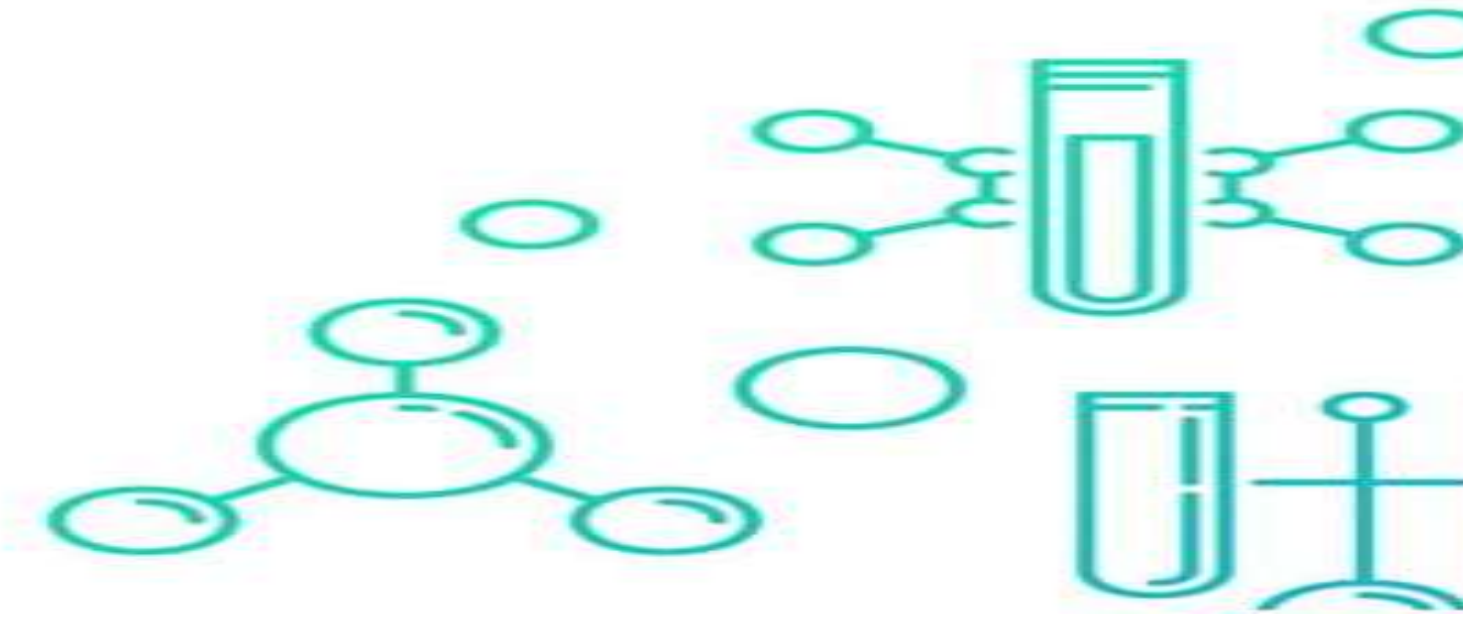


https://manara.edu.sy/

المحتويات

الجلسة 5: الشحوم 2

الجلسة 6: الأحماض الأمينية والبروتينات 1

الجلسة 7: الأحماض الأمينية والبروتينات (2

الجلسة 8: الأحماض الأمينية والبروتينات (3

الجلسة9:فصل وترسيب البروتينات (2

الجلسة 10: الكشف عن المركبات الآزوتية

الجلسة 5: 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.

جَامعة المَنارة
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.

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.

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

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:

جامعة المنارة MANARA UNIVERSITY

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

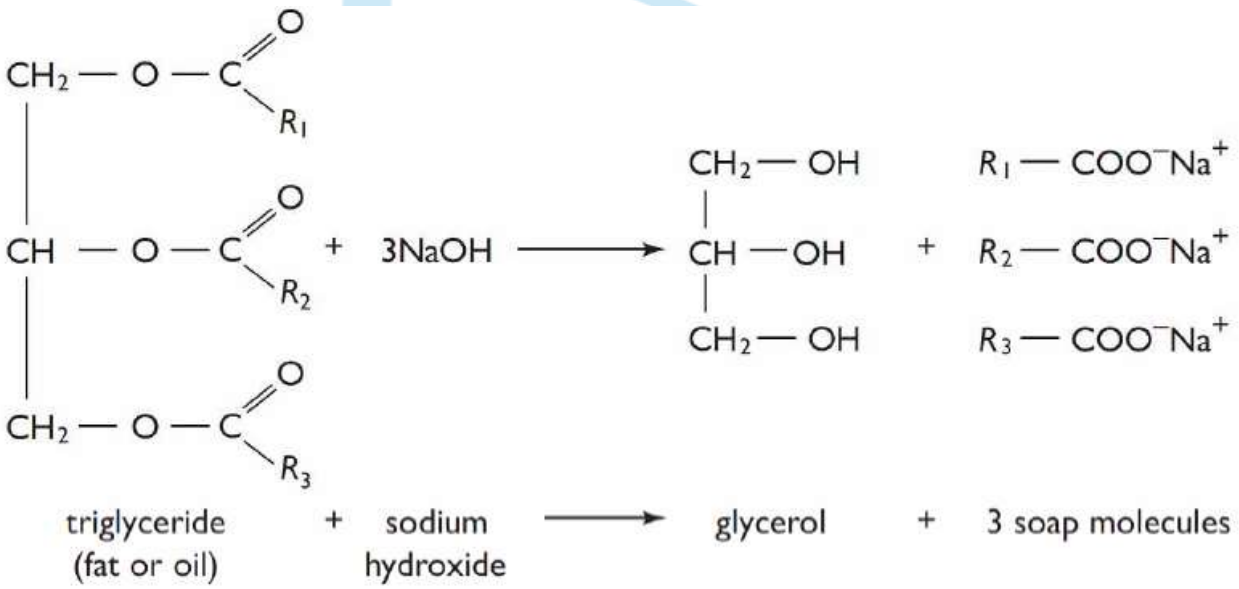
طريقة العمل:

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.



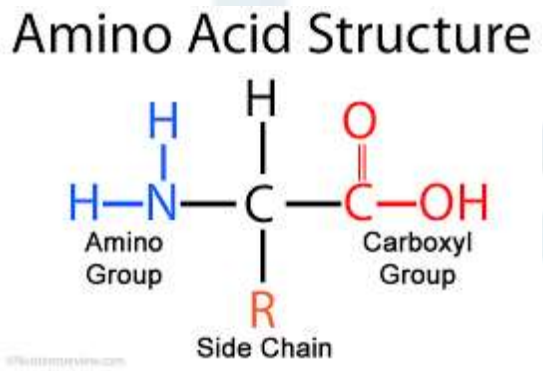
المنارة
MANARA UNIVERSITY

الجلسة6: الأحماض الأمينية والبروتينات (1)

أهداف الجلسة:

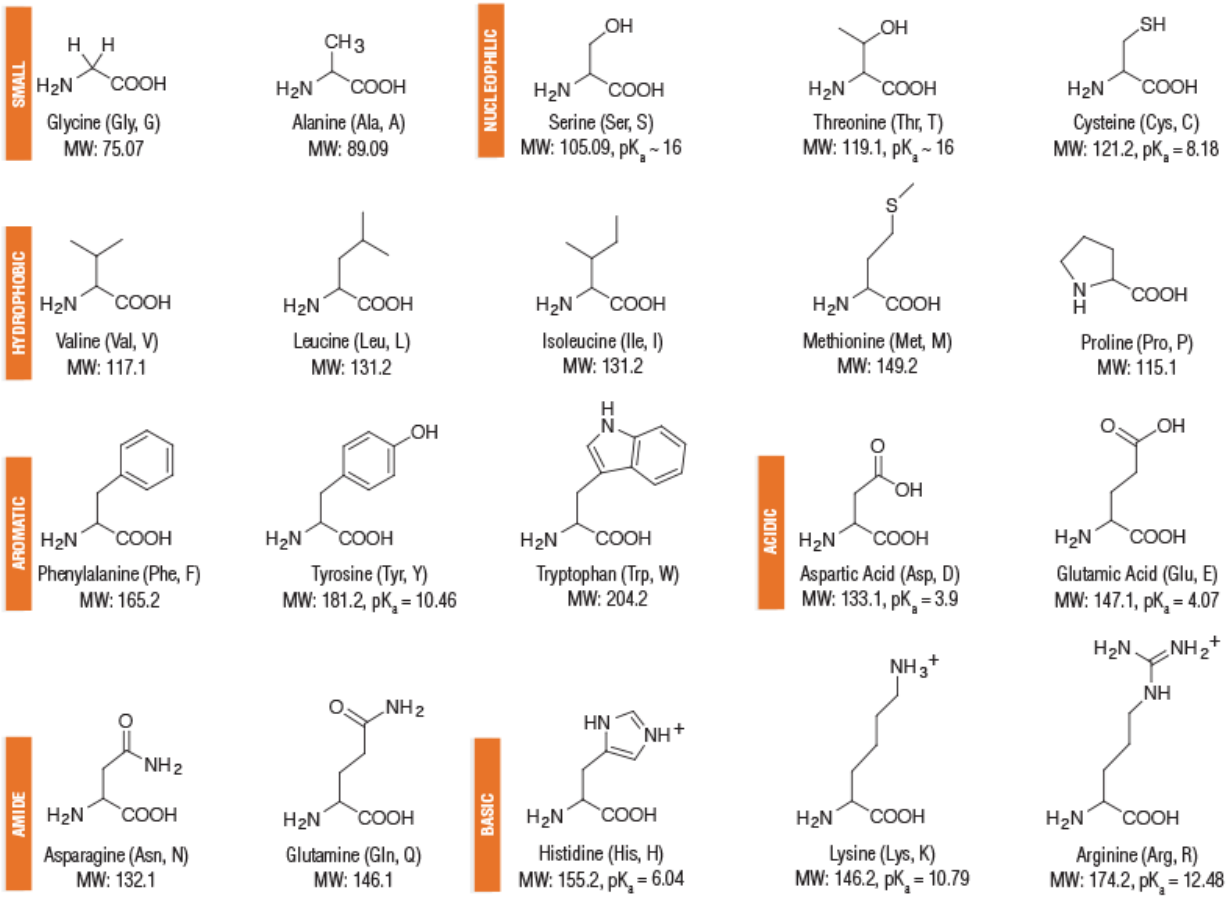
1. التعرف على تفاعلات الكشف عن الأحماض الأمينية في محاليلها وتمييزها عن المحاليل البيولوجية الأخرى.
2. التعرف على تفاعلات الكشف عن البروتينات في محاليلها وتمييزها عن المحاليل البيولوجية الأخرى.

مقدمة:

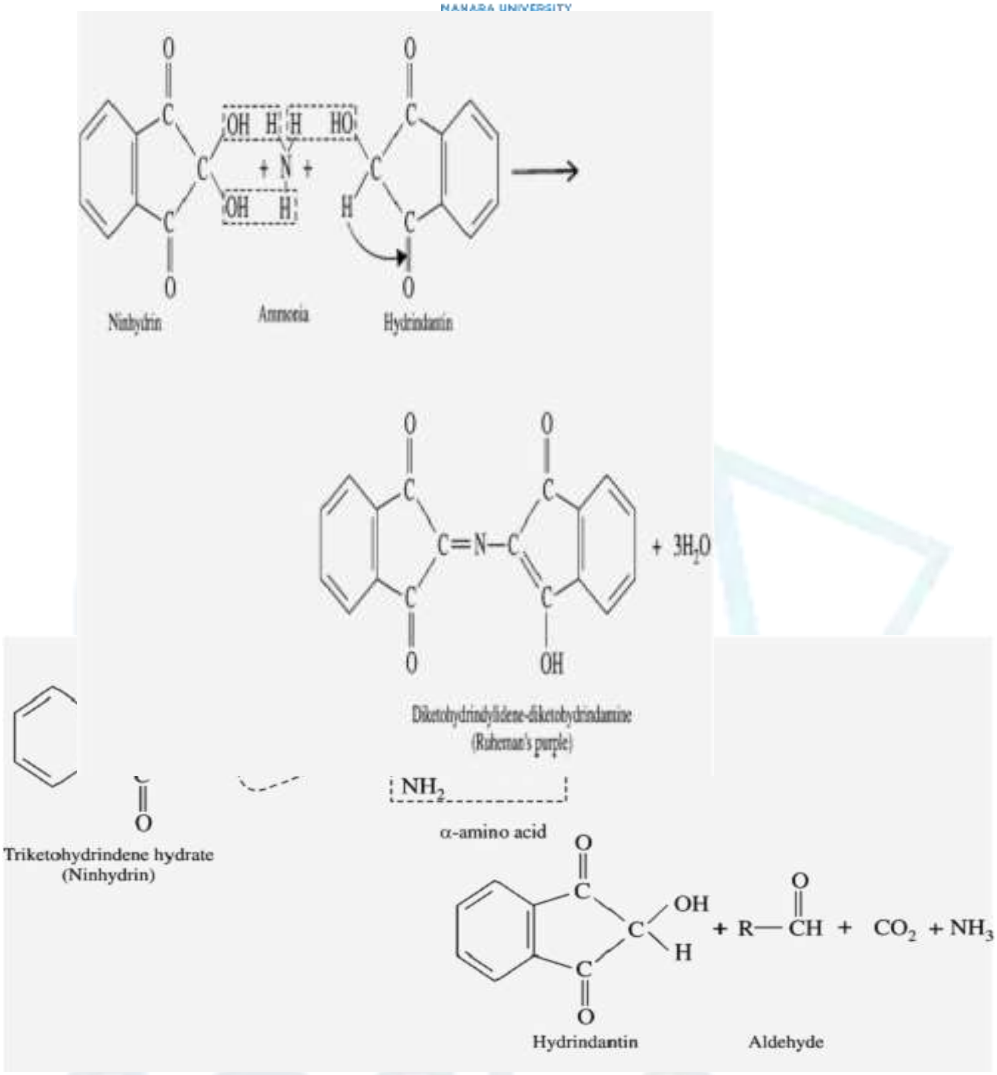


الأحماض الأمينية هي الوحدات الأساسية في بناء عديدات الببتيد والبروتينات، وتنتج عن الحلمهة الكيميائية أو الأنزيمية للبروتينات. جميع الحموض الأمينية المكونة للبروتينات الحيوية تشترك بأنها تحتوي على زمرة كربوكسيلية حمضية وزمرة أمين أولي قاعدية (عدا البرولين والهيدروكسي برولين فيحتويان على أمين ثانوي).

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



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).



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.

المواد المستعملة:

- محلول النينهيدرين 0.1%
- محلول ألبومين

- محاليل أحماض أمينية (غليسين 0.5%، برولين 0.5%).

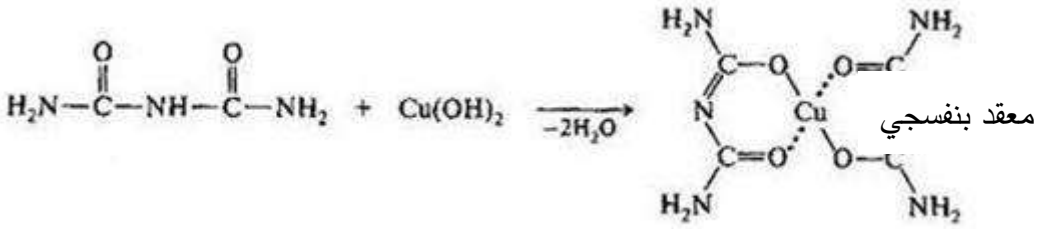
طريقة العمل:

1. أضف 1مل من محلول النهيدرين 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.

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 الصوديوموالبوتاسيوم في 500مل ماء مقطر، ثم يضاف 300 مل من ماءات الصوديوم 10% ، ويكمل الحجم بالماءالمقطر 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

https://manara.edu.sy/

الجلسة 7: 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 الكز انتوبروتئين 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.

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.

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.

الجلسة 8: 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.

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.

الجلسة 9: 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

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 حمضالساليسيليك 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 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 الصفرنتيجة 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 الـpH القريبة من4.6. 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
- 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.

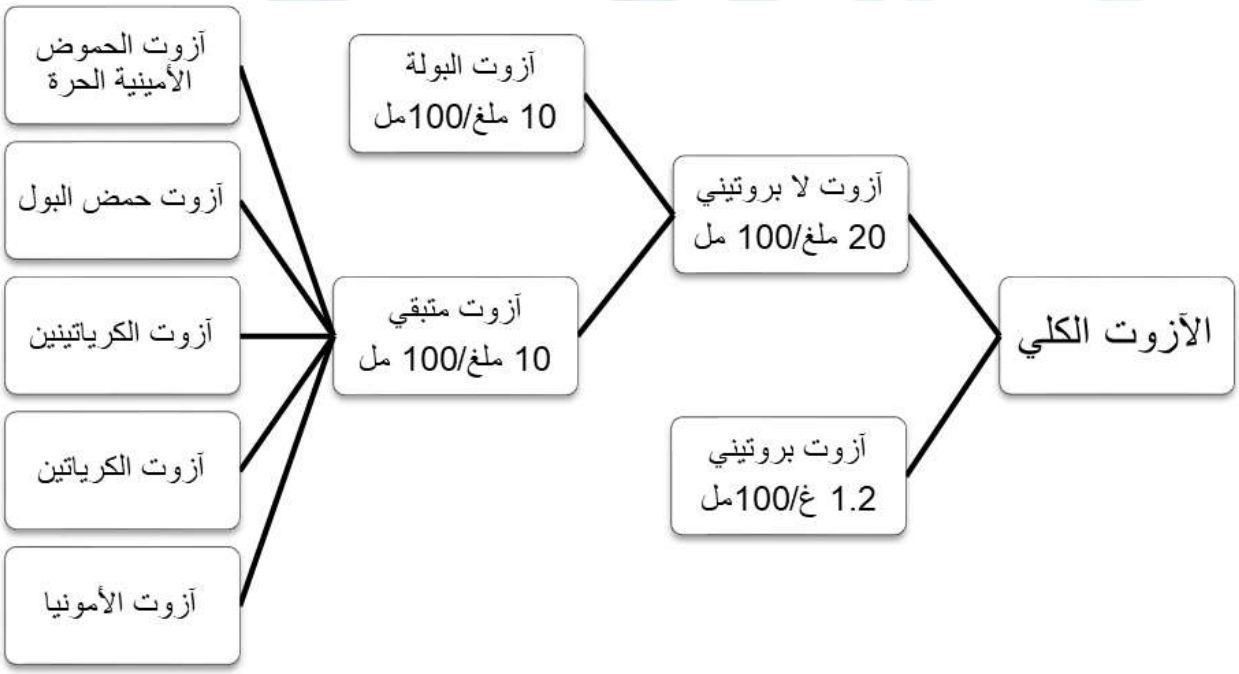
الجلسة 10: الكشف عن المركبات الآزوتية (البولة والكرياتينين والنشادر)

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.

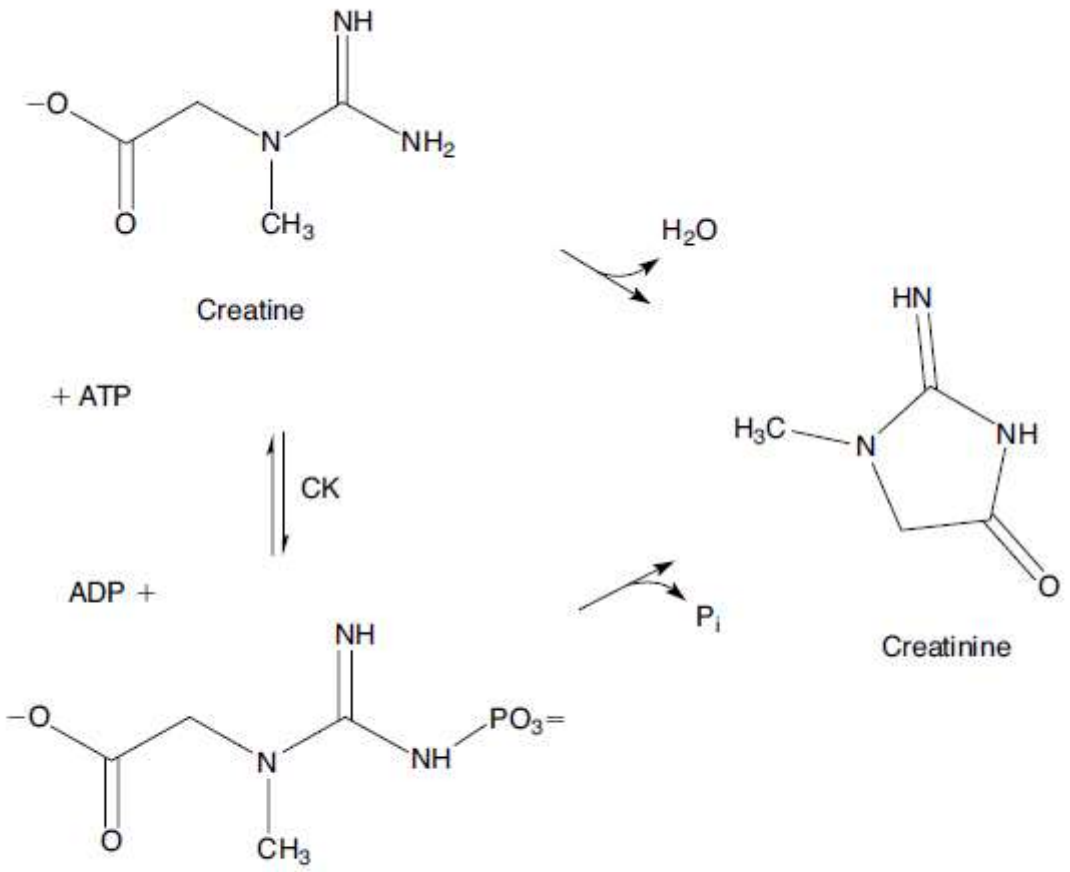


البولة Urea:

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:

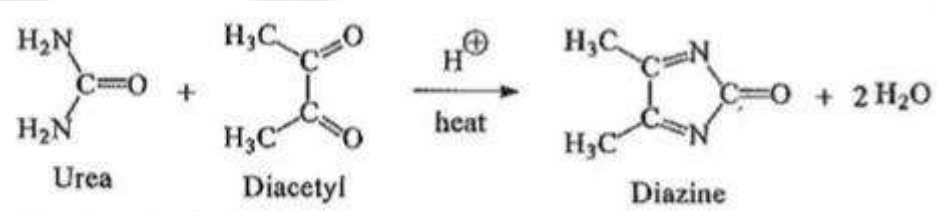
هو بلا ماء الكرياتين، ينشأ الكرياتين في الكبد من الحموض الأمينية التالية: الغليسين والأرجينين والمتيونين، ثم يتحول في العضلات إلى كرياتين فوسفات كمركب خازن للطاقة بتدخل أنزيم الكرياتين كيناز. يتحول يومياً من 1.5 – 2%من مجموع الكرياتين في الجسم إلى كرياتينين الذي ينتقل بالبلاسما إلى الكلية حيث ينطرح بالبول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



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 Thiosemicarbazide لتحفيز تشكل المعقد اللوني.



المواد المستعملة:

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

طريقة العمل:

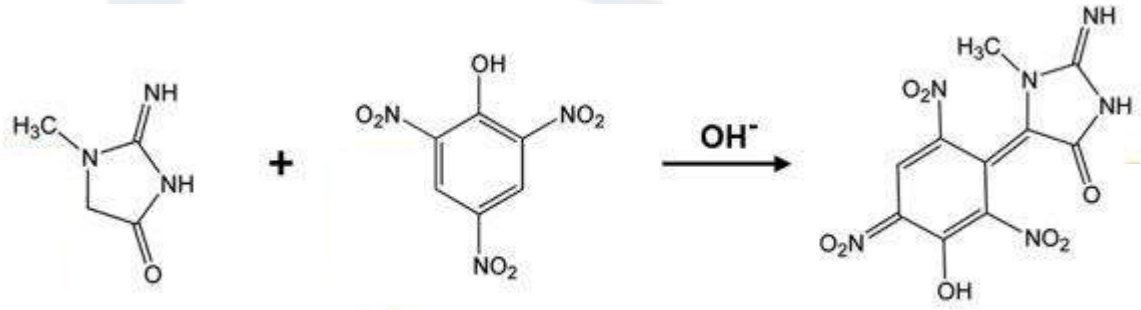
1. يوضع في أنبوب اختبار 0.5مل من محلول البولة.
2. يضاف 0.5مل دي أسيتيل مونوكسيم.
3. تضاف بضع قطرات من حمض الكبريت المركز على جدران الأنبوب.
4. يضاف 0.5مل تيوسيميكاربازيد.
5. يسخن الأنبوب على حمام مائي بالدرجة 100مئوية لمدة 10دقائق.
6. تسجل الملاحظات والنتائج.

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 المرPicric 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.

التجربة رقم 3:الكشف عن النشادر باستخدام كاشف نسلر

المبدأ:

يتألف كاشف نسلر من رباعي يود زئبقات البوتاسيوم (K2(Hg I4.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.

جَـامعة
المَـنارة
MANARA UNIVERSITY

جَـامعة
المَـنارة
MANARA UNIVERSITY

https://manara.edu.sy/

جَـامعة
المَـنارة
MANARA UNIVERSITY

جَـامعة
المَـنارة
MANARA UNIVERSITY

https://manara.edu.sy/