الجمهورية العربية السورية
جامعة المنارة
كلية الصيدلة

جَـامعة
المَـنارة
MANARA UNIVERSITY

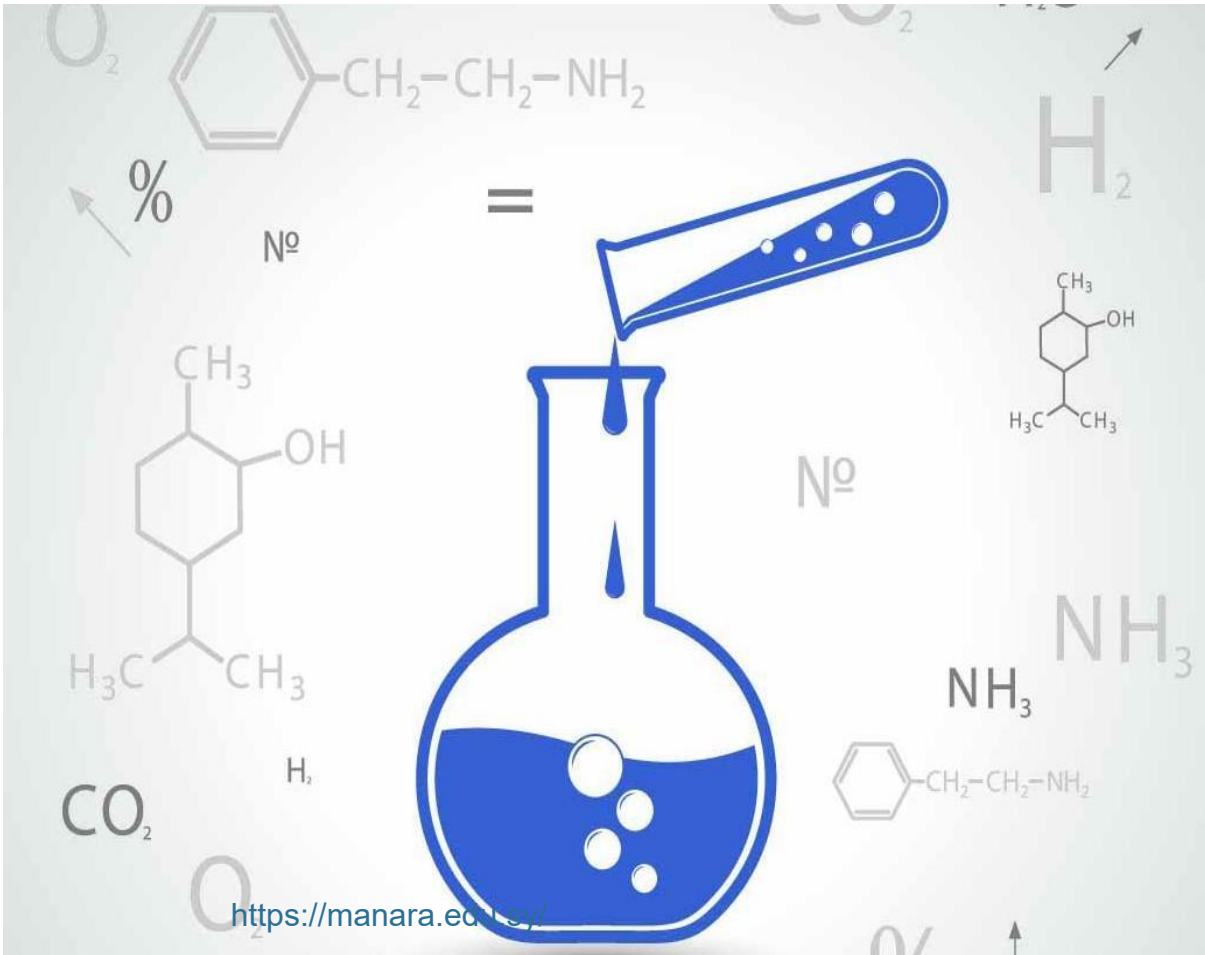
الكيمياء الحيوية 1 – القسم العملي

BIOCHEMISTRY 1- PRACTICAL COURSE

إعداد
د. كارولين بركات

مدرس القسم العملي
د. أماني حلبي

مدرس القسم النظري
د. خلود سفكونة



الفهرس

الجلسة 1: مقدمة في الكيمياء الحيوية وقواعد العمل المخبري 1

الجلسة 2: السكريات (1) اختبارات موليش، سلفانوف، بيال 5

الجلسة 3:السكريات (2) تفاعلات السكريات المرجعة اختبارات فهلنغ، بينديكت، بارفويد..... 11

الجلسة 4: السكريات (3) تفاعلات السكريات المتعددة والكشف عن محلول سكري مجهول 16

الجلسة 5: الأحماض الأمينية والبروتينات (1) اختباري النهيدرين والبيوريت 20

الجلسة 6: الأحماض الأمينية والبروتينات (2) اختبارات الكزنتوبروتئين، هوبكنز كول، ميلون 25

الجلسة 7: الأحماض الأمينية والبروتينات (3) اختبارات فول و ساكاغوتشي 28

الجلسة 8: فصل وترسيب البروتينات 30

الجلسة 9: الكشف عن المركبات الآزوتية (البولة والكرياتينين والنشادر)..... 34

الجلسة 10: الشحوم (1) الكشف عن الحموض الدسمة وثلاثيات الغليسيريد 39

الجلسة 11: الشحوم (2) الكشف عن الكوليسترول 45

جامعة المنارة
MANARA UNIVERSITY

الجلسة 1: مقدمة في الكيمياء الحيوية وقواعد العمل المخبري

مقدمة:

يعرف علم الكيمياء الحيوية بأنه علم كيمياء الحياة، حيث يعنى هذا العلم بدراسة المكونات الرئيسية الداخلة في تركيب المادة الحية، والتي تشمل البروتينات والسكريات والدسم والحموض النووية وجزيئات حيوية أخرى، وتحديد البنية الكيميائية لهذه المركبات، ودورها في العمليات والوظائف الحيوية، والتفاعلات الاستقلابية التي تطرأ عليها داخل الخلايا الحية والتي تشمل الاصطناع (البناء) والتدرك (الهدم). أما الكيمياء الحيوية السريرية فهي أحد فروع الكيمياء الحيوية، وتدعى أيضاً الكيمياء المرضية أو الكيمياء السريرية، وتدرس الاضطرابات التي تطرأ على العمليات الاستقلابية ودلالاتها المرضية. إن العمل في المخابر الكيميائية يتطلب وعياً كاملاً بخطورة المواد المستخدمة، حيث أن كثير من المواد يتصف بالسمية، أو القدرة على تهييج الأغشية المخاطية، ومنها ما هو حارق أو قابل للاشتعال، وغير ذلك من أشكال الخطورة. بالإضافة لذلك فإن مخابر الكيمياء الحيوية يتم التعامل فيها مع عينات حيوية (دم، بول..)، قد تكون مصدراً للعدوى بعوامل ممرضة معينة. بناء على ذلك يجب أخذ الحيطة والحذر وإتباع تعليمات السلامة الموصى بها خلال العمل المخبري.

قواعد العمل والأمان في مخابر الكيمياء الحيوية:

1.التقيد بارتداء لباس خاص مصمم للعمل المخبري من طبيعة قطنية، لا يعيق الحركة، ولونه أبيض، وعدم ارتداء الحلي، وعدم ترك الشعر مفروداً خلال العمل، ويفضل ارتداء نظارات واقية للعينين وكمامات وقفازات خاصة عند التعامل مع المواد الكيميائية الخطرة أو مع العينات الحيوية.

2.يمنع منعاً باتاً تناول الطعام أو الشراب أو التدخين في المخبر.

3.يهيأ مكان العمل قبل البدء بإجراء التجارب المخبرية، وتجهز جميع الكواشف والمحاليل والأجهزة اللازمة، وتغسل الأدوات قبل البدء بالماء العادي ثم بالماء المقطر.

4.توضع عبوات المحاليل والكواشف في أماكن مخصصة ولا يجوز نقلها من مكان إلى آخر. ويراعى عدم تحريك الأنابيب الزجاجية الحاوية على مواد كيميائية فوق رؤوس الزملاء في المخبر.

5.يمنع منعاً باتاً تذوق المادة الكيميائية أو تقريبها من الأنف لمعرفة هويتها، ويتم التعامل مع المواد السامة أو ذات الأبخرة تحت ساحبة الهواء حصراً.

https://manara.edu.sy/

6.توضع اللصاقات على جميع العبوات للدلالة على محتواها والمعلومات الخاصة بالمواد الموجودة فيها. ويجب الانتباه إلى بعض الرموز التي تشير إلى خطورة محتوى العبوات، ومن أهم هذه الرموز:

7.تؤخذ المواد السائلة من العبوات الرئيسية بالممصات او الاسطوانات المدرجة، ويمنع ملء الممصات من خلال الفم عند التعامل مع المواد الكيميائية السامة، وتستخدم لذلك الإجاصات المطاطية.

8.تؤخذ المواد الصلبة بواسطة ملاعق خاصة، ويمنع لمس المواد الصلبة باليد لأن بعضها قد يكون مخرش أو حارق. ويراعى عدم نقل الممصات أو الملاعق بين العبوات المختلفة لمنع تلويثها.

9.يجب الحذر عند تسخين الأنابيب الزجاجية، واستخدام الملاقط الخاصة، وعدم توجيه فوهة الأنبوب أثناء التسخين نحو نفسك أو نحو الأشخاص المجاورين. ولا يجوز خلط المحاليل أو إضافة المواد الصلبة إليها خلال عملية التسخين.

10.لا يجوز تسخين المواد القابلة للاشتعال على اللهب مباشرة إنما عن طريق الحمامات المائية.

11.يجب الانتباه لإعادة الاغطية إلى العبوات بعد الانتهاء وعدم تركها مفتوحة على طاولات العمل، ويمنع منعاً باتاً ترك الأوعية الحاوية على مواد قابلة للاشتعال أو الانفجار عرضة للحرارة أو النار.

المنارة
MANARA UNIVERSITY

12.يرتب وينظف المكان بعد الانتهاء من العمل وتغسل جميع الأدوات ويتم التخلص من الفضلات وبقايا المواد وفق إرشادات المشرف المخبري، ولا تعاد الكميات المتبقية من المحاليل أو المواد الصلبة إلى العبوات الرئيسية بعد الانتهاء من العمل.

13.تسجل المشاهدات ونتائج التجارب سواء كانت إيجابية أو سلبية على دفتر خاص.

الإسعافات الأولية للإصابات الشائعة في المخابر الكيميائية:

1.الحروق:

a. الناجمة عن الحرارة: بحالة حروق الدرجة الأولى يغسل مكان الحرق جيداً بالماء ويطهر بالكحول الإيتيلي ثم يغطى بضماد عقيم، أما في حروق الدرجات المتقدمة ينقل المصاب إلى أقرب مركز طبي.
b. الحروق الناجمة عن الحموض والقلويات: تغسل أولاً بشكل جيد بالماء ثم يغسل مكان الإصابة بمحلول بيكربونات الصوديوم 1% في حال الحموض، أما في حال القلويات تغسل الإصابة بمحلول حمض البوريك 2% أو حمض الخل 2% أو حمض الليمون.
c. الحروق الناجمة عن البروم: يغسل مكان الحرق بالماء جيداً ثم يدهن بالغليسيرين أو الفازلين أو مرهم مضاد للحروق.
d. الحروق الناجمة عن الفينول: يدهن مكان الحرق بالغليسيرين حتى عودة الجلد للونه الطبيعي ثم يغسل جيدًا بالماء ويضمد بشاش عقيم مبلل بالغليسيرين.

2.الجروح:

ينظف مكان الجرح جيداً، ويتم التخلص من بقايا الزجاج بحالة جروح الأدوات الزجاجية وذلك باستخدام ملقط أو بواسطة تيار الماء القوي، ثم يطهر الجرح باليود أو الكحول ويغطى بضماد عقيم.

3.إصابات العين:

في حال تلوث العين بمواد كيميائية تغسل جيداً بكميات كبيرة من الماء، وفي حالة الحموض يتم غسلها بمحلول بيكربونات الصوديوم، أما في حال التلوث بالقلويات فتغسل العين بمحلول حمض البور.

في حال تناثر شظايا زجاجية في العين تتم إزالتها بملقط خاص وتغسل العين بالماء جيداً لحين الوصول إلى الطبيب المختص.

https://manara.edu.sy/

4.ابتلاع المواد الكيميائية:

في حال ابتلاع حمض يخفف بشرب كميات كبيرة من الماء مصحوباً بمحلول بيكربونات الصوديوم، أما في حال ابتلاع قلوي فيخفف بالماء مضافاً إليه الخل أو حمض الليمون أو عصير البرتقال. أما في حال ابتلاع مواد سامة أخرى فيعطى المصاب مقيئاً بأسرع وقت ممكن لمنع امتصاص تلك المواد في المعدة، وينقل إلى أقرب مركز طبي.

جَامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

الجلسة 2: السكريات (1)

أهداف الجلسة:

1. التعرف على التفاعلات اللونية للكشف عن السكريات في محاليلها وتمييزها عن المواد غير السكرية.
2. التعرف على تفاعلات التمييز بين السكريات الألدهيدية (الألدوزات) والكيتونية (الكيتوزات).
3. التعرف على تفاعلات التمييز بين السكريات البسيطة: الخماسية (البنتوزات) والسداسية (الهيكسوزات).

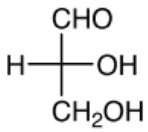
مقدمة:

السكريات هي مركبات كيميائية عديدة الهيدروكسيل تحتوي في صيغتها على زمرة ألدهيدية، كيتونية، حمضية، أو أمينية. تتميز السكريات بطعمها الحلو وتنتشر بشكل واسع في الطبيعة وتتواجد في جميع الكائنات الحية في المملكتين الحيوانية والنباتية على عدة أشكال: فمنها البنائي كالسيللوز في النباتات والكيتين في الحيوانات اللافقارية، ومنها كمخزون للطاقة كالغليكوجين الحيواني، ومنها ما يدخل في تركيب الجزيئات الهامة في الجسم كالسكريات الداخلة في تركيب الحموض النووية.

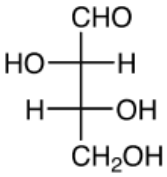
تصنف السكريات بحسب بنيتها إلى قسمين: سكريات بسيطة وسكريات معقدة:

1. السكريات البسيطة: لها الصيغة العامة $Cn(H2O)m$ وهنا نميز تصنيفين للسكريات البسيطة: إما بحسب عدد ذرات الكربون (سكريات ثلاثية، رباعية، خماسية، سداسية...إلخ) وإما بحسب نوع الزمرة الكربونيلية: (الألدوازت تحوي زمرة ألدهيدية، الكيتوازت تحوي زمرة كيتونية).
2. السكريات المعقدة :تنتج من ارتباط عدد من جزيئات السكريات البسيطة مع بعضها البعض (سكريات متجانسة)، أو مع مركبات غير سكرية مثل البروتينات والليبيدات (سكريات غير متجانسة)، عن طريق ما يسمى بالرابطة الغليكوزيدية. تصنف أيضاً السكريات المعقدة إلى سكريات ثنائية (السكروز واللاكتوز والمالتوز) وسكريات قليلة التعدد 3-10 Oligosaccharides(جزيئات سكاكر أحادية) وسكريات متعددة Polysaccharides (أكثر من 10جزيئات سكاكر أحادية مثل السيللوز والنشاء والغليكوجين)

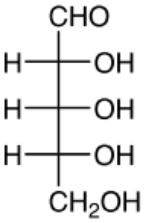
https://manara.edu.sy/



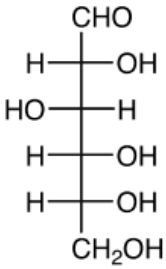
glyceraldehyde (triose)



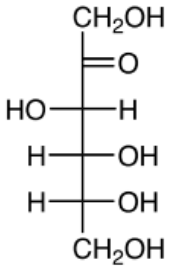
threose (tetrose)



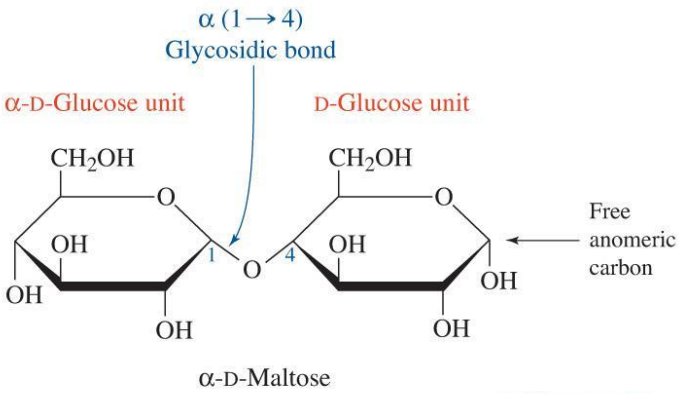
ribose (pentose)



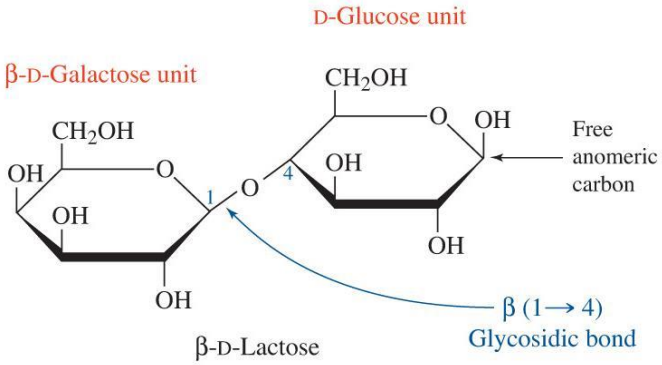
glucose (hexose) (aldohexose)



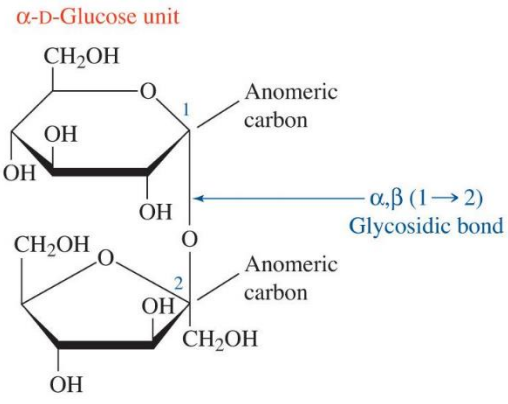
fructose (hexose) (ketohexose)



α-D-Maltose



β-D-Lactose



Sucrose

β-D-Fructose unit

https://manara.edu.sy/

التجارب العملية:

التجربة رقم 1:اختبار موليش Molisch Test:

المبدأ:

تفاعل عام لكافة السكريات، يعطي نتيجة إيجابية مع جميع السكريات الأحادية والثنائية والمتعددة وحتى مع السكريات المرتبطة بالمركبات الأخرى ذات الفعالية الحيوية مثل البروتينات السكرية أو الليبيدات السكرية. يعتمد التفاعل على نزع الماء من السكر وتشكيل المشتق الفورفورالي (الفورفورال من السكر الخماسي وهيدروكسي ميتيل الفورفورال من السكر السداسي) الذي يتحد مع كاشف موليش (محلول كحولي 10 %من ألفا النفتول) معطياً معقدات بنفسجية اللون على شكل حلقة على السطح الفاصل. إن النتيجة السلبية هي دليل على غياب السكريات في الوسط.

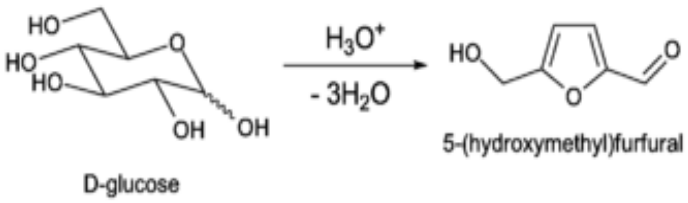
المواد المستعملة:

- حمض الكبريت المركز.
- كاشف موليش: يحضر بإذابة 10غ ألفا نفتول في 100مل من الكحول الايتيلي.
- محاليل سكرية مختلفة (غلوكوز2%، فركتوز2%)
- محلول بروتيني (ألبومين 2%)

طريقة العمل:

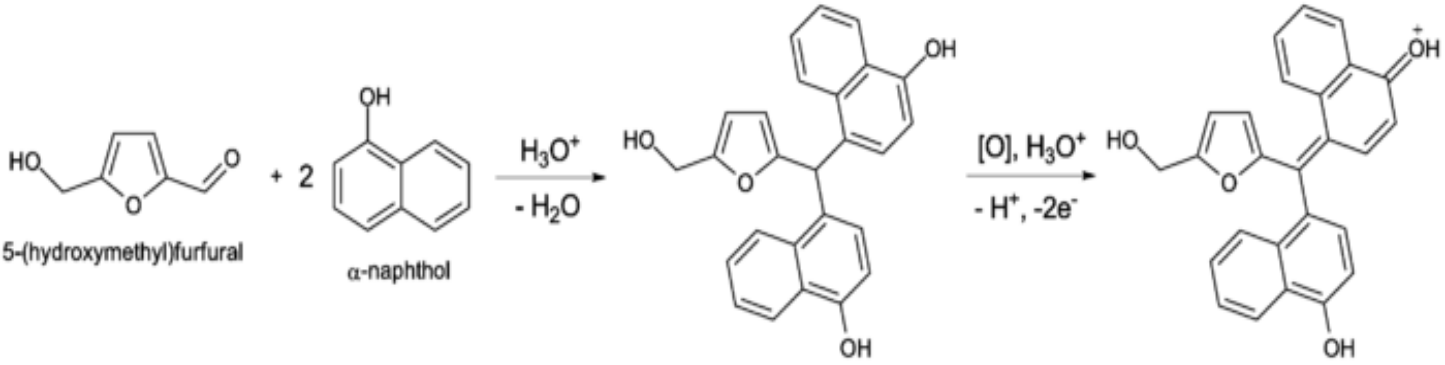
1. ضع 2مل من كل محلول من المحاليل السكرية ومحلول البروتين في أنبوب اختبار خاص واكتب اسم المادة المأخوذة على كل أنبوب.
2. أضف قطرتين من كاشف موليش إلى كل أنبوب اختبار ورج الأنابيب جيداً.
3. أضف ببطء وبحذر 1مل من حمض الكبريت المركز على جدران الأنبوب الداخلية.
4. دون النتائج والمشاهدات في جدول خاص.

جامعة المنارة
MANARA UNIVERSITY



D-glucose

5-(hydroxymethyl)furfural



5-(hydroxymethyl)furfural

α-naphthol

purple-colored dye

جَامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

التجربة رقم 2 :اختبار سلفانوف Seliwanoff

المبدأ:

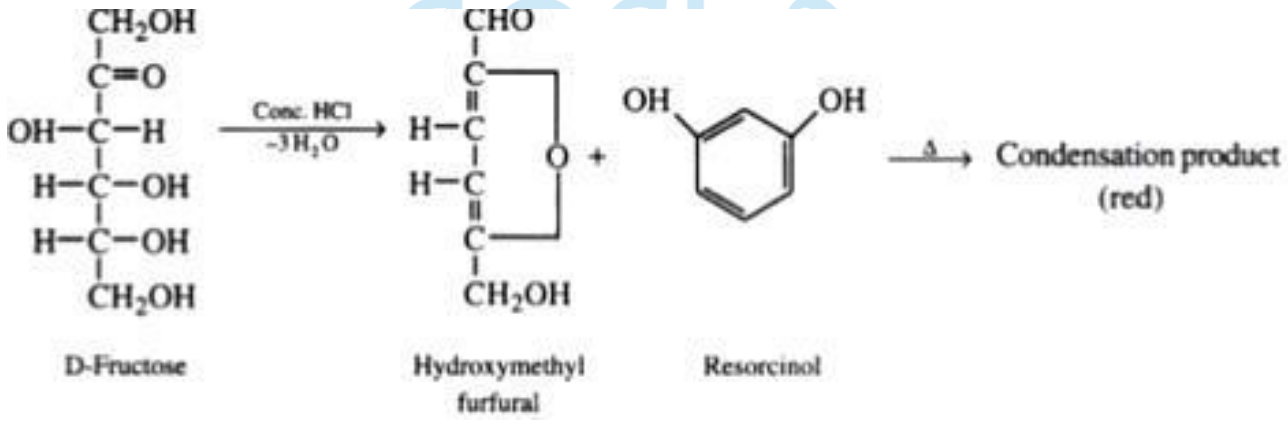
يستخدم هذا الاختبار لتمييز الكيتوهيكسوزات (السكريات الأحادية الكيتونية الحاوية على 6 ذارت كربون) مثل الفركتوز عن الألدوهيكسوزات (مثل الغلوكوز). حيث تتحول الكيتوهيكسوزات في الأوساط الحمضية القوية مثل حمض كلور الماء المركز إلى مشتقات فورفوارلية تتفاعل مع الريزورسينول وتعطي معقد بلون أحمر كرزي بشكل سريع مقارنة بالألدوزات.

المواد المستعملة:

- كاشف سلفانوف: يحضر بحل 1غ ريزورسينول في 330مل من حمض كلور الماء المركز ثم يكمل الحجم حتى اللتر بالماء المقطر.
- محاليل سكرية (غلوكوز، فركتوز)

طريقة العمل:

1. أضف 1مل من كل محلول سكري إلى أنبوب اختبار زجاجي خاص.
2. أضف 3مل من كاشف سلفانوف إلى كل أنبوب.
3. سخن في حمام مائي لمدة دقيقة ثم اترك الأنابيب لتبرد.
4. لاحظ الألوان المتشكلة في الأنابيب وسجل الملاحظات والنتائج.



https://manara.edu.sy/

التجربة رقم 3:اختبار بيال Bial's Test

المبدأ:

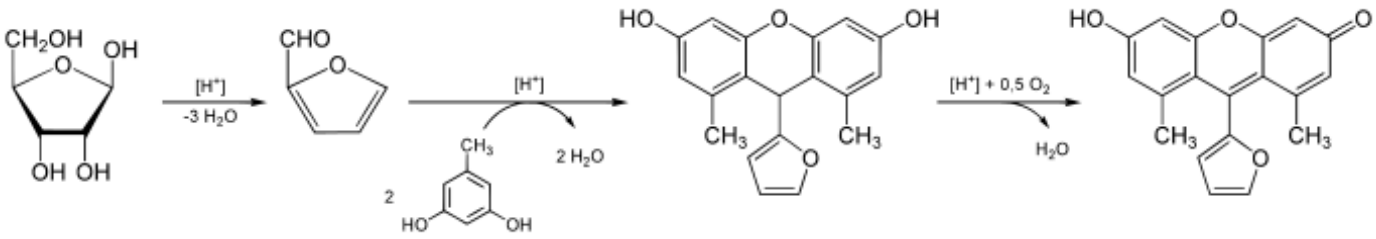
يستخدم هذا الاختبار لتمييز السكريات الخماسية (البنتوزات) مثل سكر الريبوز. يتم نزع الماء من السكر الخماسي بتفاعله مع حمض كلور الماء المركز فيتشكل مركب فورفوالي، يتكاثف الفورفورال مع الأورسينول بوجود ثلاثي كلور الحديد مشكلاً معقد لوني بلون أخضر.

المواد المستعملة:

- كاشف بيال: يحضر بحل 0.4غ أورسينول في 200مل من حمض كلور الماء المركز، ثم يضاف 0.5 مل من محلول ثلاثي كلور الحديد 10%.
- محاليل سكرية (ريبوز، غلوكوز)

طريقة العمل:

1. أضف 1مل من كل محلول سكري إلى أنبوب اختبار زجاجي خاص.
2. أضف 3مل من كاشف بيال إلى كل أنبوب.
3. سخن في حمام مائي مغلي لعدة دقائق ثم اترك الأنابيب لتبرد ولاحظ الألوان المتشكلة.
4. سجل الملاحظات والنتائج.



Ribose Furfural **Orcinol** **Green colored complex**

MANARA UNIVERSITY

الجلسة 3:السكريات (2) تفاعلات السكريات المرجعة

أهداف الجلسة:

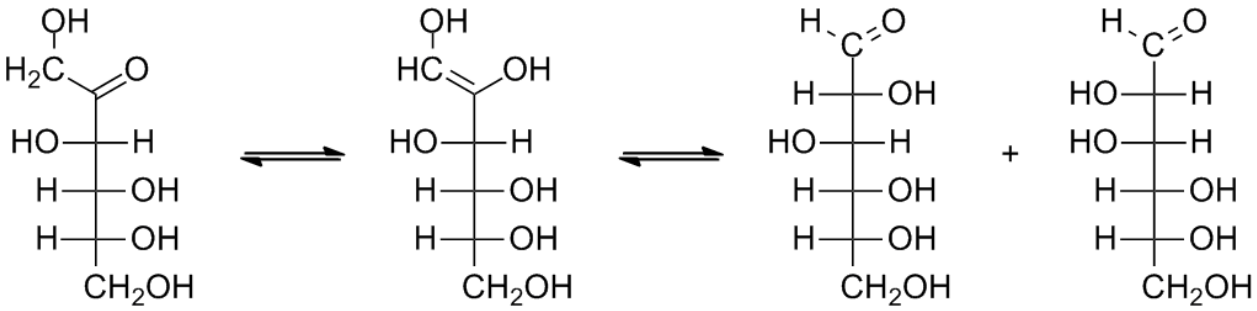
التعرف على تفاعلات التمييز بين السكريات المرجعة وغير المرجعة.

مقدمة:

تتميز السكريات التي تحوي مجموعة كربونيلية حرة (ألدهيدية أو كيتونية) بقدرتها على إرجاع العوامل المؤكسدة، من خلال إعطائها في محاليلها مركباً أو أكثر يحمل **مجموعة ألدهيدية قابلة للأكسدة بسهولة** إلى حموض كربوكسيلية، ليتحول السكر المرجع إلى الحمض السكري الموافق. بالتالي يمكن الاعتماد على تفاعلات الخاصة الإرجاعية للتمييز بين محاليل السكريات المختلفة، ولكشف ومعايرة السكريات في العينات الحيوية كالدم والبول.

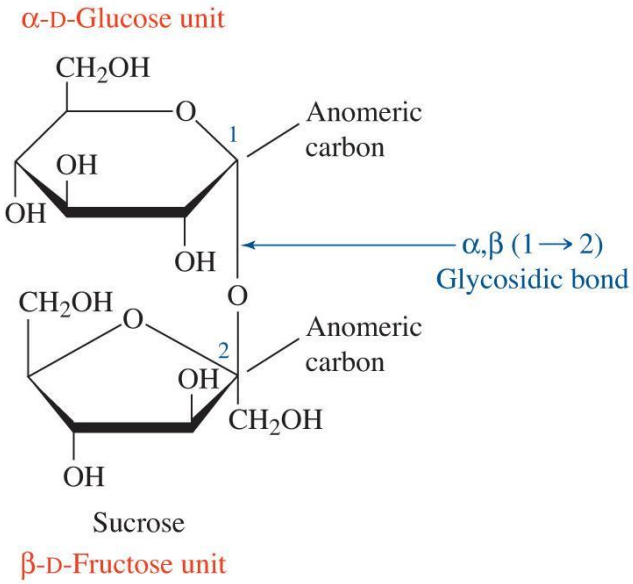
السكريات الأحادية الألدهيدية (مثل الغلوكوز والغالاكتوز والمانوز) تتمتع جميعها بالخاصية المرجعة، أيضاً السكريات الأحادية الكيتونية مثل الفركتوز تتمتع بالخاصية الإرجاعية رغم احتواءها على مجموعة كيتونية وذلك بسبب تحوله في المحاليل القلوية إلى مزيج من الغلوكوز والمانوز المرجعين.

السكريات الثنائية بعضها مرجع (اللاكتوز والمالتوز) وبعضها غير مرجع مثل السكروز، حيث تساهم المجموعتين الكربونيليتين



للغلوكوز والفركتوز في تشكيل الجسر الأوكسجيبني لتشكيل جزيئة السكروز التي تفقد بالتالي خاصيتها المرجعة. كذلك فإن السكريات المتعددة كالنشاء ليست مرجعة.

MANARA UNIVERSITY



جَامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

التجارب العملية:

التجربة رقم 1: اختبار فهلنغ Fehling Test

المبدأ:

يعتمد هذه التفاعل على قدرة السكريات المرجعة على إرجاع ماءات النحاس Cu(OH)2 المتشّكلة من تفاعل كبريتات النحاس مع ماءات الصوديوم إلى أكسيد النّحاسي Cu2O بواسطة الزّمرة الألدهيدّية الحّرة للسكر المتفاعل في وسط قلوي وبوجود ملح روشل (ملح طرطرارت الصوديوم والبوتاسيوم) الذي يمنع ترسيب هيدروكسيد النحاس من خلال تشكيل معقد منحل معه.

المواد المستعملة:

- كاشف فهلنغ: يتألف هذا الكاشف من محلولين يتم مزجهما بحجوم متساوية قبل العمل مباشرة. المحلول **فهلنغ A** يحضر بإذابة 7غ من كبريتات النحاس المائية CuSO4.5H2O في 100مل من الماء لمحلول المقطر مضافاً له قطرتين من حمض الكبريت الممدد. أما **فهلنغ B** فيحضر بإذابة 35غ من طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم (ملح روشيل) مع 12غ من هيدروكسيد الصوديوم في 100مل ماء مقطر.
- محاليل سكرية (غلوكوز 2%، فركتوز 2%، سكروز 2%، مالتوز 2%، نشاء 2%)

طريقة العمل:

1. امزج 1مل من المحلول فهلنغ A مع 1مل من المحلول فهلنغ B في أنبوب اختبار زجاجي خاص لكل محلول سكري.
2. أضف 1مل من كل محلول سكري إلى كل أنبوب.
3. سخن الأنابيب على حمام الماء المغلي وراقب تشكل الراسب الأحمر الآجري من عدم تشكله.
4. دون النتائج والملاحظات.

جامعة المَنارة MANARA UNIVERSITY

التجربة رقم 2:اختبار بينديكت Benedict Test:

المبدأ:

يستخدم هذا التفاعل لتمييز السكريات المرجعة عن غير المرجعة ويعد أكثر حساسية من اختبار فهلنغ، لذلك فهو يستخدم في حال العمل على محاليل سكرية ذات تراكيز منخفضة. يتألف الكاشف من كبريتات النحاس في وسط قلوي ضعيف من كربونات الصوديوم، حيث يتكون راسب أزرق من كربونات النحاس، وتضاف سترات الصوديوم لحل الراسب ويتكون محلول رائق أزرق اللون. يرجع هذا المركب بوجود سكر مرجع إلى أوكسيد النحاسي يظهر بشكل لون أحمر قرميدي.

المواد المستعملة:

- كاشف بينديكت: يحضر بإذابة 173غ من سترات الصوديوم مع 100غ من كربونات الصوديوم في 800 مل من الماء المقطر (يسخن المحلول للإسراع في الذوبان) ثم يرشح المحلول. يضاف إلى الرشاحة محلول مكون من 17.3 غ كبريتات النحاس المذابة في 100مل ماء مقطر ثم يكمل الحجم حتى 1000مل بالماء المقطر.
- محاليل سكريات (غلوكوز 2%، سكروز 2%)

طريقة العمل:

1. ضع 1مل من كاشف بينديكت في أنابيب مختلفة واكتب عليها اسم المادة السكرية المراد إضافتها لكل أنبوب.
2. أضف 1مل من محاليل السكريات كل على حدة إلى الأنبوب الخاص به.
3. رج محتويات كل أنبوبة جيداً.
4. سخن الأنابيب في حمام ماء مغلي لمدة 3-5 دقائق، اترك الأنابيب لتبرد ببطء.
5. لاحظ تكون الرواسب وألوانها في حالة السكاكر ذات الخاصة المرجعة.
6. دون نتائجك وملاحظاتك

جامعة المنارة
MANARA UNIVERSITY

التجربة رقم 3:اختبار بارفويد Barfoed Test

المبدأ:

يستخدم هذا التفاعل للتمييز بين السكريات الأحادية المرجعة والثنائية المرجعة من خلال إجراء التفاعل في وسط حمضي متوسط الحموضة من حمض الخل حيث يمكن فقط للسكريات الأحادية ذات القوة الإرجاعية المرتفعة أن ترجع أسيتات النحاس في كاشف بارفويد إلى أوكسيد النحاسي معطية راسب بلون أحمر يظهر في قعر الأنبوب، أما السكريات الثنائية فقدرتها الإرجاعية ضعيفة ولا تعطي نتيجة إيجابية.

المواد المستعملة:

- كاشف بارفويد: يحضر بحل 4.5غرام من خلات النحاس في 100مل ماء مقطر ثم يضاف 1مل من حمض الخل 50%.
- محاليل سكرية (غلوكوز 2%، مالتوز 2%)

طريقة العمل:

1. ضع 1مل من كل محلول سكري إلى أنبوب اختبار زجاجي خاص.
2. أضف 1مل من كاشف بارفويد إلى كل أنبوب.
3. سخن الأنابيب على حمام الماء المغلي لعدة دقائق **(لا تتجاوز5دقائق)** وراقب تشكل الراسب الأحمر من عدم تشكله.
4. دون النتائج والملاحظات.

جامعة المنارة MANARA UNIVERSITY

الجلسة 4: السكريات (3) تفاعلات السكريات المتعددة والكشف عن محلول سكري مجهول

أهداف الجلسة:

1. التعرف على تفاعلات التمييز بين السكريات المتعددة والسكريات البسيطة الأحادية والثنائية.
2. التعرف على طريقة تحديد هوية محلول سكري مجهول.

مقدمة:

السكريات المتعددة هي عبارة عن سكريات ذات وزن جزيئي كبير، يعطي الجزيء الواحد منها عدداً كبيراً من جزيئات السكريات الأحادية، تكون هذه السكريات مرتبطة مع بعضها بروابط غليكوزيدية ناتجة عن نزع جزيئة ماء من زمرتي الهيدروكسيل لسكريدين متجاورين بحيث يتكون جسر أوكسجيني يربط السكريدات الأحادية على شكل سلسلة.

خواص السكريدات المتعددة:

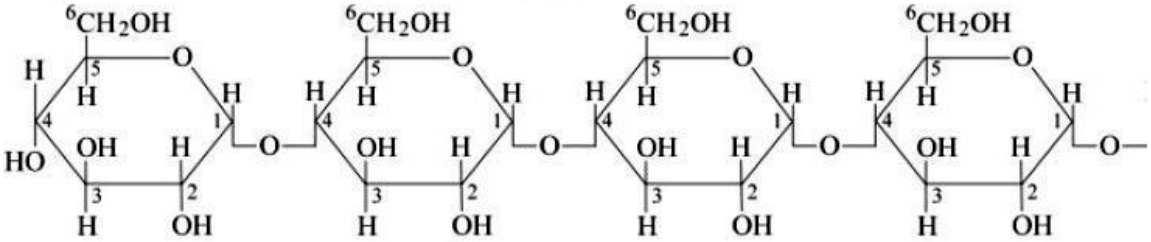
- لا تنحل في الماء بل تشكل محاليل غروية معه.
- ليس لها طعم حلو.
- لا تتمتع بخواص إرجاعية.

من أهم السكريدات المتعددة:

النشاء Starch هو من السكريدات الإدخارية التي تشكل الغذاء الرئيسي للإنسان حيث يتحلمه بأنزيم الأميلاز محرراً وحدات الغلوكوز المكونة له. يتكون النشاء من الأميلوز Amylose والأميلوبكتين Amylopektin . يشكل الأميلوز (20-30%) من النشاء وترتبط جزيئات الغلوكوز فيه بروابط غليكوزيدية (1-4) مكونة سلسلة غير متفرعة تأخذ شكلاً حلزونياً. أما الأميلوبكتين فيشكل الجزء الأكبر من النشاء (70-80%) ويكون ربط جزيئات الغلوكوز فيه ليس فقط من النوع (1-4) السلسلي بل أيضاً تتفرع السلسلة على شكل (1-6).

MANARA UNIVERSITY

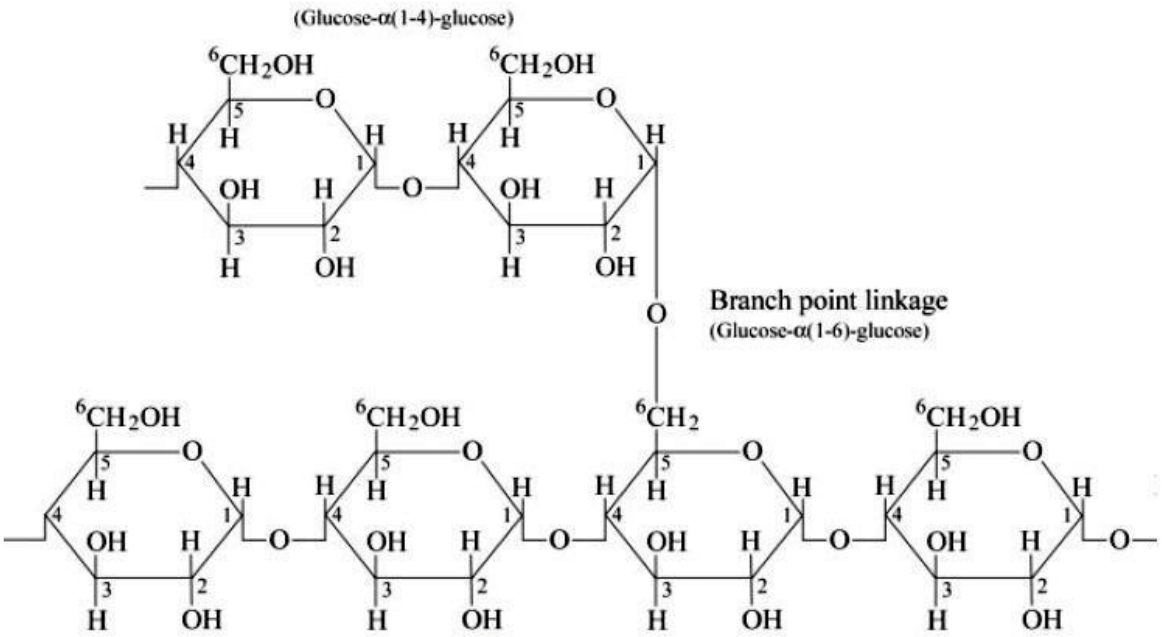
(Glucose-α(1-4)-glucose)



Amylose

(Glucose-α(1-4)-glucose)

Branch point linkage
(Glucose-α(1-6)-glucose)



Amylopectin

المَنارة
MANARA UNIVERSITY

التجارب العملية:

التجربة رقم 1:اختبار اليود Iodine Test

المبدأ:

يستخدم هذا التفاعل لتمييز السكريات المتعددة عن السكريات البسيطة حيث يعطي نتيجة إيجابية مع السكريات المتعددة فقط. يعتمد هذا الاختبار على خاصية ادمصاص جزيئات اليود على سلاسل السكريات المتعددة لتشكل معقداً ملوناً يختلف حسب نوع السكاريد المتعدد (أزرق مع النشاء، بني مزرق مع الغليكوجين.) في النشاء تتوضع جزيئات اليود بشكل أساسي داخل السلسلة الحلزونية للأميلوز معطية لون أزرق كثيف، أما في تفرعات الأميلوبكتين فتكون كمية اليود المتوضعة أقل وتعطي لوناً أحمراً مائلاً إلى البنفسجي.

المواد المستعملة:

- محلول لوغول اليودي: يحضر بإذابة 1غ من اليود الحر مع 5غ من يوديد البوتاسيوم في 100مل من الماء المقطر.
- محاليل سكريات أحادية (غلوكوز 2%) وثنائية (سكروز 2%) ومتعددة (نشاء 2%)

طريقة العمل:

1. ضع في ثلاثة أنابيب اختبار نظيفة 3مل من المحاليل السكريدّية (الغلوكوز، السكروز، النشاء.)
2. أضف لكل أنبوب قطرتين من محلول لوغول اليودي ثم قارن بين الألوان المتشّكلة في الأنابيب.
3. سخن حتى الغليان ماذا تلاحظ ؟ برد من جديد ماذا تلاحظ ؟ فسر ذلك ؟

جامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

التجربة رقم 2:الكشف عن محلول سكري مجهول

لديك محلول مجهول هو أحد المحاليل التالية: غلوكوز، فركتوز، ريبوز، سكروز، مالتوز، نشاء، ألبومين.

1. اكتب مخططاً توضح فيه آلية التمييز بين هذه المحاليل.
2. طبق مجموعة التفاعلات النوعية للكشف عن هوية هذا المحلول.

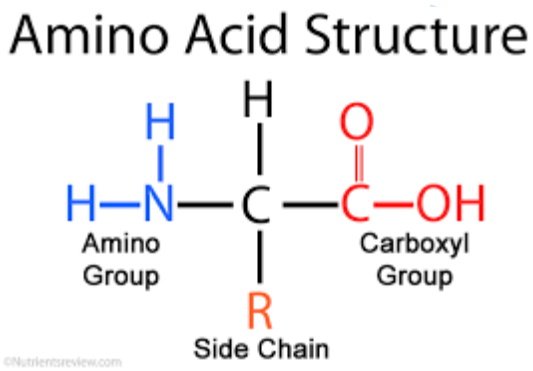
جَامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

الجلسة 5: الأحماض الأمينية والبروتينات (1)

أهداف الجلسة:

1. التعرف على تفاعلات الكشف عن الأحماض الأمينية في محاليلها وتمييزها عن المحاليل البيولوجية الأخرى.
2. التعرف على تفاعلات الكشف عن البروتينات في محاليلها وتمييزها عن المحاليل البيولوجية الأخرى.

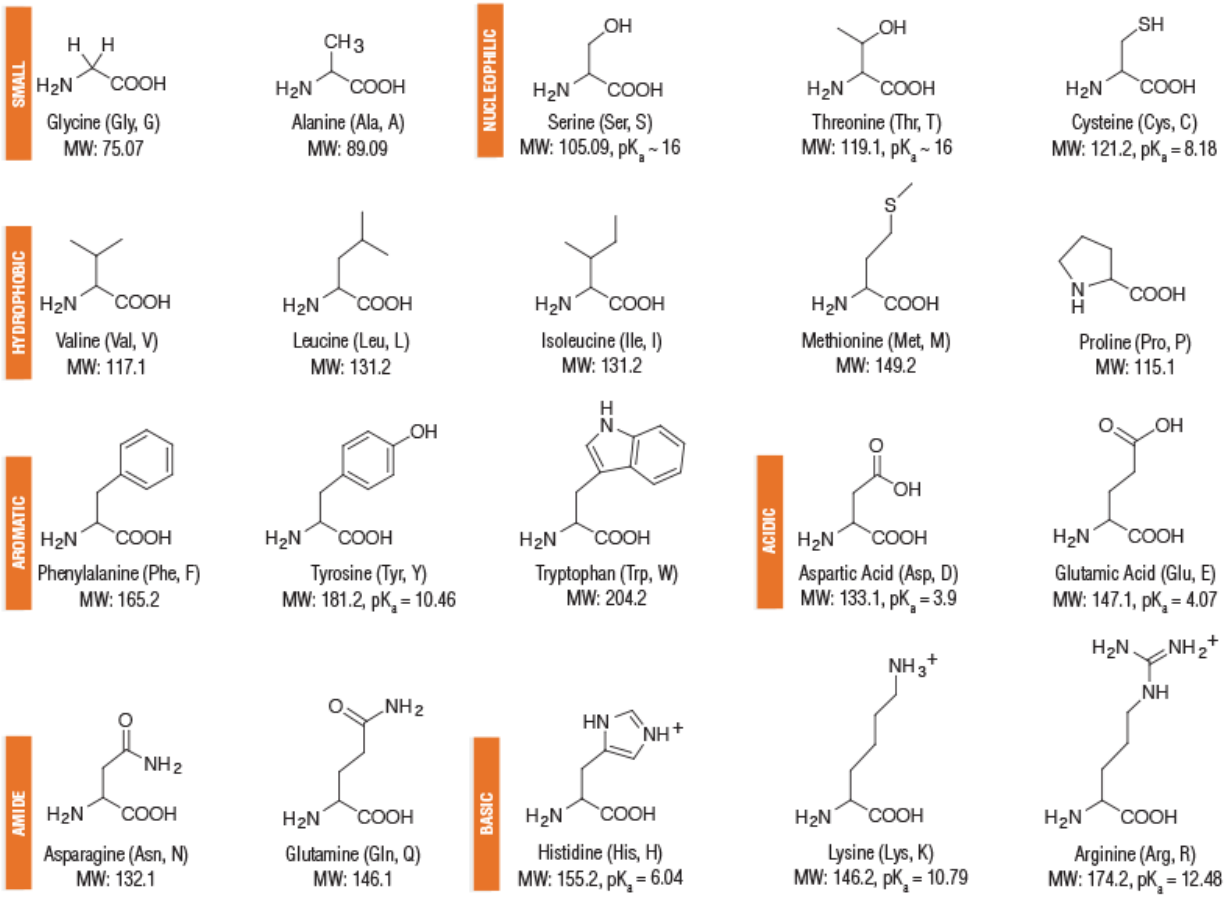
مقدمة:



الأحماض الأمينية هي الوحدات الأساسية في بناء عديدات الببتيد والبروتينات، وتنتج عن الحلمهة الكيميائية أو الأنزيمية للبروتينات. جميع الحموض الأمينية المكونة للبروتينات الحيوية تشترك بأنها تحتوي على زمرة كربوكسيلية حمضية وزمرة أمين أولي قاعدية (عدا البرولين والهيدروكسي برولين فيحتويان على أمين ثانوي).

تم التعرف حتى الآن على حوالي 150 حمض أميني موجودة في تركيب المادة الحية إما بشكل حر أو مرتبط. 20 حمضاً أمينياً منها فقط هي التي تدخل في تركيب البروتينات. يمكن اصطناع بعض الحموض الأمينية في الجسم، أما بعضها الآخر فلا يمكن اصطناعه ويجب الحصول عليه حصراً عن طريق الغذاء وتدعى تلك الأحماض الأمينية بالأحماض الأمينية الأساسية (التربتوفان، الليزين، الميتيونين، الفينيل ألانين، التريونين، الفالين، اللوسين، الإيزولوسين.) وتصنف الأحماض الأمينية وفق بنيتها الكيميائية إلى خطية وحلقية، كما تصنف بناء على امتلاكها لمجموعات وظيفية معينة (هيدروكسيلية مثل السيرين والتريونين، كبريتية مثل الميتيونين والسيستئين)، أو بناء على خصائص كيميائية معينة (الأحماض الأمينية الحمضية مثل حمض الأسبارتيك والغلوتاميك، الأحماض الأمينية القلوية مثل الليزين والأرجينين والهيستدين). يرمز للأحماض الأمينية بالأحرف الثلاثة الأولى من اسمها

جامعة المنارة
MANARA UNIVERSITY



البروتينات :هي جزيئات مكونة من تسلسل من الأحماض الأمينية المرتبطة مع بعضها بروابط ببتيدية. تتشكل الرابطة الببتيدية من تفاعل الزمرة الحمضية من حمض أميني مع الزمرة الأمينية من الحمض الأميني الذي يليه بعد حذف جزيئة ماء. تصنف البروتينات وفق تركيبها الكيميائي إلى بروتينات بسيطة متجانسة (تعطي عند حلمهتها أحماض أمينية فقط، مثل الألبومين والغلوبولين) وبروتينات معقدة أو غير متجانسة (تعطي عند حلمهتها جزيئات أخرى غير الأحماض الأمينية، مثل البروتينات السكرية والبروتينات الشحمية والبروتينات النووية والبروتينات المعدنية).

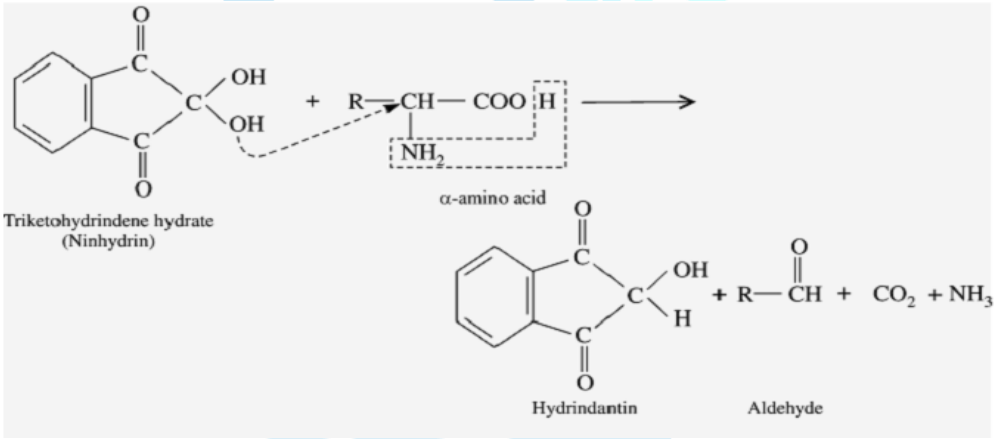
جامعة المنارة
MANARA UNIVERSITY

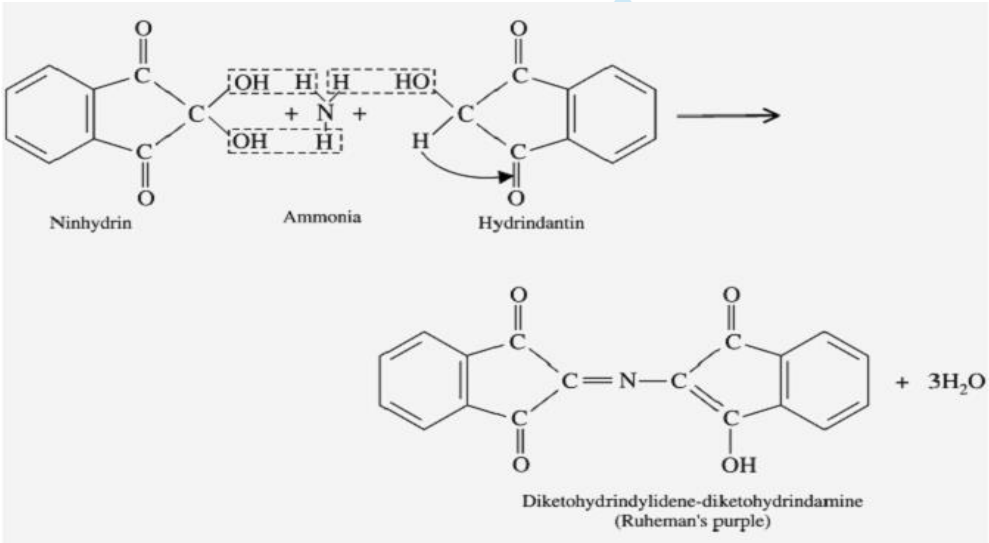
التجربة رقم 1:تفاعل النينهيدرين Ninhydrin reaction

المبدأ:

هو تفاعل عام يستخدم للكشف عن الحموض الأمينية الحاوية على زمرة أمينية حرة في الموقع α .يتم التفاعل على مرحلتين: في الأولى يحصل تفاعل أكسدة-إرجاع بين النينهيدرين والحمض الأميني فيتحرر غازي النشادر وثاني أوكسيد الكربون ويتشكل الشكل المرجع للنينهيدرين والذي يدعى بالهيدريندانتين Hydrindantine. أما في الثانية فيتم تكاثف جزيئة من الهيدريندانتين وجزيئة من النينهيدرين الحر بوجود النشادر لإعطاء معقد ذو لون أزرق بنفسجي.

ملاحظة: لا يتفاعل الحمضان الأمينيان برولين وهيدروكسي برولين مع النهيدرين ويعطيان لوناً أصفر مع هذا الاختبار.





https://manara.edu.sy/

المواد المستعملة:

- محلول النينهيدرين 0.1%
- محلول ألبومين
- محاليل أحماض أمينية (غليسين 0.5%، برولين 0.5%).

طريقة العمل:

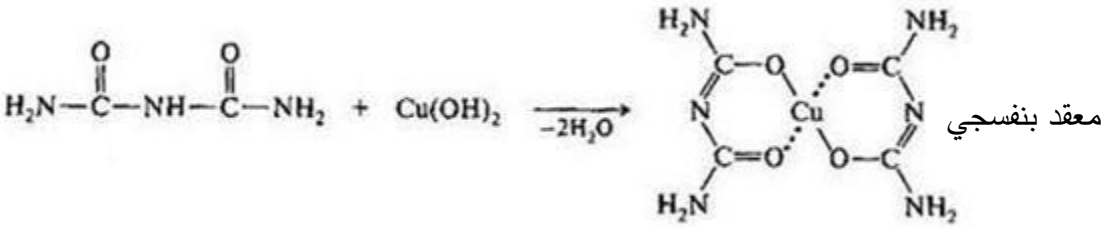
1. أضف 1مل من محلول النينهيدرين 0.1% إلى كل من المحاليل التالية:
   a. 2 مل من محلول الألبومين.
   b. 2 مل من محلول الغليسين.
   c. 2 مل من محلول البرولين.
2. سخن الأنابيب في حمام الماء المغلي 100م لمدة دقيقة واحدة.
3. لاحظ الألوان المتشكلة دون نتائجك وملاحظاتك.

جَامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

التجربة رقم 2: تفاعل البيوريت (البولة المضاعفة) Biuret reaction

المبدأ:

هو التفاعل النوعي لكشف عديدات الببتيد والبروتينات وتمييزها عن الأحماض الأمينية. يعتمد تفاعل البيوريت على مبدأ معاملة البروتين بمحلول كبريتات النحاس في وسط قلوي فينتج مركب بنفسجي اللون. يشترط وجود رابطتين ببتيديتين على الأقل لكي يعطي هذا الاختبار نتيجة إيجابية، لذلك فإن أبسط مركب يعطي نتيجة إيجابية هو البيوريت (ثنائي البولة)، وانطلاقاً من ذلك سمي التفاعل بهذا الاسم.



المواد المستعملة:

- كاشف البيوريت: يحضر بإذابة 1.5غ من كبريتات النحاس المائية مع 6غ من طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم في 500 مل ماء مقطر، ثم يضاف 300 مل من ماءات الصوديوم 10% ، ويكمل الحجم بالماء المقطر حتى اللتر. يمكن إضافة يوديد البوتاسيوم 1غ للحفظ.
- محلول الألبومين.
- محلول حمض أميني (غليسين).

طريقة العمل:

1. أضف 3مل من كاشف البيوريت إلى 2مل من كل من المحاليل التالية:
   a. محلول الألبومين
   b. محلول الغليسين
2. احضن الأنابيب الزجاجية لمدة عشر دقائق بالدرجة 37م.
3. لاحظ تشكل اللون البنفسجي من عدم تشكله في الأنابيب.
4. دون النتائج والملاحظات

جامعة المنارة MANARA UNIVERSITY

الجلسة 6: الأحماض الأمينية والبروتينات (2)

أهداف الجلسة:

1. التعرف على التفاعلات العامة للكشف عن الأحماض الأمينية العطرية (تربتوفان، تيروزين).
2. التعرف على التفاعلات النوعية للكشف عن بعض الأحماض الأمينية (تربتوفان، تيروزين).

التجربة رقم 1: تفاعل الكزانتوبروتئين للكشف عن الأحماض الأمينية العطرية

المبدأ:

يستخدم هذا التفاعل لتمييز الأحماض الأمينية العطرية مثل التيروزين والتربتوفان. يتم التفاعل على مرحلتين: أولاً نترجة الحلقة العطرية للحمض الأميني بواسطة حمض الآزوت المركز الذي يؤدي لتشكل ثنائي نترو الحمض الأميني ذو اللون الأصفر. في المرحلة الثانية يتفاعل المركب الناتج مع ماءات الأمونيوم منتجاً مشتقاً برتقالي اللون هو عبارة عن الملح القلوي لثنائي نترو الحمض الأميني العطري.

المواد المستعملة:

- حمض الآزوت المركز
- محلول هيدروكسيد الصوديوم 40%
- محاليل حموض أمينية (تيروزين، تربتوفان، غليسين)

طريقة العمل:

1. أضف 1مل من كل من التيروزين والتربتوفان والغليسين إلى أنبوب اختبار زجاجي خاص.
2. أضف 1مل من حمض الآزوت المركز وسخن على حمام مائي مغلي حتى ظهور راسب أصفر اللون
3. أضف عدة قطرات من هيدروكسيد الصوديوم 40%
4. لاحظ تحول اللون إلى برتقالي في الأنبوبين الحاويين على التيروزين والتربتوفان.
5. دون نتائجك وملاحظاتك.

https://manara.edu.sy/

التجربة رقم 2: تفاعل الكشف عن التربتوفان (تفاعل هوبكنز-كول)Hopkins-Cole

المبدأ: يعتمد مبدأ هذا التفاعل على تكاثف حلقة الإندول في الحمض الأميني تربتوفان مع زمرة الألدهيد من الأسيت ألدهيد أو الفورم ألدهيد معطية نواتج تكاثف ملونة بلون بنفسجي غامق.

المواد المستعملة:

- محلول فورم ألدهيد
- حمض الكبريت المركز
- محاليل أحماض أمينية (تربتوفان، آرجينين)
- محلول بروتيني (ألبومين)

طريقة العمل:

1. أضف 2مل من كل حمض أميني ومن المحلول البروتيني إلى أنبوب اختبار زجاجي خاص.
2. أضف 2مل من الفورم ألدهيد إلى كل أنبوب.
3. أضف بحذر بضع قطرات من حمض الكبريت المركز على جدران الأنبوب.
4. اترك الأنابيب بدون خض على حامل الأنابيب ولاحظ تشكل حلقة بنفسجية غامقة اللون على السطح الفاصل في أنبوب التربتوفان (حلقة الإندول).
5. دون الملاحظات والنتائج.

جامعة المنارة
MANARA UNIVERSITY

التجربة رقم 3: تفاعل الكشف عن التيروزين (تفاعل ميلون)Millon's Test

المبدأ:

يعتبر هذا التفاعل نوعي للأحماض الأمينية الفينولية مثل التيروزين. يتفاعل التيروزين مع كاشف ميلون (كبريتات الزئبق وحمض الآزوت) مشكلاً معقداً بلون زهري محمر.

المواد المستعملة:

- كاشف ميلون: يحضر بإذابة 10غ من الزئبق في 10مل من حمض الآزوت المركز، ثم يمدد الناتج ب 20مل من الماء المقطر.
- محاليل أحماض أمينية (تيروزين، آرجينين)

خطوات العمل:

1. أضف 1مل من كل حمض أميني إلى انبوب اختبار زجاجي خاص.
2. أضف إلى كل أنبوب 1مل من كاشف ميلون.
3. سخن على اللهب لمدة 2-3 دقائق.
4. لاحظ تشكل اللون أو الراسب الزهري المحمر في الأنبوب الخاص بالتيروزين.
5. دون الملاحظات والنتائج.

جامعة المنارة
MANARA UNIVERSITY

الجلسة 7: الأحماض الأمينية والبروتينات (3)

أهداف الجلسة:

1. التعرف على تفاعل ساكاغوشي للكشف عن الآرجينين.
2. التعرف على التفاعلات النوعية للكشف عن الأحماض الأمينية الكبريتية.

التجربة رقم 1: الكشف عن الآرجنين (تفاعل ساكاغوشي)Sakaguchi reaction

المبدأ:

يعطي الأرجينين والبروتينات الحاوية عليه بفضل وجود زمرة الغوانيدين لون أحمر قاتم مع الألفا نفتول في وسط قلوي قوي من هيدروكسيد الصوديوم وبوجود مؤكسد من هيبوكلوريت أو هيبوبروميت الصوديوم.

المواد المستعملة:

- محلول ألفا نفتول 5% في الكحول الايتيلي
- محلول هيدروكسيد الصوديوم
- هيبوكلوريت الصوديوم
- محاليل حموض أمينية (أرجينين ، تربتوفان)
- محلول بروتيني (ألبومين)

طريقة العمل:

1. أضف 1مل من كل من الألبومين والأرجينين والتربتوفان إلى أنبوب اختبار زجاجي خاص.
2. أضف 2-3 قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم و 2-3 قطرات من محلول الألفا نفتول و 2-3 قطرات من هيبوكلوريت الصوديوم إلى كل أنبوب.
3. لاحظ تشكل اللون الأحمر القاتم من عدمه.
4. دون نتائجك وملاحظاتك.

جامعة المنارة
MANARA UNIVERSITY

التجربة رقم 2: تفاعل الكشف عن الأحماض الأمينية الكبريتية (تفاعل فول)

المبدأ:

يستخدم التفاعل مع خلات الرصاص لتمييز الأحماض الأمينية الحاوية على الكبريت مثل السيستئين. يتم بالحلمهة القلوية فصل الكبريت بشكل Na2S وتتفاعل الزمرة الكبريتية مع خلات الرصاص لتعطي راسب أسود هو كبريت الرصاص.

المواد المستعملة:

- هيدروكسيد الصوديوم 10%
- خلات الرصاص
- محاليل أحماض أمينية (تيروزين، سيستئين)

خطوات العمل:

1. خذ في أنبوبي اختبار 1مل من الحمض الأميني (التيروزين والسيستئين)
2. أضف 1مل محلول ماءات الصوديوم 10%ثم سخن المزيج لمدة دقيقتين.
3. أضف 1مل من محلول خلات الرصاص وسخن لمدة 5دقائق تقريباً
4. لاحظ تشكل راسب ذو لون أسود إذا كان يحتوي على حمض أميني كبريتي.

جَامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

الجلسة 8: فصل وترسيب البروتينات

أهداف الجلسة:

1. التعرف على طرق فصل وترسيب البروتينات من محاليلها.
2. عزل واستخلاص بروتين الكازئين من الحليب بطريقة الترسيب بالاعتماد على نقطة التعادل الكهربائي.

مقدمة:

تختلف البروتينات من حيث قابلية ذوبانها في المحاليل فهي بصوره عامة قليلة الذوبان في الماء والمذيبات القطبية ولكنها تكون محلول غروي مع الماء له لزوجة خاصة. تعتمد قابلية ذوبان للبروتينات في المحاليل المائية على توزع ثمالات الأحماض الأمينية المحبة للماء والكارهة للماء على سطح البروتين. البروتينات التي تحتوي على نسبة عالية من الأحماض الأمينية الكارهة للماء على السطح لها قابلية منخفضة للذوبان في المذيبات المائية. تتفاعل الثمالات السطحية المشحونة مع المجموعات الأيونية في المذيب وتزيد من قابلية البروتين للذوبان. تساعد معرفة نوع الأحماض الأمينية المكونة البروتين في تحديد المذيبات التي ينحل فيها وأساليب الترسيب المثالية.

يعتمد ذوبان البروتينات إذاً على عدة عوامل منها:

- نوع السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية المكونة للبروتين.
- بنية البروتين (كروي أوليفي)
- عوامل خارجية مثل القوة الأيونية للمحلول – درجة الpH - درجة الحرارة – نوع المذيب المستعمل.

يوجد عدد من التفاعلات التي يتم عن طريقها ترسيب البروتينات وبالتالي فصلها عن المكونات الأخرى في المحاليل البيولوجية. يمكن أن يكون الترسيب عكوساً أو ليس عكوساً تبعاً للطريقة المستخدمة. لا تتغير في تفاعلات الترسيب العكوسة الجزيئات البروتينية بشكل كبير، حتى أنه لا يحدث تغير في الشكل الفراغي وبالتالي فإن نواتج هذه التفاعلات تبقى قابلة للانحلال وتبقى فعاليتها البيولوجية سليمة دون أن تتحطم. أما في تفاعلات الترسيب اللاعكوسة فيحدث تغير كبير في خواص البروتينات وفي شكلها الفراغي، مما يؤدي إلى تغيرات في فعاليتها البيولوجية وتفقد قدرتها على الانحلال. تستخدم تفاعلات ترسيب البروتينات لعدة أهداف منها:

- دراسة خواص البروتينات.
- تنقية البروتينات وفصلها عن الشوائب.
- فصل أنواع البروتينات ومعايرتها وذلك في الحالات المرضية المختلفة

https://manara.edu.sy/

أهم طرق ترسيب وفصل البروتينات:

1- **ترسيب البروتينات بالتسخين**: تعد البروتينات مركبات غير ثابتة بالحرارة، ويؤدي تعريضها للحرارة إلى تغيرات غير عكوسة في خواصها الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية، ويعرف ذلك بتمسخ البروتينات. يؤدي التسخين إلى تفكيك الروابط الهيدروجينية والروابط الكارهة للماء وبالتالي إلى تخريب البنيتين الثانوية والثالثية للبروتينات دون تأثر البنية الأولية (الناتجة عن الروابط الببتيدية). انطلاقاً من هذا المبدأ تستخدم الحرارة لتخثير البروتينات الطعامية وجعلها أسهل هضماً، وأيضاً تستخدم الحرارة كعامل تعقيم حيث تقضي على الجراثيم من خلال تمسيخ البروتينات الجرثومية.

2- **الترسيب بواسطة أملاح المعادن الثقيلة**: يجري ترسيب البروتينات في المحاليل بإضافة أملاح المعادن الثقيلة مثل الرصاص، النحاس، الفضة، الزئبق، وغيرها. يعود ذلك إلى تعديل الأيونات المعدنية الموجبة للشحنة السالبة على سطح البروتينات فتتشكل نتيجة لذلك معقدات غير منحلة في الماء. انطلاقاً من ذلك تستخدم بعض أملاح المعادن الثقيلة في التعقيم، وبالمقابل يستخدم الحليب وزلال البيض كترياق لعلاج حالات التسمم بأملاح المعادن الثقيلة.

3- **الترسيب بواسطة الأحماض المعدنية** :تؤدي الأحماض المعدنية المركزة إلى تشكيل معقدات مع البروتينات بسبب تخرب الطبقة المائية المحيطة بالبروتين وتعادل شحنتها مما يؤدي إلى فقدان بنيتها الطبيعية وتشكل رواسب غير منحلة في الماء.

4- **الترسيب بواسطة الأحماض العضوية** :تؤدي الأحماض العضوية مثل ثلاثي كلور حمض الخل وسلفو حمض الساليسيليك إلى عزل الطبقة المائية المحيطة بجزيئة البروتين وتعديل شحنته ولذا تعد هذه العملية من العمليات اللاعكوسة. يستعمل سلفو حمض الساليسيليك بشكل واسع في المخابر السريرية للكشف عن بروتينات البول.

5- **الترسيب بواسطة المحلات العضوية** :تستطيع المحلات العضوية المزوجة بالماء (الغول، الأسيتون) الارتباط مع الغلاف المائي المحيط بالجزيئة البروتينية من خلال تكسير الروابط الهيدروجينية بين السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية وتشكيل روابط هيدروجينية بديلة مع الكحول أو الأسيتون مما يؤدي إلى إضعاف ثبات البروتين في المحلول وترسبه

6- **الترسيب بالأملاح** :تزداد قابليه ذوبان البروتينات بوجود تراكيز قليلة من الاملاح المتعادلة وتسمى هذه الظاهرة "التمليح الداخليSalting-in". أما في حالة ازدياد التراكيز فإن البروتين يترسب وهذا ما يسمى "التمليح الخارجي Salting-out" وسبب الترسيب هو فقدان الماء من جزئية البروتين المستحلبة (بفعل أيونات الملح) وكذلك

https://manara.edu.sy/

بسبب تعادل الشحنات الكهربائية في البروتين مع الشحنات المعاكسة لأيونات الملح. إن درجة الترسيب الحاصل تعتمد على تركيز ونوع الملح المستعمل، وطبيعة البروتين، ووزنه الجزيئي. وتستخدم طريقه التمليح الخارجي في فصل البروتينات في مزيج منها وذلك بزيادة تركيز الملح بصورة تدريجية، ومن أكثر الأملاح شيوعاً في الاستخدام هو كبريتات الامونيوم.

7- **الترسيب بالاعتماد على نقطة التعادل الكهربائي** :يعتمد ذوبان البروتينات على قيمة الـ PH ويكون هذا الذوبان أصغرياً في نقطة التعادل الكهربائيpI، والتي تعرف بأنها الأس الهيدروجيني pHالتي يكون عندها محصلة الشحنات على الجزيء تساوي الصفر نتيجة لتساوي الشحنات الموجبة والسالبة، وعند هذه النقطة يصبح البروتين أقل ذوبانية فيسهل ترسيبه، وتختلف نقطة التعادل الكهربائي من بروتين إلى آخر حسب الأحماض الأمينية المكونة له، بالتالي يمكن الاستفادة من هذه الطريقة في فصل البروتينات ذات نقاط التعادل الكهربائي المختلفة.

التجربة العملية:

عزل واستخلاص بروتين الكازئين من الحليب بالاعتماد على نقطة التعادل الكهربائي

المبدأ:

يعتبر الحليب الغذاء الأكثر تكاملاً في الطبيعة. يوجد ثلاثة أنواع من البروتينات في الحليب: الكازئين وألبومين الحليب وغلوبولين الحليب. تتميز هذه البروتينات باحتوائها على جميع الأحماض الأمينية الضرورية لبناء الدم والنسج وتأمين النمو الطبيعي. يشكل الكازئين البروتين الرئيسي من تلك الأنواع الثلاثة (80 %) وهو عبارة عن بروتين فوسفوري (يحوي مجموعات فوسفات مرتبطة مع مجموعات الهيدروكسيل في السلاسل الجانبية لبعض الأحماض الأمينية،) ويتواجد في الحليب على شكل ملح للكالسيوم (كازئينات الكالسيوم.) يوجد 3أنواع لكازئين الحليب (ألفا وبيتا وكابا كازئين) ويكون النوع كابا هو المسؤول عن تأمين انحلالية الكازئين من خلال تشكيل المذيلات.

نقطة التعادل الكهربائي لكازئينات الكالسيوم تكون عند درجةpH=4.6 ،لذلك تكون غير منحلة في درجات الـ pH القريبة من 4.6.وبالتالي يمكن ترسيب الكازئين في الحليب بالاعتماد على هذه الخاصية وإضافة وقاء لتخفيض درجة الـ pHإلى نقطة التعادل الكهربائي.

المواد المستعملة:

- 100 مل حليب خالي الدسم (تركيزه 50غ/لتر)
- وقاء (حمض الخل + خلات الصوديوم) pH=4.6

https://manara.edu.sy/

- ايتانول 95%
- ايتر

طريقة العمل:

1. يوضع 100مل من الحليب في بيشر زجاجي ويسخن حتى درجة الحرارة 40 مئوية.
2. يسخن 100مل من المحلول الموقي إلى الدرجة 40 مئوية.
3. يضاف المحلول الموقي إلى الحليب ببطء مع التحريك بواسطة قضيب زجاجي. يجب الانتباه إلى عدم إضافة كمية المحلول الموقي الحمضي بسرعة.
4. تستمر إضافة المحلول الموقي والتحريك حتى يصبح الحليب رائقاً ويتوقف ترسب الكازئين.
5. يترك المعلق الناتج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق ثم يرشح باستخدام ورق الترشيح.
6. يغسل الراسب على ورقة الترشيح ب 5مل من الايتر مرتين متتاليتين ثم يترك ليجف حتى الاسبوع القادم. يوزن الراسب وتحسب النسبة المئوية للكازئين والبروتين الكلي في الحليب المستخدم.

جَامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

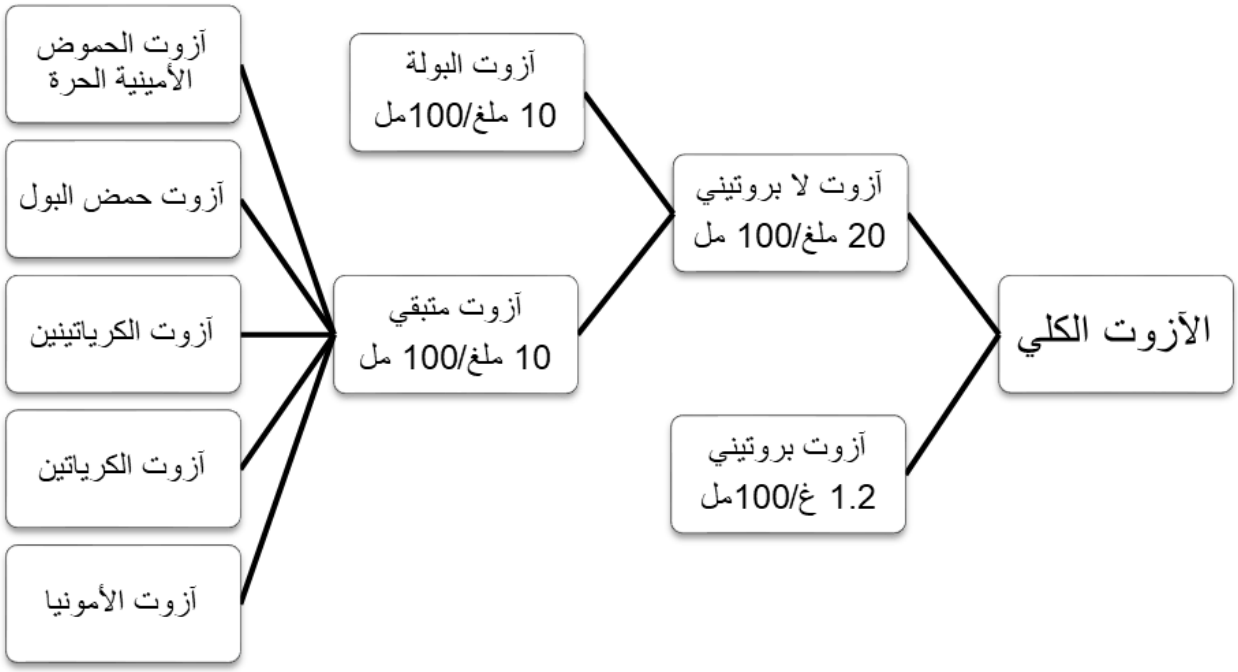
الجلسة 9: الكشف عن المركبات الآزوتية (البولة والكرياتينين والنشادر)

أهداف الجلسة:

1. التعرف على أهم المواد الآزوتية اللابروتينية الموجودة في الجسم الحي.
2. التعرف على التفاعلات النوعية للكشف عن أهم هذه المواد الآزوتية (النشادر والبولة والكرياتينين) وتمييزها.

مقدمة:

تتوزع المواد الآزوتية الكلية الموجودة في الدم إلى آزوت بروتيني وآزوت لا بروتيني، يشمل الآزوت اللابروتيني مجموعة من نواتج استقلاب البروتينات تضم: البولة Urea، الأحماض الأمينية الحرة، حمض البول Uric acid، الكرياتين والكرياتينين، الأمونيا. تعتبر البولة والكرياتينين النواتج الرئيسية لاستقلاب المواد الآزوتية في الجسم.



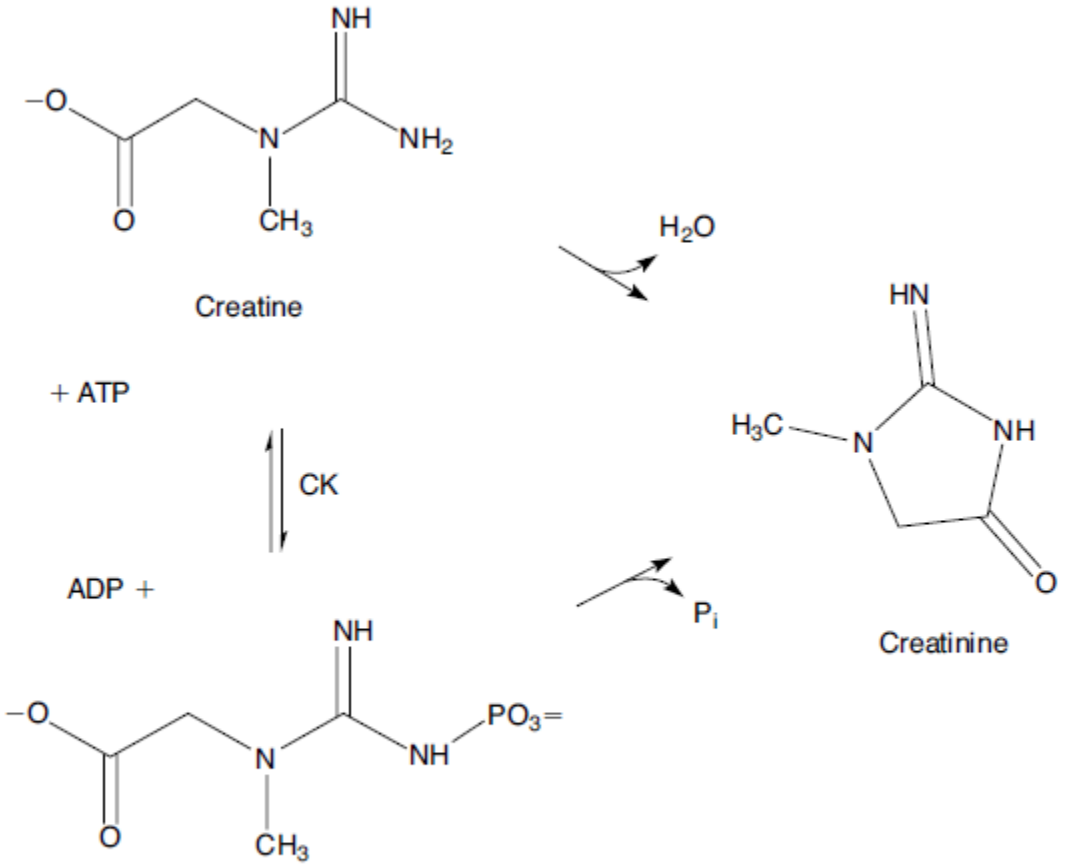
MANARA UNIVERSITY

البولة Urea:

هي المستقلب الرئيسي للبروتينات والحموض الأمينية، حيث تنتج الأمونيا بعمليات نزع الأمين من الحموض الأمينية وتدخل الأمونيا في حلقة البولة urea cycle في الكبد لتشكيل البولة. تشكل البولة 50 – 75 % من المركبات الآزوتية غير البروتينية. تطرح البولة عن طريق الكلية بنسبة 90%لذلك تعطي دلالة على الوظيفة الكلوية وبما أنها تتشكل في الكبد فهي تعطي أيضاً دلالة على الوظيفة الكبدية.

الكرياتينين creatinine:

هو بلا ماء الكرياتين، ينشأ الكرياتين في الكبد من الحموض الأمينية التالية: الغليسين والأرجينين والمتيونين، ثم يتحول في العضلات إلى كرياتين فوسفات كمركب خازن للطاقة بتدخل أنزيم الكرياتين كيناز. يتحول يومياً من 1.5 – 2%من مجموع الكرياتين في الجسم إلى كرياتينين الذي ينتقل بالبلاسما إلى الكلية حيث ينطرح بالبول بشكل كامل تقريباً. ويعتبر الكرياتينين أيضاً من أهم مشعرات الوظيفة الكلوية.

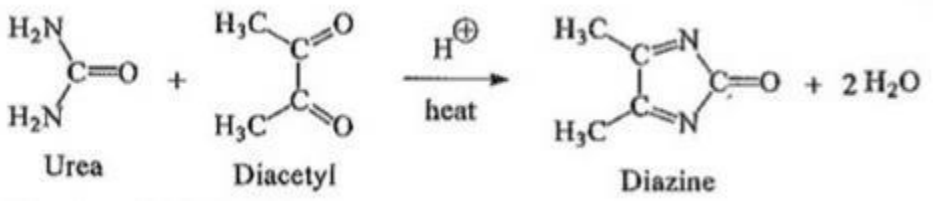


https://manara.edu.sy/

التجربة رقم 1:الكشف عن البولة باستخدام دي أسيتيل مونوكسيم

المبدأ:

يستخدم هذا الاختبار في الكشف الكيفي والكمي عن البولة. يتحلمه الدي أسيتيل مونوكسيم في وسط حمضي معطياً دي أسيتيل، تتكاثف البولة مع الدي أسيتيل بدرجة حرارة 100م وتعطي معقد بلون أحمر وردي. يضاف الثيوسيمي كاربازيد Thiosemicarbazideلتحفيز تشكل المعقد اللوني.



المواد المستعملة:

- محلول دي أسيتيل مونوكسيم 1%
- محلول تيوسيميكاربازيد 0.5%
- حمض كبريت مركز
- محلول البولة 1%

طريقة العمل:

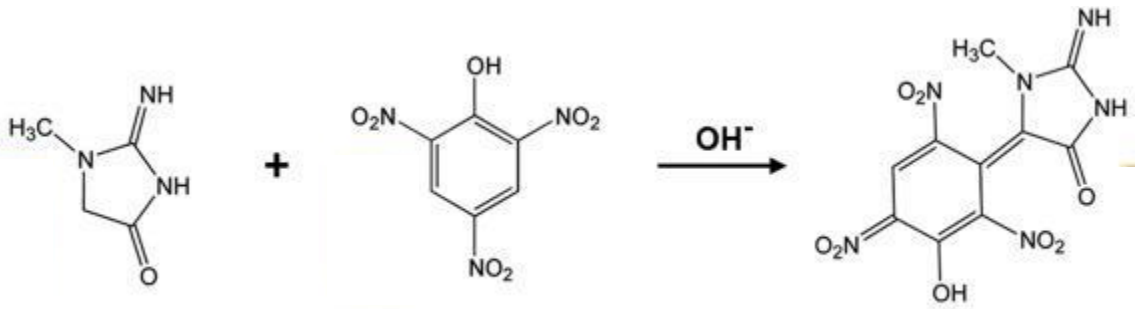
1. يوضع في أنبوب اختبار 0.5مل من محلول البولة.
2. يضاف 0.5مل دي أسيتيل مونوكسيم.
3. تضاف بضع قطرات من حمض الكبريت المركز على جدران الأنبوب.
4. يضاف 0.5مل تيوسيميكاربازيد.
5. يسخن الأنبوب على حمام مائي بالدرجة 100مئوية لمدة 10دقائق.
6. تسجل الملاحظات والنتائج.

جامعة المنارة
MANARA UNIVERSITY

التجربة رقم 2:تفاعل جافيه Jaffee للكشف عن الكرياتينين

المبدأ:

إن طريقة جافيه هي أقدم طريقة ولازالت تستخدم حتى اليوم في كشف ومعايرة الكرياتينين لكن مع بعض التعديلات. يتكاثف الكرياتينين مع حمض المر Picric acid (حمض2،4،6 ثلاثي نترو الفينول) في وسط قلوي مشكلاً معقد بلون أصفر برتقالي يدعى (معقد جانوفسكي.)



Creatinine Picric acid Janovsky complex

المواد المستعملة:

- حمض المر
- ماءات الصوديوم
- محلول الكرياتينين

طريقة العمل:

1. يوضع في أنبوب اختبار 0.5مل من محلول الكرياتينين.
2. يضاف 0.5مل من حمض المر.
3. تضاف عدة قطرات من ماءات الصوديوم.
4. تسجل الملاحظات والنتائج.

جامعة المنارة MANARA UNIVERSITY

التجربة رقم 3:الكشف عن النشادر باستخدام كاشف نسلر

المبدأ:

يتألف كاشف نسلر من رباعي يود زئبقات البوتاسيوم $K_2(HgI_4)$.يعطي هذا الكاشف مع النشادر راسباً بلون أصفر برتقالي إلى أحمر حسب تركيز النشادر.

المواد المستعملة:

- كاشف نسلر
- كبريتات الأمونيوم 1%
- ماءات الصوديوم 0.5%

طريقة العمل:

1. يوضع في أنبوب اختبار 0.5 مل من محلول كبريتات الأمونيوم.
2. يضاف 0.5 مل من كاشف نسلر
3. تضاف عدة قطرات من ماءات الصوديوم.
4. تسجل الملاحظات والنتائج.

جامعة المنارة
MANARA UNIVERSITY

الجلسة 10: الشحوم (1) الكشف عن الحموض الدسمة وثلاثيات الغليسيريد

أهداف الجلسة:

1. دراسة خاصية انحلالية الشحوم في الماء والمذيبات العضوية المختلفة.
2. التعرف على التفاعلات النوعية للكشف عن الغليسيرول وثلاثيات الغليسيريد.
3. التعرف على التفاعلات النوعية لتمييز الحموض الدسمة سواء المشبعة أو غير المشبعة.

مقدمة:

تعرف الشحوم (الليبيدات Lipids) بأنها مركبات عضوية تكون غالباً بشكل أسترات لأغوال معقدة مع الحموض الدسمة. تتميز بأنها مركبات غير قطبية، انحلاليتها ضعيفة أو معدومة في الماء، بينما تنحل في المحلات العضوية. تأتي في المركز الثاني كمركز للطاقة في الجسم بعد السكريات، وتؤدي وظائف أخرى هامة حيث تساهم في بنية الأغشية الخلوية (الفوسفولبيدات والكوليسترول) وتلعب دور تمائم أنزيمية (الفيتامينات المنحلة في الدسم) وتساهم في ضبط الاستتباب الداخلي في الجسم (الهرمونات الستيروئيدية.)

تتكون الحموض الدسمة من سلسلة هيدروكربونية طويلة وزمرة كربوكسيلية طرفية، وتكون مشبعة (جميع الروابط فيها أحادية) مثل حمض الشمع أو غير مشبعة (تحوي رابطة مضاعفة أو أكثر) مثل حمض الزيت. تكون الحموض الدسمة المشبعة صلبة في درجة حرارة الغرفة الأمر الذي يجعل الدهون الحيوانية صلبة على اعتبار أنها مكونة بشكل رئيسي من حموض دسمة مشبعة، أما الحموض الدسمة اللامشبعة فتكون سائلة كما في الزيوت النباتية.

أهم الشحوم:

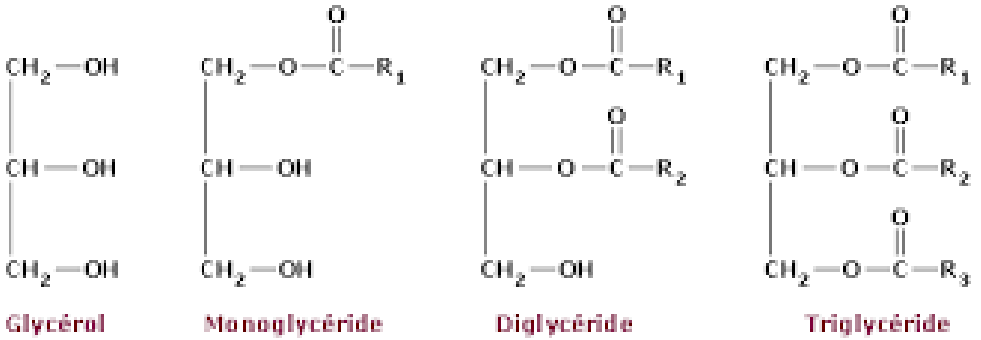


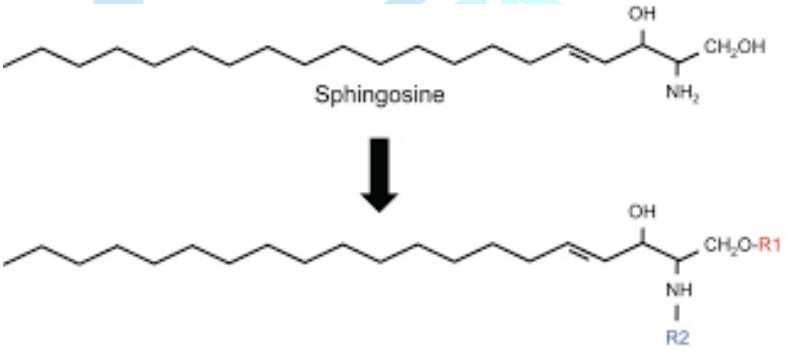
Figure 4 : Glycérides

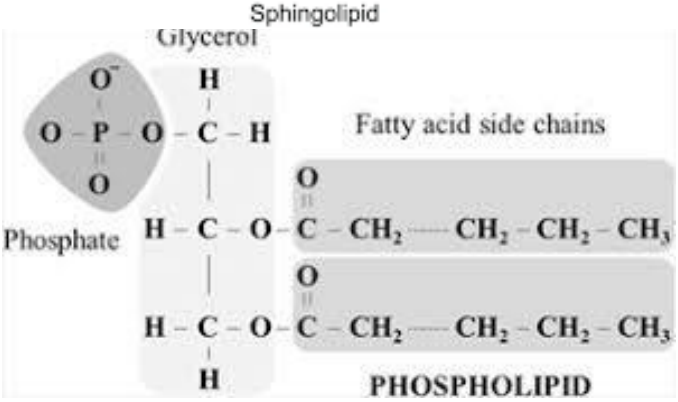
المنارة
MANARA UNIVERSITY

1.الغليسيريدات: تنتج عن أسترة الغليسرول مع الحموض الدسمة وهي إما متجانسة (تحتوي على نوع واحد من الحموض الدسمة) أو غير متجانسة (تحتوي على أكثر من نوع من الحموض الدسمة). حسب عدد الحموض الدسمة المتأسترة مع الغليسيرول تصنف إلى أحاديات أو ثنائيات أو ثلاثيات الغليسيريد (الشحوم الثلاثية.)

2.الشحميات الفوسفورية Phospholipids: مكونات هامة ومميزة للأغشية الخلوية يتم فيها تأستر إحدى الوظائف الكحولية الأولية للغليسرول مع حمض الفوسفور وليس بحمض دسم فأساسها هو حمض الغليسروفوسفوريك. وهي مركبات أمفيباتية لأنها تحوي على نهاية قطبية محبة للماء ونهاية غير قطبية محبة للدسم.

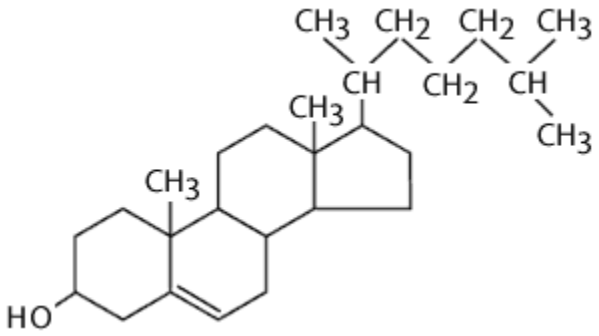
3.السفينغوليبيدات: ليبيدات معقدة أساسها السفينغوزين، وهي مكونات هامة للأغشية الخلوية وتوجد بكميات كبيرة في الدماغ والنسيج العصبي ومكونة من ثلاث جزيئات هي السفينغوزين أو أحد مشتقاته، وحمض دسم طويل السلسلة مشبع او غير مشبع، وجزيئة قطبية كبيرة الحجم.





https://manara.edu.sy/

4.الستيرولات والستيروئيدات: من أهمها الكوليسترول، يتواجد في المصل حراً أو مؤستراً مع حموض دسمة. يتمثل دوره في بناء الأغشية الخلوية مع الشحميات الفوسفورية، وكطليعة لاصطناع الهرمونات الستيروئيدية والحموض الصفراوية والفيتامين D. % 40من كولسيترول الجسم خارجي المنشأ، و 60 %منه داخلي المنشأ يتم اصطناعه منAcetyl-CoA خاصة في الكبد وقشر الكظر.



جَامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

التجربة رقم 1:دراسة الخاصية الذوبانية للشحوم

المبدأ:

يمكن الكشف عن الشحوم من خلال خواصها الانحلالية، كذلك يمكن الاستفادة من تفاوت انحلاليتها في المحلات المختلفة من أجل فصلها من مزائجها. تنحل في المحلات العضوّية اللاقطبية مثل الكلوروفورم والأيتر، وأغلبها ينحل في الإيتانول والأسيتون. وتشّكل جميعها في الماء مستحلباً ذا لون حليبي.

المواد المستعملة:

- أسيتون
- ايتر ايتيلي
- ايتانول 95%
- ماء مقطر
- زيت نباتي
- حمض دسم (حمض الزيت.)

طريقة العمل:

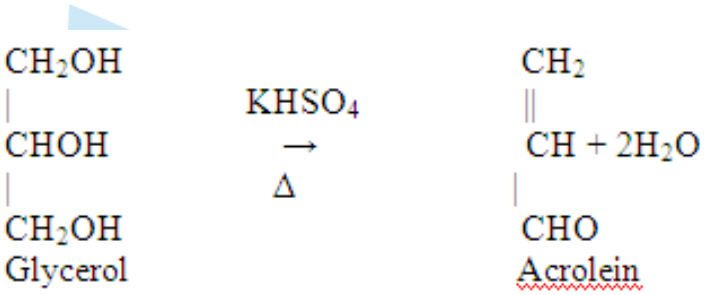
1. خذ أربعة أنابيب اختبار نظيفة وجافة وضع في الأوّل 2مل ماء مقطر وفي الثاني 2مل من الأيتر أو الكلوروفورم وفي الثالث 2مل كحول إيتيلي وفي الرابع 2مل من الأسيتون.
2. أضف إلى كل أنبوب 4نقاط من الزّيت النّباتي أو من حمض الزيت.
3. خض الأنابيب بشكل جّيد ولاحظ مدى الانحلال في الأنابيب الأربعة.
4. سجل ملاحظاتك ونتائجك.

جامعة المنارة
MANARA UNIVERSITY

التجربة رقم 2: الكشف عن الغليسيرول من خلال تفاعل تشكل الأكرولئين

المبدأ:

يستخدم هذا الاختبار للكشف عن الغليسرول الحر أو المرتبط مع الحموض الدسمة بروابط استيرية بشكل غليسيريدات من خلال تفاعل تشكل الأكرولئين، يتم نزع جزيئ ماء من كل جزئ غليسرول من خلال التسخين بوجود بيكبريتات البوتاسيوم KHSO4الصلبة، فيتحول الغليسرول إلى اكرولئين والذي يمكن تمييزه من رائحته الواخذة المهيجة للأغشية المخاطية.



المواد المستعملة:

- مسحوق ثاني كبريتات البوتاسيوم.
- زيت نباتي (زيت الزيتون)

طريقة العمل:

1. ضع حوالي 0.25غ من مسحوق ثاني كبريتات البوتاسيوم في أنبوب اختبار.
2. أضف5 قطرات من زيت الّزيتون.
3. سخن بحذر على نار هادئة حتى يسوّد المزيج
4. الرائحة النّفاذة الحادّة هي رائحة الأكرولئين.

جامعة المنارة
MANARA UNIVERSITY

التجربة رقم 3:التفاعل مع خلات النحاس لتمييز الحموض الدسمة الحرة

المبدأ:

يستخدم هذا الاختبار لتمييز الحموض الدسمة الحرة سواء كانت مشبعة أو غير مشبعة. لا تتفاعل الزيوت أو الدهون مع محلول خلات النحاس أما الأحماض الدسمة فتتفاعل مع خلات النحاس وتعطي ملح النحاس المقابل. مثلاً يتفاعل حمض الزيت مع خلات النحاس معطياً زيتات النحاس. الملح النحاسي المتكون يمكن استخلاصه بواسطة الإيثر البترولي.

المواد المستعملة:

- زيت نباتي.
- حمض دسم (حمض الزيت.)
- محلول خلات النحاس (كاشف بارفويد.)
- ايتر البترول.

طريقة العمل:

1. ضع 2مل من محلول خلات النحاس في أنبوبي اختبار.
2. أضف 5 قطرات من الزيت النباتي إلى أحد الأنابيب ومن حمض الزيت إلى الأنبوب الآخر وامزج جيداً.
3. أضف 2مل من الايتر البترولي إلى كل أنبوب.
4. لاحظ تلون الطبقة الايترية العلوية في الأنبوب الحاوي على الحمض الدسم بلون أزرق نتيجة احتوائها على ملح زيتات النحاس، أما في الأنبوب الحاوي على الزيت النباتي فتبقى الطبقة الايترية شفافة.

جامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

الجلسة 11: الشحوم (2) الكشف عن الكوليسترول

أهداف الجلسة:

1. التعرف على التفاعلات النوعية للكشف عن الكوليسترول في محاليله.
2. التعرف على تفاعل التصبن والذي يمكن أن يستخدم للكشف عن الحموض الدسمة وللتمييز بين الليبيدات القابلة للتصبن وتلك الغير قابلة للتصبن.

أولاً: تفاعلات الكشف عن الكوليسترول:

الكوليسترول هو عبارة عن مركب ستيروئيدي له مصدران: خارجي عن طريق الغذاء الحيواني (الكبد، المخ، صفار البيض، السمك..) وداخلي عن طريق الاصطناع الحيوي له في خلايا الكبد بشكل رئيسي بدءاً من Acetyl Co A . ينقل الكولسترول في البلازما عن طريق البروتينات الشحمية Lipoproteins حيث يكون مرتبطاً مع البروتينات والفوسفوليبيدات وثلاثيات الغليسريد لتشكيل بنية البروتين الشحمي.

يوجد الكولسترول بشكلين: حر غير مؤستر يتركز على سطح الليبوبروتين وبشكل مؤستر مع الحموض الدسمة (حمض الزيت وحمض الشمع) يتركز داخل اللب الكاره للماء في الليبوبروتين، ويمثل الكولسترول المؤستر ثلثي الكولسترول الكلي في البلازما. يلعب الكولسترول دوراً حيوياً هاماً في بناء وإصلاح الأغشية الخلوية وهو طليعة لاصطناع الحموض الصفراوية وفيتامين Dوالهرمونات ذات البنية الستيروئيدية.

جامعة المنارة
MANARA UNIVERSITY

التجربة رقم 1: تفاعل ليبرمان للكشف عن الكوليستيرول

المبدأ: يعتبر تفاعل ليبرمان التفاعل النوعي للكشف عن الكوليسترول وله أهمية كبيرة في معايرة الكوليسترول في الدم. يتفاعل الكوليسترول مع بلا ماء حمض الخل في وسط يحوي حمض الكبريت المركز فيتشكل مركب كبريتات الكوليسترولين ذي اللون الأخضر المزرق.

المواد المستعملة:

- بلا ماء حمض الخل
- حمض الكبريت المركز
- محلول الكوليسترول 1% (يحل 1غ من الكوليستيرول في 100مل من حمض الخل الثلجي).

طريقة العمل:

1. ضع 2 مل من محلول الكوليسترول في أنبوب اختبار زجاجي جاف.
2. أضف1 مل من بلا ماء حمض الخل وامزج جيداً.
3. أضف 2 مل حمض كبريت مركز على جدران الأنبوب وبهدوء.
4. لاحظ تشكل لون زهري في البداية ثم لا يلبث أن يتحول تدريجياً إلى لون أخضر مزرق.

جامعة المنارة
MANARA UNIVERSITY

التجربة2: تفاعل سالكوفسكي للكشف عن الكوليسترول

المبدأ: يستخدم هذا التفاعل للكشف عن الكوليستيرول في محلوله في الكلوروفورم وذلك باستخدام حمض الكبريت المركز. حيث تتلون طبقة الكلوروفورم العلوية باللون الأحمر القاتم، أما طبقة حمض الكبريت تتلون بلون أصفر وتألق أخضر.

المواد المستعملة:

- محلول الكوليسترول في الكلوروفورم 1%
- حمض الكبريت المركز

طريقة العمل:

1. ضع في أنبوب اختبار جاف ونظيف حوالي 2 مل من محلول الكولسترول في الكلوروفورم.
2. أضف بحذر على جدار الأنبوب الداخلي 0.5 مل من حمض الكبريت المّركز
3. خض الأنبوب بلطف.
4. لاحظ ظهور اللون الأحمر البنفسجي.
5. سجل النتائج والملاحظات.

جَامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

ثانياً: تفاعل التصبن:

يعرف تفاعل التصبن saponification بأنه تفاعل حلمهة الأسترات في وسط قلوي يؤدي لتشكيل الكحول وأملاح الحموض الدسمة التي تعرف بالصابون. يكون الصابون الصوديومي مادة صلبة بينما الصابون البوتاسيومي فهو أقل صلابة وكلاهما قابل للذوبان في الماء. أما الصابون الكالسيومي فهو صلب وغير قابل للذوبان في الماء. ونستطيع استعادة الحمض الدسم بشكله الحر عن طريق التفاعل مع حمض قوي مثلHCl.

تصنف الشحوم من حيث قابلية التصبن إلى:

1. الشحوم المعقدة (القابلة للتصبن:)

- ثلاثيات الغليسريد
- الفوسفولبيدات
- السفينغوليبيدات
- الشموع

2. الشحوم البسيطة (الغير القابلة للتصبن:)

- التربينات
- الستيرولات و الستيروئيدات
- البروستاغلاندينات

جَامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

التجربة 3: تفاعل تصبن الغليسيريدات

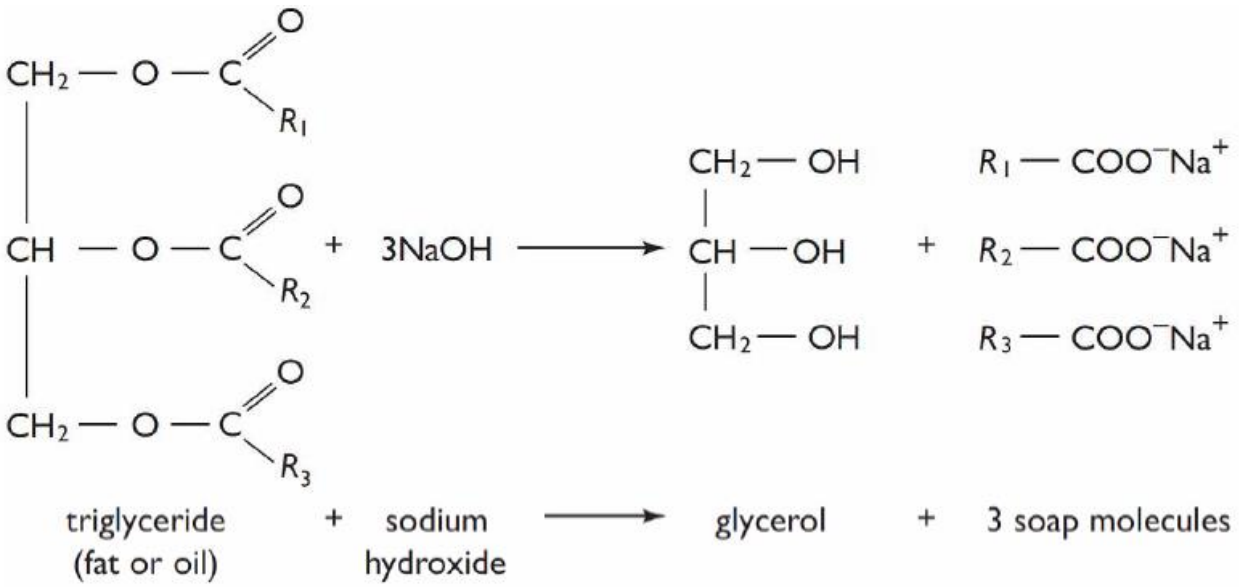
المبدأ: تخضع الغليسيريدات في الأوساط القلوية لتفاعلات حلمهة يتشكل بنتيجتها أملاح للحموض الدسمة التي تعرف بالصابون. يكون ذلك من خلال تسخين المادة الدسمة الحاوية على الغليسيريدات بوجود قلوي (هيدروكسيد الصوديوم أو البوتاسيوم).

المواد المستعملة:

- محلول هيدروكسيد البوتاسيوم KOH أو هيدروكسيد الصوديوم NaoH
- زيت نباتي (زيت الزيتون)

طريقة العمل:

1. خذ في أنبوبي اختبار كبيرين نسبياً 1مل زيت وأضف 10مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم إلى الأنبوب الأول و 10مل من هيدروكسيد الصوديوم للأنبوب الثاني.
2. امزج المحتويات وسخن المزيج في حمام مائي مع التحريك المستمر، استمر بالتسخين لمدة 20-15دقيقة.
3. لاحظ تشكل طبقة من الصابون على سطح المزيج.
4. اترك المزيج يبرد وافصل الصابون بالإبانة واحفظه للتفاعلات التالية.



https://manara.edu.sy/

التجربة رقم 4: الاختبارات على محلول الصابون:

1. خذ 3مل من محلول الصابون في الماء في انبوب اختبار وأضف إليه 2مل من كلوريد الكالسيوم 5% ولاحظ تشكل راسب من الصابون الكالسيومي عديم الانحلال بالماء. اكتب معادلة التفاعل الجاري

2. أضف إلى 3مل من محلول الصابون في الماء نفس الحجم من كلوريد الصوديوم المشبع، لاحظ ترسب الصابون بسبب ضعف انحلاله في المحاليل الملحية وكأنه طرد من محلوله المائي.

3. ضع 3مل من محلول الصابون في انبوب اختبار وأضف إليه 2 مل من محلول حمض كلور الماء، تأكد من أن الوسط حمضي من خلال ورقة عباد الشمس امزج محتويات الأنبوب واتركه جانباً لعدة دقائق. لاحظ بعد ذلك تشكل طبقة من الحمض الدسم الحر قد انفصلت وتوضعت على سطح السائل اكتب معادلة التفاعل الجاري.

جَامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY