المملكة العربية السعودية
وزارة التعليم العالي
جامعة الملك سعود
كلية العلوم
قسم الكيمياء الحيوية

قسم الكيمياء الحيوية
Biochemistry Department
College of Science - King Saud University

مذكرة الجزء العملي

١٠١ كيح

إعداد :

د. فريد عطايا

أ. صالح الدغيشم

أ. محمد اللعبون

أ. سلمان العميري

أ. أحمد الزهراني

أ. محمد الحليلي

أ. منى العنزي

أ. نورة العلي

أ. فريدة الخويطر

بسم الله الرحمن الرحيم

المحتويات

١. السلامة في المختبرات ١

١,١ قواعد ومواصفات السلامة في المختبرات ١

١,٢ احتياطات السلامة من مخاطر الكيماويات ٢

١,٣ العلامات الإرشادية للمواد الكيميائية ٢

١,٤ احتياطات السلامة من مخاطر الزجاجيات ٣

١,٥ احتياطات السلامة من المخاطر الكهربائية ٣

١,٦ إرشادات السلامة في مختبرات قسم الكيمياء الحيوية ٣

١,٧ بعض الأدوات المستخدمة في المختبرات ٤

٢. المحاليل المنظمة ٥

٢,١ الرقم الهيدروجيني pH ٥

٢,٢ قياس الرقم الهيدروجيني ٥

٢,٣ المحاليل المنظمة ٦

٢,٤ سعة المحلول المنظم ٧

٢,٥ تحضير محلول منظم فوسفاتي ٧

٢,٦ دراسة خواص المحاليل ٩

٣. الكربوهيدرات (١) ١١

٣,١. وظيفة الكربوهيدرات ١١

٣,٢. تصنيف الكربوهيدرات ١١

٣,٣. الاختبارات العامة للكربوهيدرات ١٤

٣,٣,١. اختبار الذوبانية ١٤

٣,٣,٢. اختبار موليش ١٦

٣,٣,٣. الاختبارات الاختزالية ١٨

٣,٤,٣,١. اختبار بندكت ١٨

٣,٤,٣,٢. اختبار بارفويد ٢٠

٣,٤,٤. اختبار بيال ٢٢

٣,٤,٥. اختبار سيليفانوف ٢٤

٤. الكربوهيدرات (٢) **٢٦**
٤,١. التركيب الحلقي للسكريات الأحادية ٢٦
٤,٢. الكربوهيدرات عديدة التسكر ٢٦
٤,٣. الإختبارات الوصفية للسكريات العديدة والثنائية ٢٧
٤,٣,١. اختبار اليود ٢٧
٤,٣,٢. التحلل المائي للسكروز ٢٩
٤,٣,٣. التحلل المائي للنشاء ٣١

٥. الليبيدات **٣٣**
٥,١. الأحماض الدهنية ٣٣
٥,٢. الاختبارات الوصفية لليبيدات ٣٥
٥,٢,١. اختبار الذوبانية ٣٥
٥,٢,٢. اختبار التصبن ٣٧
٥,٢,٣. اختبار فصل الصابون من المحلول بالتمليح ٣٩
٥,٢,٤. اختبار تكوين الأحماض الدهنية من الصابون ٤٠
٥,٢,٥. اختبار تكوين أملاح الأحماض الدهنية الغير ذائبة ٤١
٥,٢,٦. اختبار خلات النحاس ٤٣
٥,٢,٧. اختبار عدم التشبع (اختبار اليود) ٤٥
٥,٢,٨. اختبار الأكرولين ٤٦

٦. الأحماض الأمينية **٤٨**
٦,١. الخواص الكيميائية و الفيزيائية للأحماض الأمينية ٤٩
٦,١,١. النشاط الضوئي ٤٩
٦,١,٢. الخاصية الأمفوتيرية ٤٩
٦,١,٣. نقطة التعادل الكهربي ٥٠
٦,١,٤. درجة الإنصهار ٥٠
٦,٢. الاختبارات العامة و الوصفية للأحماض الأمينية ٥١
٦,٢,١. اختبار الذوبانية ٥١
٦,٢,٢. اختبار النهيدرين ٥٢
٦,٢,٣. الكشف عن الأحماض الأمينية المحتوية على الكبريت ٥٥
٦,٢,٤. إختبار الزانثوبروتيك ٥٧
٦,٢,٥. إختبار ساكاجوتشي ٥٩
٦,٢,٦. إختبار ميلون ٦٠

٧. البروتينات **٦٢**

٧,١. الأشكال البنائية للبروتين ٦٢

٧,٢. نقطة التعادل الكهربي للبروتين ٦٤

٧,٣. الاختبارات الوصفية للبروتينات ٦٥

٧,٣,١. اختبار الذوبانية ٦٥

٧,٣,٢. اختبار البيوريت ٦٧

٧,٣,٣. ترسيب البروتينات بأملاح المعادن الثقيلة ٦٩

٧,٣,٤. ترسيب البروتينات بواسطة القلويدات ٧٠

٧,٣,٥. أثر الأملاح على ذوبانية البروتين ٧١

٧,٤. التقدير الكمي للبروتينات ٧٣

٧,٤,١. طريقة لاوري ٧٣

٨. الإنزيمات **٧٦**

٨,١. العوامل المؤثرة في نشاط الإنزيمات ٧٦

٨,٢. مبدأ دراسة نشاط الإنزيمات بطريقة عملية ٧٦

٨,٣. الاختبارات الوصفية للكشف الإنزيمات ٧٧

٨,٣,١. الكشف عن الطبيعة الكيميائية للإنزيمات ٧٧

٨,٣,٢. اختبار نشاط إنزيم الأمايليز ٧٨

٨,٣,٣. اختبار نشاط إنزيم السكريز ٨٠

٩. المراجع **٨١**

١. السلامة في المختبرات

يتطلب العمل في المختبرات وعي كامل بأهمية وخطورة المواد والأجهزة المستخدمة، حيث أن كثير من المواد يتصف بالسمية أو مهيّج للأغشية ومن المواد ما هو حارق أو مشتعل وغير ذلك من أشكال الخطورة، لذا يجب قبل بدء العمل في المختبر أن نعي أهمية وخطورة المواد المستخدمة، وأخذ الحيطة والحذر واتباع تعليمات السلامة الموصى بها في كل مختبر.

١,١. قواعد ومواصفات السلامة في المختبرات:

١. يجب أن تكون مساحة المختبر تتناسب مع أعداد الباحثين والطلاب لكي تسمح لهم بحرية الحركة خلال إجراء التجارب دون تزاحم.
٢. يجب أن يتوفر بابان بقاعة المختبر للدخول والخروج، وأن يكون اتجاه فتح الأبواب للخارج.
٣. يجب تزويد النوافذ بستائر مقاومة للحريق و قضبان حماية متحركة.
٤. يجب تجهيز المختبر بوسائل الإضاءة والتهوية الطبيعية والصناعية ومتابعة الصيانة الدورية لتلك التجهيزات.
٥. يجب أن تكون أرضيات المختبرات والأحواض والطاولات من الأنواع المقاومة للمواد الكيميائية والحريق.
٦. يجب توفير خزانة غازات وذلك لاستخدامها عند تحضير أو استخدام المواد المتطايرة أو الغازات الخطرة أو ذات الرائحة الكريهة.
٧. يجب تجهيز المختبر بمقاعد مريحة سهلة الحركة ويمكن التحكم في ارتفاعها.
٨. يجب تجهيز المختبرات بعدد كاف من نقاط الكهرباء متعددة الفولتية وذات أغطية.
٩. يجب تجهيز المختبرات بأنظمة غاز وكهرباء ووضع مفاتيح للتحكم بهذه الأنظمة في مكان ظاهر يمكن الوصول إليها بسهولة في حالة الطوارئ.
١٠. يجب أن يزود كل مختبر بغرفة لتخزين الأدوات و الأجهزة.
١١. يجب تزويد كل مختبر بعربة نقل متحركة لنقل الأجهزة والأدوات من غرفة التحضير إلى المختبر وبالعكس.
١٢. يجب توفير وسائل السلامة الأولية مثل طفايات الحريق وصندوق الإسعافات الأولية ودش غسيل الطوارئ وأجهزة إنذار وأن تكون في مكان ظاهر ويسهل الوصول إليه وعمل صيانة دورية لها للتأكد من صلاحيتها.

يمكن تقسيم المخاطر في المختبرات إلى:

١. مخاطر المواد الكيميائية.
٢. مخاطر الزجاجيات.
٣. المخاطر الكهربائية.
٤. المخاطر الحيوية.

١,٢. احتياطات السلامة من مخاطر المواد الكيمائية:

١. معرفة خصائص المادة الكيميائية من خلال العلامات الإرشادية على العبوة.
٢. عدم لمس الكيماويات باليد مباشرةً وعدم تذوقها أو استنشاقها.
٣. لبس القفازات والبالطو أثناء العمل.
٤. عدم استخدام الفم لملء الماصة بل يجب استخدام الضاغطة الهوائية.
٥. عدم تخزين الكيماويات داخل المختبر ولكن يجب وضعها في أماكن تخزين خاصة.
٦. التخلص من بواقي المواد الكيميائية بالطريقة المناسبة لكل مادة حسب إرشادات الفني المسؤول عن المختبر.
٧. إجراء التجارب التي يتصاعد منها غازات أو روائح في غرفة الغازات.
٨. عدم توجيه أنبوبة الاختبار ناحية الوجه أو الجسد أثناء التسخين.
٩. إغلاق زجاجات الكيماويات عند الانتهاء منها وعدم فتح عدة زجاجات في وقت واحد.

١,٣. العلامات الإرشادية على عبوات المواد الكيميائية

علامات تحذيرية للمواد الكيميائية
Chemical Warning Signs

١,٤. احتياطات السلامة من مخاطر الزجاجيات

١. تخزين الزجاجيات على رفوف ذات ارتفاع مناسب ليسهل التقاطها و إعادتها.
٢. حمل الزجاجيات بطريقة مناسبة وبحذر وعدم حمل أكثر من زجاجة واحدة في المرة الواحدة.
٣. عدم استخدام زجاجات غير نظيفة أثناء التجارب.
٤. عدم لمس الزجاجات أثناء التسخين باليد مباشرةً ويجب استخدام الماسكات المخصصة لذلك.

١,٥. احتياطات السلامة من المخاطر الكهربائية

١. يجب أن تكون صنابير المياه بعيدة عن الكهرباء والأجهزة.
٢. التأكد من قوة التيار الكهربائي (١١٠ أو ٢٢٠ فولت) قبل توصيل الأجهزة.
٣. صيانة الأجهزة بشكل دوري وتنظيفها.
٤. مراقبة الأجهزة أثناء التشغيل وإطفاءها بعد الانتهاء من الاستخدام.

١,٦. إرشادات السلامة في مختبرات قسم الكيمياء الحيوية

١. لبس البالطو لحماية ملابسك وجسمك من الكيماويات المنسكبة.
٢. لبس القفازات المناسبة عند التعامل مع المواد الكيميائية أو العينات.
٣. لبس الحذاء الواقي يحميك من الأخطار المحتملة.
٤. وضع نظارة واقية لحماية العينين من المواد الكيميائية.
٥. إزالة الغترة أو الشماغ قبل البدء في إجراء التجربة.
٦. تأدية التجربة بحرص و هدوء يقيك من الحوادث.
٧. تجنب الأحاديث الجانبية مع زملائك أثناء القيام بالتجربة.
٨. تبليغ الفني المسؤول عن المختبر عن الحوادث مهما كانت صغيرة.
٩. لا تتردد في سؤال الأستاذ عما لا تعرف.
١٠. عدم شم أو استنشاق روائح المواد الكيميائية.
١١. عدم لمس أو تذوق المواد الكيميائية.
١٢. عدم الأكل أو الشرب داخل المختبرات.
١٣. عدم التدخين داخل المختبرات.
١٤. عدم إخراج المواد الكيميائية من المختبر.
١٥. عدم استعمال أو لمس الأدوات الملوثة بالكيماويات.
١٦. طلب الإسعافات الأولية فوراً إذا تعرض أي شخص لأي حادث لا سمح الله.
١٧. الالتزام باحتياطيات السلامة الخاصة بكل تجربة.
١٨. إجراء التجارب التي يتصاعد منها غازات في خزانه شفط الغازات.
١٩. استخدام التسخين بالحمام المائي بدلاً من اللهب المباشر.
٢٠. سحب السوائل بطريقة آمنه باستخدام الماصات البلاستيكية أو الماصات الزجاجية بالضاغطة الهوائية.

٢١. اقرأ علامات التحذير المدونة على زجاجات المواد الكيميائية قبل لاستعمال.

٢٢. عدم محاوله فك الزجاجيات المستعصية بالقوة.

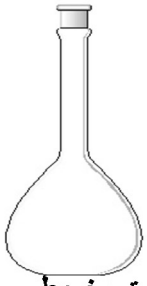
٢٣. غسل اليدين بالماء والصابون دائما بعد الانتهاء من التجربة.

٢٤. استخدام المواد المطهرة لتعقيم اليدين ولتعقيم المكان بعد استخدام العينات.

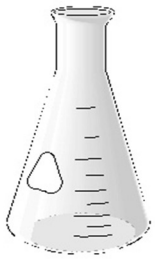
٢٥. جعل المساحات التي تعمل بها أو عليها نظيفة.

١,٧. بعض الأدوات المستخدمة في المختبرات

قمع Funnel

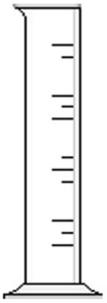


دورق مخروطي
Volumetric flask



دورق Flask

كأس Beaker

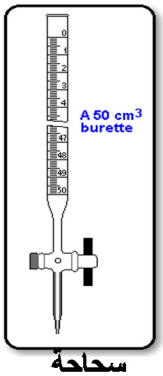


مخبار مدرج
Cylinder

قمع فصل
Separated funnel

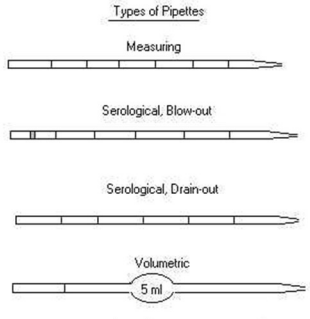
قارورة غسيل
Bottle wash

قارورة كواشف
Bottle reagent



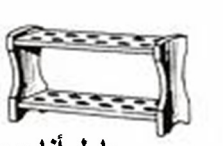
سحاحة
Burette

ماصة أوتوماتيكية

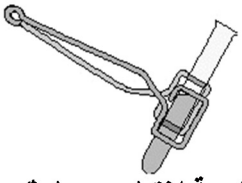


ماصات
Pipette

قطارة Pastuer



حامل أنابيب
Rack



أنبوبة اختبار مع ماسك
Test tube with tongs

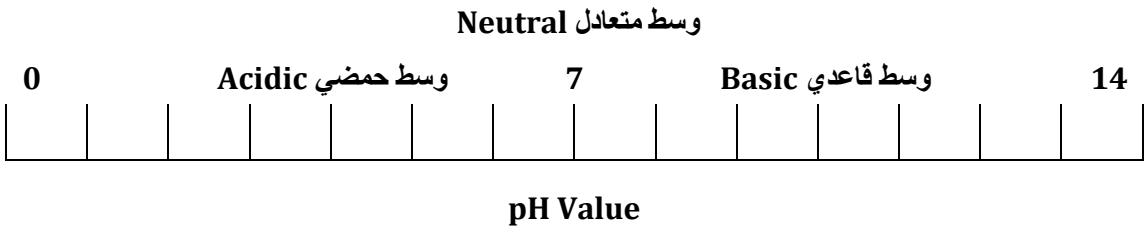
٢. المحاليل المنظمة Buffer Solutions

٢,١. الرقم الهيدروجيني pH

اقترح العالم سورنسن **Sorensen** طريقة للتعبير عن حموضة المحاليل باستخدام الرقم الهيدروجيني الذي يعرّف بأنه: اللوغاريتم السالب لتركيز أيونات الهيدروجين $[H^+]$ في المحلول .

$$pH = - Log[H^+]$$

وبملاحظة أن الإشارة سالبة فإن قيمة الرقم الهيدروجيني ترتفع كلما انخفض تركيز أيونات الهيدروجين والعكس صحيح.



٢,٢. قياس الرقم الهيدروجيني :

لقياس الرقم الهيدروجيني للمحاليل المختلفة بدقة يجب أن نستخدم جهاز خاص يسمى **pH meter**. يتكون الجهاز من قطبين: الأول يسمى قطب مرجعي يحتوي على محلول مشبع من كلوريد البوتاسيوم يعمل اتصالاً كهربائياً بالمحلول، والثاني قطب زجاجي في أسفله غشاء رقيق على شكل انتفاخ حساس ونفّاذ لأيونات الهيدروجين. يقيس هذا الجهاز الفرق في الجهد بين القطبين، ويحوله إلى رقم هيدروجيني من **0** إلى **14**.

جهاز قياس الرقم الهيدروجيني pH meter

٢,٣. المحاليل المنظمة Buffer Solutions

هي المحاليل التي تقاوم التغير في الرقم الهيدروجيني عند إضافة كميات قليلة من الأحماض أو القواعد القوية أو المخففة، وهي عبارة عن محلول لحمض ضعيف وأحد أملاحه أو قاعدة ضعيفة وأحد أملاحها.

المحاليل المنظمة لها أهمية كبيرة في الأنظمة الكيميائية والبيولوجية بحيث تتميز السوائل الحيوية برقم هيدروجيني ثابت، ففي جسم الإنسان تختلف قيمة الـ pH من سائل إلى آخر فمثلا في الدم تبلغ ٧,٤ بينما في العصارة المعدية تبلغ ١,٥ ، هذه القيم تعتبر مناسبة ومثالية لعمل الإنزيمات وموازنة الضغط الأسموزي. هذه القيم يحافظ عليها غالباً عن طريق المحاليل المنظمة وأهم المحاليل المنظمة هي الفوسفات والبيكربونات.

وضع العالمان هندرسون و هاسلبالخ Henderson & Hasselbalch المعادلة الأساسية التي توضح العلاقة بين الرقم الهيدروجيني pH ونسبة الحمض والقاعدة المقترنة. وهذه المعادلة لها أهميتها في فهم عمل وتحضير المحاليل المنظمة.

لنفترض أنه يوجد لدينا محلول من الحمض الضعيف ويرمز له بـ HA فإنه يتفكك لدى إذابته في الماء حسب المعادلة التالية:

$$\mathbf{HA \rightleftharpoons A^- + H^+}$$

حمض ضعيف قرين **قاعدة قرينة**

وطبقاً لقانون فعل الكتلة فإن قيمة ثابت التفكك للحمض :

$$\mathbf{Ka = \frac{[A^-]\,[H^+]}{[HA]}}$$

للحصول على قيمة pH تُفصل $[H^+]$ لوحدها في طرف ونأخذ اللوغاريتم لكلا الطرفين الناتجين

$$\mathbf{[H^+] = \frac{Ka[HA]}{[A^-]}}$$

$$\mathbf{Log\,[H^+] = log\ Ka\ \frac{[HA]}{[A^-]}}$$

وبحسب قوانين اللوغاريتمات نحصل على :

$$\mathbf{Log\,[H^+] = log\,Ka + log\,\frac{[HA]}{[A^-]}}$$

وبضرب الطرفين بـ (-)

$$\mathbf{-\,Log\,[H^+] = -\,log\,Ka - log\,\frac{[HA]}{[A^-]}}$$

معادلة هندرسون - هاسلبالخ

$$\mathbf{pH = pKa + log\,\frac{[A^-]}{[HA]}}$$

$$\mathbf{Or\ \ pH = pKa + log\,\frac{[\text{القاعدة القرينة}]}{[\text{الحمض القرين}]}}$$

ويمكن استخدام هذه المعادلة في حساب الرقم الهيدروجيني للمحلول المنظم المراد تحضيره إذا عُرفت نسبة الحمض إلى القاعدة المقترنة وثابت التفكك للحمض pKa .

ومن المعادلة السابقة نجد أن الرقم الهيدروجيني للمحلول المنظم يعتمد على عاملين هما :

١. قيمة pKa .
٢. النسبة بين تركيز الحمض والقاعدة المقترنة.

٢,٤. سعة المحلول المنظم (أو كفاءته) Buffer Solution Capacity

تُعبر عن مدى مقاومة المحلول المنظم للتغير في الرقم الهيدروجيني، وتكون أكبر ما يمكن عندما تكون النسبة بين الحمض والقاعدة المقترنة مساوية للواحد.

من الأمثلة: حمض الخليك Acetic Acid (CH_3COO^-) كحمض ضعيف وقاعدته المقترنة هي خلات الصوديوم Sodium Acetate (CH_3COONa^+)

٢,٥. تحضير محلول منظم فوسفاتي Preparation of Phosphate Buffer

المطلوب: تحضير واحد لتر من محلول منظم فوسفاتي تركيزه 0.25M و pH = 7.4 علماً بأن (pKa = 7.2)

١. معرفة مكونات المحلول المنظم وهي:

فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين NaH_2PO_4 ويعتبر الشق الحمضي (Acid)

فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين Na_2HPO_4 ويعتبر الشق القاعدي (القاعدة المقترنة أو الملح Salt)

٢. حساب النسبة بين الحمض والملح باستخدام معادلة هندرسون كالتالي :

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$7.4 = 7.2 + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$7.4 - 7.2 = \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$0.2 = \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

وبأخذ مقلوب اللوغاريتم :

$$\frac{Na_2HPO_4}{NaH_2PO_4} = 1.6$$

أي أن النسبة بين الشقين تساوي 1 : 1.6 فإذا مزجناهما بحسب هذه النسبة نحصل على محلول منظم رقمه الهيدروجيني يساوي 7.4 كما هو مطلوب في هذا المثال .

٣. حساب وزن كلا المادتين كالتالي:

وزن NaH_2PO_4 = $\frac{1}{2.6}$ x 0.25 x الوزن الجزيئي لـ NaH_2PO_4

= ..... جرام

وزن Na_2HPO_4 = $\frac{1.6}{2.6}$ x 0.25 x الوزن الجزيئي لـ Na_2HPO_4

= ..... جرام

٤. يذاب وزن كلا المادتين في حوالي 500 ml من الماء المقطر في كأس زجاجي.

٥. يقاس الـ pH للمحلول باستخدام جهاز pH meter وسيكون قريب للمطلوب و يضبط تماماً على الـ pH المطلوب بإضافة كميات بسيطة من حمض HCl أو قاعدة NaOH .

٦. توضع الكمية في دورق حجمي سعة (1L) ثم نكمل الحجم إلى واحد لتر (1000 ml) بالماء المقطر، ويُرج جيداً.

٢,٦. دراسة خواص المحاليل المنظمة Study of Properties of Buffer Solutions

الفكرة الأساسية:

هل يتغير الرقم الهيدروجيني (pH) للمحلول المنظم تغيراً كبيراً أو يقاوم التغير في الرقم الهيدروجيني عند إضافة حمض مخفف أو قاعدة مخففة إليه ومقارنة ذلك بما يحدث للماء المقطر عند إضافة نفس الحمض أو القاعدة إليه.

المواد والأدوات المطلوبة:

١. كـأسين (سعة كل منهما 50 ml) وملعقة زجاجية للتحريك.
٢. جهاز قياس الرقم الهيدروجيني pH meter.
٣. محلول منظم فوسفاتي رقمه الهيدروجيني 7.4 (المحضر في الجزء العملي السابق).
٤. حمض هيدروكلوريك HCl مخفف تركيزه 0.1 M
٥. محلول هيدروكسيد صوديوم NaOH مخفف تركيزه 0.1 M

طريقة العمل:

أولاً: دراسة خواص المحلول المنظم باستخدام حمض هيدروكلوريك HCl تركيزه 0.1 M

١. ضع في الكأس (أ) 40 ml من الماء المقطر وفي الكأس (ب) 40 ml من المحلول المنظم الفوسفاتي (الذي تم تحضيره في الجزء العملي).
٢. يُقاس الرقم الهيدروجيني (pH) لمحتويات كلا الكأسين باستخدام جهاز pH meter
٣. أضف لمحتويات كلا الكأسين كمية معينة من حمض الهيدروكلوريك المخفف، وحرك كلا المحلولين جيداً بملعقة زجاجية نظيفة.
٤. يُقاس الرقم الهيدروجيني (pH) لمحتويات كلا الكأسين مرة أخرى.
٥. أعد الخطوة رقم ٣ بإضافة كمية أخرى من حمض هيدروكلوريك المخفف مرة أخرى لمحتويات كل كأس، وحرك المحلولين جيداً بملعقة زجاجية نظيفة.
٦. يُقاس الرقم الهيدروجيني (pH) لمحتويات كل كأس مرة أخرى.

النتائج:

	حجم الحمض المضاف volume of HCl 0.1 M	قيمة الـ pH للمحلول المنظم بعد الإضافة	قيمة الـ pH للماء المقطر بعد الإضافة
١	0.5 ml		
٢	1 ml		
٣	2 ml		
فرق التغير في الـ pH بعد الإضافة			

الأسئلة:

من خلال نتائج الجدول، أكمل الجمل التالية:

- نقص الـ pH بعد إضافة الحمض للمحلول المنظم بمقدار ..... ، بينما نقص pH بعد إضافة الحمض للماء المقطر بمقدار .....
- أيهما تغير له الـ pH بدرجة كبيرة ؟

.....

- أيهما قاوم التغير في الـ pH ؟

.....

ثانياً: دراسة خواص المحلول المنظم باستخدام قاعدة هيدروكسيد الصوديوم NaOH تركيزها 0.1 M

أعد التجربة السابقة مع استبدال حمض الهيدروكلوريك بقاعدة هيدروكسيد الصوديوم

النتائج :

	حجم القاعدة المضافة volume of NaOH 0.1 M	**قيمة الـ pH للمحلول المنظم بعد الإضافة**	**قيمة الـ pH للماء المقطر بعد الإضافة**
١	0.5 ml		
٢	1 ml		
٣	2 ml		
فرق التغير في الـ pH بعد الإضافة			

الأسئلة:

من خلال نتائج الجدول، أكمل الجمل التالية:

- يزيد pH بعد إضافة القاعدة للمحلول المنظم بمقدار ..... ، بينما يزيد pH بعد إضافة القاعدة للماء المقطر بمقدار .....
- أيهما تغير له الـ pH بدرجة كبيرة ؟

.....

- أيهما قاوم التغير في الـ pH ؟

.....

٣. الكربوهيدرات (١)

الكربوهيدرات هي مركبات عضـوية ألدهيدية أو كيتونية متعددة الهيدروكسـيل أو التي تعطي عند تحللها مائيا ألدهيدات أو كيتونات عديدة الهيدروكسيل. وهي تتكون من عناصر الكربون (**C**) والأكسجين (**O**) والهيدروجين (**H**) وبعضها يحتوي على النيتروجين (**N**) والفوسفات (**P**) والكبريت (**S**)

وصيغتها الجزيئية هي :

$$(CH_2O)_n$$

٣,١. وظيفة الكربوهيدرات:

الوظيفة الأساسية للكربوهيدرات هي توفير الطاقة لجسم الكائن الحي خاصةً الدماغ والجهاز العصبي، والمادة الأولية للكربوهيدرات في الجسم هي الجلوكوز ويسمى الجلوكوز بسكر الدم لأنه يسير في الدم ويصل إلى كل خلية في الجسم لكي تستفيد منه في إنتاج الطاقة التي تحتاجها الخلية. حيث يدخل الجلوكوز في العديد من العمليات البيولوجية التي تؤدي إلى إنتاج الطاقة اللازمة لضمان استمرار الحياة وكذلك قيام الخلية بوظائفها، كما أنه قد يُستخدم في تصنيع أنواع أخرى من السكريات الأحادية كالفركتوز والجالاكتوز.

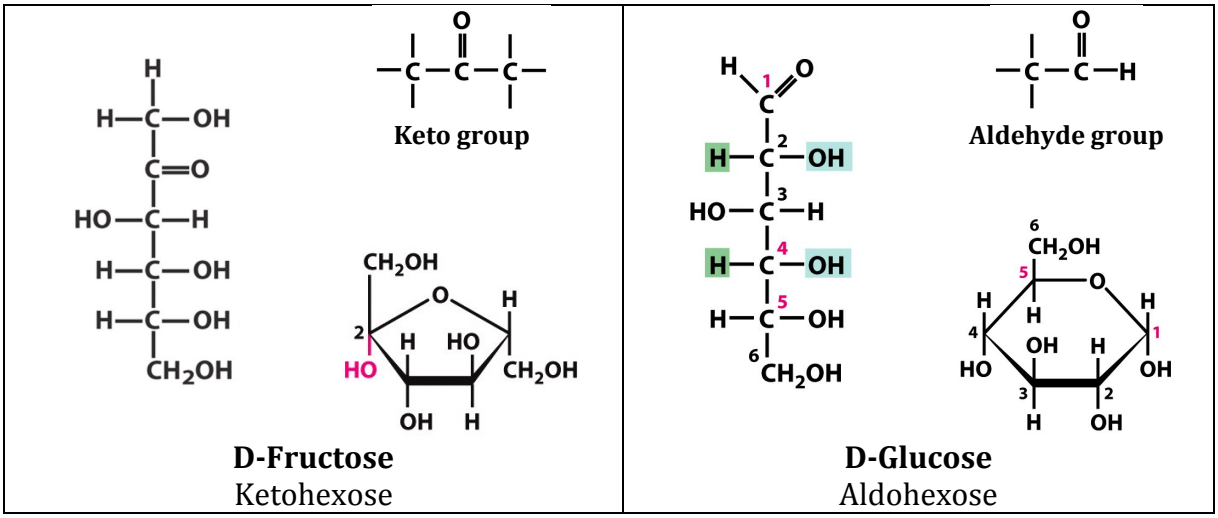
ويتم تخزين الجلوكوز في الخلية النباتية على هيئة نشاء وفي الحيوانات على هيئة جلايكوجين حيث يُخزن في العضلات والكبد والمخزون في الكبد يمكن أن يكون مصدرا للجلوكوز لجميع أنسجة وأعضاء الجسم عند الحاجة.

٣,٢. تصنيف الكربوهيدرات :

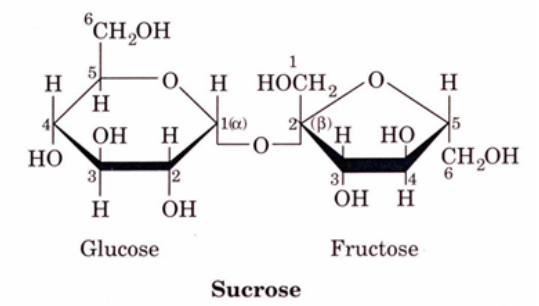
(١) **سكر أحادي (Monosaccharides):** هي أبسط أنواع الكربوهيدرات وهي الوحدات البنائية للسكريات الثنائية و العديدة، يُرمز لها بالصيغة الجزيئية $C_n(H_2O)_n$ و تُصنف إلى قسمين

أ. سكر ألدهيدي لاحتوائه على مجموعة ألدهيد مثل الجلوكوز.

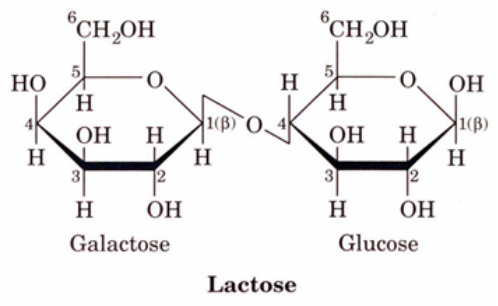
ب. سكر كيتوني لاحتوائه على مجموعة كيتون مثل الفركتوز.



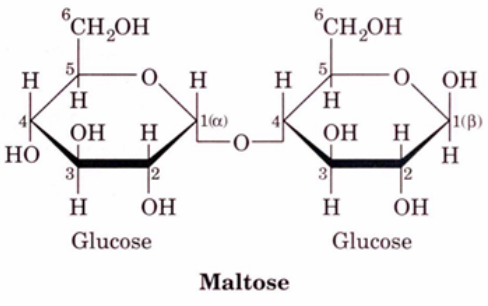
(٢) **ســكريات ثنائية (Disaccharides):** هي ناتجه عن اتحاد جزيئين من الســكريات الأحادية الســداســية، وأهمها السكروز والمالتوز واللاكتوز.



Sucrose

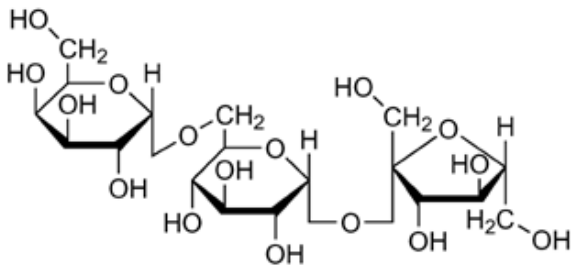


Lactose



Maltose

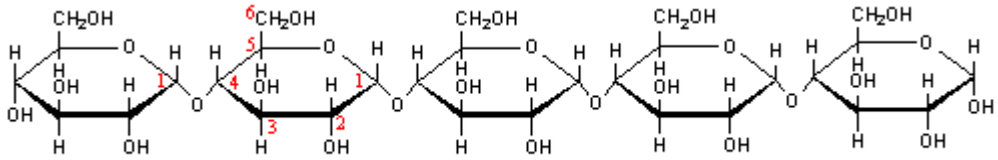
(٣) **الســكريات المتعـــــددة (Oligosaccharides):** تشـمل السـكريات التي تنشـأ من اتحاد ٣ إلى ١٠ وحدات من السكريات الأحادية، ومثالها سكر رافينوز.



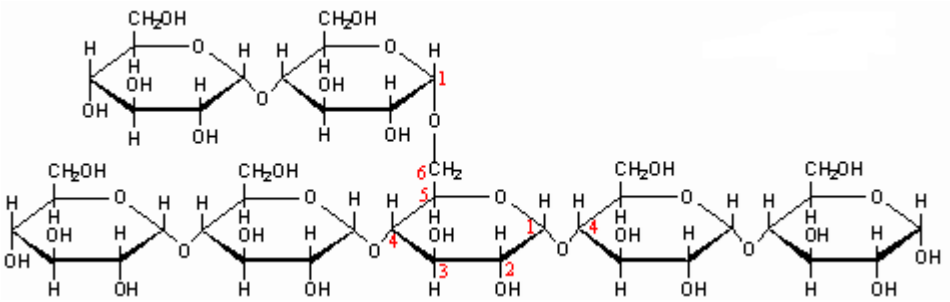
Glucose + Glucose + Fructose

Raffinose

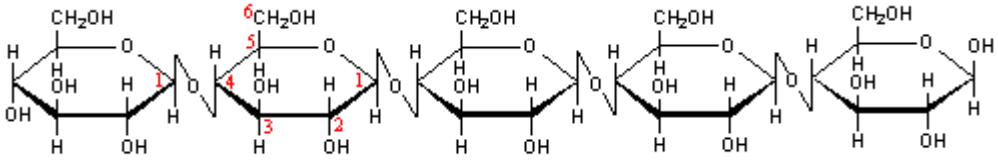
(٤) **السكريات العديدة (Polysaccharides):** وهي ناتجة من اتحاد عدد كبير من الجزيئات السكريات الأحادية يربط بينها روابط جلايكوسيدية، وأشهرها النشاء (الأمايلوز ، الأمايلوبكتين) و الجلايكوجين و السيليولوز.



Amylose



Amylopectin



Cellulose

٣,٣. الاختبارات العامة للكربوهيدرات:

الهدف من هذه الاختبارات:

١. التعرف على الكربوهيدرات كمواد مختلفة عن الليبيدات والبروتين.
٢. التمييز بين السكريات المختزلة وغير المختزلة.
٣. التمييز بين السكريات الأحادية والثنائية والعديدة.
٤. التمييز بين السكر الألدهيدي والسكر الكيتوني.
٥. التمييز بين السكريات الأحادية خماسية ذرات الكربون (البنتوزات) والسكريات الأحادية سداسية ذرات الكربون (الهكسوزات).

٣,٣,١. اختبار الذوبانية Solubility Test

تذوب السكريات الأحادية و الثنائية في المحاليل المائية نظراً لاحتوائها على مجموعات قطبية مثل مجموعة الهيدروكسيل والتي تستطيع تكوين روابط هيدروجينية مع الماء بينما السكريات العديدة فهي إما ضئيلة أو عديمة الذوبان وذلك بسبب وزنها الجزيئي الكبير و طول السلاسل المكونة لها و درجة تفرعها.
يمكننا من خلال هذه التجربة التمييز بين السكريات الأحادية والثنائية من جهة والسكريات العديدة من جهة أخرى.

النظرية العلمية للاختبار:

السكريات الأحادية والثنائية قابلة للذوبان في الماء أما السكريات العديدة فنظراً لكبر جزيئاتها فإنها شحيحة الذوبان أو عديمة الذوبان في الماء وإذا ذابت فإنها تُكوّن محاليل غروية وتظهر معكرة نوعاً ما.

الأدوات و المواد:

- محاليل مواد سكرية أحادية (جلوكوز - فركتوز - رايبوز).
- محاليل مواد سكرية ثنائية (سكروز - لاكتوز - مالتوز).
- محاليل مواد سكرية متعددة (النشاء).
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.
- حمام مائي.

طريقة العمل:

اختبر ذوبانية كل مادة على حده وذلك برَجّ كمية قليلة من المادة مع الماء البارد أولاً ثم مع الماء الساخن.
دوّن ملاحظاتك في الجدول التالي وقارن بين درجة ذوبانية المواد في الماء البارد والساخن.

النتائج:

	الأنبوبة	إذابة في ماء بارد	إذابة في ماء ساخن
سكريات أحادية	جلوكوز		
	فركتوز		
	رايبوز		
سكريات ثنائية	سكروز		
	مالتوز		
	لاكتوز		
سكريات عديدة	نشاء		

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

.....

الأسئلة:

لماذا تُكوّن السكريات العديدة محاليل غروية ؟

.....

.....

.....

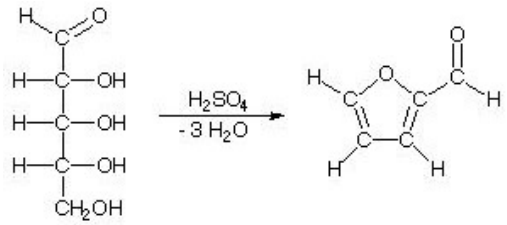
.....

٣،٣،٢. اختبار موليش Molisch's Test

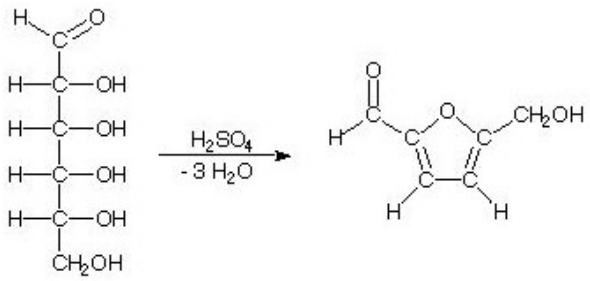
يعتبر اختبار عام للكشف عن الكربوهيدرات وتمييزها عن الليبيدات والبروتينات و يُعطي هذا الاختبار نتيجةً إيجابية عبارة عن لون بنفسجي مع جميع أنواع الكربوهيدرات (أحادية، ثنائية، متعددة، عديدة).

النظرية العلمية للاختبار:

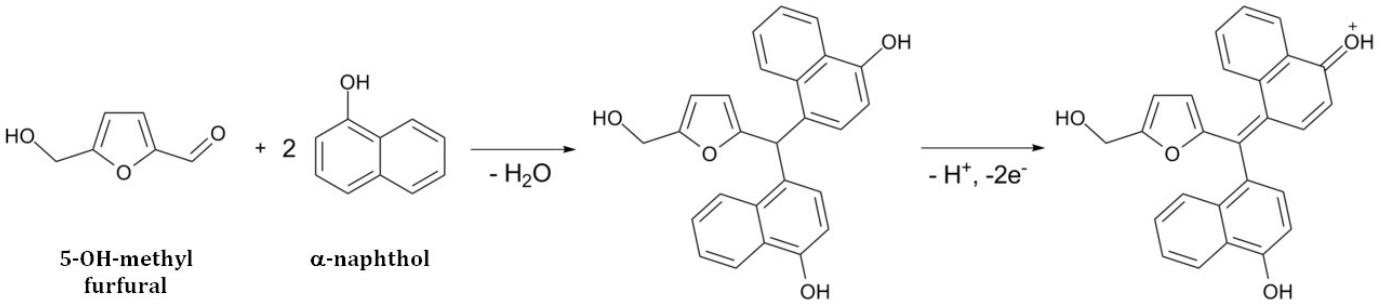
عند إضافة الأحماض المركزة إلى السكريات يتم نزع ٣ جزيئات ماء من ثلاث مجموعات هيدروكسيل في السكر ويتكون مركب ألدهيدي حلقي (فورفورال) تتفاعل مجموعة الألدهيد فيه مع الكثير من المركبات العطرية كمركب ألفا- نافثول الكحولي فتنتج عنه مركبات ملونة تستخدم للتعرف على وجود السكريات. حيث ينتج فورفورال من السكر خماسي ذرات الكربون وهيدروكسي ميثايل فورفورال من السكر سداسي ذرات الكربون، ويمكن لكل منهما أن يتفاعل مع مركب ألفا- نافثول ليتكون مركب بنفسجي يظهر على هيئة حلقة أو قرص يفصل بين طبقتين.



Pentose **Furfural**



Hexose **5-OH-methyl furfural**



5-OH-methyl furfural **α-naphthol** **Purpule-colored dye**

*** معلومة : الكاشف الكيميائي Chemical Reagent هو مادة كيميائية مصنّعة تتفاعل مع المادة الطبيعية المُراد الكشف عنها وينتج عن هذا التفاعل مركب ذو لون مميز.**

الأدوات و المواد:

- حمض الكبريتيك المركز.
- محلول ٥ % ألفا- نافثول (٥٠جم/لتر مذاب في كحول الإيثانول ويجب أن يكون حديث التحضير)
- محاليل بعض الكربوهيدرات.
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. ضع في أنبوبة الاختبار ٢ مل من محلول الكربوهيدرات.
٢. أضف ٣ نقط من محلول ٥ % ألفا- نافثول.
٣. أضـــف باحتراس وببطء (على جانب الأنبوبة) ٢ مل من حمض الكبريتيك المركز مع عدم الرج بحيث تتكون طبقتان تفصل بينهما حلقة بنفسجية اللون في حال وجود مواد كربوهيدراتية، ينتشر هذا اللون البنفسجي عند رج الأنبوبة ليتلون الخليط كله باللون البنفسجي. تعتمد كثافة اللون على تركيز المادة السكرية المختبرة.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

لماذا تعطي جميع السكريات نتيجة إيجابية مع اختبار موليش ؟

.....

.....

هل لاحظت سخونة في الأنبوبة عند نهاية التجربة مع أنك لم تقم بتسخينها ! ماهو تعليلك ؟

.....

.....

٣,٣,٣. الاختبارات الاختزالية Reducing Tests

تُقسم السكريات إلى سكريات مختزلة أو غـــير مختزلة، فإذا وجدت مجموعة كربونيل (C=O) حُره سُميت بالسكريات المختزلة أما إذا ارتبطت تلك المجموعة بمادة أخرى و أصبحت غـــير حرة (مثل السكر الثنائي سكروز) فإنها تفقد صفاتها الاختزالية.

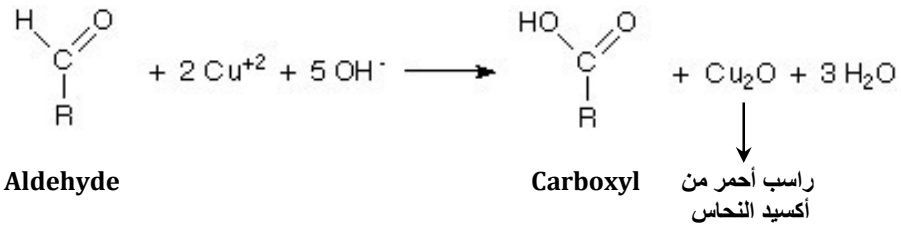
٣,٣,٣,١. اختبار بندكت Benedict's Test

يُميز السكريات المختزلة (الجلوكوز - الفركتوز - المالتوز - اللاكتوز - الرايبوز) عن غير المختزلة (السكروز).

النظرية العلمية للاختبار:

تتميز السكريات الألدهيدية والكيتونية بقدرتها الاختزالية لكثير من المواد المؤكسدة (لذلك تُصنّف بأنها عوامل مختزلة قوية) وبذلك تتأكسد مجموعة الألدهيد والكيتون إلى مجموعة كربوكسيلية.

اختبار بندكت يميز السكريات المختزلة Reducing Sugars (هي السكريات المحتوية على مجموعة ألدهيد أو كيتون حرة مجاورة لمجموعة كحولية حرة). تختزل السكريات المختزلة مثل الجلوكوز محلول كاشف بندكت (يحتوي على أيونات النحاسيك في وسط قاعدي) حيث يؤدي الوسط القاعدي إلى تحول التركيب الحلقي للسكر (هيمي أسيتال) إلى التركيب المفتوح (الصورة الألدهيدية أو الكتونية). ثم تؤكسد أيونات النحاسيك مجموعة الألدهيد أو الكيتون إلى مجموعة كربو كسيل وبالتالي تُختزل أيونات النحاسيك إلى نحاسوز وتكون على هيئة راسب أحمر من أكسيد النحاسوز.



المواد و الأدوات:

- محاليل سكرية مختلفة (١ %)
- كاشف بندكت (كبريتات النحاس + كربونات الصوديوم + سترات الصوديوم)
- حمام مائي يغلي.
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. ضع ١ مل في كل أنبوبة من محلول السكر.
٢. أضف ٢ مل من كاشف بندكت ورج المزيج.
٣. ضع الأنابيب في حمام مائي يغلي لمدة دقيقة واحدة.
٤. أترك الأنابيب لتبرد ولاحظ تكون راسب أحمر أو برتقالي أو أخضر وذلك حسب كمية السكر المختزل. في غياب السكريات المختزلة يتكون لون أسود من أكسيد الحديديك.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

أي من السكريات تختزل كاشف بندكت ؟ ولماذا ؟ اذكر مثال علي ذلك؟

.....

.....

.....

أي من السكريات لا تختزل كاشف بندكت ؟ ولماذا ؟ اذكر مثال علي ذلك؟

.....

.....

.....

بالرغم من أن السكروز والمالتوز كل منهما سكر ثنائي إلا أن أحدهما مختزل والآخر غير مختزل. كيف تفسر ذلك؟

.....

.....

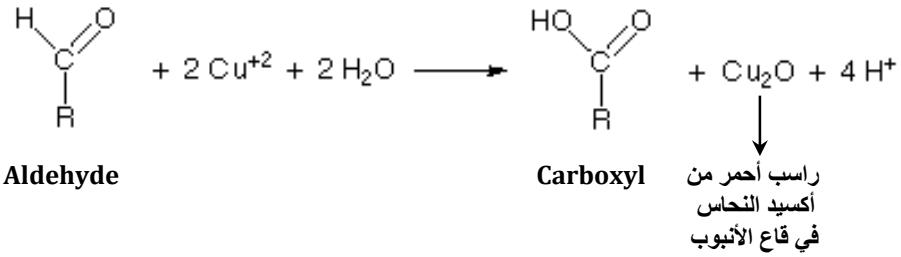
.....

٣,٣,٣,٢. اختبار بارفويد Barfoed's Test

يميز السكريات الأحادية المختزلة (الجلوكوز- الفركتوز- الأرابينوز- الرايبوز) عن السكريات الثنائية المختزلة (المالتوز - اللاكتوز).

النظرية العلمية للاختبار:

في هذا الاختبار تقوم السكريات باختزال محلول كاشف بارفويد (يتكون كاشف بارفويد من محلول خلات النحاس في حمض الخليك) في وسط حمضي بدلاً من الوسط القلوي كما هو الحال في اختبار بندكت. وفي هذه الظروف تستجيب السكريات الأحادية المختزلة للاختبار أسرع من السكريات الثنائية المختزلة حيث تتفاعل السكريات الثنائية المختزلة ببطء. لكن يلاحظ أنه عند زيادة التسخين فوق خمس دقائق فان السكريات الثنائية سوف تتحلل بفعل الحرارة إلى سكريات أحادية وبذلك تعطي نفس النتيجة.



Aldehyde **Carboxyl** **راسب أحمر من أكسيد النحاس في قاع الأنبوب**

المواد و الأدوات:

- محاليل سكرية مختلفة (١ %)
- كاشف بارفويد (يذاب ١٣,٣ جم من خلات النحاس في ٢٠٠مل ماء ثم يضاف ١,٨ جم من حمض الخليك).
- حمام مائي يغلي.
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. ضع ١ مل من محلول السكر في أنبوبة اختبار.
٢. أضف ١ مل من كاشف بارفويد ثم رج الأنبوب.
٣. ضعها في حمام مائي يغلي لمدة ٢-٣ دقائق.
٤. لاحظ تكون راسب أحمر طوبي في قاع الأنبوب يدل على وجود سكر أحادي مختزل.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

لماذا يجب عدم ترك الأنابيب تغلي لمدة تتجاوز خمس دقائق؟

.....

.....

.....

ما وجه الاختلاف بين اختبار بندكت و اختبار بارفويد؟

.....

.....

.....

ما الفرق بين السكريات التي أظهرت نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار وتلك التي لم تُظهر؟

.....

.....

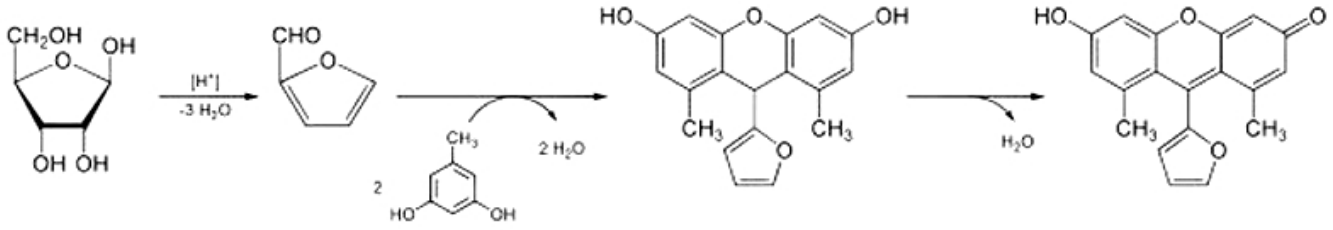
.....

٣،٣،٤. اختبار بيال Bial's Test

يستخدم هذا الاختبار للتمييز بين فئتين متقاربتين في التركيب الكيميائي هما السكريات الأحادية خماسية ذرات الكربون C_5 (البنتوزات مثل الارابينوز والرايبوز) والسكريات الأحادية سداسية ذرات الكربون C_6 (الهكسوزات مثل الجلوكوز والفركتوز).

النظرية العلمية للاختبار:

عند تسخين محلول السكر الخماسي (البنتوز) مع حمض الهيدروكلوريك المركز لمدة قصيرة يتم نزع ٣ جزيئات ماء و يتكون مركب الفورفورال وهذا المركب الوسطي بدوره يتفاعل مع كاشف بيال (يتكون من مركب الأورسينول في وجود أيونات الحديديك) حيث يتكون معقد ذو لون أخضر مائل إلى الأزرق. بينما إذا تم تسخين محلول السكر السداسي (الهكسوز) مع حمض قوي يتكون مركب هيدروكسي ميثايل فورفورال وهذا المركب الوسطي أيضاً يتفاعل مع كاشف بيال ولكن ينتج عنه معقد ذو لون أحمر فاتح.



Pentose **Furfural** **Orcinol** **Bluish Green dye**

المواد و الأدوات:

- كاشف بيال (يذاب ١,٥ جم من الأورسينول في ٥٠٠ مل من حمض الهيدروكلوريك المركز ثم يضاف ٢ مل من محلول ١٠% كلوريد الحديديك)
- محاليل سكرية مختلفة (١ %).
- حمام مائي يغلي.
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. ضع ١ مل من محلول السكر في أنبوبة اختبار.
٢. أضف ٢ مل من كاشف بيال ثم رج الأنبوب.
٣. ضعها في حمام مائي يغلي لمدة ٢-٣ دقائق.
٤. لاحظ تكون لون أخضر مائل إلى الأزرق يدل على وجود سكر أحادي خماسي ذرات الكربون.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

ماهي السكريات التي تتفاعل مع كاشف بيال؟

.....

.....

.....

ما هو المركب الذي يتكون خلال التفاعل والذي بدوره يتفاعل مع كاشف بيال؟

.....

.....

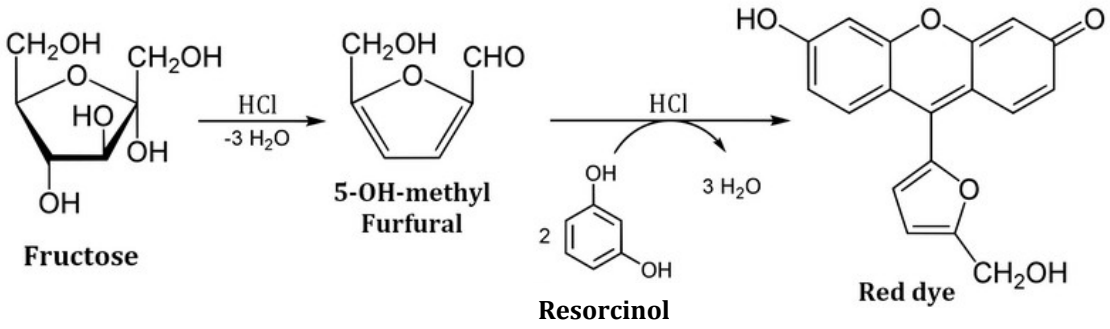
.....

٣,٣,٥. اختبار سيليفانوف Seliwanoff's Test

يستخدم هذا الاختبار لتمييز السكريات الأحادية الكيتونية (الفركتوز) عن السكريات الأحادية الألدهيدية (الجلوكوز)، كذلك السكريات الثنائية التي تعطي سكريات كيتونية بالتحلل المائي مثل السكروز.

النظرية العلمية للاختبار:

تختلف السكريات الكيتونية عن السكريات الألدهيدية في أنها تفقد جزيئات الماء بسهولة وتكوّن مركب هيدروكسي ميثايل فورفورال الذي يتكثف مع كاشف سيليفانوف (يتكون من مركب الريزورسينول مع حمض الهيدروكلوريك) ليتكون معقد أحمر اللون. وعلى ذلك يجب ألا يُسخن المحلول لمدة طويلة وإلا فإن السكريات الألدهيدية تعطي نتيجة إيجابية أيضاً.



المواد و الأدوات:

- كاشف سيليفانوف (٠,٥ جم ريزوسينول/لتر من حمض الهيدروكلوريك ٣ عياري)
- محاليل سكرية مختلفة (١ %).
- حمام مائي يغلي.
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. ضع ١ مل من محلول السكر في أنبوبة اختبار.
٢. أضف ٢ مل من كاشف سيليفانوف ثم رج الأنبوب.
٣. ضع المحلول في حمام مائي يغلي لمدة ٥ دقائق.
٤. لاحظ تكون لون أحمر داكن مع السكريات السداسية الكيتونية بينما السكريات السداسية الألدهيدية تعطي لون احمر قرمزي فاتح ببطء.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

ماهي السكريات التي تعطي نتيجة إيجابية مع كاشف سيليفانوف؟

.....

.....

.....

٤. الكربوهيدرات (٢)

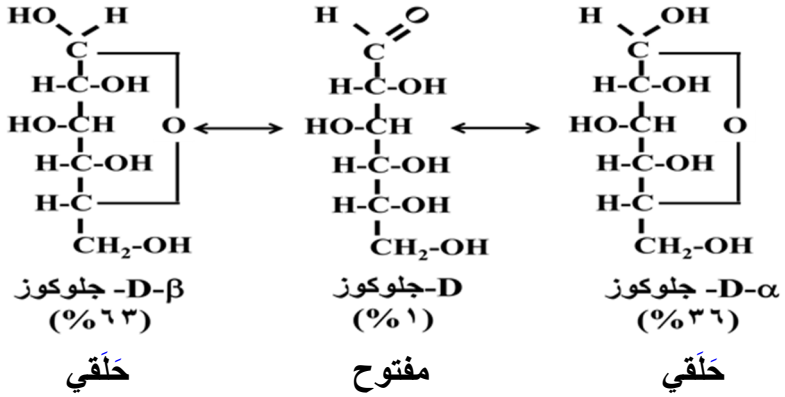
هناك نوعان من الكربوهيدرات:

١. **كربوهيدرات بسيطة:** تتكون من السكريات الأحادية فقط

٢. **كربوهيدرات معقدة:** تتكون من جزيء سكري وجزيء آخر غير سكري مثل البروتينات وتسمى جلايكوبروتين أو الدهون وتسمى جلايكوليبيد.

٤,١.التركيب الحلقي للسكريات الأحادية

أثبتت الدراسات أن السكريات الأحادية توجد في محاليلها على هيئة الصورة الحلقية وتسمى هيمي أستيال Hemiacetal وأن السلسلة المفتوحة تُعد ذات نسبة ضئيلة جداً في المحلول و الشكل الحلقي ينتج عنه أشكال متناظرة بناءً على ارتباط ذرة الكربون رقم ١ في الجلوكوز الحلقي، فإذا كانت مجموعة الهيدروكسيل إلى أسفل أو اليمين يطلق على المتناظر ألفا (α) والعكس إذا اتجهت إلى أعلى أو اليسار يطلق عليه بيتا (β).



٤,٢.الكربوهيدرات عديدة التسكر :

هي كربوهيدرات ينتج من تحللها المائي عدد كبير من السكريات الأحادية و تتكون هذه السكريات من سلسلة طويلة جداً ممكن أن تكون مستقيمة أو متفرعة مرتبطة بواسطة روابط جلايكوسيدية Glycosidic Bonds ، وقد تكون متجانسة أي أنها تحتوي على نوع واحد من السكريات الأحادية كالنشاء أو السيليولوز، أو تكون غير متجانسة أي أنها تحتوي علي أكثر من نوع من السكريات الأحادية كالهيبارين. وتتحلل السكريات العديدة عموماً وكذلك المتعددة والثنائية بواسطة الأحماض القوية أو الإنزيمات التي تحلل تلك الروابط إلى مكوناتها من السكريات الأحادية.

٤,٣.الاختبارات الوصفية للسكريات العديدة والثنائية Qualitative Tests for Di and Ploy Saccharides

٤,٣,١. اختبار اليود Iodine Test

يستخدم هذا الاختبار للتمييز بين السكريات العـديدة (النشاء – الجلايكوجين – الديكسترين - الأنيولين) والسكريات الأخرى (الأحادية و الثنائية). حيث تعطي بعض السكريات العـديدة مثل النشاء (أمايلوز و أمايلوبكتين) و الجلايكوجين و الدكسترين ألواناً مميزةً عند إضافة اليود إليها.

النظرية العلمية للاختبار:

تعتمد فكرة هذا التفاعل على ظاهرة فيزيائية لونية وليس تفاعلاً كيميائياً، حيث يتموضع اليود بين طيّات السلاسل الكربوهيدراتية الحلزونية لجزيء الأمايلوز مثلاً ويعطي لون أزرق داكن ناتج عن انعكاس الضوء، هذا اللون يزول بالتدفئة ويعود بالتبريد مرةً أخرى و الأمايلوبكتين يعطي لون بنفسجي مع اليود، بينما يعطي الجلايكوجين لوناً بنياً ويعطي الديكسترين ألواناً تتدرج من البنفسجي الفاتح إلي البني إلي الأصفر تبعاً لعدد وحدات الجلوكوز بجزيء الدكسترين، ولا يعطي الأنيولين أي لون مع اليود. وكذلك لا تعطي السكريات الأحادية أو الثنائية نتائج إيجابية مع هذا الاختبار.

المواد و الأدوات:

- محلول اليود (يذاب ٠,٦ جم من اليود في ٥٠٠ مل من محلول يوديد البوتاسيوم ٣%)
- محاليل سكريات عديدة (النشاء - الجلايكوجين - الديكسترين)
- محاليل سكريات أحادية وثنائية (جلوكوز - سكروز)
- حمام مائي.
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. ضع ٢ مل من محلول الكربوهيدرات في أنبوبة اختبار.
٢. أضف ٣ نقط من محلول اليود.
٣. رج جيداً ولاحظ اللون المتكوّن، بعد ذلك سخن الأنبوبة ولاحظ اختفاء اللون ثم برد الأنبوبة ولاحظ عودة اللون مرةً أخرى.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

لماذا يعطي النشاء والجلايكوجين نتيجة إيجابية بينما لا يعطي الجلوكوز ولا السكروز نفس النتيجة؟

.....

.....

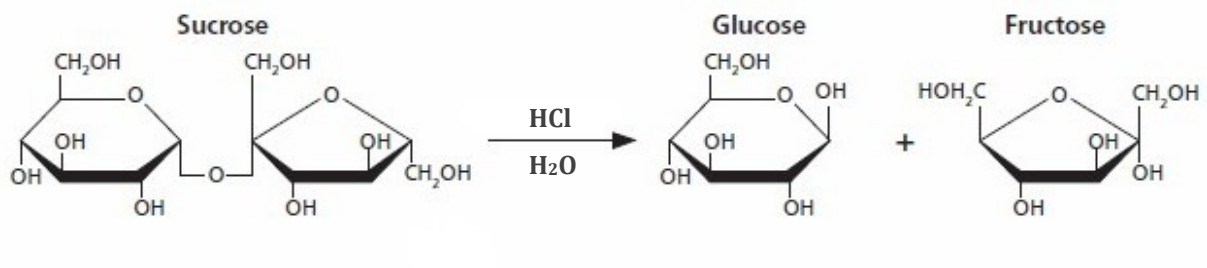
.....

٤,٣,٢. التحلل المائي للسكروز Sucrose Hydrolysis

يستخدم هذا الاختبار للكشف عن نواتج التحلل المائي للسكروز بواسطة حمض الهيدروكلوريك المركز حيث يتم كسر الرابطة الجلايكوسيدية وإضافة جزيء ماء.

النظرية العلمية للاختبار:

السكروز سكر ثنائي يتكون من ارتباط جزيء من الجلوكوز مع جزيء من الفركتوز في الذرتين ١ و ٢ على الترتيب ولذا لا توجد مجموعات مختزلة في السكروز وبالتالي فإنه لا يمتلك الخواص الاختزالية فلا يؤثر على كاشف بندكت أو كاشف بارفويد إلا في حال تحلله إلى مكوناته من السكريات الأحادية. فعند تحلله مائيا يعطي السكرين المختزلين الجلوكوز والفركتوز فيكتسب خواصاً اختزالية مما يسهل الكشف بطريقة غير مباشرة عن وجوده في المحاليل.



المواد و الأدوات:

- محلول سكروز (١ جم/لتر)
- حمض الهيدروكلوريك المركز.
- محلول هيدروكسيد الصوديوم (٥عياري).
- كاشف بندكت.
- حمام مائي يغلي.
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصه.

طريقة العمل:

١. ضع ٢ مل من محلول السكروز في أنبوبة اختبار.
٢. أضف ٣ نقط من حمض الهيدروكلوريك المركز.
٣. سخن لمدة ٥ دقائق في حمام مائي يغلي ثم أترك الأنبوبة لتبرد.
٤. أضف ٠,٥ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم لتحصل على محلول متعادل أو قلوي.
٥. اكشف عن وجود الجلوكوز و الفركتوز في المحلول وذلك بإجراء اختبار بندكت للكشف عن الجلوكوز أو إجراء اختبار سيليفانوف للكشف عن الفركتوز.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

مما يتكون السكروز؟

.....

.....

.....

السكروز سكر غير مختزل! لماذا؟

.....

.....

.....

٤,٣,٣. التحلل المائي للنشاء Starch Hydrolysis

يستخدم هذا الاختبار للتعرف على طبيعة السكر الأحادي المكون لجزيء النشاء وذلك بالتحلل المائي في وسط حمضي حيث يتكون الجلوكوز الذي يمكن الكشف عنه بواسطة اختبار بندكت.

النظرية العلمية للاختبار:

لا يحتوي جزيء النشاء العملاق إلا على عدد محدد جداً من المجموعات المختزلة ولذا فهو أساساً لا يختزل كاشف بندكت ولا كاشف بارفويد. أما بعد التحلل المائي فينتج عنه الجلوكوز وهو سكر مختزل يمكنه اختزال كاشف بندكت أو بارفويد.

المواد و الأدوات:

- محلول النشاء (١%)
- حمض الهيدروكلوريك المركز
- محلول هيدروكسيد الصوديوم (٥ عياري)
- محلول اليود.
- كاشف بندكت
- هيدروكسيد الصوديوم ١٠%
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.
- حمام مائي.

طريقة العمل:

١. ضع ٢ مل من النشاء في أنبوبة اختبار.
٢. أضف ٣ نقط من حمض الهيدروكلوريك المركز.
٣. سخن في حمام مائي يغلي لمدة ١٠ دقائق، ثم برد المحلول.
٤. أضف ٠,٥ مل من هيدروكسيد الصوديوم لكي يصبح الوسط قاعدياً.
٥. قسم محتوى الأنبوبة إلى أنبوبتين نظيفتين بالتساوي.
٦. أضف لإحدى الأنبوبتين ١ مل من محلول اليود ولاحظ النتيجة.
٧. أضف للأنبوبة الثانية ١ مل من NaOH و ١ مل من كاشف بندكت ثم رج و سخن لمدة ٣ دقائق ولاحظ النتيجة.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

ماذا ينتج من تحلل النشاء؟ وكيف يمكن الكشف عنه؟

.....

.....

.....

٥. الليبيدات Lipids

توجد الدهون طبيعياً في الكائنات الحية، حيث تُمثل حوالي ٥ % من تركيب الخلية الحية، ولها وظائف تركيبية في الخلية، حيث تدخل في تركيب الغشـــاء الخلوي، وتعتبر الدهون مصـــدرا أســـاســـيّاً من مصـــادر الطاقة في الجســـم تفوق كل من الكربوهيدرات والبروتينات.

ويمكن تعريفها بأنها مركبة عضوية غـــير قطبية عديمة الذوبان في الماء ولكنها تذوب في المذيبات العضوية مثل البنزين والإيثر والكلوروفورم وغيرها.

٥,١.الأحماض الدهنية Fatty Acids

هي الوحدات البنائية للدهون، وهي عبارة عن سلسلة هيدروكربونية (Hydrocarbon Chain) طويلة تحتوي في طرفها على مجموعة كربو كسيل (Carboxyl Group). وتنقسم الأحماض الدهنية إلى:

- أحماض دهنية مشبّعة (Saturated Fatty Acids)
- أحماض دهنية غير مشبّعة (Unsaturated Fatty Acids)

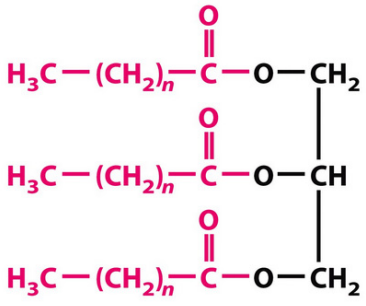
الصيغة العامة للأحماض الدهنية:

$$CH_3\ (CH_2)_n\ COOH$$

يمكن تقسم الليبيدات حسب تركيبها الكيميائي إلى:

أ- ليبيدات بسيطة (Simple Lipids):

وهي إسترات الأحماض الدهنية مع الكحول مثل الجليسيرول، ومن أمثلتها الدهون والزيوت (Fats and Oils). ويعتبر ثلاثي أسايل الجليسيرول Triacylglycerol من أبسط وأكثر الدهون انتشاراً وهو الصورة التي تُخزن عليها الدهون ومخزن الطاقة داخل الخلية. **والصيغة العامة للدهون والزيوت هي**



Triacylglycerol

ب- ليبيدات مركبة (Conjugated Lipids):

وهي دهون تربط مع مركبات أخرى مثل الفوسفوليبيد (Phospholipids) و الجلايكوليبيد (Glycolipids).

ج- ليبيدات مشتقة (Derived Lipids):

وهي مواد توجد ذائبة في الدهون وبالرغم من أن العديد منها ليست إسترات ولكن حيث إنها توجد ذائبة في الدهون أو اشتُقت من تحلل الدهون مائيا فتعتبر جوازاً أنها دهون مشتقة ومن أمثلتها الكولسترول.

٥,٢.الاختبارات الوصفية لـ الليبيدات Qualitative Tests of Lipids

٥,٢,١. اختبار الذوبانية Solubility Test

يهدف هذا الاختبار إلى إثبات أن الزيوت والدهون هي مركبات تختلف في ذوبانها عن الكربوهيدرات و البروتينات نظراً لاختلاف تركيبها الكاره للماء.

النظرية العلمية للاختبار:

لا تذوب الزيوت أو الدهون في الماء نظراً لطبيعتها الغير قطبية (Hydrophobic) ولكنها تذوب في المذيبات العضوية كالإيثر والبنزين والكلوروفورم والكحول المغلي وغيرها.

تختلف الدهون فيما بينها في قابليتها للذوبان في المذيبات العضوية المختلفة ويستفاد من ذلك في فصل خليط من الدهون عن بعضها البعض وعلى سبيل المثال لا تذوب الفوسفاتيدات (Phosphatides) في الأسيتون ولا تذوب السيريبروسايد (Cerebroside) وكذلك السفنجومايلين (Sphingomyelin) المختلفة في الإيثر.

المواد والأدوات:

- زيت الزيتون (أو زيت بذرة القطن) - زبدة - زيت الذرة.
- المذيبات: حمض مخفف - قلوي مخفف - إيثانول - إيثر - كلوروفورم - أسيتون.
- حمام مائي.
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة
- حامل أنابيب

طريقة العمل:

١. ضع ٠,٥ مل من الزيت في ٦ أنابيب اختبار نظيفة جافه.
٢. أضف لكل أنبوبة ٤ مل من أحد المذيبات (الأسيتون و الكلوروفورم و الإيثر و الإيثانول البارد والماء).
٣. رج الأنابيب جيداً ، ثم اترك المحاليل لمدة حوالي دقيقة واحدة.
٤. لاحظ النتائج ، فإذا انفصل المحلول إلى طبقتين فيكون الزيت غير ذائب وإما إذا تكونت طبقه واحدة متجانسة شفافة يكون الزيت ذائباً في المذيب.
٥. دون النتائج في الجدول.

النتائج:

المذيب / الليبيد	مـدى الذوبانية				
	الأسيتون	الكلوروفورم	الإيثر	الإيثانول البارد	الماء
زيت الزيتون					
زيت بذرة القطن					
زيت الذرة					
زبدة					

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

أي المذيبات يعتبر أفضل المذيبات لليبيدات ؟

.....

.....

أي المذيبات يعتبر أسوا المذيبات لليبيدات ؟

.....

.....

ما أنواع الأحماض الدهنية الموجودة في الأغذية الشائعة الاستخدام مثل:

زيت دوار الشمس

.....

زيت الزيتون

.....

زيت الذرة

.....

الزبدة

.....

شمع النحل

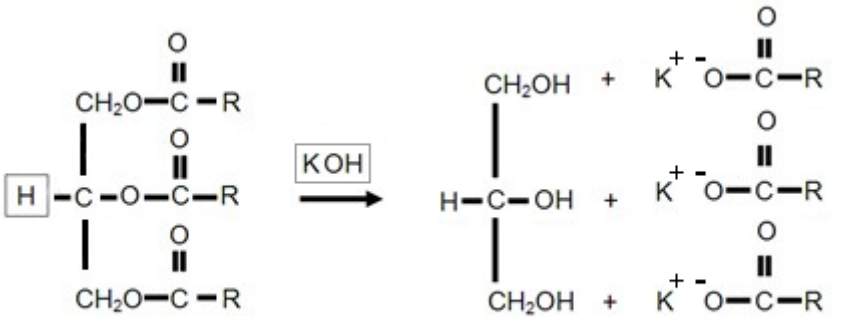
.....

٥,٢,٢. اختبار التصبن Saponification Test

يهدف هذا الاختبار إلى معرفة التركيب الكيميائي للصابون و طريقة عمله كمنظف ومزيل للزيوت والأوساخ.

النظرية العلمية للاختبار:

التصبن عبارة عن عملية تحليل الزيت أو الدهن مائيا في وسط قلوي (قاعدي) وينتج عن ذلك جليسيرول وأملاح الأحماض الدهنية (الصابون Soap) ويمكن استخدام عملية التصبن في فصل المواد القابلة للتصبن عن المواد الغير قابلة للتصبن (التي توجد ذائبة في الدهون) ويمكن توضيح عملية التصبن كما يلي :



Triacylglycerol **Glycerol** **Salts of Fatty Acids (SOAP)**

يمكن تعريف الصابون على انه الأملاح المعدنية للأحماض الدهنية. والصابون قابل للذوبان في الماء ولكنه غير قابل للذوبان في الإيثر. ويعمل الصابون على استحلاب الزيوت والدهون في الماء حيث أنه يعمل على تقليل الجذب السطحي للمحلول .

المواد والأدوات:

- زيت الذرة أو زيت الزيتون.
- محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (20% KOH).
- حمام مائي يغلي.

طريقة العمل:

١. ضع ١ مل من الزيت في أنبوبة اختبار كبيره (خذ في الاعتبار أن هذا محتوى هذا الأنبوب سيُستخدم في جميع التجارب اللاحقة فاحرص على تطبيق الخطوات بشكل دقيق لتحصل على نتائج صحيحة)
٢. أضف ٥ مل من هيدروكسيد البوتاسيوم.
٣. ضع الأنبوب في حمام مائي يغلي لمدة ٥ دقائق.
٤. برّد الأنبوبة تحت ماء الصنبور (في هذه الخطوة يتكون صابون ذائب وللتأكد رج الأنبوب ولاحظ تكون الرغوة).
٥. أضف بشكل بطيء ١٠ مل من الماء المقطر.
٦. احفظ جميع المحلول الناتج لإجراء التجارب المتبقية.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

الأسئلة:

ما هو التركيب الكيميائي للصابون ؟

.....

.....

.....

ما فائدة إضافة هيدروكسيد البوتاسيوم في هذا الاختبار؟

.....

.....

.....

اذكر أهم النواتج لعملية التصبن؟

.....

.....

.....

لو استخدمت أحماض دهنية بدلاً من الزيت فهل تتوقع أن تحصل على الصابون ؟

.....

.....

٥,٢,٣. اختبار فصل الصابون من المحلول بالتمليح Salting Out of Soap

يمكن بواسطة هذا الاختبار الحصول على الصابون من محلوله وذلك بعملية التمليح (Salting Out)

النظرية العلمية للاختبار:

عند إضافة كلوريد الصوديوم الصلب أو المذاب في الماء المقطر إلى محلول الصابون حتى درجة التشبع ينفصل الصابون على صورة غـــير ذائبة ويطفو فوق السطح ، وذلك لأن كلوريد الصوديوم مركب شره للماء فهو ينافس جزيئات الصابون على الارتباط مع جزيئات الماء.

المواد والأدوات:

- محلول الصابون (الذي تم تحضيره في التجربة الأولى).
- ملح كلوريد الصوديوم الصلب NaCl.
- كأس زجاجي صغير.

طريقة العمل:

١. ضع ٢-٣ مل من محلول الصابون في كأس صغير (سعة ٢٥ مل).
٢. أضف ١ مل من محلول كلوريد الصوديوم الذائب (NaCl) ثم حرك المحلول.
٣. أضف كمية أخرى كافية من محلول كلوريد الصوديوم الذائب مع التحريك المستمر حتى تلاحظ انفصال الصابون على هيئة قطع صغيرة على سطح المحلول.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

ما سبب انفصال طبقة الصابون على السطح عند إضافة الملح؟

.....

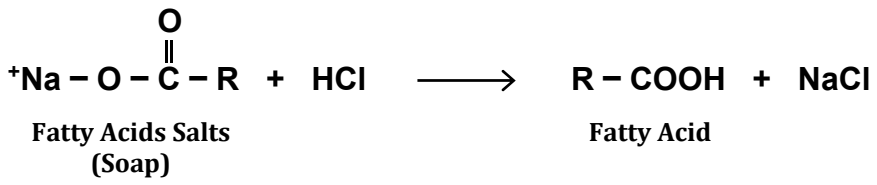
.....

.....

٥,٢,٤. اختبار تكوين الأحماض الدهنية من الصابون Formation of Fatty Acids

النظرية العلمية للاختبار:

عند إضـافة حمض الهيدروكلوريك إلى الصـابون (الأملاح المعدنية للأحماض الدهنية) فإنه يعمل على تحلل الجليسـيريدات إلى أحماض دهنية على صورة حرة غير ذائبة في الماء.



المواد والأدوات:

- محلول الصابون (الذي تم تحضيره في التجربة الأولى)
- حمض الهيدروكلوريك (10% HCl)
- حمام ثلجي

طريقة العمل:

١. ضع ٢ مل من محلول الصابون في أنبوبة اختبار ثم ضعها في حمام ثلجي.
٢. أضف ٥ نقط من حمض الهيدروكلوريك.
٣. لاحظ تكون طبقة زيتية طافية على السطح تدل على تكون الأحماض الدهنية.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

الأسئلة:

ما هو التركيب الكيميائي للطبقة الزيتية الطافية؟

.....

.....

اكتب معادلة حمض الهيدروكلوريك مع الصابون؟

.....

.....

.....

٥,٢,٥. اختبار تكوين أملاح الأحماض الدهنية الغير ذائبة Insoluble Soaps

النظرية العلمية للاختبار:

تعمل أيونات الكالسيوم أو المغنسيوم أو الرصاص أو الحديد على ترسيب الصابون وتجعله غـــير ذائب في الماء حيث تحل هذه الأيونات محل أيونات الصـــوديوم أو البوتاســيوم الموجودة في الصـــابون ، ونظراً لاحتواء الماء العســـر على كميات ملحوظة من أيونات Ca^{++} و Mg^{++} وبعض أيونات Fe^{+++} فيصـعب تكون الرغوة و يتكون صـابون غير ذائب على هيئة راسب أبيض.

المواد والأدوات:

- محلول الصابون (الذي تم تحضيره في التجربة الأولى)
- كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$ 5% Calcium chloride)
- كلوريد المغنيسيوم ($MgCl_2$ 5% Magnesium chloride)
- أسيتات الرصاص Lead Acetate
- أنابيب اختبار نظيفة وجافة

طريقة العمل:

١. ضع في ٢ مل من محلول الصابون في ٣ أنابيب اختبار.
٢. أضف ٥ قطرات من محلول كلوريد الكالسيوم على الأنبوب الأول.
٣. أضف ٥ قطرات من محلول كلوريد الماغنيسيوم على الأنبوب الثاني.
٤. أضف ٥ قطرات من محلول خلات الرصاص على الأنبوب الثالث.
٥. لاحظ تكون صابون غير ذائب يترسب في المحلول.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج
Ca^{++}		
Mg^{++}		
Fe^{+++}		

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

اكتب معادلة تفاعل كلوريد الكالسيوم مع الصابون؟

.....

.....

.....

ماذا يحدث للصابون عند الغسيل بالماء العسر؟

.....

.....

.....

٥,٢,٦. اختبار خلات النحاس Copper Acetate Test

يستخدم هذا الاختبار للتمييز بين الزيت أو الدهن المتعادل و الحمض الدهني المشبع والحمض الدهني غير المشبع.

النظرية العلمية للاختبار:

لا تتفاعل الزيوت أو الدهون مع محلول خلات النحاس أما الأحماض الدهنية المشبعة والغير مشبعة فتتفاعل مع خلات النحاس مكونةً ملح النحاس المقابل. الملح النحاسي المتكون في حالة الأحماض الدهنية الغير مشبعة فقط يمكن استخلاصه بواسطة الإيثر البترولي.

المواد والأدوات:

- زيت الزيتون
- حمض الأوليك (حمض دهني غير مشبع)
- حمض الستيارك (حمض دهني مشبع)
- إيثر بترولي
- محلول خلات النحاس (5%).

طريقة العمل:

١. ضع ٠,٥ مل من كل مادة في ٣ أنابيب اختبار.
٢. أضف ٣ مل من الإيثر البترولي
٣. أضف ٣ مل من محلول خلات النحاس.
٤. رج الأنابيب جيداً واتركها بعض الوقت.

في حالة زيت الزيتون يُلاحظ أن طبقة الإيثر البترولي العليا تحتوي على الزيت مذاباً فيها ويظهر عديم اللون ويبقى المحلول المائي السفلي أزرق اللون ، وفي حالة حمض الأوليك تتلون طبقة الإيثر البترولي العليا بلون أخضر نتيجة لذوبان أوليات النحاس فيها أما الطبقة السفلى فتقل زرقتها ، وفي حالة حمض الستيارك يُلاحظ أن طبقة الإيثر البترولي العليا تبقى عديمة اللون بينما يتكون راسب أخضر باهت من ستيارات النحاس في الطبقة السفلى.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج
زيت الزيتون		
حمض الأوليك		
حمض الستيارك		

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

لماذا لا يتكون راسب أو لون أخضر مع زيت الزيتون في هذه التجربة ؟

.....

.....

.....

ماذا تتوقع أن تكون النتيجة فيما لو استخدمت حمض البالمتيك أو اللينولييك؟

.....

.....

.....

٥,٢,٧. اختبار عدم التشبع بواسطة اليود Desaturation Test by Iodine

تستخدم هذه التجربة للتعرف على طبيعة الأحماض الدهنية في الزيت أو الدهن هل هي من النوع المشبع أو غير المشبع.

النظرية العلمية للاختبار:

يتفاعل اليود (بني اللون) مع المركبات غير المشبعة وذلك بالإضافة على جانبي الرابطة المزدوجة وبذلك يتغير لون اليود.

المواد والأدوات:

- زيت الزيتون.
- حمض الأوليك.
- زبدة.
- حمض الستيارك.
- محلول اليود مذاب في الكحول.
- أنابيب اختبار.

طريقة العمل:

١. ضع ٢ مل من كل محلول في أنبوبة اختبار.
٢. أضف ٣ نقط من محلول اليود.
٣. لاحظ ما يحدث وفسر مشاهدتك.

النتائج:

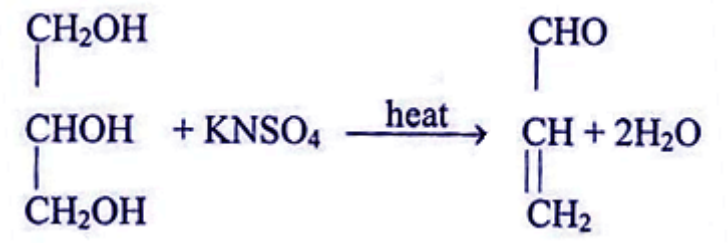
الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج
زيت الزيتون		
حمض الأوليك		
زبدة		
حمض الستيارك		

٥,٢,٨. اختبار الأكرولين Acrolein Test

يستخدم هذا الاختبار للكشف عن وجود الليبيدات حيث تعطي رائحة مميزة مع مركب الأكرولين

النظرية العلمية للاختبار:

تعمل بيكبريتات البوتاسيوم $KHSO_4$ (الصلبة) على نزع جزيئين ماء (Dehydration) من كل جزيء جليسيرول في الزيوت أو الدهون حيث يتحول الجليسيرول إلى أكرولين Acrolein والذي يمكن تمييزه من رائحته النفاذة المهيجة للأغشية.



Glycerol **Acrolein**

ويمكن الكشف عن وجود الدهون بواسطة صبغة Sudan IV (صبغة عامه للدهون) ، حيث تُصبغ الدهون عند إضافتها بصبغه حمراء.

المواد والأدوات:

- أنواع من الزيوت النباتية مثل (زيت الذرة - زيت الزيتون - زبدة)
- جليسيرول Glycerol
- بيكبريتات البوتاسيوم $KHSO_4$
- أنابيب اختبار نظيفة وجافة
- حمام مائي يغلي

طريقة العمل:

١. ضع كمية من بيكبريتات البوتاسيوم الصلبة في حوالي ٠,٥ مل من الجليسيرول في أنبوبة اختبار ، ثم سخن الأنبوبة بحذر في حمام مائي يغلي ولاحظ ظهور رائحة الأكرولين (رائحة مهيّجة للأغشية).

٢. أعد الخطوة السابقة باستعمال أحد أنواع الزيوت النباتية بدلاً من الجليسيرول.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

لماذا يستخدم اختبار الأكرولين كاختبار عام للزيوت والدهون ؟

.....

.....

.....

هل تتوقع أن تحصل على نتيجة إيجابية فيما لو استخدمت مايلي مع توضيح السبب:

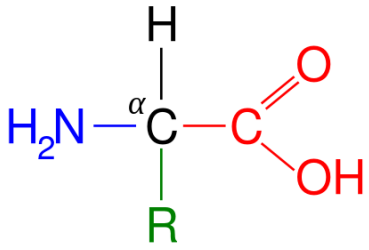
١. حمض الأوليك أو حمض البالمتيك

٢. شمع النحل

٦. الأحماض الأمينية Amino Acids

الأحماض الأمينية هي الوحدات الأساسية لبناء البروتينات. وهناك عشرون حمض أميني تم اكتشافها في الطبيعة. كل حمض أميني يحتوي على الأقل على مجموعة أمين **(NH_2)** ومجموعة كربوكسيل **(COOH)** وذرة هيدروجين ومجموعة طرفيّة **R** (تختلف من حمض إلى آخر).

الصيغة العامة لتركيب الأحماض الأمينية:



تختلف الأحماض الأمينية باختلاف المجموعة الطرفية ولذا أمكن تقسيم الأحماض الأمينية تبعاً لقطبية تلك السلاسل الجانبية (R-group) في المحاليل المائية إلى:

١. **غير قطبية Non polar**
٢. **قطبية متعادلة الشحنة Uncharged polar**
٣. **قطبية موجبة الشحنة Basic polar (positively charged)**
٤. **قطبية سالبة الشحنة Acidic polar (Negatively charged)**

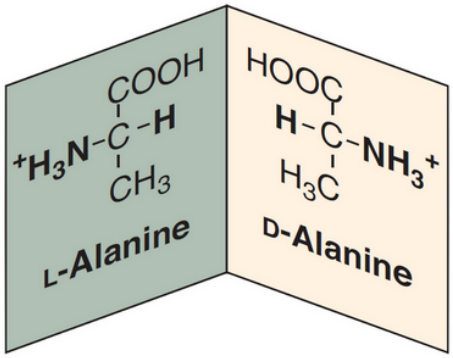
وتتميز الأحماض الأمينية القطبية بكونها أكثر ذوباناً في الماء من الأحماض الأمينية الغير قطبية ويعود ذلك إلى أن المجاميع الطرفية R عبارة عن مجاميع قادرة علي تكوين روابط هيدروجينية مع الماء.
ترتبط الأحماض الأمينية فيما بينها بتفاعل **مجموعة الكربوكسيل** لأحد الأحماض الأمينية مع **مجموعة الأمين** لحمض أميني آخر ويصاحب ذلك فقدان جزيء ماء وتتكون **الرابطة الببتيدية** ويؤدي تكرار هذا الارتباط بين الأحماض الأمينية إلى تكوين جُزيء البروتين.

٦,١.الخواص الكيميائية و الفيزيائية للأحماض الأمينية Chemical & Physical Properties

٦,١,١. النشاط الضوئي Optical Activity

تتميز الأحماض الأمينية بقدرتها على عمل انحراف لاتجاه الضوء المستقطب لاحتوائها جميعاً (باستثناء الجلايسين) على ذرة كربون غير متماثلة (asymmetrical) مرتبطة بأربع مجاميع مختلفة.

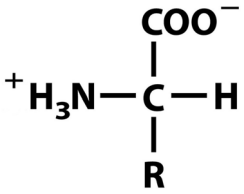
لذا فإن جميع الأحماض الأمينية ذات نشاط ضوئي فتحرف الضوء المستقطب الموجه إليها إما إلى اليمين أو إلى اليسار وتتميز جميع الأحماض الأمينية المكونة للبروتين بأنها من النوع **L** والمقصود بذلك هو ترتيب المجموعات حول ذرة الكربون الغير متماثلة وليس اتجاه الانحراف، فالنوع يعني أنه عندما تكون مجموعة الكربوكسيل لأعلى فإن مجموعة الأمين توجد ناحية اليسار.



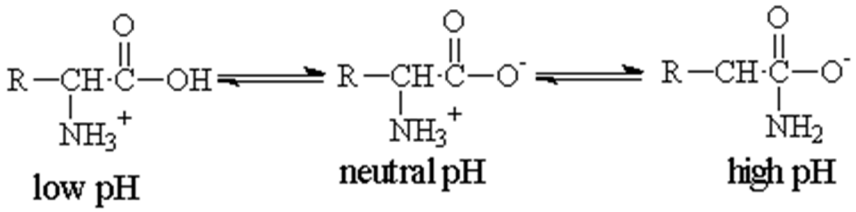
٦,١,٢. الخاصية الأمفوتيرية Amphoteric Property

جميع الأحماض الأمينية تتميز بالخاصية الأمفوتيرية أي أنها عندما تذوب في الماء فإنها تحمل شحنتين (شحنة موجبة وأخرى سالبة) مكونة ما يسمى بالأيون مزدوج الشحنة Zwitter ion وتعمل كحمض (معطي للبروتونات) وكقلوي (مكتسب للبروتونات) في نفس الوقت، حيث تكتسب مجموعة الكربوكسيل الشحنة السالبة (COO^-) لسهولة فقدها البروتون بينما تكتسب مجموعة الأمين الشحنة الموجبة (NH_3^+) لسهولة ارتباطها بالبروتون المنفصل عن مجموعة الكربوكسيل.

إن وجود هذه الحالة من التأين المزدوج يجعل الحمض الأميني قادراً على أن يسلك سلوك الأحماض لوجود مجموعة (COO^-) وسلوك القواعد لوجود مجموعة (NH_3^+).



يحمل الحمض الأميني الشحنة الموجبة في الوسط الحمضي و يحمل الشحنة السالبة في الوسط القاعدي.



وعلية فإن تغيير الأس الهيدروجيني pH للوسط الذي يوجد فيه الحمض الأميني يؤدي إلى تغير محصلة الشحنات عليه و بالتالي على حركته في المجال الكهربي.

٦,١,٣. نقطة التعادل الكهربي Isoelectric Point

هي درجة الأس الهيدروجيني pH الذي تتساوى فيه عدد الشحنات الموجبة والسالبة على الحمض الأميني، بمعنى أن تكون محصلة الشحنات تساوي الصفر، وعندها لا يتحرك الحمض الأميني لأي من القطبين السالب أو الموجب إذا وضع في مجال كهربي وبناءً عليه فإنه يترسب بسهوله عند هذه الدرجة.

٦,١,٤. درجة الانصهار Melting Point

وجود الروابط الأيونية القوية بين جزيئات الحمض الأميني لتكوين البلورات يجعلها صعبة الانصهار لذلك يجب تعريضها لدرجات حرارة عالية تصل إلى (٢٠٠°م) فما فوق.

٦,٢.الاختبارات العامة والوصفية للأحماض الأمينية Qualitative Tests of Amino Acids

٦,٢,١. اختبار الذوبانية Solubility Test

يهدف إلى اختبار ذوبان الأحماض الأمينية في المحاليل القطبية والغير قطبية والأحماض والقواعد للاستدلال على السلوك القطبي والخاصية الأمفوتيرية.

النظرية العلمية للاختبار:

تذوب الأحماض الأمينية في الماء لارتباط جزيئاتها المستقطبة بجزيئات الماء القطبية، و بوجود المجموعات NH_3^+ القاعدية و COO^- الحمضية تُسهّل ذوبان الأحماض الأمينية في القواعد و الأحماض.

الأدوات والمواد:

- أحماض أمينية: جلايسين، جلوتامين، لايسين
- المذيبات: ماء، كلوروفورم، هيدروكسيد الصوديوم، حمض الهيدروكلوريك
- أنابيب اختبار - ماصة.

طريقة العمل:

١. جهّز ٤ أنابيب اختبار ثم ضع ٥ مل من كل من مذيب في أنبوبة.
٢. أضف ٠,٥ جم من الأحماض الأمينية تحت الاختبار (مع تغيير محتوى الأنابيب عند تغيير الحمض تحت الاختبار في كل مرة).
٣. دوّن الملاحظات في الجدول.

النتائج:

الأحماض / الأنبوب	النتيجة			الاستنتاج
	جلايسين	جلوتامين	لايسين	
١. ماء				
٢. كلوروفورم				
٣. هيدروكسيد الصوديوم				
٤. حمض الهيدروكلوريك				

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

مستعيناً بالتركيب الكيميائي كل حمض، أي الأحماض يذوب في المذيبات المذكورة؟ ولماذا؟

.....

.....

.....

من دراسة الاستنتاج، على ماذا تدل هذه التجربة؟

.....

.....

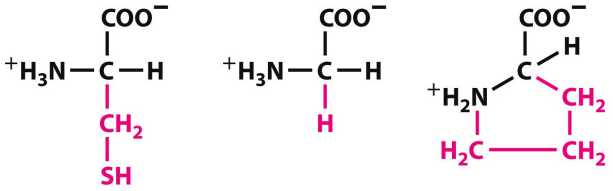
.....

٦،٢،٢. اختبار النينهيدرين Ninhydrin Test

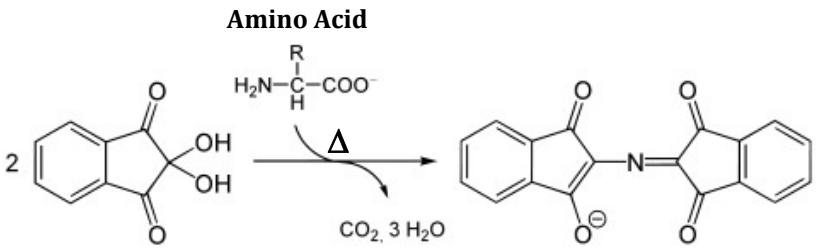
يعد أهم الاختبارات اللونية العامة للكشف عن الأحماض الأمينية.

النظرية العلمية للاختبار:

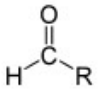
يتفاعل النينهيدرين مع جميع الأحماض الأمينية من النوع α (حيث أن مجموعة الأمين **$-NH_2$** مرتبطة بذرة الكربون **α**) عند درجات حرارة عالية لتكوين المركب الوسطي هيدرين - دانتين و النشادر و يتصاعد ثاني أكسيد الكربون. ثم يتفاعل الهيدرين - دانتين والنشادر مع جزيء آخر من النينهيدرين معطياً معقداً بنفسجي اللون. يُستثنى من ذلك الحمض الأميني برولين Proline حيث يعطي لوناً أصفر.



Cysteine **Glycine** **Proline**



Ninhydrin **Purple Complex**



Aldehyde

المواد و الأدوات:

- محاليل أحماض أمينية مجهولة (١ جم/لتر ماء مقطر)
- محلول النينهيدرين Ninhydrin solution ، (٢ جم/لتر إيثانول)
- حمام مائي يغلي.
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. أضف في كل أنبوب ١ مل من المحلول المجهول.
٢. أضف ١ مل على كل أنبوبة من محلول النينهيدرين.
٣. رج جيداً ثم ضعها في حمام مائي يغلي ثم دوّن ملاحظاتك.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

ما هي الأحماض الأمينية التي تعطي نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار؟

.....

.....

.....

ما هو الحمض الأميني الذي يعطي لوناً أصفر بدلاً من البنفسجي مع هذا الاختبار؟ وماهو السبب ؟

.....

.....

.....

٦,٢,٣. الكشف عن الأحماض الأمينية المحتوية على الكبريت Sulfur Test

هذا الاختبار خاص للكشف عن الأحماض الأمينية المحتوية على مجموعة كبريت وهي السيستين و الميثيونين.

النظرية العلمية للاختبار:

تسخين الأحماض الأمينية التي تحتوي على كبريت مع هيدروكسيد الصوديوم (قاعدة) يحول الكبريت العضوي إلى كبريت غير عضوي والذي بدوره يتفاعل مع أسيتات الرصاص معطياً راسب أسود من كبريتيد الرصاص.

المواد و الأدوات:

- محاليل أحماض أمينية مجهولة (١ جم/لتر ماء مقطر)
- هيدروكسيد الصوديوم (10% NaOH).
- أسيتات الرصاص (5% lead acetate).
- حمام مائي يغلي.
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. ضع في كل أنبوب ١ مل من محلول الحمض الأميني المجهول.
٢. أضف ١ مل من هيدروكسيد الصوديوم.
٣. أضف ٠,٥ مل من أسيتات الرصاص، ثم رج جيداً.
٤. ضع الأنابيب في حمام مائي يغلي لمدة ٥ دقائق.
٥. لاحظ تكوّن راسب أسود في حال وجود الكبريت.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

ما هي الأحماض الأمينية التي تعطي نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار؟ و أكتب الصيغة البنائية لهذه الأحماض ؟

.....

.....

.....

ما التركيب الكيميائي للراسب الأسود الذي يتكون من هذا الاختبار؟

.....

.....

.....

٦,٢,٤. اختبار الزانثوبروتيك Xanthoproteic Test

يستخدم هذا الاختبار للكشف عن حلقة البنزين الموجودة في الأحماض الأمينية العطرية (الأروماتية).

النظرية العلمية للاختبار:

تتفاعل الأحماض الأمينية العطرية المحتوية على حلقة بنزين مع حمض النيتريك المركز HNO_3 عند درجات حرارة عالية (خاصة التايروسين وبدرجة أقل الفينايل آلانين والتربتوفان) مانحاً إياها مجموعة NO_2 ترتبط مع حلقة البنزين، وتسمى هذه العملية Nitration والتي ينتج عنها ظهور لون أصفر واضح.

المواد و الأدوات:

- محاليل أحماض أمينية مجهولة (١ جم/لتر ماء مقطر)
- حمض النيتريك المركز.
- حمام مائي يغلي.
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. ضع في كل أنبوبة ١ مل من محلول الحمض الأميني المجهول.
٢. أضف ١ مل من حمض النيتريك المركز (بحذر) ثم رج جيداً.
٣. ضعها في حمام مائي يغلي لمدة ٣ دقائق.
٤. دوّن ملاحظاتك.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

ما هي الأحماض الأمينية التي تعطي نتائج إيجابية مع هذا الاختبار؟

.....

.....

.....

ما هي المجموعة الوظيفية المسئولة عن إعطاء النتيجة الإيجابية؟ وهل تقتصر هذه النتيجة على الأحماض الأمينية؟ ولماذا؟

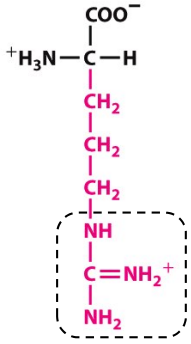
.....

.....

.....

٦,٢,٥. إختبار ساكاجوتشي Sakaguchi Test

هو اختبار خاص يكشف عن مجموعة الجوانيدين guanidine group والتي تشكل جزءاً من تركيب الحمض الأميني آرجينين Arginine



النظرية العلمية للاختبار:

تتفاعل مجموعة الجوانيدين الموجودة في الحمض الأميني آرجنين مع مركب ألفا - نافثول في وجود مركب الهيبوبرومايت كعامل مؤكسد فيُعطي معقد ذو لون أحمر غامق يدل على وجود هذه المجموعة وبالتالي تدل على وجود حمض الآرجينين.

المواد و الأدوات:

- محاليل أحماض أمينية مجهولة (١ جم/لتر ماء مقطر)
- هيدروكسيد الصوديوم (10% NaOH).
- ألفا - نافثول (α- naphthol) في ١٠% الإيثانول .
- محلول هيبوبرومايت الصوديوم (5% Sodium Hypobromite).
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. ضع في كل أنبوبة ١ مل من محلول الحمض الأميني المجهول.
٢. أضف ٢ مل من هيدروكسيد الصوديوم ثم رج جيداً.
٣. أضف ٣ نقط من ألفا - نافثول.
٤. أضف ٠,٥ مل من هيبوبرومايت الصوديوم ثم رج جيداً.
٥. دوّن ملاحظاتك.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

٦،٢،٦. اختبار ميلون Millon Test

وهو اختبار خاص بالكشف عن مجموعة الهيدروكسي فينايل.

النظرية العلمية للاختبار:

تتفاعل مجموعة الهيدروكسي فينايل في الحمض الأميني التيروسين مع كاشف ميلون (هو عبارة عن أيونات الزئبق مذابة في أحماض النترات) فيتكون راسب بني مُحمَرّ من أملاح الزئبق . هذا الكشف إيجابي أيضاً مع مركبات الفينول.

المواد و الأدوات:

- محاليل أحماض أمينية مجهولة (١ جم/لتر ماء مقطر)
- كاشف ميلون (Millon Reagent) يتوفر بشكل تجاري.
- حمام مائي يغلي.
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. ضع في كل أنبوب ١ مل من محلول الحمض الأميني المجهول.
٢. أضف ١ مل من كاشف ميلون على كل أنبوبة ثم رج جيداً.
٣. ضعها في حمام مائي يغلي لمدة دقيقتين (مع الحذر).
٤. دوّن ملاحظاتك.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

دون نتائج التجارب السابقة على كل من الأحماض الأمينية في الجدول:

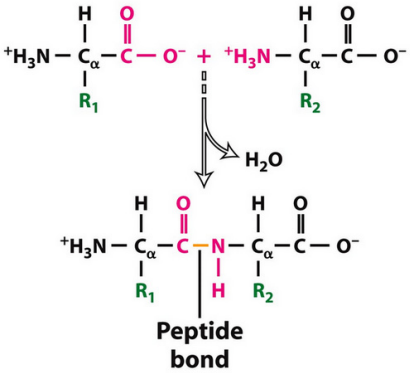
نتيجة الاختبار / الحمض الأميني	اختبار النينهيدرين	اختبار الكبريت	اختبار ساكاجوشي	اختبار زانثوبروتيك
جلايسين Glycine				
سيرين Serine				
برولين Proline				
تريبتوفان Tryptophan				
تايروسين Tyrosine				
فينايل آلانين Phenylalanine				
أرجينين Arginine				
سيستين Cysteine				

٧. البروتينات Proteins

البروتينات عبارة عن مركبات عضوية ذات أوزان جزيئية كبيرة مُكونة من سلاسل من الأحماض الأمينية المرتبطة فيما بينها بروابط ببتيدية (Peptide Bonds).

تلعب البروتينات دوراً هاماً في جسم الكائن الحي حيث تدخل في تركيب العديد من المواد البيولوجية المتخصصة مثل الأجسام المضادة (Anti Bodies) و الإنزيمات (Enzymes) و بعض الهرمونات (Hormones)، كما تساعد في نقل السيالات العصبية والتحكم في التعبير الجيني و هي المكون الأساسي للأنسجة الحية.

يتكون البروتين من سلسلة من الأحماض الأمينية المرتبطة مع بعضها بروابط ببيتيدية حيث ترتبط فيها مجموعة الكربوكسيل من حمض أميني مع مجموعة الأمين من حمض أميني آخر مع فقد جزيء ماء.



تختلف البروتينات عن بعضها البعض في بنائها الكيميائي تبعاً لعدة عوامل:

- عدد ونوع الأحماض الأمينية المكونة لسلاسلها البيبتيدية.
- ترتيب وتتابع الأحماض الأمينية.
- ارتباط البروتين مع جزيئات أخرى غير بروتينية.

٧,١. الأشكال البنائية للبروتين Structural Forms

تأخذ السلاسل البيتيدية المكونة للبروتين أشكالاً فراغية ناتجة عن التفاف تلك السلاسل معطيةً أربعة تراكيب بنائية.

١. **التركيب البنائي الأولي (Primary structure)**

يُعبّر عن تسلسل وتتابع الأحماض الأمينية المرتبطة مع بعضها البعض بروابط ببتيدية.

٢. **التركيب البنائي الثانوي (Secondary structure)**

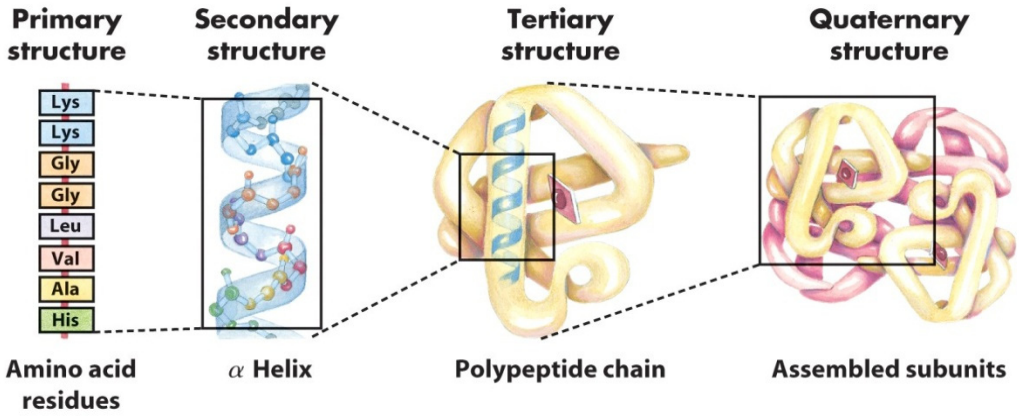
ينتج عن تكوين روابط هيدروجينية بين المجموعات الطرفية R group للأحماض الأمينية مع بعضها البعض مما يتسبب في التفاف والتواء السلسلة البيتيدية مكونةً إما شكل الصفيحة المطوية B-sheet أو الشكل الحلزوني alpha helix.

٣. **التركيب البنائي الثلاثي (Tertiary structure)**

ينتج عن تكوين روابط هيدروجينية بين المجموعات الطرفية R group للأحماض الأمينية البعيدة عن بعضها مكونة الشكل الثلاثي الأبعاد.

٤. **التركيب الرباعي (Quaternary structure)**

وفيه ترتبط وحدات مختلفة أو متشابهة من السلاسل الببتيدية (subunits) مع بعضها البعض لتكوّن الشكل الرباعي الأبعاد للبروتين. مثال جزيء الهيموجلوبين المتكون من أربعة وحدات مرتبطة معاً.



والبروتينات في هذا التركيب تصبح قادرة على أداء وظائف بيولوجية. وتشبه البروتينات في خصائصها الفيزيائية والكيميائية تلك الخصائص التي تتميز بها الأحماض الأمينية المكونة لها، لذا فللبروتينات خاصية أمفوتيرية في تفاعلها مع الأحماض فتحمل شحنة موجبة بينما مع القواعد نجد أنها تكتسب شحنة سالبة، ولذا فإن حركتها في المجال الكهربي تعتمد على قيمة الـ pH للوسط. تبتدأ السلسلة الببتيدية المكونة للبروتينات بالطرف الأميني الحر البروتينات وتنتهي بالطرف الكربوكسيلي.

وتُقسم البروتينات بالنسبة لارتباطها بمركبات غير بروتينية إلى ثلاثة أقسام:

١. **البروتينات البسيطة Simple Proteins:**

وهي التي تحتوي جزيئاتها على أحماض أمينية فقط ، وعند تحللها فإنها تعطي أحماض أمينية فقط مثل الألبيومينات و الجلوبيولينات.

٢. **البروتينات المرتبطة Conjugated Proteins**:

وهي بروتينات ترتبط بجزيئات غير بروتينية مثل البروتينات النووية والبروتينات الدهنية .

٣. **البروتينات المشتقة Derived Proteins:**

وهي جزيئات بروتينية نتجت من تأثير بعض العوامل الطبيعية أو الكيميائية أو الحيوية على البروتينات (مثل الحرارة العالية، الأحماض والقواعد القوية ، الإشعاعات ، تغير الـ pH) حيث غيرت من تركيبها الطبيعي ولكنها تحتفظ بمعظم الخواص العامة للبروتينات.

٧,٢. نقطة التعادل الكهربي للبروتين Isoelectric Point

هي قيمة الأس الهيدروجيني (pH) التي تكون عندها محصلة الشحنات على البروتين تساوي صفر. نتيجة لتساوي الشحنات الموجبة والسالبة على جزيء البروتين وعند هذه النقطة يصبح البروتين أقل كثافة وأقل ذوبانية فيسهل ترسيبه، وتختلف نقطة التعادل الكهربي من بروتين إلى آخر حسب الأحماض الأمينية المكونة له.

٧,٣.الاختبارات الوصفية للبروتينات Qualitative Tests of Proteins

٧,٣,١. اختبار الذوبانية Solubility Test

الهدف من اختبار ذوبانية البروتينات هو اختبار السلوك الأمفوتيري و الخاصية القطبية لجزيئات البروتين، حيث أن البروتينات الليفية مثل الكيراتينات غير قابلة للذوبان بينما البروتينات الكروية تمثل القسم الأعظم وقابلة للذوبان في المذيبات القطبية والأحماض والقلويات بدرجات مختلفة. تُكوّن البروتينات مع الماء محاليل غروية نظراً لكبر حجم جزيئاتها، بينما في الوسط الحمضي غالباً تكتسب جزيئات البروتين الشحنة الموجبة فتتنافر، أما في الوسط القاعدي فتكتسب جزيئات البروتين الشحنة السالبة فتصبح أيضاً قابلة للذوبان.

المواد و الأدوات:

- محاليل بروتينات:
  - البيومين (2% Albumin)
  - محلول جيلاتين (1% Gelatin).
  - محلول كازين (1% Casein).
- محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1% NaOH).
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. اختبر ذوبان كل من البروتينات (البيومين، جيلاتين، كازين) في كل من الماء البارد و الماء الحار و محلول هيدروكسيد الصوديوم (1% NaOH).
٢. سجل قابلية ذوبان كل من البروتينات في جدول النتائج.
٣. دوّن ملاحظاتك وناقش ما لاحظته

النتائج:

البروتين	نوع البروتين	قابلية الذوبان في الماء البارد	قابلية الذوبان في الماء الحار	قابلية الذوبان في 1% NaOH
البيومين	بسيط			
كازين	مرتبط			
جيلاتين	مشتق			

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

بماذا تفسر اختلاف درجات الذوبان من بروتين لآخر؟

.....

.....

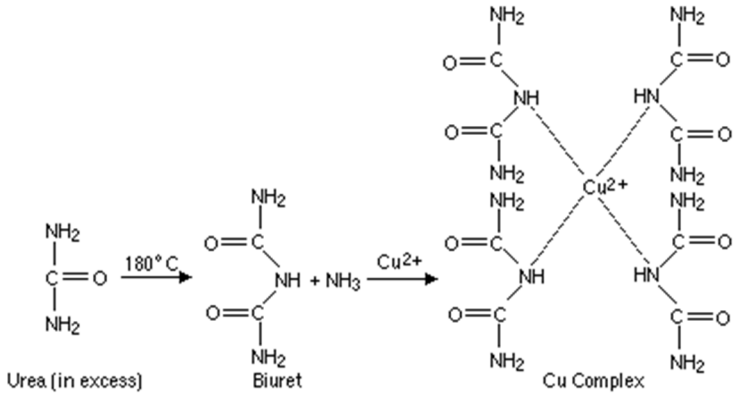
.....

٧,٣,٢. اختبار بيوريت Biuret Test

هو اختبار عام للكشف عن البروتينات الذائبة أو الصلبة. يهدف هذا الاختبار إلى التعرف على البروتينات وتمييزها عن بقية المواد البيولوجية كالكربوهيدرات والليبيدات.

النظرية العلمية للاختبار:

يتفاعل البروتين مع محلول كبريتات النحاس في وسط قاعدي فيعطي نتيجة إيجابية فقط عند وجود رابطتين ببتيديتين فأكثر في جزيء البروتين. فيتفاعل أيون النحاسيك مع مجموعتي (-CO , -NH) في الرابطة البيبتيدية مكوناً أيوناً معقداً بنفسجي اللون و قد تم تسمية هذا المركب باسم مركب بيوريت لأن البيوريت هو المركب الغير بروتيني الوحيد الذي يعطي نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار.



المواد والأدوات:

- محاليل بروتينات و محاليل مجهولة
- محلول كبريتات النحاس ($CuSO_4$ 2%).
- محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH 10%).
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. ضع في كل أنبوبة ١ مل من المحلول المجهول.
٢. أضف ٢ مل من هيدروكسيد الصوديوم.
٣. أضف ٠,٥ مل من كبريتات النحاس ثم رج جيداً.
٤. دوّن ملاحظاتك.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

ماهي البروتينات التي تعطي نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار؟

.....

.....

.....

كم عدد الروابط الببتيدية اللازم توفرها في البروتين لكي يعطي نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار؟

.....

.....

.....

٧,٣,٣. ترسيب البروتينات بأملاح المعادن الثقيلة Precipitation of Proteins by Salts of Heavy Metals

يهدف هذا الاختبار إلى التعرف على تأثير أملاح الفضة و الزئبق على طبيعة تركيب البروتينات و نشاطها الحيوي، وإيضاح خطورة التسمم بالرصاص، وإيضاح إمكانية استخدام البروتينات (الألبيومين) كعلاج في حالات التسمم بالزئبق و الرصاص.

النظرية العلمية للاختبار:

تستخدم هذه الطريقة لفصل البروتينات دون النظر إلى المحافظة على نشاطها الحيوي. تميل البروتينات إلى حمل شحنات سالبة في الوسط المتعادل أو القاعدي ($pH \geq 7$) ويؤدي ذلك إلى ارتباط المجموعات الموجبة لأملاح المعادن الثقيلة مع مجموعة الكربوكسيل السالبة (COO^-) فيحدث تعادل للشحنة ويترسب البروتين.

المواد و الأدوات:

- محاليل بروتينات:
  - البيومين (2% Albumin)
  - محلول جيلاتين (1% Gelatin).
  - محلول كازين (1% Casein).
- نترات الفضة (2% Silver Nitrate $AgNO_3$)
- كلوريد الزئبق (5% Mercury Chloride $HgCl_2$).
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. ضع في كل أنبوب ١ مل من محلول البروتين.
٢. أضف ٠,٥ مل من نترات الفضة.
٣. كرر الخطوات السابقة مع استبدال نترات الفضة بكلوريد الزئبق و قارن النتيجة.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

٧,٣,٤. ترسيب البروتينات بالقلويدات Precipitation of Proteins by Alkaloids

يهدف هذا الاختبار إلى التعرف على تأثير القلويدات (الأحماض) مثل حمض البكريك Picric Acid وحمض التانيك Tanic Acid على طبيعة تركيب البروتينات و نشاطها الحيوي.

النظرية العلمية للاختبار:

تستخدم هذه الطريقة كذلك لفصل البروتينات دون النظر إلى المحافظة على نشاطها الحيوي. حيث تميل البروتينات إلى حمل شحنات موجبة في الوسط الحامضي (pH<7) ويؤدي ذلك إلى ارتباط المجموعات السالبة للقلويدات مع مجموعة الأمين الموجبة (NH_3^+) فيحدث تعادل للشحنة ويترسب البروتين.

المواد و الأدوات:

- محاليل بروتينات:
  - البيومين (2% Albumin)
  - محلول جيلاتين (1% Gelatin).
  - محلول كازين (1% Casein).
- حمض البكريك (10% Picric Acid).
- حمض التانيك (10% Tanic Acid).
- أنابيب اختبار - ماسك - ماصة.

طريقة العمل:

١. ضع في كل أنبوب ١ مل من محلول البروتين.
٢. أضف ٠,٥ مل من حمض التانيك.
٣. كرر الخطوات السابقة مع استبدال حمض التانيك بحمض البكريك و قارن النتيجة.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

٧,٣,٥. أثر الأملاح على ذوبانية البروتين Precipitation of Proteins by Salts

يتم ترسيب البروتينات باستخدام المحاليل المركزة للأملاح و يتميز كل بروتين بتركيز معين للملح يترسب عنده فيتم فصله عن البروتينات الأخرى في المحلول و تسمى هذه العملية salting out

الهدف من الاختبار:

بيان أن التراكيز القليلة من الملح قد تساعد على ذوبان البروتينات بينما التراكيز العالية تسبب ترسيب البروتين.

النظرية العلمية للاختبار:

التراكيز المنخفضة من الملح تساعد على استقرار جزيئات البروتين و إذابته نتيجة للتجاذب بين أيونات الملح و المجموعات الفعالة في البروتين. بينما في التراكيز العالية فإن أيونات الملح تنافس جزيئات البروتين على الارتباط بجزيئات الماء فيقل استقرار البروتين مما يؤدي إلى ترسيبه. وبالرغم من ترسيب البروتينات إلا أنها تحافظ على خصائصها ونشاطها بعد إذابتها وبالتالي فإن هذه الطريقة تستخدم لتنقية البروتينات من محاليلها.

المواد و الأدوات:

- البيومين (2% Albumin)
- محلول كلوريد الصوديوم (1% NaCl).
- ماء مقطر.
- محلول مشبع من كبريتات الأمونيوم (٧٦٧جم/لتر).
- ملح كبريتات أمونيوم (صلب).

طريقة العمل:

١. ضع الألبيومين في بيكر و أضف ٣٠٠ مل ماء مقطر.
٢. يتم إضافة محلول مشبع أو الملح الصلب لكبريتات الأمونيوم بكميات مختلفة.
٣. يفصل الراسب بالطرد المركزي (300 rpm) ويحدد وزن الراسب.
٤. دون النتائج في الجدول.

النتائج:

البروتين	البيومين +٣٠٠مل ماء مقطر	يفصل بالطرد المركزي	إضافة محلول كبريتات أمونيوم مشبع	إضافة كبريتات الصوديوم
ألبيومين				
جلوبيولين				

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

ما درجة التشبع التي يترسب عندها الجلوبيولين؟

.....

.....

.....

كيف تفسر أن البروتين لا يترسب عند تراكيز قليلة من الملح ويزداد ترسبه كلما زاد تركيز الملح؟

.....

.....

.....

٧,٤.التقدير الكمي للبروتينات Quantitative Proteins Estimation

تقدير البروتينات كمياً يساعد على معرفة التراكيز القياسية لبروتينات معينة كما أن له دلالات تشخيصية عند ارتفاع أو انخفاض تركيز البروتينات عن المستوى الطبيعي، وله أهمية في معرفة المحتوى البروتيني للعينات الغذائية.

تعتبر مقدرة الجزيئات على امتصاص أطياف الضوء من أكثر الطرق الكيموحيوية المستخدمة في تقدير كميات الجزيئات في محاليلها، ومن هذه الجزيئات المهمة على مستوى الخلية الحية هي البروتينات التي لها القدرة على الامتصاص الضوئي لوجود بعض الأحماض الأمينية الحلقية العطرية (تربتوفان - فينايل ألانين - تايروسين).

وتوجد أجهزة خاصة لقياس امتصاص الطيف الضوئي تسمى (Spectrophotometer) يمكن من خلالها تقدير كمية تركيز البروتين في العينة عند طول موجي معين.

٧,٤,١. طريقة لاوري Lowry Protein Assay

تقدير البروتينات بطريقة لاوري هي من الطرق الشائعة و ذلك لسهولتها و سرعة إجرائها و كذلك لحساسيتها العالية فهي تستخدم في تقدير البروتينات المخففة عندما يكون تركيزها منخفضاً جداً، و تعتبر طريقة لاوري طريقة مطوّرة و مشتقة من طريقة بيوريت للكشف عن البروتينات.

النظرية العلمية للاختبار:

عند معاملة البروتين بمحلول كبريتات النحاس في وسط قاعدي فإن أيون النحاسيك يكون معقد مع الرابطة الببتيدية في البروتين ويسمى معقد بيوريت، وهذا المعقد يختزل محلول فولن (الذي يتكون من أملاح معقدة من تنجستنات فوسفوموليبدات) ليعطي لون أزرق يمكن قياس الامتصاص الضوئي له عند طول موجي 750nm.

ولتحديد تركيز أي بروتين مجهول يجب إعداد منحنى قياسي (Standard Curve) عن طريق رسم العلاقة بين مقدار الامتصاص الضوئي والتركيز لبروتينات معلومة ومختلفة التراكيز. يمكن من المنحنى القياسي حساب تركيز البروتينات المجهولة بمعرفة مقدار الامتصاص الضوئي لها.

المواد و الأدوات:

- محاليل البيومين سيرم الدم معلومة التراكيز، تحضر بتراكيز (50, 100, 150, 200, 250 ug/ml).
- محاليل بروتين مجهولة التراكيز (تُحضر في نطاق التراكيز المعلومة).
- محلول (a) يحتوي على كربونات الصوديوم ($2\%\ Na_2CO_3$), وهيدروكسيد الصوديوم (0.1M NaOH).
- محلول (b) يحتوي على كبريتات النحاسيك ($0.5\%\ CuSO_4$) وطرطرات الصوديوم والبوتاسيوم (1% Sodium Potassium Tartarate).
- محلول كبريتات النحاس القاعدية، وينتج عن خلط ٥٠ مل من المحلول (a) مع ١ مل من محلول (b) ويجب أن يتم الخلط بين المحلولين قبل إجراء التجربة مباشرة.
- محلول فولن (يجب تخفيف المحلول التجاري بالماء المقطر بنسبة ١:١ قبل الاستعمال).
- جهاز Spectrophotometer و يُضبط على طول موجي 750nm
- ماصات أتوماتيكية.
- عدد ٨ أنابيب اختبار نظيفة.

طريقة العمل:

المحلول	رقم الأنبوبة							
	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨
ماء مقطر	١ مل							
البروتين القياسي 50 ug/ml		١ مل						
البروتين القياسي 100 ug/ml			١ مل					
البروتين القياسي 150 ug/ml				١ مل				
البروتين القياسي 200 ug/ml					١ مل			
البروتين القياسي 250 ug/ml						١ مل		
البروتين المجهول A							١ مل	
البروتين المجهول B								١ مل
محلول كبريتات النحاس القاعدية	٥ مل	٥ مل	٥ مل	٥ مل	٥ مل	٥ مل	٥ مل	٥ مل
رج الأنابيب لمزج محتوياتها و انتظر لمدة ١٠ دقائق								
كاشف فولن	٠,٥ مل	٠,٥ مل	٠,٥ مل	٠,٥ مل	٠,٥ مل	٠,٥ مل	٠,٥ مل	٠,٥ مل
رج الأنابيب لمزج محتوياتها و انتظر لمدة ١٥ دقيقة								
قياس الامتصاص الضوئي للعينات بواسطة جهاز Spectrophotometer عند طول موجي 750 nm								

النتائج :

الأنبوبة	تركيز البروتين ug/ml	الامتصاص الضوئي عند 750nm
١	0	
٢	50	
٣	100	
٤	150	
٥	200	
٦	250	
٧	بروتين مجهول A	
٨	بروتين مجهول B	

- ارسم منحنى قياسي يوضح العلاقة بين تركيز البروتين (على المحور الأفقي) ومقدار الامتصاص الضوئي (على المحور الرأسي) وذلك على ورقة رسم بياني.
- استنتج من الرسم البياني تركيز محلول البروتين المجهول وذلك بمعلومية الامتصاص الضوئي له.

<u>ملاحظة:</u> من الممكن الاكتفاء بتحضير محلول بروتين قياسي واحد فقط ثم نستخدم المعادلة الحسابية التالية لحساب تركيز محلول بروتين مجهول (تعتبر هذه الطريقة غير دقيقة لاعتمادها على عينة قياسية واحدة فقط مما يزيد من نسبة الخطأ):

$$\mathbf{C_2 = \frac{A_2 \times C_1}{A_1}}$$

حيث أن:

$\mathbf{C_1}$ = تركيز محلول البروتين القياسي

$\mathbf{A_1}$ = مقدار الامتصاص الضوئي للبروتين القياسي

$\mathbf{C_2}$ = تركيز محلول البروتين المجهول

$\mathbf{A_2}$ = مقدار الامتصاص الضوئي للبروتين المجهول

الأسئلة:

ما نوع العلاقة بين تركيز البروتين و الامتصاص الضوئي له ؟

.....

.....

.....

قارن بين قيمة تركيز البروتين المجهول المستنتجة بواسطة المنحنى القياسي أو المعادلة الحسابية؟ و أيهما أدق في النتيجة؟

.....

.....

.....

٨. الإنزيمات Enzymes

الوظيفة الأساسية التي تقوم بها الخلايا الحية في الكائن الحي هي إنشاء مركبات معقدة من مواد بسيطة والعكس ، أي تفكيك تلك المركبات المعقدة إلى مواد أبسط ، إن هذه القدرة التي تتمتع بها الخلايا على تكوين مواد عضوية معقدة من مواد أخرى أبسط تركيباً (أو العكس) تحتاج لعدد كبير من التفاعلات الكيميائية المختلفة ، وتخضع هذه التفاعلات لآليات تتحكم في سرعتها واتجاهها عن طريق جزيئات متخصصة تسمى الإنزيمات ، التي يعتمد عملها على تحفيز (تسريع) التفاعلات الكيميائية داخل الخلية وتنظيمها بدقة بحسب حاجة الخلايا .

فالإنزيمات عوامل مساعدة عضوية حيوية تُصنّع داخل الخلية ، وتقوم بعملها من خلال تحفيز التفاعلات داخل الخلية بطريقة تخصصية ، أي أن كل إنزيم يقوم بتنشيط تفاعل محدد أو أكثر من خلال العمل على مادة معينة **(substrate)** أو مجموعة مواد متشابهة كيميائياً دون غيرها ، فالتخصص رغم اختلاف درجة تفاوته من إنزيم لآخر ، يحمي مادة الخلية نفسها ومكوناتها من الهدم ، مع ملاحظة أن عملية التنشيط التي يقـوم بها الإنزيم تعني أن الإنزيم لا يتفاعل بنفسه ولا يتأثر بنواتج التفاعل.

تتركب الإنزيمات في تكوينها من بروتينات بغض النظر عن اسمها ويمكن تقسيمها من حيث التركيب إلى نوعين:

١. **الإنزيمات البسيطة (Simple Enzymes)**

وهي كأي بروتينات بسيطة عبارة عن سلسلة من الأحماض الأمينية المتتالية.

٢. **الإنزيمات المرتبطة (Conjugated Enzymes)**

وهي التي تتكون من شقين ، أحدهما بروتيني والآخر غير بروتيني . علماً بأن المجموعات غير البروتينية هي جزء من المركز الفعّال في الإنزيم ، وتسمى في هذه الحالة باسم **المرافق الإنزيمي (Co-Enzyme)** أو **العامل المعاون (Co-Factor)** ، وهذه الأجزاء غير البروتينية ضرورية لنشاط هذه الإنزيمات .

٨,١.العوامل المؤثرة في نشاط الإنزيمات:

١. تركيز الإنزيم.
٢. تركيز المادة الداخلة في التفاعل (substrate) التي يعمل عليها ذلك الإنزيم.
٣. درجة الحرارة التي يحدث فيها التفاعل.
٤. درجة الأس الهيدروجيني للوسط (قيمة pH) .
٥. وجود مواد مثبطة (inhibitors) تعيق عمل الإنزيم أو تقلل من نشاطه الحيوي.

٨,٢.مبدأ دراسة نشاط الإنزيمات بطريقة عملية:

لنتذكر ما سبق قوله من أن الإنزيم لا يدخل في التفاعل ، ولهذا فإن دراسة نشاطه عملياً تتم من خلال قياس وتتبع المواد المتفاعلة ومدى نقصها أو اختفائها ، وكذلك باختبار ظهور نواتج التفاعل أو زيادتها. فمن الواضح أن اختفاء المواد المتفاعلة أو نقصها ، وظهور نواتج التفاعل أو تزايدها يدل على أن الإنزيم نشط في تحفيزه للتفاعل في الظروف المناسبة للتفاعل .

٨,٣. الاختبارات الوصفية للكشف عن الإنزيمات Qualitative Tests of Enzyme

٨,٣,١. الكشف عن الطبيعة الكيميائية للإنزيمات

النظرية العلمية للاختبار:

من المعلوم سابقاً بأن الإنزيمات هي من أنواع البروتينات وفي دراستنا للبروتينات تعرفنا على الكاشف العام لها وهو اختبار بيوريت ، والمبدأ هنا أن نُجري التجربة المذكورة على محاليل إنزيمات ، فإن ظهرت نتيجة إيجابية نكون قد تحققنا من أن الإنزيم عبارة عن بروتين في طبيعته الكيميائية .

المواد والأدوات:

- محلول إنزيم الأمايليز و محلول إنزيم السكريز.
- محلول كبريتات النحاس $2\%\ CuSO_4$
- محلول هيدروكسيد الصوديوم $10\%\ NaOH$
- أنابيب اختبار نظيفة.

طريقة العمل:

١. ضع في أنبوبة ١ مل من إنزيم الأمايليز ، وفي الأنبوبة الأخرى ١ مل من أنزيم السكريز .
٢. أضف لكل منهما ٢ مل من هيدروكسيد الصوديوم ، ورجّ جيداً
٣. أضف ٠,٥ مل من كبريتات النحاس ، ورجّ جيداً .

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج
إنزيم الأمايليز		
إنزيم السكريز		

الأسئلة:

أكمل الفراغات التالية:

- الكاشف العام للبروتينات هو اختبار ..... .
- نستنتج من النتائج السابقة أن الإنزيمات عبارة عن مواد ..... ، لأنها أعطت نتيجة ..... مع اختبار البيوريت .
- جميع الإنزيمات عبارة عن ..... ، بينما ليس جميع البروتينات ..... .

٨,٣,٢. اختبار نشاط إنزيم الأمايليز α-Amylase Activity Test

تفرزه الغدد اللعابية في الفم ، ليقوم بتحليل النشاء إلى وحدات عديدة من السكر الأحادي (جلوكوز) ، من خلال تفاعل يأخذ عدة خطوات :

$$\textbf{Starch} \xrightarrow{\textbf{α-Amylase}} \textbf{Glucose (}\text{many units}\textbf{)}$$

الهدف من الاختبار:

متابعة نشاطية إنزيم ألفا أمايليز وذلك بالكشف عن نواتج التفاعل مع النشاء.

النظرية العلمية للاختبار:

في هذه التجربة يتم تحضير مستخلص خام من إنزيم الأمايليز من اللعاب ، ولكي نستدل على نشاطية الإنزيم يجب أن نختبر اختفاء النشاء أو بقاءه ، ونختبر كذلك ظهور الجلوكوز من عدمه. هذا وسبق أن درسنا اختبار اليود لفحص وجود النشاء ، واختبار بندكت لفحص وجود السكر الأحادي المختزل (جلوكوز).

المواد والأدوات:

- أنابيب اختبار نظيفة
- محلول نشاء 1% Starch
- محلول إنزيم الأمايليز من اللعاب Salivary Amylase يُحضّر بمضمضة الفم بالماء عدة مرات ووضعه في كأس صغير.
- محلول اليود Iodine Solution يُحضّر بإذابة ٢٥ مجم من اليود في ١٠٠ مل من محلول يوديد البوتاسيوم ٢%
- كاشف بندكت.
- محلول كبريتات النحاس 2% $CuSO_4$
- محلول هيدروكسيد الصوديوم 10% NaOH

طريقة العمل:

١- جهّز أنبوبتي اختبار (أ، ب)

٢- ضع ١ مل من محلول إنزيم الأمايليز في كلا الأنبوبتين.

٣- ضع الأنبوبة (أ) في حمام مائي يغلي لمدة ١٠ دقائق ثم برّده تحت ماء الصنبور ، واترك الأنبوبة (ب) بدون تسخين.

٤- أضف ٢ مل من محلول النشاء إلى كلا الأنبوبتين مع الرج جيداً.

٥- اترك الأنبوبتين في درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق حتى يتم التفاعل بين الإنزيم والنشاء.

٦- جهّز أنبوبتين جديدين واقسم محتوى كل أنبوبة (أ ، ب) إلى قسمين ليصبح لديك (أ١ و أ٢) و (ب١ و ب٢).

٧- أضف ٣ نقط من اليود إلى الأنبوبتين أ١ و ب١ ، ثم لاحظ النتيجة.

٨- أضف ٢ مل من NaOH إلى الأنبوبتين أ٢ و ب٢ ثم أضف لهما ١ مل من كاشف بندكت وسخنهما في حمام مائي يغلي لمدة دقيقتين ، ثم لاحظ النتيجة.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج
أ ١ (مع اليود)		
أ ٢ (مع بندكت)		
ب ١ (مع اليود)		
ب ٢ (مع بندكت)		

مناقشة النتائج:

.....

.....

.....

الأسئلة:

في أي الحالتين وجدت أن الإنزيم غير قادر على تحليل النشاء ؟ ولماذا ؟

.....

.....

.....

٨،٣،٣. اختبار نشاط إنزيم السكريز Sucrase (Invertase) Activity Test

هو أحد إنزيمات العصارة المعويّة التي تفرزها خلايا الأمعاء الدقيقة ليقوم بتحليل السكروز (سكر ثنائي) إلى الجلوكوز والفركتوز (سكريات أحادية).

$$\text{Sucrose} \xrightarrow{\text{Sucrase}} \text{Glucose + Fructose}$$

النظرية العلمية للاختبار:

السكروز سكر ثنائي غير مختزل ، متكون من ارتباط جزيئين مختلفين من سكريات أحادية مختزلة هما الجلوكوز والفركتوز ويتحلل تحت تأثير إنزيم السكريز ، ويمكن الكشف عن نشاط هذا الإنزيم بالكشف عن وجود سكريات مختزلة ناتجة من تحلل السكروز وذلك عن طريق تطبيق تجربة بندكت.

المواد والأدوات:

- محلول السكروز 10%
- محلول إنزيم السكريز ، يُحضّر من الخميرة.
- كاشف بندكت.

طريقة العمل:

١. جهّز أنبوبتي اختبار.
٢. ضع في كل منهما ١ مل من محلول إنزيم السكريز.
٣. ضع الأنبوبة الأولى في حمام مائي يغلي واتركها لمدة ١٠ دقائق ، واترك الأنبوبة الثانية بدون غليان.
٤. برّد الأنبوبة الأولى تحت ماء الصنبور.
٥. أضف ٢ مل من محلول السكروز إلى كلا الأنبوبتين مع الرّج جيداً.
٦. اترك الأنبوبتين في درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق حتى يتم التفاعل بين الإنزيم والسكروز.
٧. أضف ٢ مل من NaOH إلى كلا الأنبوبتين ثم أضف لهما ١ مل من كاشف بندكت وسخنهما في حمام مائي يغلي لمدة دقيقتين ، ثم لاحظ النتيجة.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الاستنتاج

٩. المراجع References

- Abousalah, K. and Alnaser, A., 1996, Principles of Practical Biochemistry.
- Farid Shokry Ataya, 2007, Practical Biochemistry. AlRoshd Publisher, Riyadh, Saudi Arabia.
- Milio, F. R. and Loffredo, W. M., 1995, Qualitative Testing for Amino Acids and Proteins, Modular Laboratory Program in Chemistry, REAC 448.
- David T. Plummer, 1978, An Introduction to Practical Biochemistry