ـ ميزان حرارة ، ٧ـ عدسة عينية ، ٨ـ اكروماتر .

أعدت طرق مفصلة لتحليل البروتينات كميا . وهي مرضية بخاصة لتحليل تركيز بروتينات السوائل ذات المنشأ الحيوي كمصل الدم ، مستخلص الحشرات .. الخ .

يتم قياس معامل انكسار محلول البروتين أو السائل الحاوي البروتين ذا المنشأ الحيوي بمساعدة مقياس الانكسار الخاص . يستعمل من أجل ذلك مقياس الانكسار بدقة حساب $١٠^{-٤}$ ـ $١٠^{-٥}$ ، الذي يسمح بالعمل ليس فقط مع الضوء وحيد اللون ولكن أيضا مع الضوء الابيض . وتستعمل لاجراء التحليل عدة قطرات من المحلول . يوضح الشكل (٦ـ٢) مقياس الانكسار .

طريقة عمل مقياس الانكسار

تفتح الحجرة (٢) وتغسل المواشير بالماء بشكل خفيف وتنشف بورق الترشيح ، وتجفف ثم تمسح المواشير بقطعة قطن مرطبة بمزيج الغول الايتيلي والايتر (١:١) . تحمل بوساطة قضيب زجاجي قطرتان من الماء المقطر وتوضعان على الموشور السفلي وتغلق الحجرة . ينظم مقياس الانكسار بحيث تصبح المواشير منارة بوضوح بالضوء المباشر أو بحزمة ضوئية منعكسة عن المرآة (١) . وتحكم الرؤية الواضحة تدريجيا في أرضية العدسة العينية (٧) . اذا كانت حدود الظل ملونة وغامضة يدور ساعد الاكروماتر (٨) للحصول على حدود واضحة وغير ملونة . يقرب بتدوير الموشور أو العدسة العينية لمقياس الانكسار حدود الارضية المعتمة الى تقاطع خيط العدسة . يقرأ السلم . يجب أن يكون الحساب بالدرجة ٢٠°س يساوي ١٫٣٣٣ (معامل انكسار الماء بالدرجة ٢٠°س) يعني ذلك أن الجهاز قد انتظم وهو يعمل بشكل صحيح .

بعد تنظيم الجهاز على الماء ، تفتح حجرة المواشير ويجفف الماء بورقة ترشيح ومن ثم تمسح المواشير بمزيج الغول والايتر . توضع على الموشور السفلي قطرة شفافة من مصل الدم المحضر لهذا الغرض وتغلق الحجرة . يجري العمل والحساب كما ذكر سابقا ، يضبط الجهاز ويعين حساب ثانٍ وثالث . تسجل القيم الثلاث في الدفتر العملي . وتؤخذ القيمة الوسطية . يستعمل من أجل ذلك جدول خاص ، الجدول (٦ـ١) ، يعطي نسبة وجود البروتينات في مصل الدم . سجل القيمة التي وجدتها في دفتر العملي .

الجدول (٦ــ١) العلاقة بين قياس الانكسار وتركيز البروتين في المحلول

قياس الانكسار	تركيز البروتين ٪									
	٠٠	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩
1,337	0,60	0,66	0,72	0,77	0,83	0,89	0,95	1,01	1,07	1,12
1,338	1,18	1,24	1,30	1,36	1,41	1,47	1,53	1,59	1,65	1,70
1,339	1,76	1,82	1,88	1,94	2,00	2,05	2,11	2,17	2,23	2,29
1,340	2,34	2,40	2,46	2,52	2,58	2,63	2,69	2,75	2,81	2,87
1,341	2,93	2,98	3,04	3,10	3,16	3,22	3,27	3,33	3,39	3,46
1,342	3,51	3,57	3,62	3,68	3,74	3,80	3,86	3,91	3,97	4,03
1,343	4,09	4,15	4,20	4,26	4,32	4,38	4,44	4,50	4,55	4,61
1,344	4,67	4,73	4,79	4,84	4,90	4,96	5,02	5,08	5,13	5,19
1,345	5,25	5,31	5,37	5,43	5,48	5,54	5,60	5,66	6,72	5,77
1,346	5,83	5,89	5,95	6,01	6,07	6,12	6,18	6,24	6,30	6,36
1,347	6,41	6,47	6,53	6,59	6,65	6,70	6,76	6,82	6,88	6,94
1,348	7,00	7,05	7,11	7,17	7,23	7,29	7,34	7,40	7,46	7,52
1,349	7,58	7,63	7,69	7,75	7,81	7,87	7,93	7,98	8,04	8,10
1,350	8,16	8,22	8,27	8,33	8,39	8,45	8,51	8,57	8,62	6,68
1,351	8,74	8,80	8,86	8,91	8,97	9,03	9,09	9,15	9,20	9,26
1,352	9,32	9,38	9,44	9,50	9,55	9,61	9,67	9,73	9,79	9,84
1,353	9,90	9,96	10,02	10,08	10,13	10,19	10,25	10,31	10,37	10,43
1,354	10,48	10,54	10,60	10,66	10,72	10,77	10,83	10,89	10,95	11,01
1,355	11,06	11,12	11,18	11,23	11,29	11,35	11,41	11,47	11,52	11,58
1,356	11,64	11,70	11,76	11,81	11,87	11,93	11,99	12,05	12,10	12,16
1,357	12,22	12,28	12,34	12,39	12,45	12,51	12,57	12,63	12,68	12,74
1,358	12,80	12,86	12,92	12,97	13,03	13,09	13,15	13,21	13,26	13,32
1,359	13,38	13,44	13,50	13,55	13,61	13,67	13,73	13,79	13,84	13,90
1,360	13,96	14,02	14,08	14,13	14,19	14,25	14,31	14,37	14,42	14,48

تغسل بنهاية العمل مواشير الجهاز بالماء من مصل الدم ، وتنشف بورق الترشيح وتمسح بمحلول الغول والايتر • توضع على الموشور السفلي قطعة ورق ترشيح وتغلق الحجرة • يترك الجهاز بهذه الحالة للعملية التالية •

إذا لم تكن درجة الحرارة ٢٠°س أثناء العمل بالجهاز يدخل تصحيح على معامل الانكسار يساوي ٠٠٠١ر٠ لكل درجة • يضاف التصحيح في حالة ارتفاع درجة الحرارة ويطرح في حال انخفاضها •

تحليل البروتينات كميا بطريقة تعيين الآزوت العام والآزوت البروتيني

الادوات والمواد اللازمة

أنابيب (٥ر٠ × ٣ سم) لوزن المادة ، أنبوبة مطاطية قطر ٥ر٠ سم ، دورق كيلدال سعة ١٠٠ مل و ٥٠٠ مل ، سدادة زجاجية مجوفة لدورق كيلدال ، وصلة كيلدال ، مبرد زجاجي مخبري مستقيم ، أنبوبة مع كرة حماية (ماصة هيمبل) ، دورق ذو قاعدة سعة ٢٥٠ مل ، منظمات غليان ، سحاحة ٥٠ مل ، قمع زجاجي ، مقياس مدرج ٥٠ مل •

حمض كبريت مركز ، كبريتات النحاس ، كبريتات البوتاسيوم ، محلول هدروكسيد الصوديوم ٣٣٪ ، محلول حمض البور ٥ر٢٪ ، محلول حمض كلور الماء ١/١٤ نظاميا ، المزيج الكاشف (الكواشف) •

تعطي تحليل الآزوت العام كما لاحظنا سابقا تصورا تقريبيا عن نسبة البروتينات في المحضرات ذات المنشأ الحيوي • ويعطي تعيين الآزوت البروتيني للمحضرات الحيوية دقة أكبر • تستعمل كلتا الطريقتين بشكل واسع لتقويم نوعية الاعلاف المقدمة لتربية المواشي ، عند دراسة هضم الاعلاف والمركبات الآزوتية وامتصاصها عند الحيوانات • تعين في هذه الحالات نسبة الآزوت غالبا بطريقة كيلدال •

تحليل الآزوت العام بطريقة كيلدال

لتحليل الآزوت العام تحرق المركبات العضوية بحمض الكبريت المركز (لتحويل المادة الى عناصرها) • تتفكك المواد العضوية وتتأكسد الى غاز ثنائي أكسيد

الكربون وماء • ويتحول الآزوت في هذه الشروط الى نشادر الذي يشكل مع حمض الكبريت ملح الامونيوم • يفكك بعد انتهاء الحرق ملح الامونيوم بالقلوي فينطلق النشادر الذي يمتصه حمض البور • يعاير رباعي بورات الامونيوم بمحلول حمض كلور الماء وتحسب كمية الآزوت في الوزنة الخاضعة للحرق وبعد ذلك لكل المحضر •

يمكن تمثيل المراحل الكيميائية عند تحليل الآزوت العام حسب كيلدال بالمعادلات التالية :

$$\text{المركب العضوي حاوي الآزوت} + H_2SO_4 \xrightarrow{\text{مركز}} (NH_4)_2SO_4 + CO_2 + H_2O$$

$$(NH_4)_2SO_4 + 2KOH \longrightarrow K_2SO_4 + 2H_2O + 2NH_3$$

$$2NH_3 + 4H_3BO_3 \longrightarrow (NH_4)_2B_4O_7 + 5H_2O$$

يستعمل لتسريع الحرق وسطاء كالماء الاكسجيني ، الزئبق ، وكبريتات النحاس اضافة لكبريتات البوتاسيوم التي تعمل على رفع درجة حرارة احتراق المزيج •

توزن المادة (الجافة والمسحوقة النباتية أو الحيوانية) بدقة بميزان تحليل • يجب أن تحتوي على ٢٠ــ٤٠ مغ آزوتا • يؤخذ من المادة النباتية ٣ر٠ ــ ٥ر٠ غ ، والحيوانية ١ر٠ ــ ٢ر٠ غ • توزن المادة في أنبوب صغير (٥ر٠ × ٣ سم) ؛ ثم يوصل هذا الانبوب الصغير بأنبوبة مطاطية بالقطر المناسب ؛ وتصب المادة في دورق كيلدال • تجرى هذه العملية على الشكل التالي : يدخل الانبوب بمساعدة الانبوبة المطاطية حتى قاعدة دورق كيلدال المقلوب (القاعدة في الاعلى) ثم تقلب كل المجموعة • يوزن بعد ذلك الانبوب الفارغ ومن حساب فرق الوزن يعين وزن المادة •

يجرى الحرق بدورق كيلدال الذي يحتوي على المادة و ١٠ من حمض كبريت • تضاف الى المزيج كبريتات النحاس (كوسيط) و ٥ غ كبريتات البوتاسيوم (التي تضمن رفع درجة حرارة حرق المادة الى القيمة المثلى) • يحرك محتوى الدورق (دون الخضخضة) ، يوضع الدورق على شبكة أميانت بوضع مائل وتغلق الفتحة بسدادة زجاجية مجوفة • يتم الحرق تحت ساحبة الهواء • يجرى الحرق في البداية على لهب ضعيف • تتفحم المادة وتتشكل رغوة بسبب انطلاق الغازات وفي

عدادها أكسيد الكبريت(IV) • يبعد اللهب في حال تشكل الزبد الشديد لكي لا يسمح بصعود الزبد عاليا في الدورق • يحرك السائل بحذر في الدورق ويسخن من جديد على الشبكة بعد هبوط الزبد • يمكن زيادة التسخين بعد انقطاع الزبد ، حتى الدرجة التي يغلي بها السائل بشكل خفيف • يسبب التسخين الشديد فقدان كمية من الآزوت بسبب تفكك كبريتات الامونيوم • يجب مراقبة عنق الدورق الذي يجب أن يكون دائما باردا •

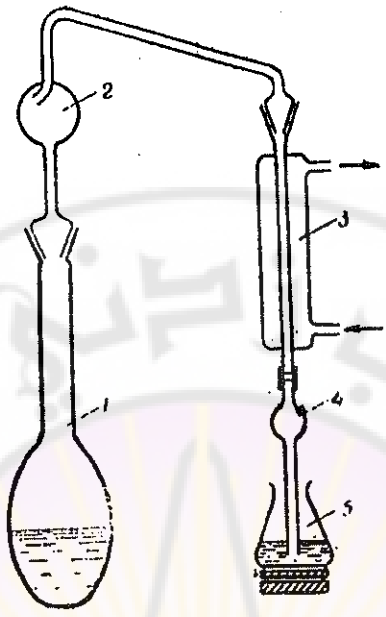
يلاحظ التفحم الشديد والرغوة الزائدة عند حرق المركبات الحاوية كمية كبيرة من السكاكر ، والشحوم ، والبروتينات • وتتأكسد المركبات المكونة من جزيئات ذات السلاسل الكربونية القصيرة دون تشكل كتل فحمية ، ويتلون السائل بلون بني ــ غامق أو بلون أسود • يجب الانتباه لعدم تشكل مركبات داكنة على جدران دورق كيلدال • يجب في حال تشكلها غسل الدورق وهو بوضع مائل بحمض ساخن •

يستمر التسخين حتى اختفاء اللون الغامق ولمدة ١ــ٢ ساعة بعد صفاء السائل• يغلق بعد ذلك دورق كيلدال بسدادة نظيفة مطاطية بشكل محكم •

يجب لتقطير النشادر استعمال الجهاز المؤلف مما يلي :

دورق تقطير سعة ٥٠٠ مل يرتبط مع وصلة لالتقاط القطرات ، مبرد ، أنبوب ذي كرة للحماية من امتصاص السائل ، قابلة سعة ٢٥٠ مل التي يوضع فيها قبل بدء التقطير ٥٠ مل محلول ٢ر٥٪ حمض البور •

يصب في دورق كيلدال الذي تم فيه الحرق بعد تبريده من ٢٠ ــ ٣٠ مل ماء • يحرك الدورق جيدا ومن ثم تصب كل محتوياته الى دورق كيلدال سعة ٥٠٠ مل ، يغسل دورق كيلدال الذي تم فيه الحرق من ٤ــ٥ مرات بكمية من الماء ٢٠ــ٢٥مل، وتصب هذه الغسالات بدورق التقطير نفسه • يجب أن يكون الحجم الكلي للسائل تقريبا ١٥٠ مل • يرمى في الدورق بضعة منظمات غليان ويصب بالمقدار نفسه محلول ٣٣٪ هدروكسيد الصوديوم الكمية اللازمة لتعديل كمية حمض الكبريت المأخوذة للحرق وتجعل الوسط قلويا شديدا •



شكل (٦ــ٣) جهاز لتقطير النشادر

١ ــ دورق تقطير كيلدال سعة ٥ر٠ لترا .
٢ ــ وصلة كيلدال .
٣ ــ مبرد ليبيغ .
٤ ــ ماصة حماية .
٥ ــ قابلة .

يؤخذ لحساب الحجم اللازم من القلوي ١٠ مل من حمض الكبريت المستعمل للحرق بدورق كيلدال ويمدد بـ ١٥ ــ ٢٠ مل ماء وتضاف اليه قطرتان من فينول فتالئين ومن ثم يصب بوساطة سحاحة مدرجة قطرات من القلوي حتى تعديل الحمض . يحسب حجم القلوي اللازم لـ ١٠ مل حمض كبريت ويضاف زيادة على ذلك ١٠ مل قلوي لجعل الوسط قلويا شديدا ، وهو الوسط اللازم لتفكيك كبريتات الامونيوم . يصب القلوي بحذر على جدران الدورق المائل ، لكي يسيل الى القعر ولا يختلط مع السائل ، لتجنب فقدان النشادر . يغلق بعد ذلك الدورق بسدادة مطاطية مع الوصلة ، ويوضع على الشبكة ، وتحرك محتويات الدورق بحذر ويسخن حتى الغليان .

يدخل النشادر المنطلق والماء المبرد الى قابلة حمض البور • يجب أن تكون نهاية الانبوب ذو الكرة مغموسة في الحمض • بعد أن تتقطر الكمية الرئيسة من النشادر ، تسحب الانبوبة من الحمض تاركين انسياب السائل بشكل حر من النهاية • تحدد نهاية التقطير بفحص القطرات المنسابة من الانبوبة ذات الكرة المتصلة بالمبرد بورق عباد الشمس • ينتهي التقطير عادة بعد تقطير ٣/٢ من حجم السائل (نحو ١١٠ مل) • تغسل بعد انتهاء العمل نهاية الانبوبة مع الكرة وداخلها بالماء بوساطة دورق غسل •

يمتص حمض البور النشادر مشكلا ملحا ــ رباعي بورات الامونيوم ، الذي هو ملح حمض ضعيف يعاير بحمض كلور الماء • تتعادل كمية حمض كلور الماء اللازمة للمعايرة مع كمية النشادر • لا تؤثر الزيادة من حمض البور لانه حمض ضعيف في تغير لون كاشف الحمض القلوي • يستعمل للمعايرة محلول ١/١٤ نظامي حمض كلور الماء •

$$(NH_4)_2 B_4O_7 + 2\,H\,Cl \rightarrow 2\,NH_4Cl + H_2\,B_4\,O_7$$

يتضح من معادلة التفاعل بأن العلاقة بين زمرة NH_4 وجزيئة $H\,Cl$ تساوي ١ : ١ • يتبع ذلك بأن ١ مل من محلول ١/١٤ نظامي حمض كلور الماء يلزم لمعايرة جزء من ألف ١/٢٨ جزيئة آزوتا معنى ذلك ١ مغ آزوتا •

يضاف لدورق القابلة من ١٠ ــ ١٥ قطرة من مزيج الكاشف حتى يظهر لون أخضر واضح وتعاير بوساطة السحاحة بمحلول ١/١٤ نظامي حمض كلور الماء حتى يتغير اللون الى بنفسجي (اللون الوسطي ــ رمادي عميق) • يوافق عدد الميلي لترات اللازمة من حمض كلور الماء عدد الميلي غرامات آزوت في المحلول •

تجري عند تحليل الآزوت تجربة مقارنة على الكواشف • تطرح كمية الآزوت الناتجة بالميلي غرامات في التجربة المقارنة من التجربة المأخوذة • تحسب نسبة الآزوت في المادة المأخوذة للحرق بضرب الرقم بـ ٦٫٢٥ نحصل على نسبة البروتين الخام في المحضر المدروس •

تحليل الآزوت البروتيني

الادوات والمواد اللازمة

فرن تجفيف ، حمام مائـي ، كؤوس سعة ١٠٠ مـل ، قضبان زجاجية ، أقماع زجاجية ، ورق ترشيح بدون آزوت ، مادة نباتية أو حيوانية جافة ، غول ايتيلـي ٩٦٪ ، محلول حمض ثلاثي كلور الخل (٥٪ و ١٠٪) ، جهاز وأدوات اللازمـة لتحليل الآزوت العام .

طريقـة العمـل

يوزن ٥ر٠غ من المادة النباتية الجافـة أو ٣ر٠غ من المادة الحيوانية الجافـة بميزان تحليل ، وتوضع في كأس سعة ٥٠ مل ، وترطب ببضـع قطرات من محلول غول ايتيلي ٩٦٪ ومن ثم يصب ٢٠ ميلي لترا ماء مقطرا . تحرك المحتويات بوساطة قضيب زجاجي وتترك في الكأس حتى نهاية اسـتخلاص الآزوت غير البروتيني . يوضع الكأس في حمام غالٍ ، ويحـرك من وقت لآخر ويستمر بالتسخين مدة ٣٠ دقيقة . تنحل المركبات الآزوتيـة المنحلة في المـاء . يبـرد الكأس حتى حـرارة الغرفة ، ويضاف حجم مساوٍ من محلول ثلاثي كلور حمض الخل ١٠٪ (TCA) ، يحرك ويترك لمدة ساعتين ، تترسـب TCA البروتينـات من الخلاصة ، تاركة في الرشاحة المركبات الآزوتية غير البروتينية . يرشـح الراسب على قمع قطره ٥ سم خلال ورق ترشيـح سميك خالي الآزوت ، يغسـل الراسب ثلاث مرات بمحلول ٥٪ TCA . ترمى الرشاحـة ويجفف الراسب مع المرشـح بلطف في فرن تجفيف بالدرجة ٦٠ ــ ٧٠°س . يسحب المرشح وتضاف اليه ١٠٠ مل حمض كبريت كثيف وبضع بلـورات كبريتـات النحاس و ٥غ كبريتـات الصوديـوم اللامائيـة أو البوتاسيوم . يحرق الراسب مع المرشح ويعين الآزوت كما ورد سابقا .

تجري بالوقت نفسـه تجربة مقارنة بأخـذ المرشح نفسه مـن حيث النوعية والقياس وباستعمال كل الكواشف . يؤخذ الفرق في قيمة الآزوت بالميلي غرامات الحاصل بين تجربة المقارنة والعينة . تحسب نسبة وجود البروتينات في المحضـر بضرب نسبة الآزوت البروتيني الذي حصل عليه بـ ٦ر٢٥ . علما بأن الرقـم الناتج

لا يعطي البروتينات بشكلها النقي لان قسما من الآزوت المحسوب يخص الحموض النووية ، والشحوم ومركبات أخرى ، لا يستخلصها الماء من المحضر . يعطي مع ذلك تحليل الآزوت البروتيني تصورا أكثر دقة عن نسبة البروتينات في المحضر من تحليل البروتين الخام .

تعد معرفة التركيز النهائي TCA ضرورية لترسيب البروتينات الكامل من الخلاصة باختلاف المحضر المعطى . لذلك تجرى مسبقا عدة تجارب لترسيب البروتينات من الخلاصة بثلاثي كلور حمض الخل بتراكيز تبدأ من ٢ر٥٪ وحتى ١٠٪ . تختار على أساس المعطيات السابقة الحالة المثلى من TCA لترسيب البروتينات عند العمل مع المحضر المعطى .

تحليل البروتينات كميا بتفاعل بيوريت

لا يتصف تفاعل بيوريت على البروتينات بحساسية كبيرة . لذلك يستعمل في الحالات التي تكون فيها نسبة البروتينات في النموذج المبحوث بكمية كافية (لا يقل عن عدة ميلي غرامات في الميلي لتر) .

الادوات والمواد اللازمة

مقياس اللون Photoelectro Colorimeter ، أنابيب زجاجية ، ماصات مدرجة سعة ١ و ٥ و ١٠ مل ، محلول هدروكسيد الصوديوم (١٠٪) لايحتوي على الكربونات كشوائب (يحضر بتمديد محلول ٧٥٪ هدروكسيد الصوديوم خالي الكربونات ، بالماء المقطر المغلي المتحرر من CO_2) ، محلول كلور الصوديوم ١٪ ، كبريتات النحاس ، ملح طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم ، مصل الدم ، مستخلص الحشرات ، مستخلص بروتينات الانسجة.

تحضر ثلاث سلاسل من المحاليل المعيارية تحتوي على ١ الى ١٠ مغ بروتين في ١ مل محلولا . يمكن أخذ بدلا من بلورات البروتين مصل الدم ، الذي عينت فيه نسبة البروتينات بطريقة قياس قرينة الانكسار ويمدد الى التركيز المناسب بتحضير سلسلة محاليل بكلور الصوديوم ١٪ .

يحضر كاشف بيوريت بالحل المتتابع في دورق معياري سعة ٢٥٠ مل للمركبات التالية : ٣٧ر٠ غ من $CuSO_4 . 5 H_2O$ و ١ر٥ غ ملح طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم KOOC — CHOH — CHOH — COO Na في ١٥٠ مل ماء . يضاف ببطء ومع التحريك المستمر ٧٥ مل هدروكسيد الصوديوم ١٠٪ ومن ثم يتمم الحجم بالماء حتى ٢٥٠ مل . لا يحفظ كاشف بيوريت لفترة طويلة في الاوعية الزجاجية يؤخذ من السلسلة الاولى ١ مل من كل محلول من محاليل البروتينات المعيارية في أنابيب اختبار مستقلة ويضاف لكل واحد منها ٨ مل من كاشف بيوريت . تخضخض الانابيب وتترك مدة ٣٠ دقيقة بحرارة الغرفة . تقاس شدة الضوء في خلية من الكوارتز (طول ١ سم) عند ٥٤٠ ميلي مكرون ضد محلول المقارنة (يؤخذ بمكان محلول البروتينات ١ مل ماء مقطرا) . يعاد التحليل ثلاث مرات آخذين كل مرة سلسلة جديدة من محاليل البروتينات المعيارية . يرسم المنحني المعياري من القيم التي حصل عليها .

يمدد ١ مل من مصل الدم أو ١ مل من مستخلص الحشرات بمحلول ١٪ كلور الصوديوم بـ ١٠ مرات . يؤخذ ١ مل من المحلول الممدد ويوضع في أنبوب اختبار ويضاف اليه ١ مل من المحلول الممدد ويوضع في أنبوب اختبار ويضاف اليه ٨ مل من كاشف بيوريت ، يحرك جيدا ويترك مدة ٣٠ دقيقة . تقاس شدة الضوء في خلية الكوارتز (طول ١ سم) عند ٥٤٠ ميلي مكرون ضد محلول المقارنة . تعين نسبة البروتينات في الانبوب بوساطة المنحني المعياري ، ويتمم الحساب باعطاء النسبة المئوية لكل المحضر .

تحليل البروتينات الكمي بطريقة لاوري

الادوات والمواد اللازمة

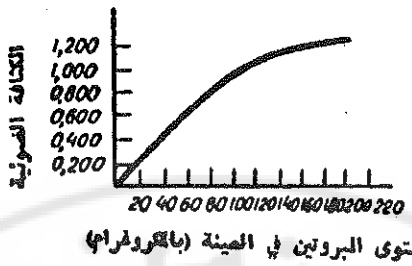
مقياس اللون Photoelectrocolorimeter ، مقاييس مدرجة سعة ١٠ و ٥٠ مل ، ماصات مدرجة سعة ١ و ٥ و ١٠ مل ، أنابيب اختبار ، محلول A : محلول كربونات الصوديوم ٢٪ في محلول ١ر٠ نظامي هدروكسيد الصوديوم ، محلول B : محلول كبريتات النحاس ٥ر٠٪ في ليمونات الصوديوم ١٪ ، محلول C : كاشف فولين (الكواشف) ، محضر بروتيني .

تعتمد طرق تحليل البروتينات كميا على التفاعلات الملونة وطريقة لاوري هي الاكثر انتشارا لحساسيتها العالية . تعطي كل الطرق المعتمدة على التفاعلات الملونة نسبة البروتينات فقط في الحالات التي يبنى فيها منحنٍ معياري للبروتين نفسه .

تعتمد طريقة لاوري على قياس شدة لون محلول التفاعلين الملونين للبروتين : تفاعل بيوريت وتفاعل فولين على البروتين الحاوي جذور التيروزين والسيستئين لتشكيل معقدات ذات اللون الازرق . تسمح طريقة لاوري بتعيين البروتينات في محلول ممدد جدا ، تتراوح كميته بحدود عشرات المكروغرامات ، تستعمل هذه الطريقة لتقدير البروتينات في محلول الشطف عند الفصل على عمود التبادل الشاردي وسيفادكس .

يمزج قبل اجراء التحليل ٤٩ مل من المحلول A مع ١ مل من المحلول B . يضاف الى ١ مل من محلول البروتينات المراد بحثه الحاوي ١٠ ــ ١٠٠ مكروغرام بروتين ٤ مل من مزيج محلول A و B . يخلط المزيج جيدا ويترك لمدة عشر دقائق بحرارة المختبر . يصب بعد ذلك بسرعة ٤ر٠ مل كاشف فولين ، يخضخض المحلول بشدة ويترك لمدة ٣٠ ــ ٩٠ دقيقة حتى ظهور اللون الاصفر الذي يتحول تدريجيا الى أزرق . تقاس الكثافة الضوئية للمحلول بالمقياس اللوني أو المقياس الضوئي عند ٧٥٠ ميلي مكرون . تعين نسبة البروتينات في العينة من المنحني المعياري المرسوم مسبقا لمحلول بروتيني نقي معلوم التركيز بدقة . يحضر من أجل ذلك محلول بروتيني (بلورات ألبومين البيض أو ألبومين مصل الدم ، الكازئين ، أو يستعمل بشكل أفضل ، بروتين او مزيج بروتينات معلومة التركيز) يحتوي على ٢٠ ــ ٤٠٠ مكروغرام بروتين في ١ مل . تستعمل البروتينات المحللة بطريقة مقياس الانكسار لتحضير محلول معياري معلوم التركيز . وبتمديده بمحلول هدروكسيد الصوديوم ١ر٠ نظاميا تحصل على سلسلة محاليل معيارية .

تقاس الكثافة الضوئية لكل محلول باستعمال طريقة لاوري . يرسم المنحني المعياري للمعطيات كما هو موضح على الشكل (٦ ــ ٤) .



شكل (٦ــ٤) المنحني المعياري لتحليل البروتينات بطريقة لاوري

يوصل لحساب نسبة البروتينات خط أفقي من إحدى قيم الكثافة الضوئية والممثلة على محور العينات الى نقطة التقاطع مع المنحني المعياري ، ومن نقطة التماس يسقط عمود على محور السينات . تعطي نقطة التقاطع مع محور السينات نسبة البروتينات بالمكروغرام في العينة المدروسة . يلي ذلك حساب نسبة البروتينات في ١٠٠ مل أو ١٠٠٠ مل محلول .

بنية البروتينات وخواصها

تفاعلات ترسيب البروتينات

تدخل بتركيب البروتينات جذور الحموض الامينية المختلفة ، يؤدي ذلك لتفاعل البروتينات مع مركبات كثيرة (الحموض ، الشوارد المعدنية ، الاغوال وغيرها) ، وتتنافس مع بعضها على جزيئات المحل (الماء) . وتكون النتيجة في كثير من الحالات ترسب البروتينات .

يستعمل لاجراء تفاعلات ترسيب البروتينات المنحلة العوامل والكواشف الوارد ذكرها بعد قليل .

الادوات والمواد اللازمة

ورق ترشيح ، محلول البروتينات ، قمع زجاجي ، أنابيب اختبار .

كبريتات الامونيوم (محلول مشبع وبلورات) ، محلول حمض الخل ١٪

و ١٠٪ ، محلول كلور الصوديوم المشبع ، محلول هدروكسيد الصوديوم ١٠٪ ، حمض الآزوت المركز ، حمض كلور المـاء المركز ، حمض الكبريت المركز ، حمض الخـل المركز ، محلول ثلاثي كلـور حمض الخـل ٥٪ ، محلـول سلفو حمض الساليسليك ٢٠٪ ، محلول كبريتات النحاس ٥٪ ، محلول خلات الرصاص ٥٪ ، محلول حمض البيكريك المشبع ، محلول حمض التنّيك ١٠٪ ، محلول يود الزئبق في يود البوتاسيـوم (الكواشـف) ، محلول حمـض كلور المـاء ٥٪ ، محلول هكساسيان حديـد البوتاسيوم ٥٪ ، محلول الفينـول المشبع ، فورمالين ، غول ايتيلي ، محلول تنغستات الصوديـوم Na_2WO_4 ١٠٪ ، محلول حمض الكبريت ٦٦ر٠ نظامي ٠

تمليح البروتينات بكبريتات الامونيوم

يصبّ في أنبوب اختبار ١ ميلي لترا محلولا بروتينيا ، ويضاف اليه حجم مماثل من محلول كبريتات الامونيوم المشبع ويخلط المزيج جيدا ٠ يظهـر عكـر نتيجـة ترسب الغلوبلينات ٠ يرشح السائل العكـر ويسخن جزء من الرشاحة الصافية حتى الغليان يلاحظ تخثر الالبومينات الموجـودة في المحلول وترسبها ٠ يؤخذ قسـم آخر من الرشاحة الصافيـة وتضاف اليه مع التحريـك زيادة من مسحوق كبريتات الامونيوم حتى الاشباع ٠ يظهر عكر أو راسب قطني من الالبوميثات ٠ يعد تفاعل ترسيب البروتينات بالاملاح عكوسيا،فعند اضافة الماء تعود البروتينات الى الانحلال من جديـد ٠

يعود سبب ثبات المحاليل البروتينية الى كـون الجزيئات البروتينية في المحاليل المائية مشحونة ومسيهة ٠ ولكن تميه الشوارد عنـد تركيز الاملاح العالي ، يؤدي لتخريب الغلاف المـائي المحيط بالجزيئات البروتينية ، وتخمد الشحن بسبب امتزاز البروتينات للشوارد الملحيـة ٠ تفقد نتيجة ماسبق المحاليل المائية ثباتها ، وتتلاصق الجزيئات البروتينية مع بعضها وتترسب ٠

يظهر استعمـال كبريتات الامونيـوم في التجربـة خاصة تمليـح البروتينات وترسبها في الوسط المعتدل ، ويفضل أيضـا الوسط الحمضي الضعيف ٠ ترسب

الاملاح الاخرى مثل كلور الصوديوم البروتينات فقط عند تحميض الوسط البروتيني .

تستعمل لتمليح البروتينات وترسبها تراكيز متغايرة من مختلف الاملاح . تترسب الغلوبلينات في محلول كبريتات الامونيوم نصف المشبع ، والالبومينات فقط في حالة المحلول المشبع .

تخثر البروتينات بالتسخين

تؤخذ خمسة أنابيب ويوضع في كل أنبوب ٢ مل من محلول البروتينات .

أ. يسخن محتوى الانبوب الاول . يتخثر البروتين قبل أن يبدأ السائل بالغليان .

ب. تضاف الى الانبوب الثاني قطرة واحدة من محلول حمض الخل ١٪ ويسخن . يلاحظ تشكل راسب قطني بسرعة وبشكل كامل ، بسبب تحميض المحلول لدرجة قريبة من نقطة التعادل الكهربائي للبروتين .

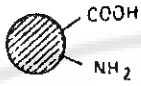
جـ. يضاف الى الانبوب الثالث ٥ر٠ مل من محلول حمض الخل ١٠٪ ويسخن لا يترسب البروتين عند الغليان .

د. يضاف الى الانبوب الرابع ٥ر٠ مل من محلول حمض الخل ١٠٪ ، وعدة قطرات من محلول كلور الصوديوم المشبع ويسخن . يتشكل الراسب البروتيني.

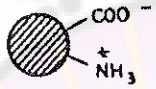
هـ. يضاف الى الانبوب الخامس ٥ر٠ مل محلول هدروكسيد الصوديوم ١٠٪ ويسخن ، لا يتشكل الراسب البروتيني حتى عند الغليان .

تعد خاصة تخثر البروتينات بالتسخين وترسبها عامة لكل البروتينات تقريبا (عدا الجيلاتين ، الذي لا يتخثر بالتسخين) . يجري ترسيب البروتينات وبشكل أكمل في وسط حمضي ضعيف (ب) ، والقريب من نقطة التعادل الكهربائي ، وبشكل أسوأ في الوسط المعتدل (أ) والحمضي ، ولم يلاحظ أبدا ترسبها في الوسط القلوي (هـ) . البروتينات كهرليتات مذبذبة يمكنها التشرد كحموض

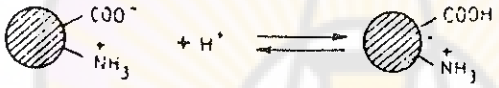
وأسس . وتمثل الجزيئة البروتينيـة التي يتساوى فيها عدد الزمر الامينية مع عدد الزمر الكربوكسيلية بالشكل التالي :



وتكون في الوسط المائي قريبة مـن نقطة التعادل الكهربائي ، ويمكن تصـور جزيئات البروتين بشكل شوارد معتدلة ثنائية القطب :



يخمد الوسط الحمضي تشرد الزمـر الكربوكسيلية وتكون الجزيئة البروتينية موجبة الشحنة :



وينخفض تشرد البروتينات في الوسط القلوي وتحمل شحنة سالبة :

تتخثر البروتينـات بسرعة بالغليـان (د) عنـد اضافة ملح معتـدل (كلور الصوديوم ، كبريتات الامونيوم) الى المحلول البروتيني ، بسبب نزع المـاء مـن الجزيئات البروتينيـة . وتوجد مركبات تثبت البروتينـات كالسكاكر المتعـددة ، والالدهيدات وغيرهـا .

يعد تخثر البروتينات غير عكوسي لفقدان البنية الطبيعية ويختلف عن ترسيبها بالامـلاح .

ترسيب البروتينات بالحموض المعدنية المركزة

يؤخذ ثلاثة أنابيب جافـة ويضاف اليها من ١ ــ ٢ ميلي لترا حمضا مركزا . في

الاول حمض الآ زوت ، وفي الثاني حمض الكبريت ، وفي الثالث حمض كلور الماء . يضاف الى الانابيب المائلة وبحذر وبوساطة الماصة وعلى جدار الانبوب ٥ر٠ مل من محلول البروتين ، بحيث لا يمتزج مع الحمض . يظهر على السطح الفاصل بين السائلين راسب أبيض هو البروتين . تخضخض الانابيب فتلاحظ زيادة الراسب المتشكل من تأثير حمض الآزوت ، بينما ينحل الراسب المتشكل بتأثير زيادة حمض كلور الماء وحمض الكبريت .

لا يترسب الجيلاتين بالحموض المعدنية .

تفاعل ترسيب البروتينات بالحموض المعدنية المركزة غير عكوسي بسبب نزع الماء وفقدان البنية الطبيعية .

ترسيب البروتينات بالحموض العضوية

يؤخذ أنبوبا اختبار ويضاف الى كل أنبوب ٢ ميلي لترا محلولا بروتينيا، تضاف الى الانبوب الاول عدة قطرات من محلول ثلاثي كلور حمض الخل ٥٪ ، والى الثاني عدة قطرات من محلول سلفو حمض الساليسيليك ٢٠٪ . يلاحظ ترسب البروتين في كلا الانبوبين .

يعد كل من ثلاثي كلور حمض الخل وسلفو حمض الساليسيليك كواشف خاصة وحساسة للبروتينات . فثلاثي كلور حمض الخل يرسب فقط البروتينات ولا يرسب نواتج تفكك البروتينات والحموض الامينية ، لذلك فهو يستعمل غالبا لفصل البروتينات الكامل من السوائل الحيوية (كمصل الدم) . تبقى في هذه الحالة نواتج تفكك البروتينات في المحلول .

ترسيب البروتينات باملاح المعادن الثقيلة

يؤخذ أنبوبا اختبار ويضاف الى كل أنبوب ١ مل من المحلول البروتيني ، يضاف الى الانبوب الاول مع التحريك قطرة فقطرة محلول كبريتات النحاس ، والى الثاني محلول خلات الرصاص . يتشكل راسب قطني بسبب قلة انحلال المركبات المتشكلة (لون الملح النحاسي ــ أزرق ، والملح الرصاصي ــ أبيض) . ينحل الراسب من جديد عند زيادة الكاشف .

تسبب أملاح المعادن الثقيلة (Ag ، Cu ، Pb وغيرها) ترسيب البروتينات غير العكوسي ، بتشكيل مركبات غير منحلة في الماء • تستعمل البروتينات كدواء ضد التسمم بأملاح الزئبق (السليماني) • وتنحل بعض الرواسب (كأملاح النحاس والرصاص والتوتياء) في زيادة المرسب بسبب امتزاز الشوارد على سطح الجزيئات البروتينية • تحمل الجزيئات البروتينية بنتيجة ذلك شحنة تجعلها تنحل من جديد • يفقد الراسب البروتيني المنحل بنيته الطبيعية بزيادة أملاح المعادن الثقيلة •

ترسيب البروتينات بكواشف الالكالوئيدات

الألكالوئيدات هي أسس آزوتية ، توجد في جزيئاتها حلقات متغايرة مختلفة حاوية الآزوت • وتحسن الجزيئات البروتينية بعض الحلقات المتغايرة ــ كالايميد آزول ، والبيروليدين وغيرها ، الداخلة في تركيب بعض الحموض الامينية • تظهر البروتينات نتيجة لذلك بعض التفاعلات الخاصة بالألكالوئيدات •

يؤخذ ثلاثة أنابيب ويصب في كل أنبوب ١ مل من محلول البروتينات • يحمض محلول البروتينات بقطرتين من حمض الخل • تضاف الى الانبوب الاول عدة قطرات من محلول حمض البيكريك المشبع ، ينفصل راسب أصفر • والى الانبوب الثاني عدة قطرات من محلول التانين ١٠٪ يتشكل راسب قطني ، ينحل بزيادة الكاشف • تضاف الى الانبوب الثالث عدة قطرات من محلول حمض كلور الماء ٥٪ ويضاف مع التحريك قطرة فقطرة محلول حديدي سيان البوتاسيوم ٥٪ ، يتشكل راسب • ويؤخذ في أنبوب رابع ٢ مل محلول البروتينات المحمض قليلا بمحلول حمض كلور الماء ٥٪ وتضاف اليه عدة قطرات من محلول يود الزئبقي في يود البوتاسيوم $K_2 [Hg I_4]$ • يتشكل راسب بروتيني •

ترسيب البروتينات بالغول الايتيلي

يؤخذ في أنبوب اختبار ١ مل من المحلول البروتيني وقليل من بلورات كلور الصوديوم • ويضاف بالتدريج ٥ مل غول ايتيلي • يترسب البروتين بشكل قطني بسبب نزع ماء الجزيئات البروتينية عند اضافة الغول الايتيلي •

ترسيب البروتينات بالفينول والفورمالين

يؤخذ في أنبوبي اختبار ١ مل محلول البروتينات • يضاف الى الانبوب الاول حجم مماثل من محلول الفينول المشبع ، والى الانبوب الثاني حجم مماثل من الفورمالين • تترسب البروتينات في كلا الانبوبين ، وتترسب بشكل أسرع عند تأثير الفينول •

ترسيب البروتينات بتنغستات الصوديوم Na_2WO_4 :

يضاف الى ٣ مل محلول البروتينات ٥ر٠ مل محلول حمض الكبريت ٦٦ر٠ نظاميا • ويضاف بعد التحريك ٥ر٠ مل محلول تنغستات الصوديوم ١٪ ، يتشكل راسب تنغستات الصوديوم وهي من أفضل مرسبات البروتينات • تستعمل كثيرا في المخابر لترسيب بروتينات السوائل والمستخلصات الحيوية • وترسب أيضا الحموض ثنائية الامين •

البروتينات المعقدة

تتألف البروتينات المعقدة من جزء بروتيني مكون من ألفا الحموض الامينية وجزء غير بروتيني عضوي أو لاعضوي زمر ضميمة • يدخل بتركيب البروتينات الملوّنة Chromoproteins ــ مركبات ملونة ، والبروتينات الفسفورية ــ حمض الفسفور ، والبروتينات النووية ــ حموض نووية •

كشف البروتينات النووية

تتألف البروتينات النووية من البروتينات والحموض النووية المبنية من النوكليوتيدات الاحادية • تدخل بتركيب النوكليوتيدات الاحادية الاسس الآزوتية (الادينين ، الغوانين ، اليوراسيل ، التيمين ، السيتوزين) ، والسكاكر الخماسية (الريبوز والريبوز منقوص الاكسجين) وحمض الفسفور • لدراسة تركيب البروتينات النووية يلجأ الى حلمهة الخميرة الغنية بتلك المركبات • يحضر حاصل حلمهة الخميرة لأغراض تحليلية مختلفة •

الكواشف والمواد اللازمة

حاصل حلمهة الخميرة : يحضر بوضع ١ غ خميرة في دورق كروي سعة ١٠٠ مل ثم تضاف اليه ٢٠ مل حمض كبريت ١٠٪ و ٢٠ مل ماء مقطرا • يجهز الدورق بسدادة وأنبوب انطلاق طول ٣٠ سم ، ويثبت بوضع مائل قليلا ، ويسخن بلطف تحت ساحبة الهواء على شبكة معدنية مدة ساعة • يبرد ويتمم بالماء الى الحجم السابق ويرشح • تستعمل الرشاحة للتجارب المطلوبة •

هدروكسيد الامونيوم المركزة ، محلول نترات الفضة ١٪ ، محلول التيمول ١٪ في الغول ، حمض الكبريت المركز ، ومحلوله ١٠٪ •

كاشف الموليبدن : يحضر بحل ٧٫٥ غ من موليبدات الامونيوم في ١٠٠ مل ماء و ١٠٠ مل حمض آزوت ٣٢٪ (الكثافة ١٫٢) • يتم انحلال موليبدات الامونيوم الكامل بعد اضافة حمض الآزوت •

تفاعلات الكشف عن مكونات حاصل حلمهة الخميرة

١• تفاعل بيوريت : لاثبات وجود البروتينات في بنية البروتينات النووية •

٢• كشف الاسس البورينية : تشكل الاسس البورينية معقدات مع أملاح الفضة : تضاف الى ١٠ قطرات حاصل حلمهة الخميرة قطرة واحدة من محلول نترات الفضة ١٪ • يتشكل بعد ٥ دقائق راسب هش بلون بني •

٣• كشف البنتوزات ــ تفاعل موليش

يعتمد على تفاعل التيمول مع الفورفورال (المتشكل من تفاعل البنتوزات مع حمض الكبريت) لتشكيل نواتج تكاثف ملونة : يضاف الى ١٠ قطرات من حاصل حلمهة الخميرة ٣ قطرات محلول التيمول ١٪ في الغول • تضاف بعد إمالة الانبوب وبحذر ٢٠ قطرة من حمض الكبريت المركز ، يظهر في قعر الانبوب لون أحمر •

٤• كشف حمض الفسفور ــ تفاعل الموليبدن

يتشكل ملح فسفوري ملون لموليبدات الامونيوم عند تفاعل حمض الفسفور مع كاشف الموليبدن : يضاف الى ٥ قطرات حاصل حلمهة الخميرة ٢٠ قطرة من

كاشف المولبيدن • يغلى المزيج لعدة دقائق • يتشكل بعد التبريد راسب أصفر بلوري •

كشف البروتينات الفسفورية

تكون الزمر الضميمة في البروتينات الفسفورية ــ حمض الفسفور • نذكر على سبيل المثال من البروتينات الفسفورية كازئين الحليب ، فيتلين البيض ، ايختولين بيض السمك ، وانزيم الببسين وفسفوريلاز •

الكواشف والمواد اللازمة

حليب ، حمض خل ثلجي ، حمض آزوت ١٠٪ ، محلول فينول فتالئين ٥ر٠٪ في الغول ، محلول هدروكسيد الصوديوم ١٠٪ ، كاشف المولبيدن •

فصل الكازئين من الحليب

يضاف الى ٤ مل حليب حجم مكافىء ماء مقطرا وقطرتان من حمض الخل الثلجي • يتشكل راسب يرشح ويغسل مرتين بالماء المقطر • يقسم الراسب للتجارب التالية :

١• كشف البروتينات

يجرى على القسم الاول من الراسب تفاعل بيوريت وعلى الثاني تفاعل فوليا وعلى الثالث تفاعل ميللون للكشف عن الحموض الامينية والبروتينات •

٢• كشف حمض الفسفور

يخضع الباقي من الراسب للحلمهة بوضعه في أنبوب اختبار ، يضاف اليه ٢ مل محلول هدروكسيد الصوديوم ١٠٪ ، يغلق الانبوب بسدادة مجهزة بأنبوب انطلاق ويغلى مدة ١٥ دقيقة على شبكة معدنية • يبرد ويكشف عن حمض الفسفور في حاصل الحلمهة •

طريقة العمل

يحضر حاصل الحلمهة باضافة عدة قطرات من حمض الآزوت ١٠٪ بوجود

قطرتين فينول فتالئين في الغول حتى زوال اللون ويرشح • يضاف الى ٥ مل رشاحة ٢٠ قطرة من كاشف المولبيدن ويغلى المزيج لعدة دقائق • يتلون المحلول بلـون أصفر ليموني ويتشكل راسب باللون نفسه بعد فترة من الزمن •

كشف البروتينات السكرية

تكون الزمر الضميمة في البروتينات السكرية سكاكر ومشتقاتها ، وهي تدخل بتركيب نسج المفاصل والاغشية الخلوية والمركبات المخاطية •

الكواشف والمواد اللازمة

لعاب ، حمض كبريت مركز ، حمض خـل ثلجي ، محلول بروتين البيض ١٪ ، محلول التيمول ١٪ في الغول •

كشف السكاكر

يجري تفاعل موليش على محلول بروتين البيض ١٪ باستعمال محلول التيمول ١٪ في الغول ، يظهر لون أحمر في قعر الانبوب •

فصل الموسين من اللعاب ـ والكشف عن السكاكر

طريقـة العمـل

يجمع في أنبوب اختبار ٣ مل لعاب وتضاف اليه ٥ قطرات حمض خل ثلجي • يتشكل راسب الموسين • يبان بحذر السائل الطافي عـن الراسب • يجرى علـى الراسب تفاعل موليش للكشف عن وجود السكاكر في هذا الانبوب •

□ □ □

الفصل السابع

الانزيمـــات

الانزيمات بروتينات طبيعية تقوم بدور الوسيط في مختلف التحولات الحيوية الجارية في الجسم الحي • يعتمد تأثير الانزيمات على خاصة ارتباط الانزيمات مع الركائز لتشكيل معقدات انزيم ــ ركيزة ، حيث ترتبط الركيزة مع المركز الفعال للانزيم • تنشط نتيجة ذلك الركيزة التي يمكنها إتمام المرحلة الثانية من التفاعل بسرعة كبيرة لتعطي ناتج التفاعل والانزيم من جديد •

الادوات والمواد اللازمة

أنابيب اختبار ، حامل أنابيب ، ملقط أنابيب ، شبكة معدنية ، كأس سعة ٢٥٠ مل •

تحضير محلول النشاء ١٪ : يحل ١ غ من النشاء المنحل في ١٠٠ مل ماء ،يغلي لمدة دقيقتين ومن ثم يترك ليبرد • يجب ترشيح المحلول في حال استعمال نشاء البطاطا • يحفظ المحلول جيدا اذا أضفنا اليه حتى الاشباع كلور الصوديوم النقي (٣٥ غ) أو كلور البوتاسيوم (٢٨ غ) •

لعاب ممدد خمس مرات (يجب غسل الفم بالماء قبل جمع اللعاب) •

محلول اليود في يود البوتاسيوم : يحضر بحل ١٠ غ يود البوتاسيوم و ٥ غ يود في ٥٠ مل ماء • يمدد المحلول الناتج خمس مرات بالماء •

كاشف فهلنغ I وفهلنغ II (الكواشف) •

محلول كبريتات النحاس ٥٪ ، محلول هدروكسيد الصوديوم ١٠٪ •

الحلمهة الانزيمية

يستعمل تفاعل الحلمهة لدراسة تركيب المركبات الحيوية ، ويمكن أن تكون الحلمهة حمضية أو قلوية أو انزيمية . يأتي الاختلاف الرئيس بينهما بدرجة الحرارة . تجري الحلمهة القلوية والحمضية بالغلي لفترة طويلة ، بينما تجري الحلمهة الانزيمية بسرعة وبحرارة جسم الانسان .

يحلمه أميلاز اللعاب النشاء الى مكوناته ليعطي الديكسترين فالمالتوز فالغلوكوز . تستعمل التفاعلات الملونة للكشف عن اختفاء المركبات الداخلة والكشف عن المركبات الناتجة الجديدة . يعطي النشاء غير المحلمه مع اليود لونا أزرق (تفاعلا ايجابيا) ، وتفاعلا سلبيا مع كاشف فهلنغ لان النشاء لا يملك خاصة ارجاعية . لا تعطي نواتج حلمهة النشاء (المالتوز والغلوكوز) التفاعل الايجابي مع اليود بينما يكون ايجابيا مع كاشف فهلنغ .

تضاف الى أنبوبي اختبار ١٠ قطرات محلول النشاء ١٪ ، والى الانبوب الاول ٤ قطرات ماء (محلول مراقبة) والى الثاني ٤ قطرات محلول اللعاب الممدد خمس مرات . يخضخض المزيج ويترك مدة ١٥ دقيقة بالدرجة ٣٧°س . يقسم محتوى الانبوب الى قسمين ، تضاف الى القسم الاول قطرة واحدة من محلول اليود في يود البوتاسيوم (التفاعل مع اليود) ، والى القسم الثاني قطرتان من كاشف فهلنغ I و II ويسخن بحذر حتى الغليان ، لاحظ النتائج .

أعد العمل نفسه مع الانبوب الثاني واكتب النتائج على الجدول التالي :

رقم الانبوب	الركيزة	الانزيم	التفاعل	
			مع اليود	مع فهلنغ
١	نشاء	ماء		
٢	نشاء	اميلاز		

تؤكد النتيجة بأن حلمهة النشاء لا تجري بوجود الماء . فيكون التفاعل ايجابيا

مع اليود وسلبيا مع فهلنغ . وتكون النتيجة مع الاميلاز معاكسة تماما ، حيث تجري حلمهة النشاء ، فيكون التفاعل سلبيا مع اليود وايجابيا مع فهلنغ .

خواص الانزيمات

الانزيمات هي بروتينات تقوم بدور الوسيط الحيوي في جسم الانسان والحيوان ، فهي تظهر جميع خواص البروتينات . فالانزيمات مركبات حيوية عالية الوزن الجزيئي ، تشكل محاليل غروية مع الماء ، وتفقد بنيتها الطبيعية بتأثير الحرارة والحموض والاملاح المعدنية . وتتأثر رفعالية الانزيمات بتغير pH الوسط ودرجة الحرارة .

الادوات والمواد اللازمة

تحضير السكاراز : يسحق ١٠٠غ خميرة في ٤٠٠ مل ماء مقطر ، يحرك المزيج جيدا ويرشح بعد ساعتين ويحفظ في الثلاجة .

محلول النشاء ١٪ ، لعاب ممدد بنسبة ١ : ١٠ و ١ : ٥ ، محلول اليود ١٪ في يود البوتاسيوم ٢٪ ، محلول كلور الصوديوم ١٪ ، فهلنغ I وفهلنغ II ، محلول السكروز ٢٪ .

تاثير الحرارة في فعالية الانزيمات

الانزيمات مركبات حساسة تجاه الحرارة وتظهر فعاليتها العظمى عند قيمة الحرارة المثلى التي تكون لانزيمات جسم الانسان بمجال ٣٥ ــ ٤٥° س . تنخفض فعاليتها عند الدرجات العالية (أعلى من ٥٠° س) ، حيث تضيع فعاليتها بسبب تخريب صيغة المركز الفعال ، مما يمنع اتحاد الانزيم مع الركيزة لتشكيل معقد انزيم ــ ركيزة .

تضاف الى أنبوبي اختبار ١٠ قطرات من محلول النشاء ١٪ . وتضاف الى الانبوب الاول ٥ قطرات من اللعاب الممدد ٥ مرات ، والى الثاني الكمية نفسها من اللعاب المغلي لمدة ١٠ دقائق (يفقد أميلاز اللعاب فعاليته بالغليان) . يخضخض الانبوبان جيدا ويتركان بالدرجة ٣٧° س مدة ١٥ دقيقة . تقسم محتويات كل

أنبوب الى قسمين ويكشف عن مكوناتها بتفاعل اليود وتفاعل فهلنغ • لايجري تفاعل حلمهة النشاء في الانبوب الحاوي اللعاب المغلي •

تاثير الانزيمات النوعي

يؤثر كل أنزيم في مادة معينة دون التأثير في غيرها ، فتأثير الانزيمات نوعي ، يؤثر الاميلاز فقط في النشاء ، والسكاراز في السكروز وهكذا •

تؤخذ ٤ أنابيب يضاف الى الانبوبين الاول والثاني محلول النشاء ١٪ ، والى الثالث والرابع ١٠ قطرات محلول سكروز ٢٪ • تضاف الى الانبوبين الاول والثالث ٤ قطرات محلول اللعاب الممدد خمس مرات ، وتضاف الى الانبوبين الثاني والرابع الكمية نفسها من محلول السكاراز • تخضخض الانابيب وتوضع بالدرجة ٣٧° س مدة ١٥ دقيقة • يكشف في محتويات الانابيب عن مكوناتها بتفاعل اليود وتفاعل فهلنغ وتوضع النتائج على الجدول التالي :

تحديد تاثير الانزيمات النوعي

رقم الانبوب	الركيزة	الانزيم	تفاعل اليود	تفاعل فهلنغ
١	نشاء	اميلاز		
٢	نشاء	سكاراز		
٣	سكروز	اميلاز		
٤	سكروز	سكاراز		

تدون النتائج على الجدول وتناقش لمعرفة بأي الانابيب لوحظ تأثير الانزيمات ولماذا ؟

تاثير pH الوسط في فعالية الانزيمات

لكل أنزيم فعالية أعظمية عند pH معينة • يسبب تغيير pH الوسط انخفاض

فعالية الانزيم أو تثبيطه بشكل كامل • يتوقف ذلـك على تخريب صيغـة المركـز الفعال (يتغير شحن الزمر الوظيفيـة الداخلة في المركز الفعـال عند تغيير pH الوسـط) •

يوضع على حامل ٨ أنابيب مرقمة ويضاف الى كل أنبوب ١ ميلي لترا ماء مقطراه يضاف الى الانبوب الاول ١ مل من محلول حمض كلور الماء ٢ر٠٪ ، يخضخض جيدا ويؤخذ منه ١ مل ويضاف الى الانبوب الثاني ، يخضخض جيدا ويؤخذ منه ١ مل ويضاف الى الانبوب الثالث ويستمر بالعمل نفسه حتى الانبوب الثامن حيث يؤخذ منه ١ مل ويرمى • يكون قد حصلنا بهذه الطريقة على محاليل حمض كلور الماء مختلفة pH الوسط • يضاف لكل أنبـوب ٣ مل محلول النشاء ١٪ و ١ مل محلول اللعاب الممدد بنسبـة ١ : ١٠ • تخضخـض الانابيب وتوضـع بالدرجة ٣٧° س لمدة ١٥ دقيقة • تبرد الانابيب وتضـاف الى كل أنبوب قطرة من محلول يود في يود البوتاسيـوم ١٪ • يلاحظ جريان الحلمهة الكاملة للنشـاء بالانابيب ٥ و ٦ التي توافق قيمـة pH الوسط ٨ر٦ ـ ٢ر٧ وهـو pH الامثل لفعالية الاميـلاز • •

تأثير المنشطات والمثبطات في فعالية الانزيمات

يمكن لمختلف المركبات أن يكون لها تأثير منشط أو مثبط في فعالية الانزيم • تلعب شوارد الكلـور دورا منشطا للاميلاز ، بينمـا تلعب شوارد النحاس دورا مثبطا • وتنشط الحموض الصفراوية ليباز المعثكلة •

توضع في الانبـوب الاول قطرة محلـول كلور الصوديوم ١٪ ، وفي الثاني قطرتان محلول كبريتـات النحاس ١٪ وفي الثالث قطـرة من الماء • تضاف لكل أنبوب من الانابيب الثلاثة ١٠ قطرات من اللعاب الممدد بنسبة ١ : ٥ • تخضخض الانابيب وتضاف لكل أنبوب ٥ قطرات من محلول النشاء ١٪ ، وتترك مدة ثلاث دقائق بدرجة حرارة المختبر ، تلي ذلك اضافة قطرة واحدة من محلول اليود في يود البوتاسيوم ١٪ الى كل من الانابيب الثلاثة • تدون النتيجة على الجدول التالي :

تأثير المنشطات والمثبطات في فعالية اميلاز اللعاب

رقم الانبوب	الركيزة	الانزيم	لون المحلول بعد إضافة اليود بوجود		
			الماء	كبريتات النحاس	كلور الصوديوم
١	النشاء	اميلاز			
٢	النشاء	اميلاز			
٣	النشاء	اميلاز			

كشف الانزيمات في السوائل والانسجة الحيوية

المواد اللازمة

ماء اكسجيني ١٪ ، دم ، مستحلب الزبدة ٥٪ ، محلول بانكرياتين ٥٪ ، محلول فينول فتالئين ١٪ في الغول ، محلول كربونات الصوديوم ١٪ .

الكشف عن الكاتالاز

الكاتالاز ــ انزيم يفكك الماء الاكسجيني :

$$H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + O_2$$

البنية الكيميائية لهذا الانزيم معقدة ، فالقسم غير البروتيني زمرة تشبه الهيم . ينتسب الكاتالاز الى الانزيمات التي تقوم بتفاعلات الاكسدة والارجاع . يوجد في أنسجة الجسم وسوائله .

تضاف الى أنبوب اختبار ١٠ قطرات محلول ماء اكسجيني ١٪ وقطرة واحدة من الدم . يلاحظ انطلاق غاز بني . اذا قربنا منه عود ثقاب مشتعل ، يزداد اشتعالا ، مما يؤكد انطلاق الاكسجين .

كشف الليباز

ينتسب الليباز الى انزيمات الحلمهة ، يفكك الغليسريدات ويتوافر بكمية كبيرة في عصارة المعثكلة .

يكشف عن تأثير الليباز في محلول الحليب أو الزبدة ، باضافة فينول الفتالئين وقلوي حتى اللون الوردي الخفيف . تتحرر الحموض الدسمة عند حلمهة الغليسريدات تحت تأثير الليباز ، فينزاح pH الوسط نحو الحموضة فيختفي اللون الوردي .

تضاف الى أنبوبي اختبار ١٠ قطرات من مستحلب الزبدة ٥٪ ، تضاف الى الانبوب الاول ٥ قطرات محلول المعثكلة ٥٪ الحاوي الليباز ، ويضاف الى الانبوب الثاني الكمية نفسها من الماء . تضاف الى كلا الانبوبين قطرة واحدة من محلول فينول فتالئين ١٪ وعدة قطرات محلول كربونات الصوديوم حتى ظهور لون وردي خفيف (يحذر من اضافة زيادة من كربونات الصوديوم) . توضع الانابيب بالدرجة ٣٧° س مدة ٣٠ دقيقة . يلاحظ تغير اللون بعد انتهاء فترة التحضين .

تعيين فعالية الانزيمات كميا

تحدد الفعالية إما بنقصان تركيز الركيزة أو بزيادة تركيز نواتج تفكك الركيزة . تتعلق فعالية الانزيمات بعوامل عدة : درجة الحرارة ، pH الوسط ، وجود منشطات أو مثبطات ، تركيز الركيزة وغيرها .

المواد اللازمة

محلول فيزيولوجي أو محلول كلور الصوديوم ٠٫٨٥٪ ، بول ، محلول النشاء ١٪ ، محلول اليود ١٪ في يود البوتاسيوم ٢٪ .

تعيين فعالية الاميلاز كميا في البول

تحدد فعالية الاميلاز بتعيين التمديد الاعظمي الذي يجري عنده تفكك النشاء الكامل . تملك هذه الطريقة أهمية خاصة في المخابر الحيوية لتشخيص مرض المعثكلة .

يضاف الى ١٠ أنابيب مدرجة ١ ميلي لترا محلولا فيزيولوجيا ، يضاف الى الانبوب الاول ١ ميلي لترا بولا ، يخضخض جيدا ويؤخذ منه ١ ميلي لترا ويضاف الى الانبوب الثاني ، يخضخض جيدا ويؤخذ منه ١ ميلي لترا ويضاف الى الانبوب

الثالث • يتم العمل كالسابق حتى الانبوب العاشر ، حيث يؤخذ منه ١ مل ويرمى • حصلنا بهذه الطريقة على محلول البول الممدد التالي :

رقم الانبوب	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠
التمديد	٢:١	٤:١	٨:١	١٦:١	٣٢:١	٦٤:١	١٢٨:١	٢٥٦:١	٥١٢:١	١٠٢٤:١

يضاف لكل أنبوب ٢ مل محلول النشاء ١ر٠٪ تخضخض الانابيب وتترك في الدرجة ٤٥° س مدة ١٥ دقيقة • تبرد ويضاف الى كل أنبوب قطرة واحدة من محلول اليود في يود البوتاسيوم ١٪ وتخضخض • تعلم الانابيب التي جرى فيها تفكك النشاء الكامل (التي تملك اللون الاصفر مع اليود) • تحسب فعالية الاميلاز على الشكل التالي :

اذا لوحظ اللون الاصفر في الانابيب الثلاثة الاولى ، يجري حساب فعالية الاميلاز بالانبوب الثالث الذي مدد فيه البول ٨ مرات •

تعين وحدة فعالية الاميلاز بكمية الانزيم اللازمة لتفكيك ١ مل محلول نشاء ١ر٠٪ بالدرجة ٤٥° س مدة ١٥ دقيقة ، يرمز لفعالية الاميلاز $A^{45^\circ}_{15}$ • جرى التفكك الكامل في الحالة المعطاة في الانبوب الثالث • يمكن لـ ١ ميلي لترا بولا غير ممدد أن يفكك كمية من النشاء أكثر بـ ٨ مرات ، يعني ذلك أن قيمة $A^{45^\circ}_{15}$ = ٢ × ٨ = ١٦ ، يدل الرقم ٢ على كمية النشاء ١ر٠٪ المأخوذة في التجربة •

تكون فعالية الاميلاز الطبيعية في بول الانسان السليم بمجال ١٦ ــ ٢٤ وحدة ، وترتفع هذه النسبة عند مرضى المعثكلة •

□ □ □

الفصل الثامن

الحمـوض النوويـة

مواصفات مستحضرات RNA و DNA

يمكن تحديد نقاوة مستحضرات الحموض النوويـة بمنحنيات الامتصاص في الاشعة فوق البنفسجية في قيم أطوال الامواج $E_{260} - E_{230}$ و $E_{260} - E_{280}$ ففي مستحضرات الحمـوض النووية المنقاة بشـكل جيد من الشوائب البروتينية والسكاكر المركبة يجب أن تكون هذه القيم بحدود ١ر٢ ــ ٤ر٢ ٠

يكشف عن البروتينات في مستحضـرات الحموض النووية بتفاعل البيوريت وتعايـر بتفاعل الـلاوري ، تبلـغ نسبة هـذه البروتينـات في مسـتحضرات DNA و RNA المستخلصة من النسج الحيوانية أقل من ٧ر٠٪ ٠

تقاس درجة التبلمـر والحالة الطبيعيـة في مستحضرات الحمـوض النووية المستخلصة بقياس درجة اللزوجة والتأثير الهيبوكرومي وبعامل التثفيل ٠

تحديد قيمة التاثير الهيبوكرومي

من المعروف أنه في المجال فوق البنفسجـي يكون طيف الامتصاص الاعظمي لجزيئـات DNA في المجال ٢٦٠ نانومتـرا وهي أقل بنسبـة ٤٠٪ من شدة امتصاص مزيج النوكيوتيدات الحـرة الموجودة في الحمـض نفسه ٠ تسمى هذه الظاهرة التأثير الهيبوكرومي وهي ناجمة عن تنظيم (أو تزاوج) الاسس الآزوتيـة في سلسلتي DNA والناجم عن التكامل المتقابل بين الاسس ٠

عندما تفقد جزيئة DNA بنيتها الثانوية ، تتفكك الروابط الهدروجينية المثبتة للاسس الآزوتية في وضع معين وتزداد بالتالي شدة امتصاص الاشعة في المجال فوق البنفسجي من الطيف وتبلغ هذه الزيادة عند تفكك البنية الثانوية كليا في المحضر ، نحو ٤٠٪ بالمقارنة مع شدة الامتصاص في الحالة الطبيعية الكاملة لمحضر DNA .

وهكذا فقيمة الامتصاص (E_p) لمول واحد من فسفور DNA عند استخدام خلية سماكتها ١ سم ، يمكن أن تؤخذ كاحدى المؤشرات عن درجة التنظيم (الحالة الطبيعية) لجزيئة DNA . فالمحضرات الطبيعية لـ DNA لها قيم E_r = ٦٢٠٠ ــ ٦٦٠٠ وتشير زيادات قيم E_p عن هذه الدرجة الى تغيرات في الحالة الطبيعية لبنية DNA .

الادوات والمواد اللازمة

مقياس ضوئي طيفي ، محلول DNA (بتركيز لا يزيد عن ٠٫٠٠٣٪) في محلول كلور الصوديوم ٠٫٢ جزيئي .

طريقة العمل

يؤخذ في خلية القياس ٤ ميلي لترات من محلول DNA وتقاس شدة امتصاصها (D) في طول الموجة ٢٦٠ نانومترا ودرجة ٢٥° س . تحسب E_p لمقطع DNA الحاوي ١ مولا من الفسفور عند استخدام خلية سمكها ١ سم من المعادلة :

$$E_p = \frac{D}{c_p \, l}$$

حيث :

D ــ شدة الامتصاص لمحلول DNA .

C_p ــ التركيز الجزيئي للفسفور في المحلول محسوبة من النسبة المئوية لتركيز الفسفور الذي تم تحديده في التجربة السابقة .

l ــ سماكة الخلية المستخدمة للقياس بـ (سم) .

تحديد درجة انصهار الروابط الهدروجينية

ترتبط الاسس الآزوتية المتقابلة في جزيئة DNA بروابط هدروجينية ويتم

تفكك هذه الروابط بتأثير درجة الحرارة بسرعة ودون المرور بحالات انتقالية • ولهذا فانه يلاحظ عند دراسة علاقة شدة الامتصاص E_λ بدرجة الحرارة في مستحضرات DNA الطبيعية انتقال طوري واضح في مجالات ضيقة جدا من تغيرات درجة الحرارة حيث يحدث في هذا المجال الضيق ازدياد سريع لشدة الامتصاص ، الشيء الذي يعبر عن تفكك الروابط الهدروجينية •

تتصف مستحضرات DNA الفاقدة لخواصها الطبيعية بتفكك غير منتظم في مختلف درجات الحرارة مما يفقد المنحني طبيعة الانتقال الطوري الواضح •

وهكذا تعد دراسة العلاقة الحرارية لتغيرات شدة الامتصاص E_λ واحدة من اختبارات الحالة الطبيعية لجزيئات DNA ويكون من السهل جدا ملاحظة ارتباط هذه العلاقة بتركيز كل من C و G في جزيئة DNA •

الادوات والمواد اللازمة

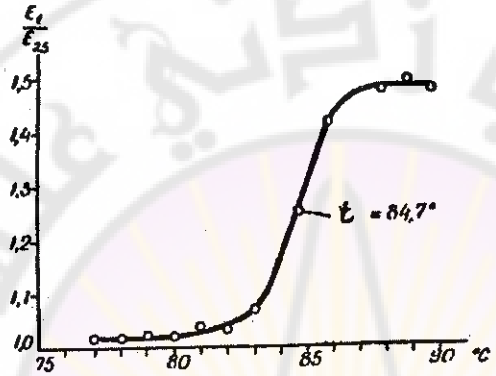
مقياس ضوئي طيفي (فوق بنفسجي) مع حاضنة منظمة حراريا ، محلول ملحي معياري يحتوي على كلور الصوديوم ٠ر١٥ مولا وليمونات الصوديوم ٠ر٠١٥ مولا في اللتر وذو درجة حموضة = ٧ ، مستحضر DNA المدروس •

طريقة العمل

تحل جزيئات DNA في المحلول الملحي المعياري الممدد عشر مرات (بنسبة ١٠ ــ ٢٠ مكروغرام DNA في ١ مل) • ثم يصب المحلول في خلية من الكوارتز سماكتها ١ سم ولها غطاء محكم لمنع التبخر • تقاس شدة الامتصاص على مقياس ضوئي طيفي في طول الموجة ٢٦٠ نانومترا وذلك في درجات مختلفة من الحرارة بدءا من ٢٥° س وحتى ٩٥° س ، وبفرق ٥ درجات لكل عينة مع إبقاء العينة الواحدة أثناء القياس مدة ٥ دقائق كاملة فاذا لوحظ أي تغير حاد في شدة الامتصاص في درجة حرارة ما فان هذا يدل على أن DNA المدروسة طبيعية • بينما اذا كان تغير شدة الامتصاص بين العينات المتعاقبة يتم بشكل تدريجي فان جزيئات DNA تكون فاقدة لحالتها الطبيعية •

يتم في نهاية العمل رسم منحني الانصهار حيث تؤخذ على محور السينات

تغيرات درجة الحرارة بين العينات وعلى محـور العينات الفرق بين شدة امتصاص مستحضر DNA في الدرجة المأخوذة t ودرجة الحرارة ٢٥° س ، ثم تحدد درجة انصهار DNA علـى المنحني (الانصهار) ، فهـي تقابل المنطقة المتوسطة على منطقة الارتفاع الحاد في منحني الانصهار :



شكل (٨ــ١) منحني انصهار DNA المستخلص من خلية Proteus Vulgaris .

تحدد نسبة الازواج G ≡ C في مستحضر DNA المدروس من العلاقة :

$$C_{GC} = (t_{\text{الانصهار}} - 69{,}3)\ 2{,}44$$

حيث C_{GC} هو تركيز الازواج G ≡ C في المستحضر (٪) .

69,3 و 2,44 ثوابت للقياس .

يؤخذ في العادة متوسط الارقام لنحو ٤ ــ ٥ تجارب متكررة .

استخلاص مجموع RNA من بيوض دودة القز (طريقة شيرد)

يتلخص مبدأ هذه الطريقة بمعالجـة النسيج المدروس بالفينول المشبع بالمـاء الحاوي على ٥ر٠٪ من دودسيل كبريتات الصوديوم . ينتقل كل من DNA ، RNA في الدرجة ٤°س الى الطور المائي ولكن في الدرجة ٥٠ ــ ٦٠°س تبقـى جزيئات DNA بشكلها المرتبط ولا ينتقل الى الطور المائي سوى RNA . تستخدم هـذه

الطريقة لفصل مجموع RNA من مختلف أنواع النسج الحيوانية • من أبسط المواد الاولية لهذه التجربة وأكثرها ملاءمة بيوض دودة القز •

الادوات والمواد اللازمة

مثفلة مبردة ، مقياس ضوئي طيفي . حمام مائي . محقن زجاجي سعة ٥٠ مل . كأس زجاجي سعة ٢٠٠ مل ، قمع بوشنر بقطر ٦ر٥ سم ، هاون بورسلان بقطر ١١ سم ، حوجلة سعة ٢٠٠ مل ، هدروكسيد الصوديوم ٢٪ ، دودسيل كبريتات الصوديوم ٢ر٠٪ ، ايتانول ٩٦٪ ، حمض الكلور ٥ر٠ نظامي ، فينول مشبع بالماء (انظر الكواشف) ، كبريتات بولي‌ڤينيل ، واقي الخلات ١ر٠ جزيئي pH = ٢ر٥ (يمزج ١٠ر٥ مل من محلول حمض الخل ٢ر٠ جزيئي مع ٣٩ر٢ مل من محلول خلات الصوديوم ٢ر٠ جزيئي ويمدد الحجم بالماء حتى ١٠٠ مل) ، كلور المغنزيوم ، كاشف لحل RNA (يحتوي على كلور الصوديوم ٥ر٠ مول وخلات الصوديوم ١ر٠ مول وكلور المغنزيوم ٠٠٠١ر٠ مول في اللتر) ، آزوت سائل ، جليد •

طريقة العمل

تغسل بيوض دودة القز بغية تثبيط النوكلياز السطحية ، أولا بمحلول هدروكسيد الصوديوم المائي ٢٪ ثم بمحلول دودسيل كبريتات الصوديوم ٢ر٠٪ وأخيرا بالماء المقطر • يتم هذا الغسل على قمع بوشنر وبمعدل ٥٠ مل من المحاليل السابقة لكل ١ غ من البيوض • تجفف البيوض بعد الغسل بالهواء •

يؤخذ ١ غ من البيوض المغسولة (أو أي مادة حيوية أخرى) وتوضع في هاون البورسلان ويصب عليها الآزوت السائل ثم تسحق حتى تتحول الى مسحوق ناعم ثم يضاف اليها ١٠ مل من واقي الخلات ١ر٠ جزيئي ذو pH = ٢ر٥ والحاوي ٠٠١ر٠ مول كلور المغنزيوم ، ودودسيل كبريتات الصوديوم بتركيز ٥ر٠٪ و ٢ مكروغرام من كبريتات بولي ڤينيل لكل ١ مل • ويتابع السحق لمدة ٣٠ دقيقة مع تكرار التجميد كلما تميع المزيج •

ينقل المسحوق المتجانس الى كأس زجاجي ويصب فوقه ١٠ مل من الفينول

المشبع بالماء والمسخن حتى ٦٠°س ، يخضخض محتوى الكأس لمدة ٣ دقائق على حمام مائي مسخن حتى الدرجة ٦٠°س . يبرد المزيج بعدها بسرعة في حمام جليدي ويثفل بسرعة ٤٥٠٠ (g) لمدة ٣٠ دقيقة في الدرجة ٤°س . يتشكل بعد التثفيل في الانابيب ثلاث طبقات : طبقة مائية وطبقة وسطى فينولية . تمص الطبقة المائية بحذر بواسطة المحقن الى حوجلة وتعاد معالجة هذه الطبقة مرتين بالفينول المشبع بالماء وبالدرجة ٦٠°س مع التبريد والتثفيل بنفس الخطوات المذكورة أعلاه . تؤخذ هذه الطبقة المائية المنتاة للمعالجة التالية وترمى بقية النواتج .

لترسيب RNA يضاف للطبقة المائية ضعفي حجمها من الايتانول ٩٦٪ فيتجمع راسب RNA خلال عدة ساعات في الدرجة صفر س ؛ حيث يجمع بواسطة التثفيل (١٠ دقائق ؛ ٤٥٠٠ g ، صفر س) . ترمى الطبقة العلوية ويحل الراسب بـ ٥ مل من محلول كلور الصوديوم ٠٫٥ جزيئي والحاوي على خلات الصوديوم ٠٫١ مول وكلور المغنزيوم ٠٫٠٠٠١ مول في اللتر .

يرسب محلول RNA الناتج مرة ثانية بواسطة ضعفي حجمه من الايتانول ٩٦٪ ويترك ليتجمع راسب RNA مدة ساعة في الدرجة ــ ١٠°س . يفصل الراسب بالتثفيل وترمى الرشاحة . يحل راسب RNA بـ ٥ مل من نفس المحل السابق ، ويؤخذ من المحلول المتشكل ٠٫١ مل لمعايرة كمية RNA أما الكمية المتبقية فترسب بواسطة الايتانول ويفصل الراسب بالتثفيل ويحفظ في البراد . يكون المردود عادة ما بين ١٫٥ ــ ١٫٨ ملغ RNA من كل ١ غ بيوض دودة القز .

تحديد ثابت التثفل (او الكتلة الجزيئية) لـ RNA بطريقة الرحلان الكهربائي في هلام بولي اكريل اميد

تعد طرق قياس اللزوجة والرحلان الكهربائي والمجهر الالكتروني أكثر الطرق استخداما لتحديد الكتلة الجزيئية للحموض النووية وقد دلت الدراسات المطولة على طريقة الرحلان الكهربائي في هلام بولي أكريل أميد أن المسافة التي يقطعها

البوليمير في هلام الاكريل أميد تتناسب طردا مع ثابت تثفيله وبالتالي مع كتلتـه الجزيئية • فاذا حوت المادة المدروسة أيـة مادة ذات كتلة جزيئية أو ثابت تثفـل معروفين فانه يمكن حساب هذه القيم لبقية المادة المدروسة • وتؤخذ كمادة معلومة للدراسة عادة جزيئات RNA المستخلصة من العصية المعوية E - coli (الموافقة لـ 23 S و 16 S) أو المستخلصة من كبد الجرذ (الموافقة لـ 28 S و 18 S) .

الادوات والمواد اللازمة

مقياس ضوئي طيفي ، مقياس ضوئي مجهري (microphotometer) ،مزود ومقوم عام للتيار ، مجموعة الرحلان الكهربائي ، محقـن زجاجـي سعة ٥٠ مـل ، أنابيب زجاجية بقطر داخلي ٥ر٠ ــ ٦ر٠ سم ، حوجلة معايرة سعة ١٠٠ و ١٠٠٠ مـل ، ماصات معايرة سعة ١ر٠ ، ١ ، ٥ مل ، مستحضر RNA مستخلص بطريقة شيرر ، سيانوغوم ــ ٤١ (أو أكريل أميد و N : N' ــ ميتيلين ثنائي أكريل أميد) ، رباعي ميتيل ايتيلين ثنائي الامين أو ما يرمز لـه (TEMED) ، فـوق كبريتات الامونيوم محلول ١٠٪ ، محلول سكروز ٤٠٪ ، أزرق بـروم الفينول ٢٥ر٠٪ ؛ الواقـي تريس ــ خلات ذو pH = ٧ر٨ [١٢ر٠ مول هدروكسي ميتيل أمينو ميتان + ٠٦ر٠ مول خلات الصوديوم + ٠٠٣ر٠ مول ملح الصوديوم لـ EDTA ، تحل في المـاء المقطر ثم يضاف حمض الخل الثلجي (ــ ٦ مل) لتعديل pH حتى ٧ر٨ ثـم يتابع التمديد بالماء المقطر حتى اللتر] ، حمض الكلور ٥ر٠ نظامي ، حمض الخل ١ جزيئي، أزرق الميتيلين ٢ر٠٪ يحل في واقي الخلات ٤ر٠ جزيئي •

طريقـة العمـل

يحمل على ثلاثة أنابيب من هلام بولي أكريل أميـد ما يعادل ١ر٠ ــ ٥ر٠ ميلي لترا من محلول RNA (الحـاوي علـى ٣٠ ــ ٦٠ مكروغراما RNA) والمستخلص من بيوض دودة الحرير ، ويحمل على ثلاثة أنابيب أخرى الكمية نفسها من RNA المستحضرة من كبد الجرذ • توضع الانابيب جميعا في وعـاء الرحلان الكهربائي وتجـري عمليـة التفريق بالطريقـة المذكـورة سـابقا (صفحة ٥٨) • بعد انتهاء التفريق وظهـور المناطق المختلفة لانـواع RNA تحدد قيمة الانتقال

النسبي لكل منطقة باستخدام أزرق بروم الفينول يرسم على اساس النتائج منحني علاقة الانتقال النسبي بثابت التثفيل لـ RNA كبد الجرذ حيث تؤخذ على محور العينات قيم ثابت التثفل S 28 و S 18 أو قيم الكتلة الجزيئية لانواع RNA نفسها وعلى محور السينات قيم انتقالها النسبي في هلام الاكريل أميد . وعلى المنحني الناتج وبأخذ قيم الانتقال النسبي لانواع RNA المستخلص من بيوض دودة القز يمكن تحديد ثابت التثفل أو الكتلة الجزيئية لها .

تحديد البنية النوكليوتيدية للحموض النووية

حلمهة RNA وتفريق الاسس بالكروماتوغرافيا الورقية

تحتوي مستحضرات DNA المستخلصة من المصادر الحيوانية أو النباتية عادة على شوائب من RNA ولذلك فمن الضروري تنقيتها من هذه الشوائب قبل تحديد كمية الاسس الآزوتية في بنيتها ، ويتم ذلك بالحلمهة القلوية في شروط خاصة حيث تتفكك جزيئات RNA الى نوكليوتيدات بينما تبقى جزيئات DNA سليمة ، ثم وبالترسيب يتم فصل النوكليوتيدات الريبية التي تبقى في المحلول .

الادوات والمواد اللازمة

مثفلة مبردة ، مقياس ضوئي طيفي ، مصباح فوق بنفسجي ، حاضنة حرارية ، حمام مائي ، وعاء كروماتوغرافيا ورقية،أنابيب تثفيل زجاجية، ورق كروماتوغرافيا (بطيئة) ، جفنة خزفية للتبخير سعة ٥٠ مل ، أنابيب اختبار ، مستحضر DNA ، محلول هدروكسيد الصوديوم ٠ر٧٥ نظاميا ، أوراق عباد الشمس ، محلول حمض فوق الكلور $HClO_4$ ٥ر١٪ و ٥٧٪ و ٧٢٪ ، ايثانول ٩٦٪ ، ايتر ايتيلي ، محلول حمض كلور الماء ٠ر١ نظاميا و١ نظاميا ، مظهر كيرب الحمضي ـ مزيج الميثانول المطلق وحمض كلور الماء والماء (بنسبة ٧٠ : ٢٠ : ١٠) ، الادينين ، الغوانين ، السيتوزين ،التيمين (محاليل بتركيز ٥٠ مكروغراما في ١ مل) في حمض كلور الماء ٠ر١ نظاميا .

طريقة العمل

الحلمهة القلوية لـ DNA

يؤخذ في أنابيب تثفيل مجهز كل منها بقضيب تحريك زجاجي نحو ٢٠٠ ـ ٣٠٠

ميلي غرام DNA ؛ ثم وبوساطة القضيب المحرك يصب محلول هدروكسيد الصوديوم ٧٥ر٠ نظاميا بكمية ١ مل من القلوي لكل ١٠٠ ميلي غرام مادة • يحرك المزيج جيدا بوساطة قضيب التحريك ثم تسد الانابيب بغطائها (في البداية بشكل غير محكم) وتوضع في الحاضنة لمدة ١٨ ساعة في الدرجة ٣٧° س • وبعد ٢٠ دقيقة من بدء الحضن وعندما يتم طرد الهواء من الانابيب يتم احكام سدها • يجب أن يتم تحريك الراسب في الانابيب خلال فترة الحضن دوريا وحتى تمام انحلاله •

عند انتهاء الحضن تبرد الانابيب حتى الدرجة صفر س ثم تعدل درجة الحموضة فيها بوساطة حمض كلور الماء المركز ٥٧٪ حتى الاعتدال وذلك باضافته على شكل قطرات صغيرة (يمكن تسهيل العملية بحساب الكمية اللازمة للقلوي المأخوذ للحلمهة وما يقابلها من كمية الحمض اللازمة للتعديل) • تضاف الى الانابيب المعدلة كمية من حمض كلور الماء المركز المبرد وعلى شكل قطرات مع التحريك حتى يصبح التركيز النهائي له في كامل الحجم ضمن الانبوب الواحد ١ ــ ٢٪ • وفي هذه الحالة تبدأ جزيئات DNA بالترسب • تسحب قضبان التحريك الزجاجية وتغسل بعدة قطرات من محلول حمض الكلور ١ر٥٪ وتثفل الانابيب لمدة ٢٠ دقيقة بسرعة ٦٠٠٠ (g) وبالدرجة صفر س • ترمى الرشاحة الحاوية نوكليوتيدات RNA • أما الراسب فيغسل مرتين بمحلول حمض فوق الكلور ١ر٥٪ مع التثفيل في كل مرة • ثم تزاح بقية حمض الكلور من الراسب بغسله مرتين بوساطة الايتانول ٩٦٪ المبرد ومرة أخرى بالايتر لطرد الايتانول • أما الايتر فيتم طرده بوضع الانابيب في حمام مائي مسخن • ثم يجفف الراسب كليا في محم كهربائي بالدرجة ١٠٠ ــ ١٠٥° س لمدة ٣٠ دقيقة (تتم جميع معالجات DNA بوساطة حمض فوق الكلور بعد الحلمهة القلوية بسرعة ١ ــ ١ر٥ ساعة وبالدرجة ما بين صفر و٣° س) •

حلمهة DNA الحمضية وتفريق الاسس الآزوتية فيه

يقسم مستحضر DNA المجفف الى قسمين ينقل كل منهما الى انبولة زجاجية ويمزج مع ١ ــ ٢ قطرة من حمض فوق الكلور ٧٢٪ بشكل يتم امتصاص هذا الحمض من قبل راسب DNA كليا ثم تغلق الانبولة على اللهب وتسخن

على حمام مائي يغلي لمدة ساعة • تتحلمه جزيئات DNA في هذه الشروط كليا الى مرحلة الاسس الآزوتية • ينصح بعدم أخذ كميات كبيرة من حمض فوق الكلور أثناء الحلمهة لان ذلك قد يؤدي الى تخريب التيمين • عند انتهاء الحلمهة تبرد الانبولات ويتم فتحها بحذر وتمدد نواتج الحلمهة بـ ٢ ــ ٣ قطرات من الماء المقطر ويحرك جيدا لغسل جدران الانبولة • تفرق الاسس الناتجة عن الحلمهة بوساطة الكروماتوغرافيا الورقية (ص ٤١ ومابعدها) باستخدام ورقة بطيئة الانتشار والتي يجب أن تبلل بشكل مسبق بمحلول كيرب الموجود في وعاء الكروماتوغرافيا لمدة ٢ ــ ٣ أيام • يتم بعدها غسل الورقة بالماء المقطر في وعاء الكروماتوغرافيا أو في وعاء آخر ثم تجفف •

يؤخذ قسم من ورقة الكروماتوغرافيا بأبعاد ٣٠ × ٥٨ سم ويحمل عليها بوساطة الماصة الشعرية (ص ٤١ ومابعدها) ثلاث وجبات من نواتج الحلمهة (في كل منها ما يعادل ٢ر٠ غ) على شكل خطوط بطول ٤ سم وعرض ٥ر٠ ملم مع ترك مسافات تعادل ٥ر١ سم بينها • بينما يترك المقطع الرابع للحصول على محلول المراقبة وعلى المقطع الخامس يحمل المحلول المعياري الحاوي ٥٠ مكروغراما من كل نوع من الاسس في ١ ميلي لترا محلولا • يتم اظهار ورقة الكروماتوغرافيا خلال ١٢ ــ ١٤ ساعة ، حيث يتم توزع الاسس عليها وفق الترتيب غوانين ــ ادنين ــ سيتوزين ثم تيامين •

استخلاص الاسس وقياس كثافتها الضوئية

يتم الكشف عن مواقع الاسس على ورقة الكروماتوغرافيا بمساعدة مصباح فوق بنفسجي وذلك بامتصاصها لهذه الاشعة حيث تتم احاطة البقع المختلفة فوق المصباح بقلم رصاص ثم تقص مواقعها في مختلف الوجبات مع الموقع المماثل بالحجم والمكان من المقطع الرابع المتروك لاستحصال محلول التحكم • يوضع كل من الاجزاء المقصوصة في أنبوب اختبار ويتم استخلاص محتواها من الاسس بوساطة محلول ١ر٠ نظاميا لحمض كلور الماء خلال ١٢ ساعة وبالدرجة ٣٧° س •

تقاس شدة الامتصاص بعد صب المحاليل المختلفة للسناطق في الخلايا الكوارتزية (سماكة ١ سم) وذلك على مقياس ضوئي طيفي مقابل محلول التحكم

وفي أطوال الامواج التالية : الغوانين في ٢٥٠ ــ ٢٩٠ نانومترا ، الادنين في ٢٦٠ و ٢٩٠ نانومترا ، السيتوزين في ٢٧٦ و ٢٩٠ نانومترا والتيمين في ٢٦٠ و ٢٠٠ نانومترا .

يستخدم لحساب كمية الاسس في نواتج حلمهة DNA ثابت الحساب الوارد في الجدول اللاحق وتحدد كمية المكرومولات لجميع الاسس وتجمع معا لتعتمد كميتها ١٠٠٪ ثم تحسب النسبة الجزيئية المئوية لاي منها ، حيث تؤخذ القيم المتوسطة لقياسات العينات الثلاث المتكررة وفق الجدول :

الاساس الآزوتي	كمية الاساس (مكرومول في ٥ مل مستحضر)	النسبة الجزيئية ٪			
		العينة ١	العينة ٢	العينة ٣	المتوسط
الغوانين	$0.414\ (E_{250} - E_{290}) =$				
الادنين	$0.399\ (E_{260} - E_{290}) =$				
السيتوزين	$0.940\ (E_{276} - E_{290}) =$				
٥ ــ ميتيل السيتوزين	$0.883\ (E_{280} - E_{300}) =$				
التيمين	$0.743\ (E_{260} - E_{290}) =$				

تحديد البنية النوكليوتيدية لـ DNA بوساطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على DEAE ــ سلولوز

من أهم ميزات هذه الطريقة سرعة انجازها ودقة انتقال الاسس وحساسيتها العالية .

يمكن في هذه الطريقة استخدام مستحضرات DNA عالية النقاوة بالاضافة الى المستحضرات الحاوية على شوائب بروتينية .

الادوات والمواد اللازمة

مقياس ضوئي طيفي ، حاضنة ، أنابيب اختبار زجاجية : حوجلة سعة ١٠٠ مل ، قمع بوشنر ، مشعر عام ، سحاحة صغرية ، صفائح زجاجية (٢٤ × ٥ سم) ، ماصات معايرة مدرجة سعة ١٠ مل ، وعاء كروماتوغرافيا ،

أقماع زجاجية عدد٣ ، محلول حمض كلور الماء بتراكيز ١ر٠ و ١ و ٢ نظاميا ، نواتج حلمهة مستحضر DNA (انظر التجربة السابقة) ، مظهر كيرب الحامضي ـ مزيج الميتانول المطلق وحمض كلور الماء المركز والماء بنسبة (٧٠ : ٢٠ : ١٠) ، مركب ثنائي ميتيل أمينو ايتيل السلولوز (DEAE ـ السلولوز) ٠

تحضير معلق DEAE ـ السلولوز وتجهيز الصفيحة الكروماتوغرافية

يغسل ١٠غ من مسحوق DEAE ـ السلولوز بخضه في ٥٠ ميلي لترا من المحلول المحضر كمحل للكروماتوغرافيا وذلك خلال ٣٠ دقيقة ثم يرشح على قمع بوشنر ، ثم تمرر فوقه كمية من محلول حمض كلور الماء ٢ نظاميا وبعدها الماء المقطر حتى اعتدال ماء الغسالة ٠ يجفف المسحوق في درجة حرارة الغرفة ثم في الدرجة ١٠٠° س لمدة ٣٠ دقيقة ٠

لتحضير صفيحة الكروماتوغرافيا يحضر معلق من DEAE ـ السلولوز في الماء المقطر ٠ لتحضير الصفيحة بأبعاد ٢٤ × ٥ سم يؤخذ ٢ غ من DEAE ـ السلولوز المغسول ويضاف اليها ١٨ ميلي لترا ماء مقطر وتصب بعد التحريك الى درجة التجانس على الصفيحة الموضوعة بشكل أفقي تماما ٠ يتم توزيع المعلق على سطح الصفيحة بشكل متساو وتترك حتى الجفاف لمدة ٨ ـ ١٠ ساعات في درجة حرارة الغرفة ٠ وقبل إجراء التحميل عليها تنشط في خزانة التجفيف لمدة ١٠ ـ ٢٠ دقيقة وفي الدرجة ١٠٠° س ٠

إجراء الفصل الكروماتوغرافي

يحدد بوساطة قلم الرصاص على طبقة DEAE ـ السلولوز وبشكل خفيف جدا خط التحميل على بعد ٢ سم من طرف الصفيحة السفلى وتحدد منطقة التحميل بعرض ١ر٥ سم وتترك مسافة ٥ر٠ سم من أحد اطراف الصفيحة ٠ يترك نصف الصفيحة فارغا للمقارنة ٠

تحمل على كل صفيحة بوساطة أنبوب شعري كمية من ناتج الحلمهة تعادل ٦ر٠ ملغ من DNA الاصلي ٠ وتجرى عملية تفريق الاسس بوساطة الكروماتوغرافيا الصاعدة في وعاء زجاجي ارتفاعه ٢٥ سم توضع في أسفله كمية

ارتفاعها ١ سم ، من مظهر كيرب الحمضي في درجة حرارة الغرفة ولمدة ٢ ساعة • تصل جبهة المحل أثناء ذلك الى الطرف العلوي من الصفيحة حيث يتم تفريق الاسس الآزوتية الاربعة الرئيسة في DNA بالاضافة الى ٥ ــ ميتيل سيتوزين •

تجفف الصفيحة بعد رفعها من وعاء الكروماتوغرافيا في تيار من الهواء الساخن ثم تحدد مواقع البقع بوساطة مصباح الاشعة فوق البنفسجية • يتم توضع بقع الاسس بدءا من الجبهة على الشكل : غوانين ، ادنين ، سيتوزين ، ٥ ــ ميتيل سيتوزين والتيمين •

استخلاص الاسس ومعايرتها

تحت مادة السلولوز في مواقع البقع المحددة بالاضافة الى المواقع الموازية لها في قسم المراقبة ويجمع كل منها في أنبوب اختبار ذي سدادة مسنفرة • أما استخلاص الاسس من السلولوز فيتم بوساطة ٥ مل من محلول حمض كلور الماء ٥ر٠ نظاميا • وبعد حضن الانابيب بالدرجة ٣٧° س لمدة ١٨ ساعة ترشح محاليل الاسس بشكل عادي على ورقة ترشيح • وتقاس شدة الامتصاص الضوئي والحسابات كما في التجربة السابقة •

معايرة الحموض النووية كميا

يمكن معايرة الحموض النووية في النسج المختلفة بعدة طرق منها ما يعتمد على إجراء تفاعلات نوعية على الريبوز أو الريبوز منقوص الاكسجين أو حمض الفسفور أو تعتمد على قياس الامتصاص النوعي للحموض النووية في المجال فوق البنفسجي من الطيف نتيجة لوجود الاسس الآزوتية فيها • وتسبق عملية المعايرة المباشرة للحموض النووية عمليات تمهيدية أولها عزل المركبات التي تعيق المعايرة • وحسب طريقة المعايرة يمكن أن تكون المركبات التي تعيق المعايرة هي السكاكر أو المركبات الخاوية فوسفورا أو النوكليوزيدات أو الببتيدات وغيرها • ولعزل هذه الاخرى متغايرة الحلقات أو الحموض الامينية أو الببتيدات وغيرها • ولعزل هذه المركبات تسحق المادة الحيوية المدروسة في شروط تؤمن تثبيط انزيمات النوكلياز ثم يتم استخلاص المركبات الفسفورية القابلة للانحلال في الحموض

وذلك بالمعالجة بحمض فوق الكلـور وثلاثي كلـور حمض الخل • وتستخلص المركبات الشحمية بوساطة المحـلات العضوية التـي تستخدم بتتابع معين • كما تسمح العمليات التمهيديـة بتفريق الحموض النوويـة الى DNA و RNA • وغالبا ما تستخدم لهذا الغرض طريقة شميد ـ تانهاوزر •

معايرة كمية DNA و RNA في بيوض دودة القز

تستخدم في هذه المعايرة طريقة شميد وتانهاوزر مع استخدام فروق الامتصاص في طولي الموجة ٢٦٠ و ٢٩٠ نانومترا •

الادوات والمواد اللازمة

مثقلة مبردة ، مقياس ضوئي طيفي ، حاضنة ، حمام مائي ، مجفف زجاجي ذو صنبور ، كأس زجاجي طويل ، قمع بوشنر ، هاون بورسلان قطر ٩ سم ، آزوت سائل ، محلول هدروكسيد الصوديوم ٢٪ ، محلول دودسيل كبريتات الصوديوم ٢ر٠٪ ، محاليل حمض فوق الكلور ٢ر٠ ، ٣ر٠ ، ٥ر٠ و ٢ر١ نظامي ، محلـول هدروكسيد البوتاسيوم ٥ر٠ نظامي ، ايتانـول ٩٦٪ ، محلول خلات البوتاسيوم ٢٪ في الايتانول ٥٠٪ ، مزيج من الاسيتون والكلوروفورم (٥ : ١) ، مزيج من الكلوروفورم والميتانول (١ : ١) ، الايتر الايتيلـي ، هدروكسيد البوتاسيوم ، قطع من الجليد •

استخلاص المركبات المنحلة بالحموض

يؤخذ ٥ر٠ غ من شرانق دودة القـز مجهزة كمـا في طريقـة شيرير السابقة وتسحق في هاون البورسلان مع التبريد بوساطة الآزوت السائل حتى تصبح على شكل مسحوق ناعم • يتم استخلاص المركبات المنحلة بالحموض بوساطة محلـول حمض فوق الكلور ٣ر٠ نظامي (يستخدم فيه ١٠ أضعاف كمية المادة المدروسة)، ويستمر الاستخـلاص ٢٠ دقيقة بالدرجـة صفر س • يتم تثفيـل المزيج المتشكل بالسرعة ٥٠٠٠ (g) ولمدة ٢٠ دقيقة بالدرجة صفر س • يضاف الى الراسـب في أنبوب التثفيل ٥ر١ مل من حمض الكلور ٢ر٠ نظامي المبرد وبعد التحريـك يحضن بالشروط السابقة نفسها لمدة ٢٠ دقيقة حيث يثفل بعدها بالشروط نفسها •

للتأكد من استخلاص المركبات المنحلة بالحموض جميعها تقاس شدة امتصاص آخر مستحضر حمضي في طول الموجة ٢٦٠ نانومترا مقابل محلول حمض فوق الكلور النقي ، ويجب أن لا تزيد ΔF في هذه الحالة عن ٠ر١ يتم عادة الاستخلاص بوساطة حمض فوق الكلور ٠ر٢ نظاميا ثلاث مرات ٠

فصل حمض فوق الكلور

يعامل الراسب الحاوي البروتينات والحموض النووية والسكاكر المركبة والشحوم ، أولا بـ ٥ مل من الايتانول ٥٠٪ الحاوي خلات البوتاسيوم ٢٪ ، ثم يعامل بـ ٥ مل من الايتانول ٩٦٪ وبدرجة صفر ـ ٤°س لمدة ١٥ ـ ٢٠ دقيقة مع التثفيل في كل مرة ٠

عزل المشتقات الشحمية

يتم استخلاص الشحوم أولا بمزيج من الايتانول والكلوروفورم بنسبة (١:٥) ثلاث مرات على البارد ، ثم بوساطة مزيج الكلوروفورم مع الميتانول بنسبة (١:١) ثلاث مرات أيضا ولكن على الساخن وفي النهاية مرة واحدة بوساطة الايتر الايتيلي ٠ يتم الاستخلاص في كل مرة بوساطة ١٠ مل من المحلل ولمدة ٢٠ دقيقة ثم يفصل المحلل بالتثفيل بسرعة ٥٠٠٠ (g) لمدة ١٥ ـ ٢٠ دقيقة ٠ يجفف الراسب في مجفف زجاجي ذي صنبور فوق هدروكسيد البوتاسيوم الصلب ٠

معايرة كمية الحموض النووية

لاستخلاص الحموض النووية من النسيج المعد بالشكل السابق بوساطة محلول هدروكسيد البوتاسيوم ٥ر٠ نظامي لمدة ١٨ ساعة في درجة ٣٧°س (يؤخذ لكل ١٠ ملغ مادة جافة من بيوض دودة القز ١ مل من محلول هدروكسيد البوتاسيوم) ٠ يبرد المزيج بعد الاستخلاص الى الدرجة صفر ويثفل مع التبريد ثم يغسل الراسب مرتين بوساطة ٣ مل من محلول هدروكسيد البوتاسيوم ٥ر٠ نظاميا ويثفل في كل مرة مع التبريد وتجمع كميات KOH الناتجة معا ثم يرمى الراسب ٠ يضاف للرشاحة القلوية الناتجة محلول حمض فوق الكلور ٢ر٠ نظاميا بحذر وعلى شكل

قطرات مع حساب التركيز النهائي له في المزيج الناتج ٢ر٠ نظاميا (ما يعادل pH = ١) ٠ تترسب في هذه الشروط جزيئات DNA والبروتينات وفوق كلورات البوتاسيوم يترك المحلول الناتج لمدة عشر دقائق في الدرجة صفر ثم يثفل ويغسل الراسب مرتين بوساطة ٢ مل من محلول حمض الكلور ٢ر٠ نظاميا مع جميع الرشاحات الحاوية نواتج حلمهة RNA معا ويقاس حجمها ٠ يؤخذ من الرشاحة المقيسة ٥ مل وتسخن لمدة ٢٠ دقيقة على حمام مائي وتقاس شدة الامتصاص فيها $E_{260} - E_{290}$ على المقياس الضوئي الطيفي ٠

يضاف للراسب الحاوي DNA ٢٠ ميلي لترا من محلول حمض فوق الكلور ٥ر٠ نظاميا وتجري عملية الحلمهة على حمام مائي يغلي لمدة ٣٠ دقيقة ٠ تقاس شدة الامتصاص الطيفي لنواتج الحلمهة في أطوال الامواج ٢٦٠ و ٢٧٠ و ٢٩٠ نانومترا ٠

لتحديد درجة نقاوة محلول الحموض النووية تستخدم شدة الامتصاص في طولي الموجة ٢٦٠ و ٢٧٠ نانومترا (حيث يجب أن لا يكون هناك اختلاف بين شدتي الامتصاص للمستحضر نفسه أكثر من ١٥٪ في هاتين الموجتين) ٠

يحسب متوسط شدة الامتصاص لخمسة قياسات متتابعة ويحسب تركيز الحموض النووية من المعادلة :

$$C = \frac{(E_{260} - E_{290}) \cdot k \cdot V}{190 \cdot a}$$

حيث :

C — تركيز الحموض النووية (ملغ/غ مادة أولية) ٠

E — الكثافة الضوئية للمحلول في طول الموجة المذكور ٠

190 — الكثافة الضوئية النوعية التي تقابل شدة امتصاص ١ ملغ فسفورا RNA في ١ ميلي لترا محلولا ٠

k — ثابت حساب يسمح بالانتقال من كمية الفسفور الى كمية الحموض النووية ٠ وهو يساوي ٥ر١٠ من أجل RNA و ١ر١٠ من أجل DNA

V — حجم العينة الكلي المدروس (مل) ٠

a — كتلة المادة المدروسة (غ) ٠

معايرة كمية DNA و RNA في المشتقات النباتية بطريقة نيمان وباولسون

يمكن بهذه الطريقة استخدام المادة النباتية الطازجة أو مادة نباتية مثبتة . يتم تثبيت المادة النباتية بوساطة الايتانول ٩٦٪ (عشرة أضعاف) وفي الحالة الاخيرة تسحق المادة وتجانس بوساطة هذا الغول .

الادوات والمواد اللازمة

مقياس ضوئي طيفي ، مثفلة ، حاضنة ، حمام مائي ، مبرد زجاجي مخبري ذو أنبوب مستقيم ، ماصات معايرة مدرجة سعة ١ و ٥ و ١٠ مل ، حوجلة معايرة سعة ٢٥ مل ، أنابيب اختبار زجاجية ، ايتانول ٩٦٪ ، ايتانول ٥٠٪ ، حمض الخل الثلجي المحمض حتى pH = ٤ر٥ ، حمض فوق الكلور ٢٠ر٠ نظامي و ٥ر٠ نظامي و١٥٪ ، محلول هدروكسيد الصوديوم ٣ر٠ نظامي ، مزيج من الايتانول المطلق والايتر بنسبة (١:٣) ، ايتر ايتيلي ، مشعر عام .

تحضير العينة للتحليل

يؤخذ ١غ من المادة النباتية المدروسة وتنقى من الاصبغة والشحوم بمعالجتها المتتابعة في كل مرة بـ ١٠ مل من : الايتانول ٩٦٪ ، الايتانول ٥٠٪ ، حمض الخل الثلجي المحمض حتى pH = ٤ر٥ (مرتين) ، حمض فوق الكلور ٢ر٠ نظامي (مرتين مع التبريد) ، ايتانول ٩٦٪ (مرتين مع التبريد) ، مزيج من الايتانول المطلق والايتر (بالغليان مع استخدام مبرد مرتد) مرتين كل منها لمدة ٣ دقائق . وأخيرا تعالج المادة بالايتر في درجة الحرارة العادية . وفي كل مرحلة أثناء المعالجة يتم فصل الراسب عن الغسالة بالتثفيل لمدة ١٥ ــ ٢٠ دقيقة وبسرعة ٥٠٠٠ (g) .

استخلاص الحموض النووية

يؤخذ ٢٠٠ ملغ من المادة المعالجة أعلاه ويتم مجانستها في ٥ مل من محلول هدروكسيد الصوديوم ٣ر٠ نظامي ، وتحضن بالدرجة ٣٧° س لمدة ١٨ ساعة . يفصل الراسب المتبقي بالتثفيل ويغسل بوساطة ٥ مل من محلول هدروكسيد

الصوديوم ٣ر٠ نظامي ثم يرمى ٠ تجمع كميتا القلوي الناتجة معا ويمدد الحجم بالمحلول القلوي نفسه ليصل الى ١٠ مل وبعدها يحمض بوساطة حمض فوق الكلور ١٥٪ حتى pH = ١ ويحضن لمدة ٤٠ دقيقة بالدرجة ٤٠° س ثم يفصل راسب DNA البروتيني المتشكل بالتثفيل ٠ يجانس الراسب بوساطة ٣ ميلي لترات من محلول حمض فوق الكلور ٢ر٠ نظامي لمدة ٢٠ دقيقة وبدرجة ٤° س ثم يثفل مرة ثانية ٠ تجمع الرشاحة الناتجة عن عمليتي التثفيل ويمدد الحجم النهائي لمستحضر RNA الناتج حتى ٢٥ مل بوساطة محلول حمض فوق الكلور ٢ر٠ نظامي ٠

- يجانس راسب DNA البروتيني بوساطة ٣ مل من محلول حمض فوق الكلور ٥ر٠ نظامي ويسخن على حمام مائي للدرجة ٧٠° س لمدة ١٥ دقيقة ثم يبرد ويثفل مع التبريد ٠ يغسل راسب البروتينات بوساطة ٢ مل من محلول حمض فوق الكلور ٥ر٠ نظامي والمبرد للدرجة صفر س ثم يفصل بالتثفيل ٠ يجمع سائل الغسل من التثفيلين ويمدد الحجم النهائي له حتى ٥ مل بوساطة محلول حمض فوق الكلور ٥ر٠ نظامي ٠

تعاير كمية DNA و RNA في المستحضرين النهائيين لهما بقياس شدة الامتصاص في طولي الموجة ٢٦٠ و ٢٩٠ نانومترا وتحسب قيمة RNA و DNA من المعادلة المذكورة في التجربة السابقة ٠

□ □ □

الفصل التاسع

الفيتامينات

يلخص في هذا الفصل أكثر التفاعلات الكيفية انتشارا وسهولة في تحديد بعض الفيتامينات ، وكذلك طرق معايرتها كميا في المركبات الحيوية .

الفيتامين — A (الرتينول المضاد للعشى الليلي)

تفاعلات الكشف الكيفي للفيتامين — A

الادوات والمواد اللازمة

حامل مع أنابيب اختبار ، ماصة معايرة سعة ١ و ٢ مل ، زيت السمك ، محلول فيتامين — A (٠٫٠٥٪) في الكلوروفورم ، محلول مشبع من كلور الانتموان III في الكلوروفورم ، بلا مـاء حمض الخـل ، حمض الخـل الثلجي ، كبريتات الحديدي ، حمض الكبريت المركز .

التفاعل مع كلور الانتموان

نصب في أنبوب اختبار جاف تماما قطرة من زيت السمك وتضاف اليها ٤ — ٥ قطرات من محلول كلور الانتموان المشبع في الكلوروفورم . يظهر لـون أزرق يتحول تدريجيا الى بنفسجي محمر . إن هذا التفاعل غير مميز لهذا الفيتامين إذ أن اللون الازرق يتشكل مع جميع المركبات الحاوية روابط مزدوجة مترافقة . يتطلب تحقيق هذا التفاعل دقة خاصة وذلك لان وجود أية نسبة من الرطوبة ، حتى ولـو

كانت ضئيلة جـدا ، يؤدي الى تشـكل مركب كلور اكسيـد الانتموان الذي لا يتفاعل مع الڤيتامين — A ، كما يسبب تعكر وسط التفاعل • وللتخلص مـن أية رطوبة قد تكون موجودة ينصح باضافة قطرتين من بلاماء حمض الخل الـى وسط التفاعل •

التفاعل مع كبريتات الحديدي

تؤخذ في أنبوب اختبـار قطرتان مـن زيت السمك أو من محلول (٠٫٠٥) ڤيتامين — A في الكلوروفورم ، وتضاف اليها ٥ — ١٠ قطرات من حمض الخل الثلجي ومثلها من محلول كبريتات الحديدي المشبع ثم قطرتان من حمض الكبريت المركز • يظهر لون أزرق يتحول تدريجيا الى أحمر وردي • تعطي الكاروتينات في الشروط نفسها لونا أخضر •

التفاعل مع حمض الكبريت (تفاعل دروموند)

تؤخذ في أنبوب اختبار قطـرة من زيت السمك وتحـل بـ ٤ — ٥ قطرات من الكلوروفورم ثم تضاف اليها قطرة من حمض الكبريت الكثيف فيظهر لون أزرق يتحول بسرعة الى أحمر ارجواني • يعتمد هذا التفاعل على نزع الماء مـن الڤيتامين — A بتأثير حمض الكبريت المركز وتشكيل ناتج تفاعل ملون •

المعايرة الكمية للڤيتامين — A

معايرة الڤيتامين — A بالتفاعل مع ١ ، ٣ ـ ثنائي كلور البربانول ـ ٢

تعتمد هذه الطريقة على تفاعل الڤيتامين — A مع محلول حمض كلور الماء في مركب ١،٣ ـ ثنائي كلور البروبانول ـ ٢ ، حيث يكون للمركب الناتج عن هذا التفاعل لون بنفسجي وردي تعاير شدته بوساطة مقياس اللون •

الادوات والمواد اللازمة

مقياس اللون ، حمام مائي ، هاون بورسـلان ، قمع فصل سعـة ١٠٠ مل ، حوجلة مقعرة ذات مبرد هوائي سعة ٢٥ مل ، ماصة معايرة سعة ١ ، ٢ ، ٥ و ١٠

مل • نسيج كبدي (قطعة من كبد الخروف) ، كلوروفورم بمقطر حديثا وخال من الرطوبة ، ايتر ايتيلي ، كاشف الهيدرين (٢ مل من حمض كلور الماء المركز تضاف الى ٩٨ مل من ١ ، ٣ ــ ثنائي كلور البربانول ــ ٢ ، يحفظ المحلول في مكان رطب ومظلم) ، محلول غولي لهدروكسيد البوتاسيوم ٢٠٪ ، محلول معياري (١٠ ملغ من بنفسجي الميتيل و ٣ ملغ سافرونين تحلان في لتر من الماء المقطر • يمكن حفظ هذا المحلول لمدة ٥ أشهر في زجاجة غامقة ، ويحضر منه محاليل المعايرة التجريبية التي تستخدم للمقارنة ولحساب ثابت الامتصاص اللوني على المقياس وذلك بأخذ ١٢ مل من هذا المحلول ومزجها مع ١٣ مل من الماء بشكل جيد ثم تقاس شدة امتصاص عينة المراقبة ، حيث تعادل شدة امتصاص ١ مل منه ٠٣ر٠ ملغ من الفيتامين A) .

طريقة العمل

يؤخذ في هاون بورسلان ٥غ من النسيج الكبدي وتسحق جيدا ثم تنقل كميا الى الحوجلة المجهزة بمبرد هوائي وتضاف اليها ١٠ مل من محلول هدروكسيد البوتاسيوم ٢٠٪ في الايتانول •

يسخن على حمام مائي يغلي لمدة ٣٠ دقيقة وذلك حتى تمام انحلال النسيج الكبدي • ينقل المحلول الى قمع الفصل ويستخلص ثلاث مرات بوساطة وجبات من الايتر الايتيلي وتغسل من القلوي في قمع الفصل بوساطة الماء المقطر • تجفف العينات بوساطة كبريتات الصوديوم اللامائية • يرشح ويغسل الراسب مرتين بـ ٥ ميلي لترات من الايتر ثم يبخر الايتر على حمام مائي ساخن(أو تحت الفراغ في جو من غاز الكربون) ويحل الراسب بـ ٥ مل من الكلوروفورم •

يؤخذ في أنبوب اختبار جاف ونظيف ١ مل من المحلول الكلوروفورمي السابق ويضاف اليه ٢ مل من الكاشف الهيدريني • يخضخض الانبوب بشدة ويترك ليهدأ مدة ٥ دقائق في الدرجة ٢٥° س ثم تقاس شدة الامتصاص ويتم الحساب بوساطة المعادلة :

$$C = \frac{E_1 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 0{,}03 \cdot 3}{E_2 \cdot 5}$$

حيث :

C — كمية الڤيتامين — A في المادة المدروسة (ملغ٪) ٠

E_1 — شدة الامتصاص في العينة المدروسة ٠

E_2 — شدة الامتصاص في عينة المراقبة ٠

معايرة كمية الكاروتين في النسج النباتية بطريقة الكروماتوغرافيا العمودية

يتم استخلاص الكاروتينات α و β و γ من النسج النباتية بوساطة الاسيتون ثم تنقل الى البنزول ٠ ويتم عزل الاصبغة الكاروتينوئيدية (الكساتوفيل ، الليكوبين وغيرهما) من الكلوروفيل بطريقة الكروماتوغرافيا الادمصاصية على عمود اكسيد الالمنيوم ٠ تعاير كمية الكاروتينات في المحلول البنزولي النقي بطريقة الامتصاص اللوني ، ويستخدم كمحلول معياري محلول الآزوبنزول ، الذي حددت كمية امتصاصه بالمقارنة مع محلول كاروتيني نقي ٠

الادوات والمواد اللازمة

مقياس اللون ، عمود كروماتوغرافيا شكل (٩ — ١) ، قمع فصل سعة ١٠٠ مل ، حوجلتين للترشيح تحت الفراغ (بونزن) ، قمع بوشنر (بقطر خارجي ١٠ سم) ، هاون بورسلان (قطره ١١ سم) ، حوجلة معايرة سعة ٥٠ و ١٠٠ مل ، مقياس مدرج سعة ٥٠ مل (عدد ٢) ٠ قطع من الجزر ، اكسيد الالمنيوم ، محلول معياري من آزوبنزول (بحل ١٤ر٠ غ من الآزوبنزول النقي في ١٠٠ مل ايتانول ٩٦٪ ، ويمدد المحلول عشر مرات قبل الاستخدام بالايتانول نفسه) ، اسيتون ، بنزول ، كربونات المغنزيوم المنشطة (يسخن الملح لمدة ساعة في الدرجة ٢٠٠° س ثم يفرد على لوح زجاجي ويترك في الهواء لمدة ١٧ — ١٨ ساعة) ، كربونات الصوديوم اللامائية ، كبريتات الصوديوم اللامائية ٠

طريقة العمل

يسحق ٢٠ غراما من قطع جذور الجزر في الهاون مع كمية قليلة من رمل الكوارتز وكمية قليلة من كربونات الصوديوم ثم يضاف اليها ١٠ مل من

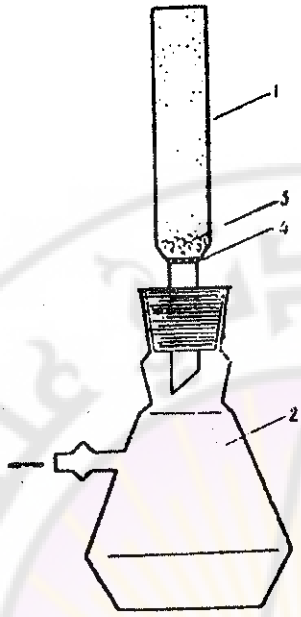
لاسيتون ويستمر بالسحق • يرشح المزيج الناتج كميا على قمع بوشنر ويغسل الراسب بعدة وجبات من الاسيتون حتى يصبح الاسيتون المترشح عديم اللون • ينقل المحلول الاسيتوني الى قمع الفصل ويضاف اليه ٢٠ ميلي لترا من البنزول ويمزج بشكل جيد حيث تنتقل الاصبغة النباتية ومن بينها الكاروتينات الى الطور البنزولي • يتم التخلص من بقايا الاسيتون الموجودة في البنزول بغسل الاخير بالماء ، الذي يضاف الى قمع الفصل بكميات قليلة وخضه قليلا • يعزل ماء الغسل ويرمى • يجفف المحلول البنزولي للاصبغة النباتية بوساطة كبريتات الصوديوم اللامائية ثم يمرر هذا المحلول عبر عمود الفصل الكروماتوغرافي شكل (٩ــ١) والمملوء إما بكربونات المغنزيوم المنشطة أو بأكسيد الالمنيوم •

تحضير عمود الفصل

تؤخذ قطعة من الصوف الزجاجي على شكل كتلة سماكتها ١ سم وتوضع في أسفل الانبوب الزجاجي (عمود الفصل) ويصب فوقها وعلى دفعات مسحوق كربونات المغنزيوم أو اكسيد الالمنيوم بحيث ترص كل دفعه بنعومة وذلك بوساطة قضيب زجاجي • يستمر بعملية الصب حتى يصبح ارتفاع المسحوق في العمود ما بين ٥ ــ ٧ سم • يصب في هذا العمود ما بين ٥ و ٧ مل من البنزول ويوصل مع الحوجلة المترشيح تحت الفراغ ثم يشغل المص وتعاير سرعة الشفط حتى يبلل البنزول كامل مسحوق الفصل وتصبح سرعة خروجه من العمود بمعدل ٢٥ ــ ٣٠ قطرة في الدقيقة •

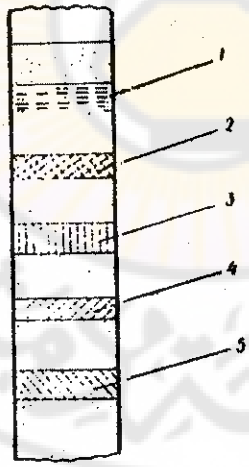
مراحل التفريق :

يصب في العمود محلول الاصبغة البنزولي مع المحافظة على سرعة الامتصاص ومراقبة كون سطح مسحوق الفصل مغمورا بطبقة من البنزول (وذلك للحيلولة دون أكسدة الكاروتينات) • يستمر بإمرار البنزول عبر العمود حتى وصول محلول الكاروتينات كاملا الى الحوجلة المستقبلة ؛ ويحدد انتهاء عملية الكروماتوغرافيا بعدم تلون البنزول الخارج من العمود • يبين الشكل (٩ ــ ٢) كيفية توزع الكاروتينات على عمود أكسيد الالمنيوم •



شكل (٩ ــ ١) عمود كروماتوغرافي

١. عمود كروماتوغرافي ، ٢. دورق بونزن ، ٣. صوف زجاجي ، ٤. ماز مسامي



شكل (٩ ــ ٢) الفصل الكروماتوغرافي على اكسيد الالمنيوم

١. كسانتوفيل ، ٢. ليكوبين ٣. β ــ كاروتين ، ٥. α ــ كاروتين

لمعايرة الكاروتينات كميا ، يؤخذ المحلول البنزولي من حوجلة بونزن وينقل كميا الى حوجلة معايرة ويمدد حتى العلامة بالبنزول وتقاس شدة اللون بمقياس اللون وتقارن مع المحلول المعياري من آزوبنزول (١ مل من محلول آزوبنزول المعياري يقابل ٠٠٢٣٥ر٠ ملغ من الكاروتين — α أو — β) ٠

تحسب كمية الكاروتينات في المحلول البنزولي (وبالتالي في المادة المدروسة) من المعادلة :

$$c = \frac{0.00235 \cdot 100 \cdot V \cdot E_1}{a \cdot E_2}$$

حيث :

c — كمية الكاروتينات في العينة المدروسة (ملغ٪) ٠

V — حجم المحلول البنزولي للكاروتينات (مل) ٠

E_1 — شدة امتصاص المحلول المعياري لآزو البنزول ٠

E_2 — شدة امتصاص محلول الكاروتينات المدروس ٠

a — وزن المادة المدروسة (غ) ٠

الفيتامين — D (الكالسيفيرول المضاد للخرع)

تفاعلات الكشف الكيفي عن فيتامينات المجموعة — D

الادوات والمواد اللازمة

ماصة معايرة سعة ١ مل (عدد ٤) ، حامل مع أنابيب اختبار ، زيت السمك ، أنيلين ، محلول البروم في الكلوروفورم بنسبة (١:٦٠) ، حمض كلور الماء المركز (الكثيف) ٠

التفاعل مع الانيلين

يصب في أنبوب اختبار جاف ١ مل من زيت السمك و ١ مل من مزيج الانيلين — حمض كلور الماء الكثيف بنسبة (١:١٥) ٠ يمزج جيدا ويسخن الانبوب بحذر حتى الغليان ويغلى لمدة نصف دقيقة ٠ يتحول لون المستحلب الاصفر في حال

وجود الڤيتامين ـــ د الى اللون الاخضر أولا ثم الى الاحمر . ينفصل هذا المستحلب خلال دقائق الى طبقتين ، تكون السفلى منها ذات لون أحمر شديد .

اختبار البروم الكلوروفورمي : يؤخذ في أنبوب اختبار جاف ١ مل من زيت السمك و ١ مل من محلول البروم في الكلوروفورم (١:٦٠) . يتشكل لون أخضر يزرق في حال وجود الڤيتامين ـــ D .

المعايرة الكمية للڤيتامين ـــ

الادوات والمواد اللازمة

مقياس اللون ، حمام مائي ، قمع فصل سعة ٣٠٠ مل (عدد ٢) ، حوجلة سعة ٢٠٠ مل مستفرة ، ماصات معايرة سعة ١ ، ٥ و ١٠ مل ، زبدة الحليب ، ايتانول (٩٦٪) ، محلول هدروكسيد البوتاسيوم (٥٠٪) ، الايتر الايتيلي ، كبريتات الصوديوم اللامائية ، كلوروفورم (مغسول بالماء ومجفف بواسطة كبريتات الصوديوم اللامائية ومقطر حديثا) ، محلول ثلاثي كلور البزموت (٢١ـــ٢٣٪) في الكلوروفورم اللامائي (ينصح بحفظ هذا المحلول في زجاجة عاتمة وضمن مجفف زجاجي فوق حمض الكبريت الكثيف) ، كلور الاسيتيل ، محلول كالسيفيرول معياري (تحل ١٠ ملغ كالسيفيرول في ١٠٠ مل ايتانول، مما يوافق ٤٠٠ آلف وحدة دولية من الڤيتامين . يكون هذا المحلول ثابتا لمدة عام ويمكن حفظه في البراد) .

طريقة العمل

يؤخذ في حوجلة مجهزة بمبرد هوائي مرتد طوله ٨٠ سم ، ١٠ غ من زبدة الحليب و ٤٠ مل من الايتانول ٩٦٪ و ٨ مل من محلول هدروكسيد البوتاسيوم ٥٠٪ . تسخن الحوجلة لمدة ٥٠ دقيقة على حمام مائي مسخن للدرجة ٩٠°س . بانتهاء التصبن ينقل محتوى الحوجلة كميا الى قمع الفصل ويستخلص ثلاث مرات بالايتر الايتيلي (٥٠ ، ٢٥ و ٢٥ مل) . تجمع الاطوار الايترية في كل مرة في قمع فصل ثان وتغسل بعدة دفعات من الماء حتى زوال القلوية تماما (للتأكد من ذلك يستخدم مشعر فينول فتالئين) . يضاف للمستحضر الايتري بعد ذلك ٧ غ من كبريتات الصوديوم اللامائية ويجفف حتى تمام الشفافية (١٥ـــ٢٠ دقيقة) .

يرشح عبر ورقة ترشيح ثم يبخر الايتر من المستحضر على حمام مائي ، مسخن بشكل مسبق ، حتى الجفاف التام . يحل الراسب المتشكل في ٥ مل من الكلوروفورم يؤخذ منها ١ مل وتضاف اليه ٣ قطرات من كلور الاسيتيل و ٦ مل من محلول ثلاثي كلور البزموت .

تقاس شدة اللون بعد مرور ٤ دقائق بوساطة مقياس اللون (طول الموجة ٥٠٠ نانومتر) ، وذلك مقابل المزيج المؤلف من ١ مل كلوروفورم و ٦ مل محلول ثلاثي كلور البزموت وثلاث قطرات من كلور الاسيتيل . تقدر كمية الڤيتامين — D بمساعدة المنحني المعياري .

يرسم المنحني المعياري بتحضير مجموعة من المحاليل المعيارية التي تحتوي على تراكيز من ٢٠٠ وحتى ١٠٠٠ وحدة دولية كالسيفيرول في ١ مل . ثم وبعد اجراء التفاعل الملون عليها وفق الخطوات السابقة ، تقاس شدة الامتصاص لكل منها . تتم الحسابات وفق المعادلة :

$$c = \frac{x \cdot v \cdot d}{a}$$

حيث

c — كمية الڤيتامين — D في ١ غ من الدسم (مقدر بالوحدة الدولية) .

X — كمية الڤيتامين — D ، التي حددت على المنحني المعياري في ١ مل محلول (مقدرة بالوحدة الدولية) .

V — التمديد (مل) .

a — وزن المادة الدسمة (غ) .

d — كثافة الدسم (غ/سم^3) .

الڤيتامين — E (التوكوفرول المضاد للعقم)

تفاعلات الكشف الكيفي عن الڤيتامين — E

الادوات والمواد اللازمة

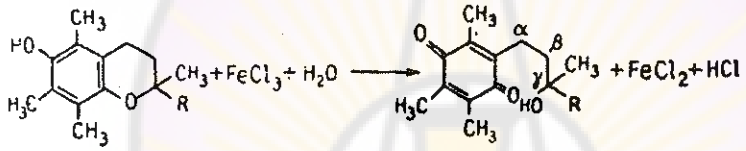
أنابيب اختبار مع حامل ؛ محلول a — توكوفرول ١ر٠٪ في الايتانول ٩٦٪ ؛ حمض الآزوت المركز ، كلور الحديد .

التفاعل مع حمض الآزوت المركز :

تؤخذ في أنبوب اختبار جاف ٥ قطرات من المحلول الغولي لـ α ـــ توكوفرول وتضاف اليها ١٠ قطرات من حمض الآزوت الكثيف • يخضخض الانبوب فيتشكل مستحلب تنفصل فيه طبقة زيتية عليا ذات لون أحمر • ينتج هذا اللون عند أكسدة α ـــ توكوفرول الى α ـــ توكوفريل كينون ذي اللون الاحمر أو الاصفر المحمر •

التفاعل مع كلور الحديد

تؤخذ في أنبوب اختبار جاف ٥ قطرات من المحلول الغولي لـ α ـــ توكوفرول ويضاف اليها ٥ر٠ مل من محلول كلور الحديد • يخضخض الانبوب جيدا فيتلون المحلول بلون أحمـــر نتيجة تأكسد α ـــ توكوفرول بوساطة كلـــور الحديد الى توكوفريل كينون وفق المعادلة :



حيث R ـــ جذر ايزو هكساديكان •

المعايرة الكمية للفيتامين ـــ E

الادوات والمواد اللازمة

مقياس اللون ، حمام مائي ، قمع فصل سعة ٢٠٠ مل ، حوجلة ذات قعر كروي سعة ١٠٠ مل وأخرى سعة ٢٥٠ مل مجهزتين بمبرد هوائي ، حوجلة معايرة سـعة ٢٥ مل (عدد ٢) ، مقياس مدرج سعة ٢٥ مل (عدد ٤) ، ماصة معايرة سعة ١،٢ و ٥ مل ، حليب ، محلـــول هدروكسيد البوتاسيوم (٦٠٪) ، ايتانول ٩٦٪ ، ايتـر ايتيلـي ، كبريتات الصوديوم اللامائيـة ، ايتانـول مطلـق ، حمـض الآزوت (d = 1,4) ، مجموعة محاليل غولية معيارية من α ـــ توكوفرول ذات تراكيز متزايدة من ١٠٠ ـــ ٤٠٠ مكروغرام في ١ مل •

طريقة العمل

يصب في حوجلة مزودة بمبرد هوائي، ١٠٠ مل من الحليب و ٢٥ مل من محلول هدروكسيد البوتاسيوم ٦٠٪ و ٢٠ مل من الايتانول ٩٦٪ • تسخن الحوجلة لمدة ساعتين على حمام مائي يغلي ثم يبرد حاصل الحلمهة الناتج ويمدد بـ ٢٠ مل من الماء وينقل كميا الى قمع الفصل • يتم استخلاص a ـ توكوفرول بوساطة الايتر الايتيلي الذي يضاف الى القمع على ثلاث دفعات مستقلة (٢٥،٥٠ و ٢٥ مل) • تجمع كميات الايتر الثلاث معا وتغسل بوساطة الماء المقطر ٣ـ٤ مرات في قمع الفصل وذلك حتى زوال قلوية الوسط (باستخدام مشعر فينول فتالئين)•

يجفف المستحضر الايتري الناتج بوساطة كبريتات الصوديوم اللامائية (٥ـ٧غ) حتى تمام شفافية السائل ثم يرشح في حوجلة (سعة ١٠٠ مل) ويغسل الراسب على القمع بوساطة قليل من الايتر يضاف الى الكمية الاصلية • يبخر الايتر على حمام مائي مسخن بشكل مسبق ثم يحل الراسب الناتج في ٥ مل من الايتانول المطلق ويضاف اليه ١ مل من حمض الآزوت المركز ويوصل بعدها الى الحوجلة مبرد هوائي ويسخن على حمام مائي يغلي لمدة ٣ دقائق،وذلك لأكسدة a ـ توكوفرول• يؤخذ للمقارنة ٥ مل من الايتانول المطلق ، الذي يضاف اليه ١ مل من حمض الآزوت الكثيف ويغلي أيضا على حمام مائي لمدة ثلاث دقائق • تبرد الحوجلتان وتتركان لمدة ١٥ دقيقة في الظلام وذلك لتشكل المعقد الملون ، ثم ينقل محتوى كل من العينتين ـ التجريبية والمقارنة الى حوجلتي معايرة سعة ٢٥ مل وتمددان بالايتانول المطلق حتى الحجم ٢٥ مل •

تقاس شدة الامتصاص في عينة التجربة مقابل محلول المقارنة وباستخدام مرشح اللون المقابل لطول الموجة ٤٧٠ نانومترا ، وتقارن كمية الفيتامين ـ E في العينة بوساطة منحني المعايرة •

لرسم منحني المعايرة تتم أكسدة ٥ مل من كل من محاليل a ـ توكوفرول المعيارية في الغول المطلق بوساطة ١ مل من حمض الآزوت الكثيف وذلك بغليها على حمام مائي لمدة ٣ دقائق ، ثم تعامل تماما كما في حالة عينة التجربة • ويرسم المنحني بأخذ تراكيز الفيتامين المتزايدة على محور السينات وشدة الامتصاص

المقابلة على محور العينات . وتتم الحسابات من المعادلة :

$$c = \frac{x \cdot v \cdot d}{a \cdot 1000}$$

حيث

c — كمية الڤيتامين — E في ١ غ من المادة المدروسة (ملغ) .

x — كمية الڤيتامين — E التي تم ايجادها على المنحني في ١ مل محلول (مكروغراما) .

v — الحجم النهائي للمحلول المدروس مع حساب جميع التمديدات (مل) .

d — كثافة الحليب المدروس .

a — وزن الحليب (غ) .

1000 — عامل لتحويل المكروغرامات الى ميلي غرامات .

الڤيتامين — K (الفيللوكونيون ـ المضاد لنزف الدم)

تفاعلات الكشف الكيفي عن الڤيتامين — K

الادوات والمواد اللازمة

أنابيب اختبار مع حامل ، ماصة معايرة سعة ١و٢ مل . محلول غولي للڤيكاسول (١ر٠٪) أو محلول غولي للميتينون (٢ر٠٪) ، مشابهات مصنعة للڤيتامين — K ، محلول سيستئين (٠٢٥ر٠٪) ، محلول هدروكسيد الصوديوم (١٠٪) ، محلول استر ثنائي ايتيل المالونيك (١٪) ، محلول هدروكسيد البوتاسيوم (١٪) ، انيلين مقطر حديثا .

التفاعل مع المحلول القلوي للسيستئين

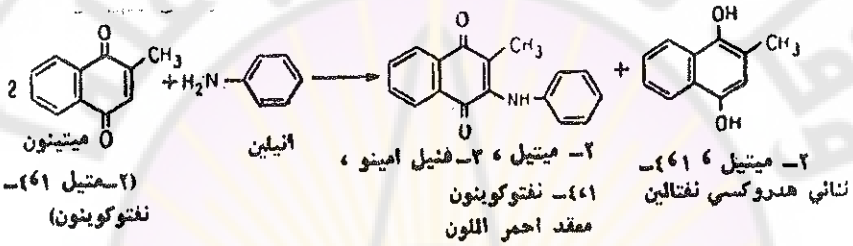
يؤخذ في انبوب اختبار ١ مل من محلول ڤيكاسول الغولي (أو ١ مل من محلول ميتينون الغولي) . تضاف اليه قطرتان من محلول السيستئين ٠٢٥ر٠٪ وقطرتان من محلول هدروكسيد الصوديوم (١٠٪) . يظهر لون أصفر دليل وجود الڤيتامين — K .

التفاعل مع استر ثنائي ايتيل المالونيك

يؤخذ في أنبوب اختبار ٢ مل من محلول الفيكاسول الفولي ويضاف اليها ٥ مل من محلول استر ثنائي ايتيل المالونيك و ١ر٠ مل من محلول هدروكسيد البوتاسيوم ١٪ • يظهر لون بنفسجي محمر دليل وجود الفيتامين ـــ •

التفاعل مع الانيلين

يؤخذ في أنبوب اختبار ٢ مل من محلول الميتينون الفولي ويضاف اليه ١ مل من الانيلين • يتلون المزيج بعد التحريك بلون أحمر حيث يجري التفاعل التالي :



ميتينون (٢ـ متيل ١، ٤ـ نفتوكوينون) + انيلين ← ٢ـ ميتيل ، ٣ـ فنيل امينو ، ١، ٤ـ نفتوكوينون معقد احمر اللون + ٢ـ ميتيل ، ١، ٤ـ ثنائي هدروكسي نفتالين

المعايرة الكمية للفيتامين — K

تعتمد الطريقة على امكان الفيتامين ـــ K تشكيل مركب ملون مع استر ثنائي ايتيل المالونيك في الوسط القلوي • تتناسب شدة تلون المركب مع كمية الفيتامين ، حيث يمكن معايرته كميا •

الادوات والمواد اللازمة

مقياس لوني ، حمام مائي ، قمع بوشنر بقطر ١١ سم ، حوجلة للترشيح تحت الفراغ ، قمع بورسلان بقطر ١١ سم ، حوجلة معايرة سعة ١٠ مل (عدد ٢) ، ماصة معايرة سعة ١ مل (عدد ٤) ، بشّارة جزر ، جذور الجزر ، رمل الكوارتز ، الايتر الايتيلي ، كلوروفورم جاف ومقطر حديثا ، كربونات الصوديوم اللامائية ، كبريتات الصوديوم اللامائية ، محلول الاستر ثنائي الايتيلي لحمض المالون ١٪ في الايتانول ، محلول هدروكسيد البوتاسيوم (١٪) ، محلول معياري من الفيتامين ـــ K (٠٤ر٠ مكروغرام في ١ مل) •

طريقـة العمـل

يسحق حوالي ١٠ــ١٥ غ (موزونة بدقة) من مبشور الجزر في هاون بورسلان مع قليل مـن رمل الكوارتز وبوجود كمية قليلة مـن كربونات الصوديوم • ثـم يصب في الهاون ١٠ مل من الايتر الايتيلي ويتابع السحق • ينقل المزيج المتجانس الى قمع بوشنر ويغسل الهاون مرتين بكمية قليلة من الايتر ، وبعد الترشيح يغسل الراسب على القمع ثلاث مرات بكميات قليلة مـن الايتر • تجمع كميات المستحضر الايتري وتجفف بوساطة كبريتات الصوديوم اللامائية ثـم يبخر الايتر على حمام مائي مسخن مسبقا ويحل الراسب المتشكل في ٥ مل من الكلوروفورم •

يضاف الى المحلول الناتج ١ مل مـن المحلول الغولي لاستر حمض المالونيك ثنائي الايتيل و ٢ر٠ مل من محلول هدروكسيد البوتاسيوم ، ويمدد الحجم النهائي في الحوجلة المعايرة حتى ١٠ مل •

تجري بالوقت نفسه معايرة المحاليل المعيارية للڤيتامين ــ K ويتم قياس شدة اللون في جميع هذه العينات بوساطة مقياس اللون وتحسب كمية الڤيتامين ــ K بالمعـادلة :

$$c = \frac{E_1 \cdot 0{,}2 \cdot 100}{E_2 \cdot a}$$

حيـث

c ــ كمية الڤيتامين ــ K (مكروغرام٪) •

a ــ كتلة المادة المدروسة (غ) •

E_1 ــ شدة الامتصاص في عينة التجربة •

E_2 ــ شدة الامتصاص في المحلول المعياري •

الڤيتامين ــ C (حمض الاسكوربيك المضاد للاسقربوط)

تفاعلات الكشف الكيفي عن الڤيتامين ــ C

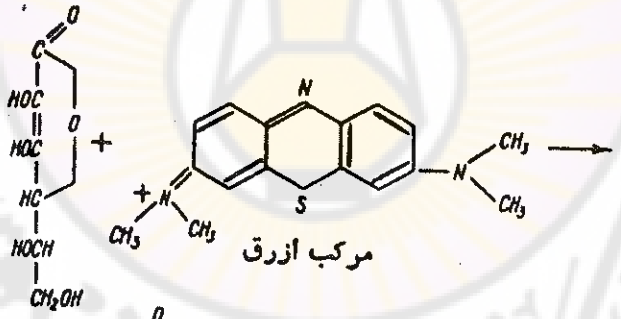
تعتمد تفاعلات الكشف الكيفي عن هذا الڤيتامين على امكان دخوله وبسهولة في تفاعلات الاكسدة والارجاع ،فهو يرجع مثلا أزرق الميتيلين و ٦،٢ــ ثنائي كلور فينولين دو فينول وحديد سيان البوتاسيوم وترات الفضة وغيرها •

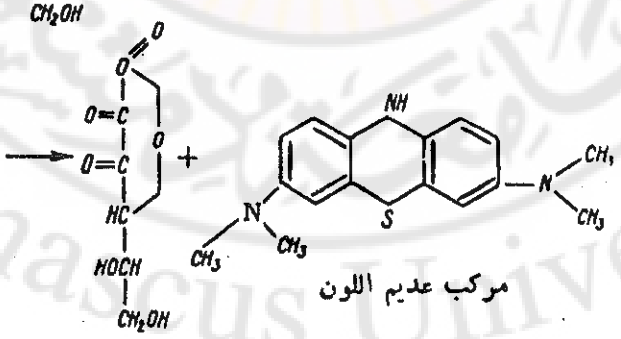
الادوات والمواد اللازمة

حاضنة حرارية ، ماصة معايرة سعة ١ مل (عدد ٥) ، أنابيب اختبار مع حامل ، عصير الملفوف أو البطاطا (أو محلـول حمض الاسكوربيك بتركيز ٠٠٢ر٠٪) ، محلول أزرق الميتيلين (٠١ر٠٪) ، محلول حديد سيان البوتاسيوم (٥٪) ، محلول هدروكسيد البوتاسيوم (٥٪) ، محلول حمض كلور الماء (١٠٪) ، محلول كلـور الحديد (١٪) ، محلول حمض الخل (١٠٪) ، محلول ٦،٢ـ ثنائي كلـور فينولين دو فينول طازج (٠٢ر٠٪) .

التفاعل مع ازرق الميتيلين

يؤخذ في أنبوب اختبار ١ مل من عصير الملفوف أو البطاطا ويضاف اليها ١ مل من محلول أزرق الميتيلين (٠١ر٠٪) ، يخضخض جيدا ثم يسد الانبوب وذلـك لمنع التأكسد بوساطة أكسجين الهواء . يوضـع الانبوب في حمـام مائي بالدرجة ٣٧ ــ ٤٠°س وبعد فترة من الزمن يلاحظ اختفاء اللون الازرق في الانبوب نتيجة ارجاع أزرق الميتيلين الـى شكل عـديم اللـون وتشكل ثنائـي هدرو حمض الاسكوربيك :

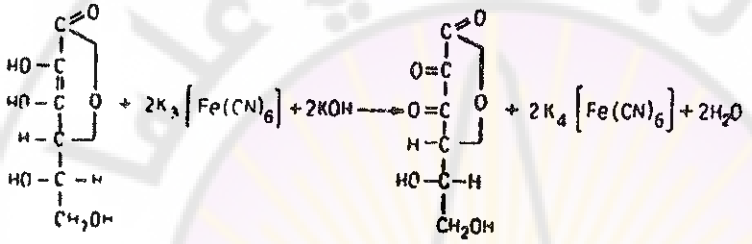




اذا خضخض الانبوب بعد تعريضه للهواء الجوي فترة من الزمن ، يلاحظ عودة اللون الازرق الى المحلول مجددا .

التفاعل مع حديد سيان البوتاسيوم

عندما يتأكسد حمض الاسكوربيك فانه يستطيع ارجاع حديد سيان البوتاسيوم $K_3 [Fe (CN)_6]$ الى حديدي سيان البوتاسيوم $K_4 [Fe (CN)_6]$ ، الذي يتفاعل مع شوارد الحديد Fe^{++} مشكلا المركب:حديدي سيان البوتاسيوم والحديد — $K Fe [Fe (CN)_6]$ أزرق بروسيا :



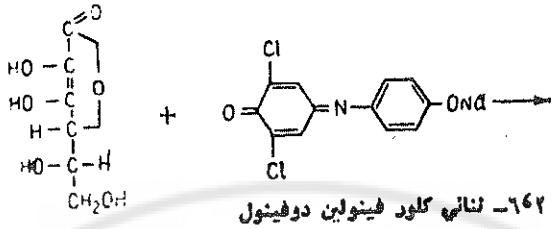
$$K_4 [Fe (CN)_6] + FeCl_3 \rightarrow K Fe [Fe (CN)_6] + 3 KCl$$

ازرق بروسيا

يؤخذ في أنبوب اختبار ١ مل من عصير الملفوف وتضاف اليها قطرتان من محلول هدروكسيد البوتاسيوم وقطرتان من محلول حديد سيان البوتاسيوم . يخضخض الانبوب بشدة ثم تضاف اليه من ٦ــ٨ قطرات محلول حمض كلور الماء ١٠٪ وقطرة أو قطرتان من محلول كلور الحديد . يتشكل لون أزرق (أو أخضر مزرق) نتيجة لتشكل أزرق بروسيا .

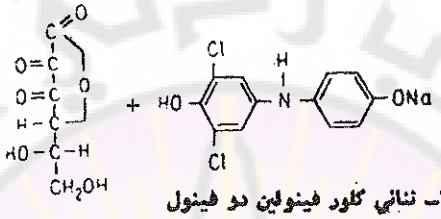
التفاعل مع ٦،٢ ـ ثنائي كلور فينوبين دوفينول

يؤخذ في أنبوب اختبار ١ مل من محلول ٦،٢ــ ثنائي كلور فينولين دوفينول (٠،٠٢٪) ويضاف اليها ١ مل من عصير الملفوف أو البطاطا ثم يخضخض محتوى الانبوب . يختفي لون السائل نتيجة تشكل البنية عديمة اللون من الكاشف . إذا أضيفت زيادة من الكاشف فان اللون الوردي يبدأ بالظهور مجددا وذلك لان حمض الاسكوربيك الموجود في عينة الفيتامين المأخوذة قد تأكسد بكامله وأصبح عاجزا عن ارجاع الزيادة من كاشف ٦،٢ ــ ثنائي كلور فينولين دو فينول المضافة :



L - حمض الاسكوربيك

٦،٢- ثنائي كلور فينولين دوفينول
(البنية المؤكسدة والملونة)



L - حمض الاسكوربيك
منقوص الهدروجين

٦،٢- ثنائي كلور فينولين دو فينول
(البنية المرجعة لا الملونة)

المعايرة الكمية للفيتامين — C

تتم معايرة حمض الاسكوربيك في المصادر الحيوية بوساطة محلول معايرَ من ٦،٢- ثنائي كلور فينولين دوفينول ، وبحساب كمية الكاشف المستهلكة في أكسدة الفيتامين المدروس تحدد نسبة هذا الأخير في المادة الحية .

الادوات والمواد اللازمة

سحاحة سعة ٥ مل (عدد ٢) ، ماصات معايرة سعة ٥،٢ و ٢٠ مل ، حوجلة سعة ٥٠ مل وأخرى سعة ١٠٠ مل ، كأس زجاجي سعة ١٠٠ مل (عدد ٤) ، حوجلة معايرة سعة ١٠٠ مل (عدد ٢) ، مقياس مدرج سعة ٢٥٠ مل ، هاون بورسلان بقطر ١١ سم ، زجاجة ساعة ، رمل الكوارتز ، قطع بطاطا ، قطع جزر ، عصير البندورة، محلول حمض كلور الماء (٥٪) ، محلول ٦،٢- ثنائي كلور فينولين دوفينول بتركيز ٠٠١ر٠ نظامي (الكواشف) ، محلول ميتا حمض الفسفور (٢٪ و ٤٪) ، محلول حمض الاسكوربيك (١ر٠٪) ، محلول يودات البوتاسيوم بتركيز ٠٠١ر٠ نظامي (الكواشف) ، يود البوتاسيوم ، مطبوخ النشاء (١٪) ، محلول يود البوتاسيوم (٥٪) ، محلول الماء الاكسجيني (٣٪) .

معايرة محلول ٦،٢ ـ ثنائي كلور فينولين دوفينول :

تتم معايرة محلول ٦،٢ـ ثنائي كلور فينولين دوفينول (ذي التركيز التقريبي ٠،٠٠١ر نظامي) بوساطة محلول حمض الاسكوربيك في يوم التجربة نفسه ، حيث يؤخذ لهذا الغرض ٢ مل من محلول حمض الاسكوربيك (١ر٠٪) وتحل في ٥٠ مل من محلول ميتا حمض الفسفور (٢٪) أو تحل في حمض الكبريت (٢٪) . يؤخذ من المحلول النهائي ٥ مل وتعاير بوساطة محلول ٦،٢ ثنائي كلور فينولين دوفينول وذلك حتى ظهور اللون الوردي . تحدد كمية الكاشف المستخدمة في هذه المعايرة وتتم بالوقت نفسه معايرة كمية ثانية مساوية بالحجم من محلول حمض الاسكوربيك بوساطة محلول يودات البوتاسيوم (٠،٠٠١ر نظاميا) والمعبأ في سحاحة مستقلة .

تضاف الى محلول حمض الاسكوربيك قبل المعايرة عدة بلورات من يودات البوتاسيوم (لاتزيد عن ١ر٠ غ) و ٥ قطرات من مطبوخ النشاء (١٪) . تتم المعايرة بحذر شديد حتى مرحلة ظهور بدايات اللون الازرق التي بالكاد تلاحظ . يتحدد بهذه الطريقة حجم يودات البوتاسيوم اللازمة للعمايرة وذلك لانه في كلتا المعايرتين قد تمت معايرة الحجم نفسه من حمض الاسكوربيك وبالتالي فان كميتي يودات البوتاسيوم وكاشف ٦،٢ـ ثنائي كلور فينولين دوفينول المستخدمين في المعايرتين متكافئتان . ونظرا لان ١ مل من محلول يودات البوتاسيوم (٠،٠٠١ر نظاميا) تكافىء ٠،٠٨٨ر ميليغراما من حمض الاسكوربيك ، فان عيار محلول ٦،٢ـ ثنائي كلور فينولين دوفينول (محسوبا بميليغرامات حمض الاسكوربيك) يحسب بالمعادلة :

$$T = \frac{0.088 \cdot V_2}{V_1}$$

حيث V_1 و V_2 هي حجم محلولي ٦،٢ـ ثنائي كلور فينولين دوفينول ويود البوتاسيوم على التتابع واللازمين لمعايرة الحجم نفسه من محلول حمض الاسكوربيك .

تحضير مستخلص حمض الاسكوربيك من المادة النباتية

تقطع المادة النباتية المدروسة (بطاطا أو جزر أو غيرها) الى قطع صغيرة ثم يوزن نحو ١٠ غ منها وتنقل الى هاون بورسلان وتسحق جيدا بمساعدة كمية صغيرة من رمل الكوارتز وتضاف اليها دفعات صغيرة من محلول ميتا حمض الفسفور (٤٪) وذلك حتى تتشكل كتلة عجينية . ينقل المزيج كميا الى حوجلة معايرة سعة ١٠٠ مل ويغسل الهاون وذراع السحق جيدا بمحلول حمض الفسفور نفسه وتجمع الغسالة في الحوجلة مع الا تتباه الى عدم استخدام أكثر من ٥٠ مل من محلول حمض الفسفور (وذلك لان تركيزه النهائي في المستخلص يجب أن يكون ٢٪) . وفي حال عدم توافر ميتا حمض الفسفور يمكن أن يستبدل به حمض كلور الماء بتركيز ٥٪ (بحيث يكون تركيزه النهائي ٥ر٢٪) .

يمدد الحجم في حوجلة المعايرة بوساطة الماء المقطر حتى ١٠٠ مل ثم يحرك بشكل جيد ويرشح أو يثفل ، حيث يجب أن يكون المستخلص بشكله النهائي شفافا .

معايرة حمض الاسكوربيك في المستخلص

تؤخذ في كل من حوجلتين صغيرتين سعة ٥٠ مل كمية ١٠ مل من المستخلص النباتي . يخرب حمض الاسكوربيك في احداهما وذلك بغليه مع عدة قطرات من الماء الاكسجيني ثم يعاير محتوى كل من الحوجلتين بوساطة محلول ٦،٢ ـ ثنائي كلور فينولين دو فينول . في حال وجود الفيتامين ـ C في العينة فان لون المحلول يزول وبمتابعة زيادة اضافة الكاشف يبدأ اللون الوردي بالظهور وذلك لان حمض الاسكوربيك كاملا قد تأكسد في العينة المأخوذة للمعايرة ويصبح الصبغ المضاف غير قابل للارجاع . أما في العينة التي تم فيها تخريب الفيتامين فان اللون الوردي سيظهر بعد اضافة عدة قطرات فقط من الكاشف . تسجل نتائج المعايرة ثم تعاد العملية مع كمية جديدة من نفس المستخلص . يؤخذ متوسط أرقام ثلاث معايرات وتحسب كمية الفيتامين C ـ وفق المعادلة :

$$c = \frac{100 \cdot V_1 \cdot V.T}{a \cdot V_2}$$

حيث :

c — كمية حمض الاسكوربيك (ملغ./٪) .

T — عيار ٦٠١ـ ثنائي كلور فينولين دو فينول بميليغرامات حمض الاسكوربيك (انظر أعلاه) .

V — حجم المستخلص (مل) .

a — كتلة المادة النباتية الموزونة والمستخدمة للاستخلاص (غ) .

V_1 — حجم الكاشف المستخدم أثناء المعايرة (مل) .

V_2 — حجم المحلول المأخوذ للمعايرة (مل) .

وبعد هذه الحسابات تحسب كمية حمض الاسكوربيك في المادة النباتية بالميليغرامات في ١٠٠ غ من المشتق النباتي المدروس . هذا ومن الواضح أن الطريقة المذكورة أعلاه تعاير الشكل المرجّع والقابل للتأكسد من حمض الاسكوربيك .

□ □ □

جامعة دمشق
Damascus University

الفصل العاشر

الهرمونات

ينظر للهرمونات في الوقت الحاضر كمركبات تصطنع في خلايا معينة لتقوم بتحقيق وظائفها في خلايا أخرى كمنظمات للاستقلاب الخلوي فيها • ومن الضروري التعرف على بعض التفاعلات الكيفية التي يتم بها كشف هذه الهرمونات، وطرق معايرة بعضها •

الهرمونات ذات البنية الببتيدية

تفاعلات الكشف الكيفي للانسولين

الادوات والمواد اللازمة

أنابيب اختبار ، محلول الانسولين (امبولات) ، محلول هدروكسيد الصوديوم ١ر٠٪ ، حمض الخل ٥ر٠٪ ؛ المواد اللازمة للتفاعلات الملونة على البروتينات (بحث البروتينات ص ١١٤) •

التفاعل مع محلول هدروكسيد الصوديوم المهدد

طريقة العمل

يؤخذ في انبوب اختبار ١٠ ــ ١٥ قطرة من محلول الانسولين وتضاف إليه قطرة فقطرة من محلول هدروكسيد الصوديوم ١ر٠٪ حتى يترسب راسب قطني •

ينحل هذا الراسب عند تحميض الوسط بحمض الخل ٥ر٠٪ لدرجة pH = ٥ر٢ ــ ٥ر٣ ٠

التفاعل الدال على الطبيعة البروتينية للانسولين

تجرى على الانسولين التفاعلات المختلفة التي تكشف بوساطتها البروتينات (البيوريت وميللون وغيرهما) ٠

الهرمونات الستيروئيدية

تحتوي الهرمونات الجنسية الانثوية ــ الفوليكولين والاستراديول والاسترول ــ على حلقة فينولية ولذلك فهي تعطي مجموعة من التفاعلات المميزة للزمرة الفينولية٠

الكشف الكيفي للفوليكولين (الاسترون)

الادوات والمواد اللازمة

حمام مائي ، قمع فصل ، أنابيب اختبار ؛ هدروكسيد الصوديوم ٣٠٪ ؛ محلول ميتانتروبنزول ٢٪ في الايتانول ، حمض الكبريت المركز ؛ كاشف فولين (الكواشف) ، كاشف ديآزو (الكواشف) ، كربونات الصوديوم ١٠٪ ، محلول غولي للفوليكولين (يصب في قمع الفصل ١٠٠ مل ايتانول ومحلول زيتي للفوليكولين من (١٠ انبولات) ؛ يتم استخلاص الفوليكولين بوساطة الايتانول بالخضخضة وطرح الطبقة السفلية الزيتية وتستخدم الطبقة العليا الغولية) ٠

تفاعل ديآزو

يؤخذ ٣ مل من المحلول الغولي للفوليكولين ويضاف اليه ٢ مل من محلول كربونات الصوديوم ١٠٪ و ٣ مل من كاشف ديآزو ٠ يظهر تدريجيا لون أبيض مصفر في الانبوب ٠

التفاعل مع حمض الكبريت المركز

يؤخذ في أنبوب اختبار ١ مل من المحلول الغولي للفوليكولين ويوضع على

حمام مائي يغلي لمدة ٥ ــ ١٠ دقيقة وذلك ليتبخر الايتانــول • يضاف للفوليكولين المتبقي ١ مل من حمض الكبريت الكثيف ويوضع الانبوب مجددا على الحمام المائي ويتحول باستمرار التسخين الى البرتقالي ذي الفلورة الزرقاء •

تشكيل فينولات الفوليكولين

يؤخذ في انبوبي اختبار جافين ٥ر٠ مل من الفوليكولين ويضاف للانبوب الاول ١ مل من الماء فيتشكل مستحلب وتضاف للانبوب الثاني الكمية نفسها من محلول هدروكسيد الصوديوم ٣٠٪ فلا يتشكل استحلاب وذلك لانه يتشكل في الوسط القلوي فينولات الفوليكولين المنحل •

كشف الزمرة الفينولية

يؤخذ ٢ مل من محلول الفوليكولين ويضاف اليه ١ مل من محلول هدروكسيد الصوديوم ٣٠٪ و ١ مل مــن كاشف فولــين • يتشكل لــون أزرق يميز الزمرة الفينوليــة •

تفاعل الزمرة ــ١٧ــ كيتو

يؤخذ انبوب اختبار جاف ويصب فيه ١ مل من محلول الفوليكولين و ١ مــل من محلول هدروكسيد الصوديوم ٣٠٪ و ١ مل مــن محلول ميتاثنائي تروبنزول ٢٪ في الايتانول • بعد مرور ٥ــ٨ دقائق يبدأ اللون الاحمر بالظهور •

الكشف الكيفي عــن مشتقات الكورتيكوستيرون

لا يحتوي الكورتيكوستيرون على حلقة فينولية ولهــذا فهــو لا يعطي تفاعل الاسترون ، ولكنه غني بزمر الكيتو وزمر الاوكسو في جذره الجانبي حيث يمكن أن يقوم بتفاعلات ممبزة تستخدم لكشفه كيفيا •

كشف الكورتيزون (١٧ــ هدروكسي كورتيكوستيرون ــ١١ــ منقوص الهدروجين)

الادوات والمواد اللازمة

حمام مائي ؛ ماصة معايرة سعة ١ مل عــدد ٢ ، أنابيب اختبار ؛ محلول فينيل

هدرازين في حمض الكبريت (١ر٠ غ فينيل هدرازين تحل في ١٠٠ مل من مزيج مبرد لحمض الكبريت الكثيف والممدد بمقدار حجمه ماء ، يحضر المزيج قبل الاستعمال مباشرة) ، محضر جاهز من الكورتيزون ـ خلات ، غول ميتيلي كاشف فهلنغ ٠

التفاعل مع فينيل هدرازين حمض الكبريت

يحضر ١ ملغ من محضر كورتيزون ـ خلات في ١ مل من الميتانول ويضاف اليها ٥ مل من محلول فينيل هدرازين في حمض الكبريت ٠ يسخن على حمام مائي فيظهر بعد عدة دقائق لون أصفر ناجم عن تشكل فينيل هدرازون ثم الاوزازون على حساب الزمر الكربونيلية للكورتيزون ٠

التفاعل مع كاشف فهلنغ

يؤخذ ١٠ ملغ من محضر كورتيزون ـ خلات وتحل في ١ مل من الميتانول ويضاف اليها ١ مل من كاشف فهلنغ (مزيج فهلنغ I و II) ، يسخن على حمام مائي يغلي فيترسب راسب أحمر بني أو أحمر برتقالي من أكسيد النحاسي ٠

الكشف الكيفي للكورتيكوسترون ـ١١ـ منقوص الاكسجين

الادوات والمواد اللازمة

أنابيب اختبار ؛ ايتانول ٩٦٪ ، حمض الكبريت المركز ؛ محلول زيتي للكورتيكوسترون ـ١١ـ منقوص الاكسجين ـ خلات ٠

طريقة العمل

تؤخذ في انبوب اختبار قطرة من المحلول الزيتي للكورتيكوسترون ـ ١١ ـ منقوص الاكسجين ـ خلات وتضاف اليها ٣ـ٤ قطرات من الايتانول وأخرى من حمض الكبريت ٠ يسخن الانبوب حتى الغليان ثم يبرد ٠ تضاف بعد التبريد ١٥ قطرة من حمض الكبريت ويسخن من جديد فيظهر لون أزرق ذو فلورة حمراء ٠

الهرمونات ذات البنيات الاخرى

الكشف الكيفي عن التيروكسين

يمكن الكشف عن التيروكسين في محضر التيروئيدين الذي يستحصل من الغدة الدرقية المجففة والتي استخلصت منها الشحوم • يتم كشف التيروكسين بنزع يود الهدروجين منه بوساطة الحلمهة الحمضية وتحويل شوارد اليود الى جزيئات حرة يمكن استخلاصها بوساطة الكلوروفورم والذي يتلون بلون بنفسجي •

الادوات والمواد اللازمة

حمض الآزوت الكثيف ، يودات البوتاسيوم ١٪ ، كلوروفورم ، محضر التيروئيدين •

طريقة العمل

تؤخذ في انبوب اختبار نصف حبة من التيروئيدين و ١٠ قطرات من حمض الآزوت المركز وتجرى عليها الحلمهة (بحذر خوفا من التطايرات) وذلك بالتسخين لمدة ٢ دقيقة • بعد مرور الوقت تضاف ٢٠ قطرة من محلول يودات البوتاسيوم ١٪ ويخضخض الانبوب جيدا ثم يبرد •

تؤكسد يودات البوتاسيوم يود الهدروجين المتحرر عن الحلمهة الحمضية محولة إياه الى يود جزيئي :

$$5\,HI + KIO_3 + HNO_3 \rightarrow 3\,I_2 + KNO_3 + 3\,H_2O$$

يضاف في الانبوب ١ــ٢ مل من الكلوروفورم ويخضخض جيدا ويترك ليهدأ فتنفصل طبقة الكلوروفورم وتكون ملونة باللون البنفسجي •

الكشف الكيفي للادرينالين

تعتمد الطريقة على قياس شدة اللون الازرق بوساطة مقياس اللون يتشكل اللون الازرق عن تفاعل الادرينالين مع كاشف فولين •

الادوات والمواد اللازمة

مقياس اللون ، أنابيب مدرجة سعة ١٠ مل عدد ٢ ، ماصة معايرة سعة ١ مل عدد ٣ وسعة ٥ مل عدد ٢ ، حوجلة معايرة سعة ٢٥ مل ، محلول معياري للادرينالين (يحضر بأخذ ١ مل ادرينالين جاهزا في حوجلة معايرة سعة ٢٥ مل وتمديدها بالماء حتى العلامة) ، محلول كربونات الصوديوم ١٠٪ ، كاشف فولين (الكواشف) .

طريقة العمل

يؤخذ انبوبا اختبار مدرجان سعة ١٠ مل يصب في الانبوب الاول ١ مل من المحلول المعياري للادرينالين وفي الثاني ١ مل من المحلول المدروس . ويصب بعدها في كل من الانبوبين ٤ مل من محلول كربونات الصوديوم ١٠٪ المحضر حديثا ونصف مل من كاشف فولين . يخضخض الانبوبان فيبدأ اللون الازرق بالظهور تدريجيا ويصل الى حده الاعلى خلال ٥ دقائق . يمدد حجم المحلول في كل انبوب حتى ١٠ مل وذلك بوساطة محلول كربونات الصوديوم ١٠٪ . وبعد مزج محتويات كل انبوب تقاس شدة الامتصاص في المحلول المدروس وتقارن مع شدة امتصاص المحلول المعياري . تحسب كمية الادرينالين في المحلول المدروس من المعادلة :

$$C_1 = \frac{C \cdot E_1}{E}$$

حيث :

C — تركيز الادرينالين في المحلول المعياري .

C_1 — تركيز الادرينالين في المحلول المدروس .

E — شدة الامتصاص للمحلول المعياري .

E_1 — شدة الامتصاص للمحلول المدروس .

يجب عند الضرورة إجراء حسابات على المحلول المدروس كاملا ويتم التعبير عن تركيز الادرينالين بالوحدة الاكثر ملاءمة .

□ □ □

الفصل الحادي عشر

استخلاص بعض المركبات الحيوية ودراستها

استخلاص السكاكر وحلمهتها

الادوات والمواد اللازمة

كأس زجاجي سعة ١٠٠ و ٢٥٠ مل ، أرلينه سعة ١٠٠ مل و ٢٥٠ مل ، قمع ترشيح ، ماصة ، انابيب اختبار ، حامل انابيب ، ملقط انابيب ، شبكة ، دورق كروي سعة ٢٥٠ مل ، ماصة معيارية ١٠ مل عدد ٢ ، سحاحة ، مقياس مدرج ، أوراق التوت الجافة ، غول ايتيلي ٧٥٪ ، ايزوبروبانول ١٠٪ خميرة الخباز ، محلول السكروز ٢٠٪ ، محلول ثلاثي كلور حمض الخل (٥٪ و ١٠٪) ، رمل كوارتز ، ايتانول ، ايتر ايتيلي ، سكر كثير التعدد (غليكوجين أو نشاء) ، حمض كلور الماء المركز ، هدروكسيد الصوديوم (٥ مول/لترا) ، محلول اليود (يحل ١ غ يود و ٢ر٥ غ KI في ٢٠ مل ماء ، ثم يتمم حتى ١٠٠ مل) .

استخلاص السكاكر المنحلة من اوراق التوت

يوزن بدقة ١ غ من أوراق التوت المجففة والمطحونة . تسحق العينة في هاون بورسلان مع ١٠ مل غول ٧٥٪ لمدة ٣٠ دقيقة . يرشح الناتج على قمع بوشنر خلال ورقتي ترشيح . يغسل الراسب ثلاث مرات بـ ٢ مل ايتانول ٧٥٪ . يعاد الاستخلاص من جديد ثلاث مرات . يجمع الغول المستخلص ويجفف بعد تبخير

المحل بمجفف • يعلق الراسب الناتج بـ ٢ مـل ايزوبروبانول ١٠٪ ، ويثفل عنـد ١١٠٠٠ g مدة ٢٠ دقيقة لفصل اليخضور • ينقل السائل الطافي بحذر الى صحن تبخير ، ويغسل الراسب مرتين بـ ٢ مل ايزوبروبانول ١٠٪ ، ويثفل كل مرة • يجمع السائل الطافي والغسالة في المرتين ويبخر حتى الجفاف • يؤخـذ الراسب المتشكل للتحليل الكروماتوغرافي الكيفي والكمي بعد وزنه بدقة •

استخلاص الغليكوجين من الخميرة

الغليكوجين هو من أهم السكاكر المركبة الادخارية عند الاحياء كافة وبخاصة في العضلات والكبد ويوجـد كذلك في الخمائر • يتراكم الغليكوجين اذا نمت الخميرة في محلول سكري مركز •

يوجد الغليكوجين في أعضاء الجسم بشكلين : يرتبط الشكل الاول بثبات مع البروتينات ويصعب استخلاصه ، والشكل الثاني المرتبط مع البروتينات أقـل ثباتا ويمكن استخلاصه بسهولة بالماء الحار ومحلول ممدد لثلاثي كلور حمض الخل •

توجد طريقتان لفصل الغليكوجين : تعتمد الطريقة الاولى على معالجة النسيج الذي يـراد استخلاص الغليكوجين منـه بمحلـول ٣٠٪ هدروكسيد البوتاسيوم وبالتسخين على حمام مائي غال • تتحطم الانسجة عنـد المعالجة بمثل هذه الشروط القاسية التي تفكك معظم المواد ، ولكن الغليكوجين لا يتغير ويترسب عند اضافـة الغول الايتيلي ومن عيوب هذه الطريقة نقصان الوزن الجزيئي للغليكوجين •

تعتمد الطريقة الثانية على استخلاص الغليكوجـين بمحلول ٥٪ ثلاثي كلـور حمض الخل • يكون تأثير هذه الطريقة بشكل أقل في الوزن الجزيئي للغليكوجين ولكن من عيوبها صعوبة استخلاص الغليكوجين المرتبط مع البروتينات بشكل كامل

طريقـة العمـل

يخلط ١٠ غ خميرة (مغسولة جيدا من عصير المولاس) مع ٢٠٠ مل من محلول السكروز ٢٠٪ ويترك مدة ثلاث ساعات بالدرجـة ٢٥°س • يبـدأ تخمر شديد ويتوضع في هذه المرحلة الغليكوجين في خلايا الخميرة •

تفصل الخميرة بالتثفيل وتسحق بهاون (مبرد مسبقا لمدة عشر دقائق) مع ١٥مل

محلول ثلاثي كلور حمض الخل ١٠٪ المبرد الى الدرجة صفر سلسيوس وبوجود ٥ غ من رمل الكوارتز مدة ١٠ دقائق • يثفل المزيج مدة خمس دقائق عند ٣٠٠٠ g تصب الخلاصة الحمضية في دورق ذي قاعدة سعة ٢٠٠ مل وتحفظ بالدرجة صفر سلسيوس • يحمل الراسب الى هاون من البورسلان ويستخلص من جديد بـ ١٠ من محلول ثلاثي كلور حمض الخل ٥٪ والمبرد • تعاد هذه العملية ثلاث مرات • يمكن الاستعاضة عن التثفيل بالترشيح على قمع بوشنر • يجمع كل المحلول المستخلص في الدورق ذي القاعدة (يرشح في حال وجود أجزاء قاسية ويغسل الراسب مرتين بـ ٣ مل من محلول ثلاثي كلور حمض الخل) • تتصف الخلاصة ببريق عند النسبة العالية من الغليكوجين •

يضاف للمحلول المستخلص حجم مضاعف من الغول الايتيلي ويترك بالدرجة صفر لمدة ٣٠ دقيقة ، يفصل بعد ذلك راسب الغليكوجين بالتثفيل عند ٣٠٠٠ g مدة ٥ ــ ١٠ دقائق • يظهر السائل الطافي ويحل راسب الغليكوجين بأقل كمية من الماء الساخن ثم يضاف اليه حجم مضاعف من الغول الايتيلي ، يترك مدة ٣٠ دقيقة في الدرجة صفر س ويثفل بعد ذلك • يغسل راسب الغليكوجين مرتين بـ ٥ مل غول ٦٥٪ ، يحرك جيدا ويفصل كل مرة بالتثفيل • يغسل بعد ذلك الغليكوجين بـ ٥ مل غول ايتيلي ٩٦٪ ، وأخيرا بـ ١٠ مل ايتر ايتيلي • يجفف بالدرجة ٨٠° س ويوزن •

حلمهة السكاكر كثيرة التعدد ، حلمهة الغليكوجين

تحتوي السكاكر كثيرة التعدد على عدة مئات أو أكثر من بقايا السكاكر الاحادية • تعطي الحلمهة الحمضية مكونات من السكاكر الاحادية التي تكشف عنها بالطرق الكروماتوغرافية وبتفاعلات الكشف الملونة •

طريقة العمل

يوضع نحو ١٠ مل من الغليكوجين (أو النشاء أو أي سكر كثير التعدد) بأنبوب غلي مع ١٠ قطرات من حمض كلور الماء المركز ، ويغلى المزيج بلطف •

تؤخذ من حين لآخر قطرة واحدة من المحلول وتخلط مع قطرة واحدة من محلول اليود على بلاط البورسلان الابيض • ثم يؤخذ في أنبوب اختبار ثلاث قطرات من المحلول وتعدل بـ NaOH ثم يضاف ٥ مل من محلول بنديكت ، يسخن المزيج على حمام ماء غالٍ مدة ثلاث دقائق ثم يترك ليبرد • أعد العمل كل ٦ دقائق وفسر النتائج •

يعدل الباقي من المحلول بالقلوي بعد انتهاء الحلمهة ويحدد نوع السكر بأسرع وقت بالطرق الكروماتوغرافية وبتفاعلات الكشف الملونة •

طرق استخلاص الحموض الامينية

يبلغ عدد الحموض الامينية المفصولة من مختلف المصادر الطبيعية ٢٠٠ حمض أميني ، توجد بشكل مرتبط في البروتينات ، أو حرا في تركيب الاحياء والعضويات الدقيقة •

تستخلص الحموض الامينية حسب وجودها في الحالة الحرة أو المرتبطة • فالحموض الامينية الحرة تستخلص من المصادر الحيوية بمحلول ٧٥ ــ ٨٠٪ غولا ايتيليا أو ميتيليا ، تذهب بعض البروتينات الى الخلاصة الغولية عند الاستخلاص من المصادر النباتية • تترسب البروتينات إما بتغيير pH الوسط أو باضافة بعض الكواشف • يعد محلول ٥٪ ثلاثي كلور حمض الخل من أفضل الكواشف المرسبة للبروتينات الحيوية • ويأتي العيب في الطريقة السابقة بكيفية التخلص من ثلاثي كلور حمض الخل • وتستعمل كواشف أخرى لاستخلاص الحموض الامينية الحرة من المصادر الحيوية كالماء والاسيتون وحمض الخل الممدد •

تستخلص الحموض الامينية المرتبطة فقط بعد إجراء حلمهة البروتين ، بتسخين البروتين مع الحمض (محلول ٢٠٪ حمض كلور الماء أو محلول ٣٠٪ حمض الكبريت) أو مع القلوي (محلول ٥ نظامي هدروكسيد الصوديوم أو محلول ١٤٪ هدروكسيد الباريوم) أو بطريقة تحضين البروتينات مع انزيمات خاصة •

تكمن الصعوبة باختيار الطريقة المناسبة لاستخلاص حمض أميني معين من مزيج الحموض الامينية المرافقة له والموجودة في حاصل الحلمهة • استعملت قديما

لهذا الغرض عدة طرق لعـزل الحموض الامينيـة بعضها عن بعض (التقطير تحت الخلاء للاستر الايتيلي للحمـوض الامينية أو ترسيبها على شكل أملاح فضـة ، أو اختيار المحل العضوي المناسب) .

تستعمل في الوقت الحاضـر لفصل مزيـج معقد من الحموض الامينيـة الى مكوناته الطرق الكروماتوغرافية .

استخلاص الحموض الامينية من المصادر الحيوية

الادوات والمواد اللازمة

شرائق دودة القز المجففة بالهواء ، ورق ترشيح ، هاون بورسلان ، حمـام مائي ، ميزان حرارة ، قمـع زجاجي ، طبق تجفيـف ، قضيب زجاجـي ، أنابيب اختبار ، ماصة مدرجة سعة ١ مل ، محلول ٧٥٪ غولا ايتيليا ، محلول ١٪ حمض كلور الماء ، محلول ١٪ نينهيدرين في الاسيتون ٩٥٪ .

طريقـة العمـل

يوضع في هاون بورسلان ١ غ من مسحوق شرائق دودة القز الجافة ، ويضاف اليها ١٠ مل من محلول ٧٥٪ غولا ايتيليا ، يسخن المزيج على حمام مائي بالدرجة ٦٠ ــ ٧٠° س مدة ١٥ دقيقـة مع التحريك المستمـر . يرشح المستخلص الغولي خلال قمع زجاجي ، الى طبق تجفيف . يبخر الغول حتـى الجفاف بوضع الطبق على الحمام المائي . يحل الباقي الجاف في ١ مل مـن محلول ١٪ حمض كلور الماء وذلك بالحك بوساطة قضيب زجاجي لمدة ١٠ ــ ١٥ دقيقة .

يكشف عن الحموض الامينية في المحلول المستخلص بتفاعل النينهيدرين وذلك بوضع عدة قطرات من الخلاصة في أنبوب اختبار وتمديدها بالماء حتى الحجـم ٢ ــ ٣ مل ، ثم يضاف اليها ٣ ــ ٤ قطرات من محلول ١٪ نينهيدرينا في محلـول ٩٥٪ أسيتونا . يحرك المزيج مع التسخين على حمام مائي بالدرجة ٧٠° س لمـدة خمس دقائق. يظهر لون أزرق ــ بنفسجي واضح يؤكد وجود α ــ الحموض الامينية في الخلاصة .

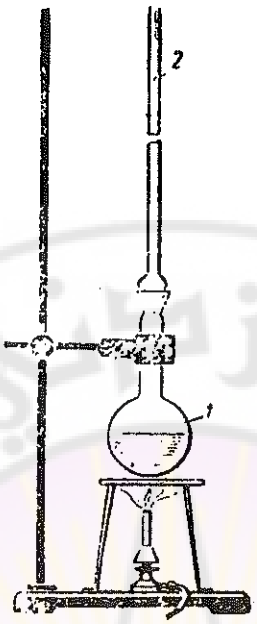
استخلاص التيروزين من الحرير

الادوات والمواد اللازمة

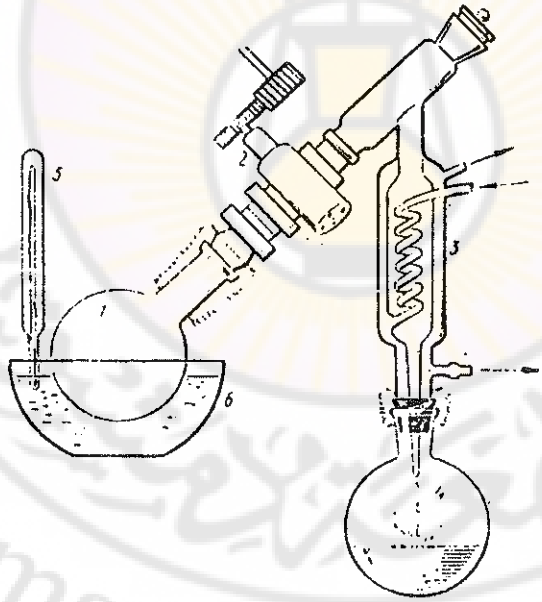
مبخر دوار ، مجهر ، حمام مائي ، مقص ، دورق كروي سعة ٢٠٠ مل ، مبرد هوائي مرتد (طول ٧٠ ــ ٨٠ سم) ، ميزان حرارة ، ورق ترشيح ، قمع زجاجي ، طبق تجفيف سعة ٥٠ مل ، زجاجة بونزن مع قمع بوشنر ، قمع ترشيح بالساخن ، حرير ، حمض كلور الماء ٢٠٪ ، كربون فعال .

طريقة العمل

تنظف شرانق دودة القز التي هي مصدر الحرير الطبيعي من بقايا الاوراق والشوائب . يوزن ٢٠ غراما من الشرانق وتقطع بالمقص الى قطع صغيرة ، وتوضع في دورق كروي سعة ٢٠٠ مل ، مجهز بمبرد مرتد طوله ٧٠ ــ ٨٠ سم . يرمى في الدورق عدة أنابيب شعرية . يصب في الدورق ١٠٠ مل من محلول ٢٠٪ حمض كلور الماء ، يوضع الدورق في حمام مائي لمدة ١ ــ ٢ ساعة ، يخضخض محتواه من حين لآخر لكي لا تبقى الاجزاء الصلبة من الحرير عالقة على جدران الدورق . يسحب الدورق من الحمام المائي عندما ينحل الحرير ، يجفف بالمنشفة ويوضع على شبكة ويغلى بشكل ضعيف مدة ١٦ ساعة (يمكن ذلك مع الانقطاع) لاتمام حلمهة البروتين شكل (١١ ــ ١) . يبرد حاصل الحلمهة ويرشح (اذا لوحظ راسب أسود غير منحل في الحمض) يغسل القمع مرتين بكمية صغيرة من الماء المقطر ، تجمع الرشاحة والغسالة في دورق كروي سعة ٢٠٠ مل ، وتبخر بالمبخر الدوار لطرد حمض كلور الماء شكل (١١ ــ ٢) . يجري التبخير حتى الجفاف بدرجة الحمام المائي ٤٥ ــ ٥٠° س . يعاد العمل عدة مرات (٥ ــ ٦ مرة) لطرد حمض كلور الماء بشكل كامل ، باضافة ٣٠ ميلي لترا ماء مقطرا والتبخير . يحل الباقي بـ ١٠ مل ماء مقطر مع التحريك والتسخين على حمام مائي مدة ١٠ ــ ١٥ دقيقة . يرشح المحلول الى طبق تبخير سعة ٥٠ مل . يعالج الراسب الباقي بالماء الساخن ويرشح (يعاد العمل مرتين) تجمع الرشاحات السابقة وتغلى ثلاث مرات مع الكربون الفعال لتصبح عديمة اللون ، يفصل الكربون كل مرة بالترشيح الساخن . يبخر المحلول على حمام مائي حتى ظهور طبقة رقيقة من البلورات تبرد وترشح .



شكل (١١ ــ ١) جهاز حلمهة :
١ ــ دورق كروي ، ٢ ــ مبرد هوائي .



شكل (١١ ــ ٢) مبخر دوار :
١ــ دورق تقطير كروي ، ٢ــ مركز لتدوير دورق التقطير ، ٣ــ مبرد ، ٤ــ دورق كروي قابلة ، ٥ ــ ميزان حرارة ، ٦ ــ حمام مائي .

إذا حصلنا على بلورات التيروزين بلون غامق ، تحل بكمية صغيرة من المـاء الساخن ويضاف اليها قليل من الكربـون الفعال ، يغلى المزيج مدة عشر دقائق • يفصل الكربون بوساطة الترشيح بالساخن • تبخر الرشاحة حتى ظهور طبقة رقيقة من البلورات تبرد جيدا وترشح وتجمـع بلورات التيروزين وتجفف بـين ورقتـي ترشيـح •

يرسم شكل بلورات التيروزين في دفتر العملي بعد رؤيتها في المجهر • يلاحـظ أن لها شكلا ابريا غالبا ما تتجمع مع بعضها بشكل حزم •

فصـل الببتيدات

يعد فصل الببتيدات بشكل حر من المركبات الطبيعية احدى المسائل الصعبـة في الكيمياء الحيوية • تستعمـل في الوقت الحاضـر طرق متعددة مثل الشبكة الجزيئية والكروماتوغرافيا والرحلان الكهربائي ، التي سمحت بفصل مزيج معقد من الببتيدات الطبيعية الى مكوناته بشكل نقي • استعملت بشكل فعال عند فصل الببتيدات طريقة الرحلان الكهربائي مع توتر عالٍ (حتى ١٠٠٠٠ فولت) ، وطريقة أكروماتوغرافيا التبادل الشاردي مثل داوكس ـ ٥٠ (Dowex-50) الذي هـو بولي ستيرول يحمل زمر السلفونيل ($-SO_3^-$) ..

وتعطي نتائـج جيدة طريقة الكروماتوغرافيا التوزعية عـلى الورق • توجد بالاضافة للطرق السابقة طـرق قديمة تعطي نتائـج جيدة لفصل بعض الببتيدات معتمدة على ترسيبها الانتقائي بشكل أملاح المعادن الثقيلة •

فصل الغلوتاتيون من الخميرة

الادوات والمواد اللازمة

مثفلة ، مبخر دوار ، ورق ترشيح ، خميرة الخباز ، هاون بورسلان ، قضبان زجاجية ، مقياس مدرج سعة ٥٠ مـل ، كأس سعة لتر ، أنابيب اختبار ، ماصات ٢ مل ، جهـاز للحصول علـى غـاز ثنائي أكسيد الكربون وكبريت الهدروجين ،

جفنات بورسلان ، مجفف يحتوي علـى حمض الكبريت ، مجفف يحتوي علـى هدروكسيد الصوديوم ، قمع بوشنر مـع دورق بونـزن ، حمض كبريت كثيف ؛ ايتر ، حمض كبريت ٥ر٠ نظاميا ، معلـق أكسيد النحاسي (I) ، غول ايتيلي (٧٠٪ ، ٩٠٪ ، ٩٦٪ ومطلقا) ، هدروكسيد الصوديوم ، غلوتاتيون ٠

طريقـة العمـل

يوضع في هاون بورسلان ١ كغ من خميرة الخباز المسحوقة ، يضاف اليهـا مزيج مكون من ٧٠ ميلي لترا غـولا ايتيليا ٩٠٪ و ١٠ مل حمض كبريت كثيف ٠ يحرك المزيج جيدا ثم يضاف اليه ٤٠ ميلي لترا من الايتر الايتيلي٠ يسحق الراسب في الهاون بلطف خلال عدة دقائق، يضاف بعد ذلك ٢٠٠ مل حمض كبريت ٥ر٠ نظاميا ٠ يحرك المزيج جيدا ثم ينقـل الى أنابيب مثفلة كبـيرة ٠ يثفل لفصل الراسب عن الرشاحة ٠ يصب السائل الطـافي في كأس سعة لتـر ، ويغسل الراسب الباقي في الانابيب بحمض الكبريت ٥ر٠ نظاميـا وتضاف الغسالة الـى الكأس ٠ تسـخن الرشاحة والغسالـة للدرجة ٥٠° س ٠ يرسـب الغلوتاتيون بشـكل ملح نحاسي باضافة معلق أكسيد النحاسـي (I) ٠ يحضر أكسيد النحاسي (I) مباشرة قبل الاستعمال وذلك بغلي الغلوكوز (كمية زائدة) مع كاشف فهلنغ ٠ يفصـل الراسب الاحمر عن الرشاحة بالاباتة ومن ثم الترشيح ، يغسل الراسب ويحضر منه معلق أكسيد النحاسي (I) بخلط ١ غ أكسـيد النحاسي (I) مع ٣٠ ميلي لترا ماء مقطرا ٠

يضاف المعلق بكميات صغـيرة (كل مرة ٢ مل) الى الكـأس مع التحريك بقضيب زجاجي ٠ تنحل الاجزاء الاولى المضافة من أكسيد النحاسي وبعد ذلـك يبدأ تشكل راسب حريري هو الملح النحاسي للغلوتاتيون ٠ ينحل الاخير بوجود كمية زائدة من أكسيـد النحاسي (I) ، لذلـك يتوجب تعيـين لحظة انتهاء الترسيب ٠ لتحقيق ذلك يبان السائل الطافي على سطح الراسب بعد اضافة ٨ مل من المعلق ، ثم تضاف من جديد الى السائل كمية جديدة مـن معلق أكسيد النحاسي (I) حتى ظهور اللون الاحمر ــ الارجواني الذي لا يختفي بعد وقت قصير من التحريك ٠ يترك ليهدأ خلال الليل ثم تبـان الرشاحة ٠ يجمع الراسب في المرتـين

ويثفل . يغسل عدة مرات بالماء المقطر المغلي حديثا .

يمكن تخريب الملح النحاسي للغلوتاتيون باشباع معلقة في ٣٠ ــ ٤٠ ميلي لترا ماء بكبريت الهدروجين . يتشكل راسب أسود من كبريت النحاس (II) يفصل بالنبذ ويغسل بالماء . يجمع السائل والغسالة ويطرد الماء بوساطة مبخر دوار بالدرجة ٢٥ ــ ٣٠° س . تبقى في دورق التقطير عدة ميلي لترات ، يحمل الباقي الى جفنة تبخير ومن ثم يوضع في مجفف تحت الخلاء يحتوي على حمض الكبريت . يترك ليجف ، أي حتى تشكيل راسب شفاف كالزجاج . يحل الراسب بـ ٥ ميلي لترا ماء ويمزج مع نصف حجمه بالغول ، تضاف كمية قليلة من الغول حتى تتشكل طبقة غولية على سطح المحلول . توضع جفنة التبخير في مجفف تحت الخلاء يحتوي على هدروكسيد الصوديوم ، بعد اضافة عدة بلورات غلوتاتيون . تتشكل بعد عدة ساعات بلورات ، تفصل بالترشيح على قمع بوشنر ، تغسل البلورات بالغول ٧٠٪ ومن ثم ٩٦٪ . وأخيرا بالغول المطلق . المردود ٥ر٠ ــ ٧٥ر٠غ غلوتاتيون .

الكشف عن وجود حمض الغلوتاميك والسيستئين والفليسين في تركيب الغلوتاتيون

الادوات والمواد اللازمة

فرن تجفيف ، حمام مائي ، مبرد ، مسطرة ، قلم رصاص عادي ، أنبوبة زجاجية سميكة الجدران (قطر ٥ر٠ ــ ٦ر٠سم) ، وعاء تبخير ، وعاء غسل ، أدوات وكواشف لتعيين الحموض الامينية بطريقة الكروماتوغرافيا التوزعية على الورق : غلوتاتيون ، حمض كلور الماء (٢٠٪ ــ ١٪) ، بوتانول ، حمض خل ، نينهيدرين ١٪ في الاسيتون ٩٥٪ .

طريقة العمل

يوضع نحو ١٠ مغ من بلورات الغلوتاتيون في أنبوبة زجاجية سميكة الجدران (قطر ٥ر٠ ــ ٦ر٠سم) . يضاف اليها ١ مل من محلول حمض كلور الماء ٢٠٪ . يجب أن تكون كل بلورات الغلوتاتيون منحلة في حمض كلور الماء . تلحم الانبوبة على اللهب وتوضع في فرن التجفيف لمدة ٢٤ ساعة بالدرجة ١٠٥° س

ز يمكن التسخين على فترات متقطعة) • تبرد الانبوبة ويصب محتواها في وعاء تجفيف • تغسل الانبوبة مرتين أو ثلاث مرات بالماء المقطر وتضاف الغسالة الى وعاء التجفيف • يبخر محتوى الوعاء حتى الجفاف على حمام مائي تحت ساحبة الهواء • يحل الباقي الجاف بـ ١ ــ ٢ مل ١٪ حمض كلور الماء • يحمل بوساطة ماصة صغيرة خاصة ٠٫٠٢ ــ ٠٫٠٥ مل من حاصل الحلمهة على ورقة الكروماتوغرافيا ثم توضع في وعاء فصل يحتوي على مزيج البوتانول ، حمض الخل ، ماء (١٥ : ٣ : ٧) خلال الليل تسحب الورقة الكروماتوغرافية بعد ذلك وتعلم الجبهة وتجفف • تبخ الورقة الكروماتوغرافية بالنينهيدرين وتجفف من جديد بالدرجة ٧٠° س لعدة دقائق • تحدد الحموض الامينية بحساب R_f لكل من السيستئين والغليسين وحمض الغلوتاميك التي تساوي في محلول الفصل المعطى على التوالي ٠٫٠٣ ، ٠٫١٣ ، ٠٫١٧ •

فصل البروتينات وتنقيتها

يدرس فصل البروتينات وتنقيتها (الاستخلاص ، التمليح ، الفصل بمساعدة الاغوال . الرحلان الشاردي ، الكروماتوغرافيا ، الترشيح الهلامي ، التحال ، البلورة) في الكتب النظرية ، وسيرد وصف لاغلب طرق الفصل الواردة ، في تجزئة البروتينات وتنقيتها • تنتشر بشكل واسع طرق فصل الرحلان الشاردي على هلام بولي أكريل أميد الصنعي ، التي وجدت مجالا جديدا في تطور الكيمياء الحيوية العملية •

فصل الفبرين (fibrin) من شرانق دودة القز

الادوات والمواد اللازمة

فرن تجفيف ، كؤوس سعة ١٠٠ مل ، أنابيب اختبار ، زجاجة ساعة ، قضبان زجاجية ، شرانق دودة القز ، مزيج كربونات ــ وثاني كربونات الصوديوم (التحضير موجود في النص) كمحلول واقٍ ، كبريتات النحاس ١٪ ؛ هدروكسيد الصوديوم ١٠٪ •

طريقـة العمـل

بنيت شرائق دودة القز بدون انقطاع من خيط طوله نحو ١ كم ، يشكل الجزء الداخلي للخيط بروتين الفبرين والخارجي بروتين السريسين الذي يلصق القسم الطويل من الخيوط بعضها ببعض الشـيء الذي يحفظ للشرائق شكلها • يختلف الفبرين عن السريسين بأن الاخـير ينحل جيدا في الماء وبخاصـة في محلول قلوي خفيف • لذلك يتم فصل الفبرين بسهولة بطريقة حل السريسين بالماء عند تسخين الشـرائق •

توزن شرنقة واحدة على ميزان تحليل (يجب فصل العروس عن الشرنقة أولا) وتوضع في كأس سعة ١٠٠ مل ويضاف اليها ٥٠ مل محلول واقي كربونات ـ وثاني كربونات الصوديوم (يتألف المحلول الواقي من مزيج متساوي الحجم مـن ٠٫٠٥ مول كربونات الصوديوم و ٠٫٠٥ مول ثاني كربونات الصوديوم) • يغلى محتوى الكأس مدة ٣٠ دقيقة • يؤخـذ قليل من السائل الـى أنبوب اختبار ويجرى عليه اختبار بيوريت (ص ١١٤) للكشف عن وجود بروتين السريسين • بيـان السـائل الباقي ويرمى • يغسل الفبرين بالماء المقطر الدافىء ثلاث مرات ، يوضع على زجاجة ساعة ويجفف في فرن تجفيف بالدرجة ٦٠° س • بعـد أن يبرد الفبرين يوزن على ميزان تحليل • يجب حساب نسبة وجود الفبرين والسريسين في غلاف الشرنقة •

استخلاص بلورات البومين البيض

الادوات والمواد اللازمة

مقاييس معايرة مع سدادة مسنفرة سـعة ٥٠ و ١٠٠ مل ، أقماع زجاجيـة ، قضبان زجاجية ،قمع بوشنر مع دورق بونزن ، كأس سعة ٥٠ ميلي لتراء ورق ترشيح، ورق عباد الشمس ، بيض طـازج حـديث عـدد ٢ ، محلول مشبع مـن كبريتات الامونيوم ، مسحوق كبريتات الامونيوم ، حمض خل ٤٪ •

طريقـة العمـل

تؤخذ بيضتان حديثتان يفصل بحذر البروتين عن الصفار ويوضع البروتين في مقياس معايرة سعة ١٠٠ مل ذي سدادة مسنفرة • يصب حجم مساو حضر مسبقا من

محلول كبريتات الامونيوم المشبع (يحضر بحل ٧٥٧ غ في لتر ماء مع التسخين اللطيف على حمام مائي) • يغلق بالسدادة ويخضخض جيدا •

تترسب الغلوبولينات في محلول نصف مشبع من كبريتات الامونيوم (راجع الكتب النظرية) وترشح •

تصب الرشاحة في مقياس معايرة ذي حجم أصغر • يضاف للرشاحة الصافية مسحوق ناعم من كبريتات الامونيوم بنسبة ١٣ر٥ غ لكل ١٠٠ مل محلول • يحرك المزيج جيدا بقضيب زجاجي حتى نحصل على انحلال كامل للبلورات • عند ذلك يكون تركيز محلول كبريتات الامونيوم ٧٠٪ وفي هذه النسبة يترسب الالبومين • يرشح الاخير على قمع بوشنر • ينقل الراسب بحذر الى كأس سعة ٥٠ مل ويحل بكمية صغيرة من الماء • يضاف الى المحلول الناتج مع التحريك قطرة فقطرة من محلول حمض الخل ٤٠٪ حتى يتغير لون ورق عباد الشمس • تكون قيمة pH المحلول ٧ر٤ ــ ٨ر٤ • نضيف الى المحلول على دفعات صغيرة مع التحريك المستمر محلول مشبع من كبريتات الامونيوم حتى بدء ظهور عكر لا يختفي • يغطى الكأس بزجاجة ساعة ويبرد في الثلاجة لليوم التالي • تترسب بلورات ابرية من ألبومين البيض •

فصل الالبومينات والغلوبولينات بطريقة التحال والتمليح

الادوات والمواد اللازمة

هاون بورسلان ، قمع زجاجي ، كأس سعة لتر ، كيس سلفان للتحال ، شاش، ورق ترشيح ، كلور الصوديوم ١٠٪ ، نترات الفضة ١٪ ، كبريتات الامونيوم ، هدروكسيد الصوديوم ١٠٪ ، كبريتات النحاس ١٪ ، محلول مشبع من كبريتات الامونيوم ، نسيج عضلي •

الالبومينات والغلوبولينات هي من البروتينات الاكثر انتشارا في الطبيعة • وتتقابل مع بعضها بعضا بشكل مزيج يمكن فصله بالاعتماد على اختلاف انحلالها بالماء أو اختلاف ترسبها بالاملاح المعدنية •

تنحل الالبومينات في الماء وفي محلول ملحي قوي (تترسب فقط بمحلول ملحي مشبع أكثر من ٥٠٪) ، وتنحل الغلوبولينات فقط في المحاليل الملحية متوسطة

التركيز (٨ ــ ١٥٪) • يتناقص انحــلال الغلوبولينات في المحاليل ذات التراكيز العالية والمنخفضة أكثر •

تحضير الخلاصة الملحية للبروتينات

يفرم ١٠ غ من نسيج عضلي (بوساطة مفرمة لحمة) ويوضع في هاون مــع ٥٠ مل محلول كلور الصوديوم ١٠٪ ويحرك لمدة ١٥ دقيقة• تتشكل كتلة متجانسة نصف سائلة ترشح خلال طبقتي شاش ، القطرات العكرة الاولى من الرشاحة يعاد صبها على المرشح ، يعاد الترشيح حتى الحصول على رشاحة دون أجزاء عالقة •

الناتج هو ١٥ ــ ٢٠ مل من محلول شفاف متلألىء بلــون أحمر ــ وردي • تحتوي الخلاصــة الملحية البروتينية عــلى الغلوبولينات والالبومينات التي تفصل بطريقــة التحال أو التمليح •

تنقية البروتينات بطريقة التحال

تعتمد طريقة التحال على أن جزيئات الضخمة ليس لها خاصة النفوذ من خلال الاغشية نصف النفوذة (أغشية السلفان ، الاغشية الحيوانية والنباتية الطبيعية) • بينما تمر خلالها بسهولــة الجزيئات الصغيرة والشوارد • تستعمل طريقــة التحال لتنقية محاليل المركبات عاليــة الوزن الجزيئي من الاملاح وغيرهــا مــن المركبات منخفضة الوزن الجزيئي •

تتحقق طريقة التحال بشكلها البسيط باستعمال كيس السلفان • يوضع الكيس في كأس يحتوي على الماء المقطر ، ويمكــن لتحقيق السرعة والتحال التام تغيير ماء الكأس بشكل دوري أو بامرار تيار مائي منتظم •

طريقــة العمل

تقص قطعة دائرية الشكل مــن السلفان قطرهــا ٩ ــ ١٢ سم ، وتثنى بشكل كيس • يوضع في فتحة الكيس انبوب زجاجي (طوله ٥ ــ ٦ سم وقطره ٥ر٠ ــ ٨ر٠ سم) • بحيث تظهر نهايتــه العلويــة بمسافة ٢ــ٣ سم عــن فتحة الكيس ؛ وتنغمس النهاية السفلية الى ثلث الكيس • يربط طرف الكيس مع الانبوب بشريط• يجب تعليق الكيس المملوء بالماء في كأس مملوء بالمــاء بحيث لا يمس قعر الكأس

وجدرانه • يشفط الماء الموجود في كيس السلفان قبل البدء بالعمل •

يصب ١٠ مل من الرشاحة الناتجة عن الخلاصة الملحية المراد تنقيتها من الاملاح بوساطة قمع مسحوب الطرف في كيس السلفان (بحيث لا تزيد الكمية المضافة عن نصف الكيس) • يوضع الكيس في كأس سعة لتر يحتوي على الماء المقطر • يؤخذ بعد ١٠ ـ ١٥ دقيقة بوساطة ماصة كمية قليلة من ماء الكأس ويكشف فيها عن وجود شوارد الكلور (التفاعل مع محلول نترات الفضة) واختفاء البروتينات (تفاعل بيوريت أو ميللون) • يطرح ماء الكأس اذا كان التفاعل مع شوارد الكلور واضحا • يغير ماء الكأس كل ٥ ـ ١٠ دقائق ومن وقت لآخر يكشف في ماء الكأس عن شوارد الكلور والبروتينات • يصبح تفاعل الكشف عن الكلور بعد ٥ر١ ـ ٢ ساعة سلبيا أو ضعيفا جدا ، مما يؤكد انتهاء التحال ؛ أي نفوذ الاملاح الكامل من الخلاصة الملحية الى الوسط الخارجي •

تكون الرشاحة الموجود في الكيس في البدء شفافة ، ثم تتعكر نتيجة ترسب الغلوبوليئات غير المنحلة في الماء المقطر • يسحب الكيس من الكأس ويرشح محتواه •

يحتوي الراسب على الغلوبولينات والرشاحة على الالبومينات • يجري تفاعل بيوريت على الراسب والرشاحة للتأكد من وجود البروتينات في كليهما •

يضاف لترسيب الالبومينات من الرشاحة مسحوق كبريتات الامونيوم حتى إشباع المحلول ، حيث تترسب في هذه الشروط الالبومينات التي ترشح وتفصل • تترسب البروتينات من الرشاحة عند إشباعها الكامل بكبريتات الامونيوم • يمكن تأكيد ذلك بأخذ كمية صغيرة من الرشاحة ويكشف فيها عن البروتينات بتفاعل بيوريت •

فصل الغلوبولينات عن الالبومينات في بروتينات العضلات بطريقة التمليح

يتحقق فصل البروتينات من الخلاصة الملحية بطريقة التمليح التي تعتمد على خاصة ترسب الالبومينات والغلوبولينات عند تراكيز ملحية مختلفة • يضاف الى الخلاصة الملحية الناتجة عن النسيج العضلي حجم مكافيء من محلول مشبع لكبريتات الامونيوم • تترسب في هذه الشروط الغلوبولينات ، يرشح المحلول وتشبع الرشاحة باضافة مسحوق كبريتات الامونيوم ، فتترسب الالبومينات •

كثافة المحاليل الحمضية القوية

التركيز وزناً	الكثافة عند ١٥° س / ٤° س	التركيز وزناً		الكثافة عند ٤° س / ١٥° س	التركيز وزناً			الكثافة عند ٤ س / ١٥° س
H_2SO_4		H_2SO_4	HNO_3		H_2SO_4	HNO_3	HCl	
68,51	1,60	39,19	47,49	1,30	0,09	9,10	0,16	1,00
69,43	1,61	40,35	49,07	1,31	1,57	1,90	2,14	1,01
70,32	1,62	41,50	50,71	1,32	3,03	3,70	4,13	1,02
71,16	1,63	42,66	52,37	1,33	4,49	5,50	6,15	1,03
71,99	1,64	43,74	54,07	1,34	5,96	7,26	9,16	1,04
72,82	1,65	44,82	55,79	1,35	7,37	9,99	10,17	1,05
73,64	1,66	45,88	57,57	1,36	8,77	10,68	12,18	1,06
74,51	1,67	46,94	59,39	1,37	10,19	12,33	14,17	1,07
75,42	1,68	48,00	61,27	1,38	11,60	13,95	16,15	1,08
76,30	1,69	49,06	63,23	1,39	12,99	15,53	18,11	1,09
77,17	1,70	50,11	65,30	1,40	14,35	17,11	20,01	1,10
78,04	1,71	51,15	67,50	1,41	15,71	18,67	21,92	1,11
78,92	1,72	52,15	69,80	1,42	17,01	20,23	23,82	1,12
79,80	1,73	53,11	72,17	1,43	18,31	21,77	25,75	1,13
80,68	1,74	54,07	74,68	1,44	19,61	23,31	27,66	1,14
81,56	1,75	55,03	77,28	1,45	20,91	24,81	29,57	1,15
82,44	1,76	55,97	79,98	1,46	22,19	26,36	31,52	1,16
83,51	1,77	56,90	82,90	1,47	23,47	27,80	33,46	1,17
84,50	1,78	57,83	86,05	1,48	24,76	29,38	35,39	1,18
85,70	1,79	58,74	89,60	1,49	26,01	30,88	37,23	1,19
86,92	1,80	59,70	94,09	1,50	27,32	32,36	39,11	1,20
88,30	1,81	60,65	98,10	1,51	28,58	33,82		1,21
90,05	1,82	61,59	99,67	1,52	29,84	35,28		1,22

الكثافة عند ١٥° س / ٤° س	التركيز وزناً			الكثافة عند ١٥° س / ٤° س	التركيز وزناً		الكثافة عند ١٥° س / ٤° س	التركيز وزناً
	HCl	HNO_3	H_2SO_4		HNO_3	H_2SO_4		H_2SO_4
1,23		36,78	31,11	1,53		62,53	1,83	92,10
1,24		38,29	32,28	1,54		63,43	1,84	95,60
1,25		39,82	33,43	1,55		64,26	1,841	96,38
1,26		41,34	34,57	1,56		65,08	1,8415	97,70
1,27		42,87	35,71	1,57		65,90	1,8400	99,20
1,28		44,11	36,87	1,58		66,71	1,839	99,70
1,29		45,95	38,03	1,59		67,59		

يلزم أحياناً معرفة عدد غرامات الحمض في لتر واحد محلول • تحسب هذه القيمة بسهولة بالعلاقة

$$\frac{1000.d.P}{100}$$

d ـ الكثافة ، P ـ النسبة وزناً •

يمكن حسب هذه العلاقة حساب نظامية المحلول الحمضي ، بقسمة القيمة الناتجة على المكافىء الغرامي للحمض (ε) :

$$\frac{1000.d.P}{100\ \varepsilon}$$

الكواشف

١ . الفحم الفعال

يغلى الفحم الفعال مع محلول حمض كلور الماء ٢ نظاميا لمدة ٢ ــ ٣ ساعة في دورق مجهز بمبرد مرتد يبرد المزيج بعد ذلك ويرشح على قمع بوشنر . يحمل الراسب الى دورق وتضاف اليه كمية جديدة من حمض كلور الماء وتعاد المعالجة بشكل مشابه ثلاث مرات . يغسل الراسب بالماء المقطر حتى التعادل . ومن ثم بمحلول النشادر الغولي ١٪ . يغسل بالماء المقطر حتى التعادل ثم يجفف بالدرجة ١٠٥° س . يحفظ الفحم الفعال في زجاجة ذات سدادة مسنفرة .

٢ . داوكس المهبطي ١ ، ٢ بشكل — Cl

يوضع المحضر في كأس ويضاف اليه محلول كلور الصوديوم ٥٪ ويترك خلال الليل للانتفاخ . يغسل لعدة مرات بمحلول حمض كلور الماء ٢ نظاميا لكي يتحرر الراتنج من شوارد الحديد والمركبات التي تمتصها الاشعة فوق البنفسجية . يغسل الراتنج بالماء المقطر بعد الحصول على التفاعل السلبي عند الكشف عن الحديد . يغسل بعد ذلك بمحلول هدروكسيد الصوديوم ١ نظاميا ، ومن جديد بالماء وبعد ذلك بمحلول حمض كلور الماء ٢ نظاميا . تعاد هذه العملية لمرات كثيرة . يعالج الراتنج في النهاية بمحلول حمض كلور الماء ٢ نظاميا ومن ثم بالماء المقطر حتى التعادل واختفاء شوارد الكلور (التفاعل مع $AgNO_3$) من محلول الغسل . يصبح الراتنج بعد هذه المعالجة صالحا للاستعمال .

٣ . خلات المغنزيوم (في الايتانول ٩٥٪)

يحل ١٫٦١ غ خلات الصوديوم في ١٠٠ مل ايتانول ٩٥٪ وتضاف اليها عدة بلورات من اليود الصلب . يحتوي ١ مل من المحلول بعد التحريك على ٣ ملغ من أكسيد المغنزيوم . يمكن تحضير خلات المغنزيوم بحل اكسيد المغنزيوم في محلول حمض الخل ثم بلورة الملح المتشكل .

٤ . مظهر البنزيدين

يحل ٥ر٠ غ بنزيدينا أساسيا في ٨٠ مل ايتانولا ، يضاف الى المحلول ١٠ مل محلول ثلاثي كلور حمض الخل ٤٠٪ و ١٠ مل حمض خل ثلجي .

٥ . القطن المغسول والماص للرطوبة

يغسل القطن لمدة ١٥ ــ ٢٠ دقيقة بالماء المقطر ثم يرشح مباشرة على القمع ويغسل بالماء المقطر الساخن حتى يصبح تفاعل كشف السكاكر بمحلول فهلنغ في ماء الغسل سلبيا . يجفف بعدها القطن ويحفظ في وعاء محكم الاغلاق .

٦ . حمض الفليوكسيليك

يرطب بشكل خفيف ٢ غ من مسحوق المغنزيوم . يبرد ٥٠ مل محلول حمض الحماض المشبع حتى الدرجة صفر سلسيوس ، ويضاف فوق مسحوق المغنزيوم . يرشح الراسب المتشكل من حماضات المغنزيوم ويغسل بكمية من الماء . تحمض الرشاحة بحمض الخل ويتمم حجمها بالماء حتى ٢٠٠ مل ، يحفظ المحلول في الثلاجة.

٧ . كاشف ديآزو

يحضر محلولان : A ــ يحل ٩ر٠ غ من حمض السلفانيليك في ٩ مل حمض كلور الماء المركز ويمدد الحجم الى ١٠٠ مل . B ــ محلول نتريت الصوديوم ٥٪ ومباشرة قبل العمل يمزج ١ر٥ مل من المحلول ــ A مع ١ر٥ من المحلول ــ B المبردين جيدا . وبعد ٥ دقائق تضاف مع خض الوعاء ٦ مل من المحلول ــ B ثم وبعد دقيقة اخرى كمية من الماء حتى يصل الحجم الكلي الى ٥٠٠ مل . اذا حفظ المحلول مبردا بشكل جيد فانه يصلح للاستعمال لمدة ٢٤ ساعة .

٨ . كاشف ٢،٤ ــ ثنائي نتروفنيل هدرازين (١ر٠٪)

يضاف الى ١٠٠ ملغ من ٢،٤ــ ثنائي نترو فنيل هدرازين وبالتدريج ١٠٠ مل من حمض كلور الماء الممدد بنسبة ١ : ٤ ، حتى تمام الانحلال . يرشح المحلول ويحفظ في البراد .

٩ ٠ الكازئين (لتحديد نقطة التعادل الكهربائي)

ينقل ما يعادل لترا من الحليب وتطرح القشدة ثم يضاف الى الحليب المسحوب الناتج وعلى شكل قطرات مع التحريك المتواصل لمدة ٣٠ دقيقة ، نحو ١٠٠ مل من محلول حمض كلور الماء ٥ر٠ نظاميا حتى يصبح pH الوسط = ٤ر٨ ٠ يستمر بتحريك المزيج لمدة ١٥ دقيقة اخرى ويترك ليهدأ مدة ساعة ٠ يزاح السائل السطحي بالابانة ثم يرشح الراسب على قمع بوشنر ويغسل على القمع بالماء المقطر ٠ تجمع ورقة الترشيح من قمع بوشنر مع الراسب وتلف بورقة ترشيح اخرى وتعالج بالايتر على جهاز سوكسيليه لاستخلاص الشحوم منه ٠ يفرش الكازئين الناتج على شكل طبقة رقيقة على صفيحة زجاجية ويترك تحت ساحبة الهواء عدة ساعات ليتبخر الايتر ٠

١٠ ٠ الهلام الفسفاتي ـ الكلسيومي

يمزج ١٥٠ مل من محلول كلور الكلسيوم (الحاوي ١٣٢ ملغ $Ca\ Cl_2\ .\ 6\ H_2O$ في ١ مل) مع ١٤٥٠ مل من الماء المقطر ٠ ثم يضاف مع التحريك الشديد ١٥٠ مل من محلول فسفات الصوديوم (يحتوي على ١٥٢ ملغ $Na_3PO_4\ .\ 12\ H_2O$ في ١ مل) تعدل درجة الحموضة حتى pH = ٧ر٤ بوساطة محلول حمض الخل ٠ ينقل المحلول الناتج الى وعاء سعة ١٥ ـ ٢٠ لترا ويضاف اليه ١٠ لترات من الماء المقطر مع التحريك حتى الحصول على معلق متجانس ويترك ليهدأ ٠ يفصل السائل الشفاف بالابانة ويغسل الراسب ثلاث مرات اخرى بالماء ٠ يثفل الراسب بعد الغسل لمدة ٥ ـ ٧ دقائق بسرعة ١٠٠٠ g ٠ ترمى الرشاحة ويضاف الى الراسب عدة حجوم من الماء ويخلط جيدا ثم ينقل الى وعاء معتم ويحفظ في البراد ٠ بعد عدة أيام ترمى الرشاحة من فوق الراسب حيث يصبح الهلام في هذه الحالة جاهزا للاستخدام ويمكن حفظه في البراد في وعاء معتم ٠

١١ ـ داوكس المصعدي ـ ٥٠ بشكل H^+

يعالج الراتنج بشكل مشابه كما في داوكس المهبطي ٠

١٢ . كوبالت نتريت الصوديوم

يحضر محلولان : A — يحل ٢٥ غ من نترات الكوبالت في ١٢٫٥ مل حمض الخل الثلجي و ٥٠ مل ماء مقطرا . B — يحل ١٢٠ غ من نتريت الصوديوم في ١٨٠ مل ماء مقطرا . ينقل المحلول A الى زجاجة دركسل ويصب فوقها ٢١٠ مل من المحلول B ثم يمزج جيدا . يوصل الوعاء الى مخلية هواء مائية ويفتح الهواء عبر المحلول بوساطة المخلية وحتى زوال رائحة أكاسيد الآزوت ، حيث يصبح المحلول أثناء ذلك شفافا وعديم اللون . يجب ضخ الهواء عدة أيام ولمدة عدة ساعات يوميا . يحفظ الكاشف في مكان بارد ومظلم . يضخ الهواء عبر الكاشف مرة أخرى قبل الاستخدام ثم ترشح الكمية اللازمة للاستخدام منه . يصلح الكاشف المحفوظ للاستخدام لمدة شهر واحد .

١٣ . مشعر النشاء

يحل ١ غ من النشاء المنحل في ١٠ مل ماء مقطر مبرد ثم يضاف اليه تدريجيا ٩٠ مل من محلول مشبع لكلور الصوديوم المغلي . يسخن حتى الغليان ثم يبرد .

١٤ . المزيج المغنزيومي

يحل ١٠٠ غ من كلور المغنزيوم و ٢٠٠ غ من كلور الامونيوم و ٢٠ مل من محلول النشادر المركز في الماء ويمدد الحجم الى لتر واحد .

١٥ . احادي بروم حمض الخل

(محلول ٠٫٠٢٥٪ معدل بوساطة هدروكسيد البوتاسيوم) . يوضع ١٢٫٥ مل من حمض الخل الثلجي في دورق كروي القعر سعة ٢٠٠ — ٣٠٠ مل مجهز بمبرد مرتد وقمع تقطير ويضاف اليها ٠٫٧٥ غ من زهر الكبريت و ٢ — ٣ قطع خزفية مسامية . يسخن الدورق على حمام زيتي في الدرجة ١٣٠ — ١٤٠° س عندما يبدأ حمض الخل بالغليان يضاف على شكل قطرات ١١٫٥ مل من البروم الجاف . (يتم الحصول على البروم الجاف بخضخضة ١٥ — ٢٠ مل من البروم ما بين ٢ — ٣ مرات في قمع الفصل مع ٥ — ٧ مل حمض الكبريت المركز مع فصل طبقة البروم في كل مرة) . يستمر بالتسخين بعض الوقت للتخلص من زيادة البروم ثم يقطر

محتوى الدورق تحت الضغط المنخفض وتجمع النواتج المتقطرة في الدرجة ١١٧ — ١١٨°س تحت ضغط يعادل ١٥ ميلي مترا زئبقا • يحفظ أحادي بروم حمض الخل في وعاء محكم الاغلاق وذلك لانه قليل الثبات وهو شره جدا للماء ويؤذي البشرة بشـــدة •

١٦ • عجينة النسيج العضلي

تفتت عضلات حيوان مذبوح حديثا بعد التبريد بوساطة السكين أو بآلة تقطيع اللحم • ويجب أن يتم التحضير قبل الاستخدام مباشرة •

١٧ • محلول كلور الانتموان III المشبع في الكلوروفورم

يغسل مركب ثلاثي كلور الانتموان بوجبات صغيرة من الكلوروفورم النقـي على ورقة ترشيح في قمع زجاجي حتى تصبح المغسالة الناتجة عديمة اللون ثم يحل كلور الانتموان المغسول في الكلوروفورم النقي الى درجة الاشباع •

١٨ • كاشف النفتوريزورسين

يحـــل ٢ر٠ غ من النفتوريزورسين في ١٠٠ مل من الايتانول • يحضـــر محلول مائي من ثلاثي كلور حمـــض الخل (٢٠٪) • وقبـــل الاستعمال مباشرة يمزج حجمان متساويان من المحلولين السابقين •

١٩ • أكسيد الالمنيوم

(من أجل كروماتوغرافيا العمود) • يلدّن أكسيد الالمنيوم في جفنة خزفية لمدة ٥ر١ — ٢ ساعـــة •

٢٠ • كاشف الاورسين

يحل ٢ر٠غ من الاورسين في ١٠٠ مل من حمض كلور الماء ٣٠٪ ويضاف اليها ١ر٠غ من ثلاثي كلور الحديد • يحفظ المحلول في زجاجة معتمة •

٢١ • حمض البيروفيك

يسحق في هاون ١٢٠غ من هدرو كبريتات البوتاسيوم $KHSO_4$ مع ٨٠ غ من

حمض ثنائي هدروكسي حمض الكهرباء و ٤٠ غ من رمل الكوارتز المغسول جيدا بحمض كلور الماء المقطر والملدّن ٠ وبعد السحق الجيد ينقل المزيج الى دورق دائري القعر سعة ٧٥٠ مل ٠ يجهز الدورق بمبرد مرتد ويسخن على حمام زيتي في الدرجة ٢١٠ ــ ٢٢٠° س حتى يتوقف تقطر السائل ٠ يمكن للكتلة المتفاعلة أن تعطي رغوة وهنا ينصح بتسخين القسم العلوي من الدورق على اللهب مباشرة دون السماح لحرارة الحمام الزيتي أن تزيد عن ٢٢٠° س ٠ يقطر الناتج تحت الفراغ وتجمع العينة التي تتقطر بين ٥٠ ــ ٧٠°س في ضغط يساوي ١٢ ميلي مترا زئبقا ٠ عند إعادة التقطير تجمع العينة المتقطرة في الدرجة ٦٢° س (الضغط ١٢ مم عمودا زئبقا) أو المتقطرة في الدرجة ٧٥ ــ ٨٠° س (الضغط ٢٥ مم عمودا زئبقا) ٠ المردود ٢٨ ــ ٣٠غ ٠

يمكن لحمض البيروفيك أن يتفكك بسهولة ولهذا فمن الافضل حفظه على شكل ملح صوديومي ولهذا الغرض يحل الحمض المتشكل بوساطة محلول غولي من هدروكسيد الصوديوم (حجم واحد من محلول $NaOH$ المشبع في ١٠ حجوم إيتانول) ٠ تبدأ بلورات بيروفات الصوديوم مباشرة بالتشكل حيث ترشح على قمع بوشنر وتغسل بالايتانول ثم بالايتر وتجفف بمجفف زجاجي ٠ المردود ٨٥٪ ٠

٢٢ ٠ كاشف معايرة الغلوكوز بالطريقة الانزيمية

يضاف الى ٧٠ ــ ٨٠ مل من محلول الخلات الواقي ٢٥ر٠ نظاميا ($pH =$ ٨ر٤)، ٢ ملغ مستحضر الغلوكوز أوكسيداز و ١ ملغ من بلورات البيروكسيداز الجاف ٠ وبعد المزج الجيد يضاف الى المزيج ١ مل محلول اورتوتوليدين ١٪ ويمدد الحجم الى ١٠٠ مل بوساطة محلول الخلات الواقي ٠ يحضر الكاشف قبل ١ ــ ٢ ساعة من الاستخدام ٠ ويمكن حفظه في البراد في وعاء معتم ومحكم الاغلاق لمدة ١ ــ ٥ر١ شهرا ٠

٢٣ ٠ محلول هيبوبروميت الصوديوم

يحل بالتبريد ١ غراما من البروم في ٥٠ مل من محلول هدروكسيد الصوديوم ٥٪ ٠ يصلح هذا المحلول للاستعمال لمدة أسبوعين اذا حفظ في الثلاجة ٠

٢٤ . محلول ثنائي فنيل امين

تتم بلورة ١غ ثنائي فنيل أمين مرتين من المحلول الغولي ٧٠٪ أو من محلوله في ايتر البترول . ثم يحل في مزيج مكون من ٢٫٧٥ مل حمض الكبريت الكثيف و ١٠٠ مل حمض الخل الثلجي .

٢٥ . ٦،٢ـ ثنائي كلورين دوفينول (محلول ٠٫٠٠١ نظاميا)

يوزن في علبة ١٣٠ ملغ من الكاشف ثم ينقل بوساطة قمع الى دورق معايرة سعة ٥٠٠ مل مع غسل بقايا الكاشف من القمع والعلبة بوساطة الماء المقطر . تضاف ١٠ قطرات من محلول هدروكسيد الصوديوم ٠٫١ نظاميا ثم الماء حتى يمتلىء نحو نصف الدورق . يحرك المحلول جيدا حتى تمام انحلال ٦،٢ ـ ثنائي كلورين دوفينول ثم يمدد الحجم حتى العلامة ٥٠٠ مل بالماء المقطر . وبعد التحريك عدة مرات يرشح المحلول الناتج الى وعاء جاف معتم . يبقى المحلول ثابتا لمدة ثلاثة أيام .

٢٦ . محلول كشف الحموض الدسمة على الكروماتوغرام

يحل ٥٠ ملغ من أزرق بروم الفينول و ٢٠٠ ملغ من حمض الليمون في ١٠٠ مل ماء مقطر .

٢٧ . محلول اليود في يود البوتاسيوم (محلول لوغال)

يحل ١ غ من اليود و ٢٫٥ غ من يود البوتاسيوم في ٢٠ مل ماء وعند تمام الانحلال يمدد الحجم حتى ١٠٠ مل .

٢٨ . محلول يود الزئبق في يود البوتاسيوم

يحل ٥غ من يود البوتاسيوم في الماء المقطر ويشبع المحلول الناتج بوساطة ١٢غ من يود الزئبق ويمدد الحجم النهائي الى ١٠٠ مل .

٢٩ . محلول يودات البوتاسيوم (٠٫٠٠١ نظامي)

يوزن في علبة ٠٫٣٥٦٨ غ من يودات البوتاسيوم وتحل في حوجلة معايرة

سعة ١ لترا فيتشكل محلول ٠٫١ نظاميا يمدد المحلول حسب الحاجة بالماء المقطر عشرة أضعافه ليتشكل محلول ٠٫٠٠١ نظاميا ٠

٣٠ ٠ محلول موليبدات الامونيوم في حمض الآزوت

يمزج محلول موليبدات الامونيوم ١٥٪ مع حمض الآزوت المركز بنسبة ١١٠ : ٩٠ ٠

٣١ ٠ محلول موليبدات الامونيوم ٢٫٥٪ في حمض الكبريت ٥ نظاميا

يحل في حوجلة معايرة ٢٥غ من موليبدات الامونيوم في ٤٥٠ مل ماء مقطرا وبعد الانحلال يمدد الحجم حتى ٥٠٠ مل ٠ ثم وفي حوجلة معايرة سعة ١ لترا يمزج ١٣٩ مل من حمض الكبريت الكثيف (كثافته ١٨٫٤) مع ٣٥٠ مل ماء ٠ وبعد التبريد يصب في الحوجلة محلول موليبدات الامونيوم المحضر ثم يمزج بشكل جيد وبعد التبريد يمدد الحجم بالماء حتى اللتر ٠

٣٢ ٠ محلول الفلوروغلوسين

يحل ٠٫٢غ من الفلوروغلوسين في ١٠٠ مل من محلول حمض كلور الماء ٠٫٣٪ ٠

٣٣ ٠ محلول الفوكسين الحامضي (فوكسين حمض الكبريت)

يحل ١غ من الفوكسين الاساسي (القلوي) في ٢٠٠ مل ماء مقطر مع الغليان والتحريك لمدة ٥ دقائق ٠ ثم يبرد الى الدرجة ٥٠° س يرشح المحلول ويضاف الى الرشاحة ٢٠ مل من محلول حمض كلور الماء ١ نظاميا ٠ يبرد حتى الدرجة ٢٥° س ويضاف ١غ من ميتا ثاني كبريتيت الصوديوم (أو البوتاسيوم) يترك المحلول في مكان مظلم لمدة ١٤ ــ ٢٤ ساعة ثم يضاف ٢غ من الفحم الفعال ويخض المزيج لمدة دقيقة ثم يرشح ٠ يحفظ المحلول الناتج في مكان مظلم بالدرجة ٠ ــ ٤° س ٠ وقبل الاستعمال يدفأ المحلول حتى درجة حرارة الغرفة ٠

٣٤ ٠ محلول الايكونوجين

يحل ٠٫٢٥غ من الايكونوجين و ١٥ غ من ميتا ثاني كبريتيت الصوديوم و

٥ر٥ غ من كبريتيت الصوديوم اللامائية في ١٠٠ مل ماء مقطر ساخن • وبعد الانحلال التام يرشح المحلول ويحفظ في وعاء معتم • من الضروري قبل الاستعمال تمديد حجم المحلول ٥ مرات بالماء المقطر •

٣٥ • كاشف بارفويد

يحل ١٣٫٣ غ من خلات النحاس في ٢٠٠ مل ماء ساخن • يرشح ويضاف الى الرشاحة ١٫٩ مل من حمض الخل الثلجي •

٣٦ • كاشف ميللون

تحل بالبرودة كمية من الزئبق مع ضعفها من حمض الآزوت (الكثافة ١٫٤٠) ومن ثم بالتسخين على حمام مائي • يمدد المحلول الناتج بضعفي حجمه بالماء •

٣٧ • كاشف نادي

تمزج كميات متساوية من محلول غولي لـ a ــ النفتول ١٪ ومحلول ثنائي ميتيل بارافينيلين ثنائي الامين ١٪ ومحلول كربونات الصوديوم ١٫٥٪ • يمكن لهذا المحلول أن يتغير أثناء الحفظ ولهذا يحضر قبل الاستخدام مباشرة •

٣٨ • كاشف نسلر

يحل ٥٠ غ من يود البوتاسيوم في ٥٠ مل ماء ويضاف اليه محلول مركز وساخن من كلور الزئبق حتى يتوقف انحلال الراسب الناتج عن متابعة إضافة المحاليل • يضاف بعدها محلول هدروكسيد البوتاسيوم (١٨٠ غ KOH في ٣٠٠ مل ماء) ، ويمدد الحجم حتى اللتر ثم يضاف اليه مجددا ٥ مل من محلول كلور الزئبق • يترك المزيج ليهدأ ثم يعزل المحلول الشفاف عن الراسب حيث يحفظ المحلول K_2HgI_4 في وعاء معتم •

٣٩ • كاشف نيلاندز

يحل ٢ غ من نترات البزموت الاساسي (القلوي) و ٤ غ من طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم وذلك بالتسخين على حمام مائي يغلي في ١٠٠ مل محلول هدروكسيد الصوديوم ١٠٪ يبرد ثم يرشح ويرمى الراسب المتبقي •

٤٠ . **كاشف سيليفانوف**

يحل ٠٥ر٠غ من الريزورسين في ١٠٠ مل من حمض كلور الماء الممدد بنسبة ١ : ١ .

٤١ . **كاشف فولين**

يحل ١٠٠غ من $Na_2WO_4 . 2 H_2O$ و ٢٥ غ $Na_2MoO_4 . 2H_2O$ في ٧٠٠ مل ماء في دورق كروي سعة لتر مجهز بمبرد ليبغ . يضاف الى الدورق ٥٠ مل من محلول حمض الفسفور ٨٥٪ و ١٠٠ مل من حمض كلور الماء المركز ، ويرمى عدة أنابيب شعرية . يغلى المزيج في الدورق المجهز بالمبرد المرتد مدة ١٠ ساعات . يضاف بعد ذلك ١٥٠غ من كبريتات الليتيوم و ٥٠ مل ماء وعدة قطرات بروم . يغلى محتوى الدورق بدون استعمال المبرد المرتد مدة ١٥ دقيقة لطرد الزيادة من البروم (تحت ساحبة الهواء) . يبرد المزيج ويتمم الحجم حتى اللتر بالماء ويرشح خلال مرشح زجاجي . يحفظ الكاشف في زجاجة عاتمة .

يجب أن تكون كل الكواشف المستعملة لتحضير كاشف فولين نقية . ويجب أن يكون لون الكاشف بكل مراحل التحضير أصفر . يجب تنقية الكواشف المستعملة إذا ظهر لون أخضر . ينصح بتقطير حمض كلور الماء مسبقا وإشباعه بكلور الهدروجين حتى الكثافة ١٨ر١ ، للتخلص من الشوارد الموجبة الموجودة في حمض كلور الماء .

يعاير كاشف فولين بمحلول قلوي ١ نظاميا وعلى أساس المعطيات الناتجة تحسب حموضة هذا الكاشف ، وقبل استعمال هذا الكاشف يتمم الحجم بالماء حتى الحموضة التي توافق محلول حمض كلور الماء ١ نظامي .

٤٢ . **كاشف ارليخ**

يحل ١٠غ من مركب N ، N — ثنائي ميتيل — P — امينوبنز الدهيد في ٥ر١٢ مل من محلول حمض الكبريت ١٠ نظامي ثم يضاف ٥ر٨٧ مل من حمض الخل الثلجي . وقبل الاستخدام يمدد الكاشف الى عشرة أضعاف حجمه بحمض الخل الثلجي .

٤٣ . محلول بروم تيوسيانيد

يؤخذ في حوجلة ١٠ مل من محلول تيوسيانات البوتاسيوم ١ر٠ نظاميا أو تيوسيانات الامونيوم ويضاف اليها ١ غ من بروم البوتاسيوم و ١ مل من محلول حمض كلور الماء ١٧٪ ثم وبحذر شديد (تحت ساحبة الهواء) يضاف ٢ مل بروما . يستخدم المحلول مباشرة بعد التحضير .

٤٤ . مزيج المشعرات

المحلول الاساسي . يمزج ١٠٠ مل من محلول أحمر الميتين ١ر٠٪ في الغول مع ٢٥ مل محلولا أزرق الميتيلين ١ر٠٪ في الغول . يحفظ المحلول في زجاجة قاتمة .

محلول العمل : يمزج حجم من المحلول الاساسي مع حجم غول وحجمين من الماء .

٤٥ . محلول هدروكسيد البوتاسيوم الغولي (٥ر٠ نظاميا)

تضاف الى الغول الايتيلي قطرات من محلول برمنغنات البوتاسيوم المشبع حتى زوال لون النقطة المضافة ببطء . ثم يقطر الايتانول بوجود كربونات الكلسيوم التي تمتص الحموض . ترمى الكمية المتقطرة أولا من الايتانول . يحل ٣٠غ من هدروكسيد البوتاسيوم النقي في ٣٠ مل من الماء المقطر الساخن ثم يمدد الحجم حتى اللتر بوساطة الايتانول المقطر أعلاه ذي التركيز ٩٥٪ . يغلق الدورق بسدادة ذات أنبوب يحتوي على الكلس الصودي . يترك المحلول لمدة يوم أو أكثر ثم يفصل راسب كربونات الكلسيوم ويحفظ المحلول في وعاء معتم ويسد بسدادة ذات أنبوب يحتوي على الكلس الصودي .

٤٦ . محلول آزو البنزول المعياري

يحل ١٤٥٠ر٠ غ من آزو البنزول النقي (مبلور في الايتانول ومجفف تماما) في حوجلة معايرة سعة ١٠٠ مل بوساطة الايتانول ٩٦٪ ويمدد الحجم حتى العلامة بالايتانول . يمدد المحلول السابق قبل الاستعمال عشر مرات بوساطة الايتانول ٩٦٪ ويحفظ بالظلام .

٤٧ . محلول الغلوكوز المعياري لمعايرة الاميلاز

يحل ٢٠٠ ملغ من الغلوكوز النقي في لتر من محلول حمض البكريك المشبع .

٤٨ . المحلول المعياري لمعايرة الكولسترول

يحل ١٠٠ ملغ من الكولسترول في حوجلة معايرة سعة ١٠٠ مل . يؤخذ المحلول بوساطة ماصات معايرة ١٫٥ و ١٠ مل وتنقل الى حوجلتي معايرة سعة ١٠٠ مل وتمددان بالكلوروفورم حتى العلامة .

٤٩ . المحلول المعياري للمنغنيز

يؤخذ ٩١ ميلي لترا من محلول برمنغنات البوتاسيوم ١ نظاميا ، (تحدد نظامية برمنغنات البوتاسيوم بوساطة حمض الحماض) . يضاف اليها ٣٠٠ مل من الماء المقطر و ٣ مل من حمض الكبريت المركز وعلى شكل قطرات ٦ مل من محلول كبريتيت الصوديوم ١٠٪ . يغلى المحلول حتى زوال رائحة أكسيد الكبريت ، يبرد ثم ينقل الى حوجلة سعة لتر ويمدد الحجم بالماء المقطر حتى العلامة . يبلغ تركيز المنغنيز في المحلول المعياري ١٠٠ مكروغرام/ميلي لترا .

٥٠ . المحلول المعياري لحمض البول

يؤخذ ١٠٠ ملغ من حمض البول النقي والمجفف تماما ويحل بوساطة المحلول الحاوي ٢٠٠ ملغ من هدروفسفات الصوديوم و ٤٠٠ ملغ ثنائي هدروفسفات الصوديوم . يسخن المزيج حتى تمام انحلال الاملاح . ثم يمدد الحجم بعد التبريد الى ٢٠٠ مل بالماء المقطر .

٥١ . المحلول المعياري للفسفات

يحل ٠٫١٠٩٩ غراما من ثنائي هدروفسفات البوتاسيوم KH_2PO_4 في حوجلة معايرة سعة لتر . يحتوي ١ لترا من هذا المحلول على ٠٫٠٢٥ ملغ فسفورا . يضاف للمحلول ٢ ــ ٣ قطرات من الكلوروفورم كمضاد للعفن .

٥٢ . المزيج المعياري للحموض الامينية

لتحضير محلول معياري للحموض الامينية وبأي تركيز يجب أن يتواجد

الموضـوع	الصفحة

الفصل الحادي عشر ـ استخلاص بعض المركبات الحيوية ودراستها	**١٩٥**
استخلاص السكاكر وحلمهتها	١٩٥
طرق استخلاص الحموض الامينية	١٩٨
فصل الببتيدات	٢٠٢
فصل البروتينات وتنقيتها	٢٠٥
الكواشـف	**٢١٢**
المراجـع	**٢٢٨**
الفهـرس	**٢٢٩**

Damascus University