Carbohydrates: الكاربوهيدرات

هي الديهيدات او كيتونات متعددة الهيدروكسيل وتتركب من الكاربون والهيدروجين والاوكسجين والاخيران موجودان بنفس نسبتهما بالماء وصيغتها العامة $(C_n H_{2n} O_n)$.

{ منشأ الكربوهيدرات من النباتات بعملية التركيب الضوئي }.

وللكاربوهيدرات وظائف او فوائد منها: -.

(1) تركيبية . (تدخل في تركيب جدار الخلية الصلب كالسيليلوز) .
(2) مخزن للطاقة . (مثل النشا والكلايكوجين)
(3) -مصدر للطاقة . مثل الكلوكوز ← ATP .

التفاعلات الخاصة بالكربوهيدرات :-

(أ) تأثير الحوامض الغير مؤكسِدة على السكريات :

الحوامض غير المؤكسِدة تتفاعل مع السكريات الاحادية وتجردها ثلاث جزيئات ماء مكونة Furfural في حالة الخماسية. وال Hydroxy methyl furfural في حالة السداسية . وعلى هذا الاساس تعتمد تجارب مولش , سليفانوف , بيال .حيث يتحد الفورفورال ومشتقه مع انواع مختلفة من الفينولات مكوناً معقدات ملونة .

(1) كشف مولش Molisch Test [وهو كشف عام عن الكربوهيدرات]

حيث يُحلل حامض H_2SO_4 المركز (عامل مجفف وليس عامل مؤكسِد) dehydrating (agent) الاواصر الكلايكوسيدية ليعطي سكريات احادية تفقد بدورها(3جزيئات) من الماء لتعطي الFurfural ومشتقه اللذين يتحدان بدورهما (تكثف) مع Alcoholic - α - naphthol (الفا نفثول الكحولي) وظهور المعقد البنفسجي على شكل حلقة.

:Procedure تضاف قطرتان من محلول الفا نفثول الكحولي الى (2 مل) من المحلول السكري في انبوبة اختبار , يرج الخليط جيداً ثم يضاف وباحتراس على جدران الانبوبة الداخلية حوالي (1

مل) H_2SO_4 المركز بحيث ينزلق الى قعر الانبوبة مكوناً طبقتين من المحلول السكري ↑ والحامض ↓ وعند السطح الفاصل تظهر الحلقة البنفسجية .

(2) كشف سيليڤانوف: Seliwanoff Test [خاص بالسداسية الكربون الكيتونية].

لتمييز السكريات الأحادية الجزيئة السداسية الكربون الكيتونية مثل الفركتوز عن الأحادية الجزيئة السداسية الكربون الالديهايدية مثل الكلوكوز.

يعد هذا الكشف مفيداً عند الكشف عن ال Ketoses (مثل الفركتوز) , ومماثلاً لمولش حيث استبدل فيه H_2SO_4 بحامض HCL(3N , 12%) ومادة الفانفثول بمادة الريزورسينول .

Procedure : تضاف قطرتان من محلول السكر الى 1 ml من الكاشف ويرج الخليط . ثم يوضع في حمام مائي مغلي Boiling water bath ولمدة (10 min) حتى يظهر اللون الاحمر

(3) كشف بيال : Bial Test [للتمييز بين الخماسية والسداسية الكربون]

وهو كشف خاص بالسكريات الأحادية الجزيئة الخماسية الكربون Pentoses والتي عند تسخينها بوجود (HCl) المركز يتحرر ال Furfural الذي بدوره يتحد مع Orcinol بوجود ايون (Fe^{+3}) ليكون مركباً لونه اخضر مزرق. وهذا الكشف ما هو الا تعديل آخر لكشف مولش استبدل فيه H_2SO_4 والفانفثول . بحامض HCl والاورسينول على التوالي

Procedure: امزج 1 ml من المحلول السكري مع 2 ml من كاشف بيال في (T.T) ويسخن المزيج في حمام مائي يغلي لمدة (10 – 20) دقيقة لحين ظهور اللون الاخضر المزرق في حالة وجود سكر خماسي اي ان النتيجة Positive (+).

اذاً هو كشف لتميز السكريات الخماسية الكربون عن السداسية الكربون .

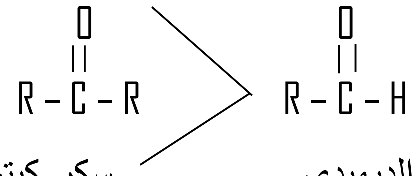
(ب)الصفات الاختزالية للسكريات :

باختزال السكريات فأنها تتحول الى كحولات مثل اختزال الكلوكوز فأنه يتحول الى كحول السوربيتول والمانوز الى كحول المانيتول والفركتوز الى كحولي السوربيتول والمانيتول . اما اكسدة السكريات فانها تتحول الى حوامض كربوكسيلية .

(1) تقاس القابلية الاختزالية للسكريات من خلال قدراتها على اختزال ايونات الفلزات $(Ag^{+}$ أو $Cu^{+2})$ في محيط قاعدي الى اكاسيدها الواطئة او الى الفلز نفسه .

حيث ان جذر الكربونيل ($C=O$) له صفة اختزالية حيث تختزل ايونات الفلزات مثل النحاس والفضة محوله اياها اما الى اكاسيدها الواطئة كما في كشف بندكت او الى الفلز نفسه كما في تولن ويتم ذلك في محيط قاعدي غالباً .

(2) السكريات الاحادية اقوى اختزالاً من الثنائية والثلاثية بسبب كبر الوزن الجزيئي للأخيرة . والسكريات الاحادية الكيتونية (مثل الفركتوز) اقوى اختزالاً من الاحادية الالديهيدية مثل (الكلوكوز) بسبب المجاميع الدافعة للالكترونات .



أقوى اختزالاً .

سكر كيتوني   سكر الديهيدي

(1)كشف بندكت : Benedict Test (كشف عام عن السكريات المختزلة)

هو كشف عام لجميع السكريات المختزلة وفيه تختزل املاح النحاسيك (Cu^{+2}) في محيط قاعدي ضعيف الى راسب احمر من اوكسيد النحاسوز (Cu^{+1}) Cu_2O .

Procedure : تضاف 5 قطرات من محلول السكر الى 2 ml من كاشف بندكت في (T.T)ويرج الخليط ثم يوضع في حمام مائي مغلي لمدة 5 min . حتى ظهور الراسب الاحمر .

س/ ما فائدة كاربونات الصوديوم في كاشف بندكت ؟

ج/ تجعل المحيط قاعدي ضعيف وبذلك نضمن استجابة المواد السكرية المختزلة فقط دون غيرها للكشف .

(2) كشف بارفويد : Barfoed Test [لتميز السكريات الاحادية الجزيئة عن الثنائية]

أ) كاشف بارفويد عبارة عن محلول خلات النحاسيك $(CH_3COO)_2Cu$ وحامض الخليك CH_3COOH .

ب) بما ان الاختزال في الوسط الحامضي الضعيف يحدث بصعوبة لذا فالسكريات الاحادية المختزلة فقط بإمكانها اختزال ايون النحاسيك (لون ازرق) الى النحاسوز (لون احمر) .

ج)مماتقدم فإن كشف بارفويد يستعمل لتمييز السكريات الاحادية القوية الاختزال مثل Fr , Glu , Gal عن السكريات الثنائية ضعيفة الاختزال مثل Maltose , Lactose .

Procedure : اضف بضع قطرات من المحلول السكري الى 1مل من كاشف بارفويد في T.T ثم نضعه في حمام مائي مغلي لمدة 10 min بالضبط لاحظ ظهور الراسب الاحمر

(3)كشف حامض البكريك: Picric Acid Test

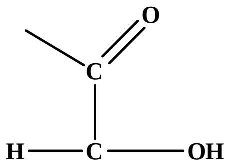
يعتمد هذا الكشف على اختزال حامض البكريك الاصفر اللون في وسط قاعدي (Na_2CO_3) الى حامض البكراميك الاحمر اللون بواسطة السكريات المختزلة ولقد امكن استخدام هذا الكشف سريراً في تقدير كمية الكلوكوز في الدم .

:Procedure

يمزج (2مل)من محلول السكر في انبوبة اختبار مع (1مل) من حامض البكريك المشبع ثم يضاف (0.5مل)من كربونات الصوديوم(10%) وتوضع الانبوبة في حمام مائي مغلي لمدة عشر دقائق حتى ظهور اللون الاحمر .

تكوين الاوزازون: Osazone Formation

تتفاعل السكريات الاحادية (الالديهيدية أوالكيتونية)وبعض الثنائية الحاوية على الجذرادناه:



مع الفنيل هايدرازين مكونة مركبات بلورية صفراء اللون ذات شكل مميز بالامكان ملاحظته تحت المجهر و يمكن تشخيص هذه المركبات بالاستعانة بالعوامل التالية:

1-اشكالها البلورية .

2-درجات انصهارها.

3-الزمن الذي يستغرقه تكوين تكون الاوزازون.

4-الوسط الذي انفصلت فيه البلورات(وسط حار أم بارد).

وعليه فتفاعل الاوزازون لايحدث الا مع جذر الكاربونيل الحر, فهو للسكريات المختزِلة فقط.

خطوات التفاعل:

(أ)تفاعل سكر الديهايدي مثل الكلوكوز مع الفنيل هيدرازين:

1-عملية التكثيف: Condensation

في هذه الخطوة يتفاعل الكلوكوز عن طريق المجموعة الالديهايدية في C_1 مع الفنيل هيدرازين ليعطي مركب الفنيل هيدرازون حيث يتحد جذر الامين مع جذر الكاربونيل تاركا الماء وهذه الخطوة تُعد اختزالاً لسكر الكلوكوز.

(2)عملية اكسدة: Oxidation

في هذه الخطوة تتاكسد مادة الفنيل هيدرازون الناتجة من الخطوة الاولى الى مركب كيتو فنيل هيدرازونketophenylhydrazone عند فقدانها لذرتي H المرتبطتين بذرة الكربون الثانية واللتين تعملان على اختزال الفنيل هيدرازين الى أنيلين وامونيا

(3)عملية تكثيف ثانية:

في هذه الخطوة يتحد كيتو فنيل هيدرازون مع جزيئة ثالثة من مادة الفنيل هيدرازين

في (C2)لتكوين بلورات الكلوكوزازون(Glucosazone)والتي تنفصل على شكل بلورات أبرية صفراء اللون وتتم عملية الفصل وانبوبة الاختبار في حمام الماء

(ب)تفاعل سكر كيتونى (الفركتوز)مع الفنيل هيدرازين:

في هذه الحالة تتكررنفس الخطوات الثلاثة السابقة للسكر الالديهايدي (الكلوكوز)الا ان الخطوة الاولى(التكثيف)تحدث عى ذرة الكربون الثانية C2ثم الاولىC1(عكس الكلوكوز)وينتج في النهاية مركب الفركتوزازون(Fructosazone) الذي يتشابه في صفاته الطبيعية والكيميائيةمع الكلوكوزازون(الفركتوزازون و الكلوكوزازون هما مركب واحد من الناحية الكيميائية)حيث تتشابه ذرات 3,4,5,6 في الكلوكوز والفركتوز. ويمكن بيان خطوات التفاعل كمايلي:

(1)-عملية التكثيف: Condensation

(2)عملية اكسدة: Oxidation

(3)عملية تكثيف ثانية:

اشكال البلورات

كلوكوزازون= ابري

فركتوزازون=ابري

مالتوزازون= نجمي

لاكتوزازون= دوار الشمس

Procedure:

1-نضع حوالي 2مل من المحلول السكري في انبوبة اختبار واضف اليه كمية زائدة؟ من كاشف الفنيل هيدرازين ثم رج الانبوبة رجاً جيدا حتى يذوب الكاشف.

2- ضع انبوبة الاختبار في حمام مائي مغلي لمدة نصف ساعة مع ملاحظة مايلي :

أ- بلورات(اوزازونات) السكريات الاحادية (كلوكوز,فركتوز مثلا) تنفصل في المحلول الساخن بسرعة؟.

ب- اذا انقضت فترة التسخين دون ان تترسب بلورات الاوزازون فيحتمل وجود سكر المالتوز او اللاكتوز (سكريات ثنائية مختزِلة) وفي هذه الحالة تترك انبوبة الاختبار لتبرد ببطء (دون محاولة تبريدها بالماء) لتنفصل بلورات هذين السكرين.

كشوفات السكريات المتعددة: Polysaccharides Tests

(1)كشف اليود: Iodine Test

السكريات المتعددة مركبات عديمة الطعم والرائحة.وتتكون من اتحاد عدد كبير من جزيئات السكريات الاحادية المرتبطة مع بعضها البعض بواسطة اواصر كلايكوسيدية مكونة سلاسل ذات اطوال مختلفة.والسكريات المتعددة على نوعين اما متجانسة مثل النشا والكلايكوجين والسليلوز اوغير متجانسة مثل الاكار والهيمي سليلوز والبكتين .ومن صفات السكريات المتعددة:

1- وزنها الجزيئي العالي .

2-عدم وجودها بحالة بلورية.

3- تحللها المائي يعطي وحدات عديدة من السكريات الاحادية.

اساس الكشف:

يعتمد هذا الكشف على تكوين اليود لمعقدات امدصاص ملونه(colored adsorption compounds).مع السكريات العديدة حيث يمتز اليود على سطوحها ليعطي الوان مميزة .والكشف حساس للحرارة ولا يصح اجراءهُ الا في الوسطين الحامضي والمتعادل البارد وسنأتي الى تفصيل ذلك لاحقاً

:Procedure

نضيف 5 قطرات من محلول اليود(0.05% من I_2 مذاب في3% KI)الى 1 مل من محلول السكر الموجود في انبوبة الاختبار هنا سيظهر اللون الازرق نتيجة لامتزاز اليود على سطح السكر المتعدد, ثم نسخن محتويات الانبوبة لدرجة الغليان ممايؤدي الى اختفاء اللون الازرق؟وظهوره بالتبريد ؟وعند الاستمرار بالتسخين الشديد يختفي اللون ولا يعاود الظهوربسبب تبخر اليود بصورة كلية.

(2)التحلل المائي للنشأ بواسطة الاحماض المعدنية :

Acid Hydrolysis of Starch

يتحلل النشأ وفق المعادلات التالية:

HCl+ Starch ⟶ Amylodextrin ⟶ Erythrodextrin ⟶ Achredextrin ⟶

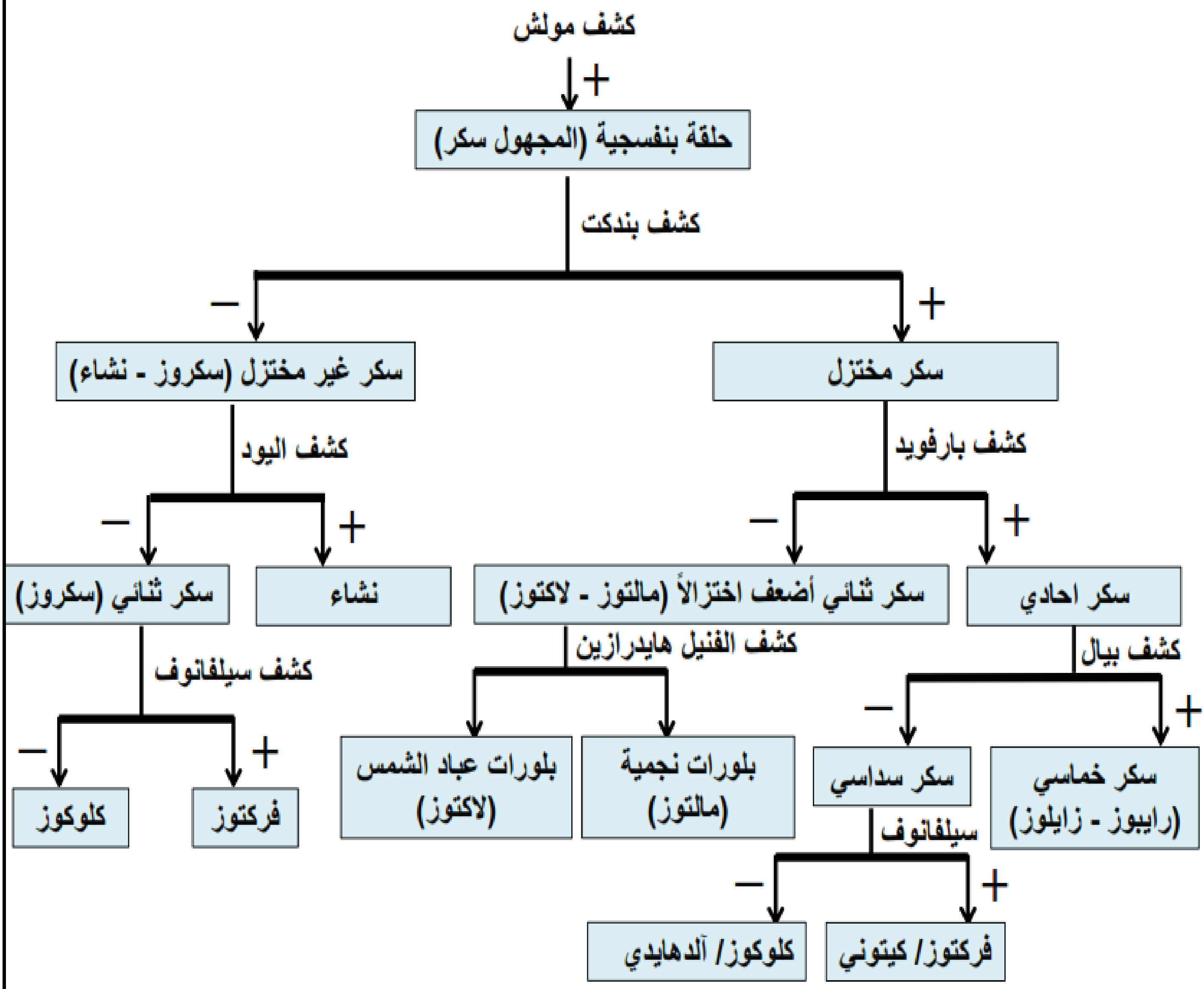
ازرق مع اليود — بنفسجي — بني محمر — بني محمر

Amylose ⟶ Maltose ⟶ Glucose

لاتعــــــــــــــــــــــــــطي الوان مع اليود

Procedure:اخلط 10مل من محلول النشا مع 3مل من حامض HCl المخفف اغمر T.Tفي حمام مائي مغلي .بعد كل 3 دقائق خذ قطرات من هذا المحلول واكشف عن نواتج التحلل بواسطة اليود(1%).لاحظ في البداية يتكون لون ازرق (نشأ) ثم بنفسجي(اميلو دكسترين) ثم بني محمر(اريثرودكسترين)ثم لايتغير بعد ذلك اللون.وعند هذه المرحلة (عدم ظهور اللون المميز)اترك الانبوبة في الحمام المغلي لمدة عشر دقائق بعد ذلك خذ قليلا من هذا المحلول وعادل الحموضة بواسطةNa_2CO_3 ثم اجر كشف بندكت(راسب برتقالي)ثم اجر كشف الاوزازون,فنلاحظ تكون بلورات ابرية صفراء دليل ان الناتج هو الكلوكوز ممايدل ان الناتج النهائي للتحلل المائي للنشا بواسطة الاحماض المخففة هو الكلوكوز اي ان النشأ يتكون من وحدات متعددة من الكلوكوز.كرر التجربة مع اللعاب بدل الحامض المخفف.(ماذا تستنتج؟)

الكشف عن مجهول سكري



الدهـــــــــون Lipids

هي مجموعة مركبات عضوية غير متجانسة لاتذوب بالماء وتذوب بالمذيبات اللاقطبية مثل الكحول والايثر والكلوروفورم $CHCl_3$ ورابع كلوريد الكاربونCCl_4.وهي تشكل 50%من تركيب الخلية الحية.

من أهم وظائفها:

1- تعتبر مصدر مهم للطاقة اذ ان (1 gm of Fat ⟶ 9cal).
2- تعمل كمواد عازلة لاعضاء الجسم كالدهون المحيطة بالقلب والكِلية .
3- تعمل كمولدات للهرمونات والاحماض الصفراوية وبعض الفيتامينات مثلD.

ملاحظة: ان زيوت وشحوم محركات المكائن هي مشتقات نفطية لاقيمة غذائية لها.

الحوامض الشحمية: Fatty acids

هي حوامض كربوكسيلة ذات سلسلة هيدروكربونية مستقيمة زوجية العدد(لذرات الكربون) وغيرحلقية تنتهي بمجموعة الكربوكسيل وتعد هذه الحوامض اللبنة الاساسية للدهون والزيوت الغذائية.وتوجد في الطبيعة متحدة مع الكليسيرول وليس بشكل حُر.وهي على نوعين اما مشبعة وهذه تكون صلبة شمعية في درجة حرارة الغرفة مثل حامض البالميتك او الستيارك او غير مشبعة وهذه تكون سائلة في درجة حرارة الغرفة مثل حامض الاوليك واللينوليك.

الكشوفات الخاصة بالدهون:

اولاً/كشف عدم التشبع: Unsaturation Test

(1)خلات النحاس : Copper Acetate

تعتمد هذه التجربة على أن الاحماض الدهنية المُشبعة الحرة تتحد مع خلات النحاس مكونة املاح النحاس (صابون النحاس)وبشكل راسب اخضر مزرق Bluish green في الطبقة المائية السفلى(water layer) بينما تعطي الحوامض الشحمية غير المشبعة املاح النحاس الخضراء في طبقة الايثر البترولي العليا.

:Procedure توضع كمية قليلة من حامض الستياريك المشبع فيT.T1 وتوضع كمية قليلة من حامض اوليك غير المشبع في T.T2 ثم يضاف 3مل من الايثر لكل منهما وترج جيداً, بعد ذلك نضيف 3مل من خلات النحاس وتترك لفترة قصيرة ونلاحظ تكون راسب ازرق في الطبقة المائية السفلى للحامض المشبع(الستيارك)ولون اخضر في طبقة الايثر العليا بالنسبة للحامض غير المشبع(الاوليك).

(2)كشف اليود : Iodine Test

في الاحماض الشحمية المشبعة تكون جميع ذرات الكربون مشبعة ولذلك لايمكن ان يتفاعل اليود مع الحامض المشبع ،اما لاحماض **غير** المشبعة فان اليود يتفاعل معها بمايؤدي الى تشبع جميع الاواصر المزدوجة ولهذا السبب يختفي اللون (لون اليود) والى حين تشبع جميع الاواصر المزدوجة عندها يبقى لون اليود.

:Procedureتذاب الحوامض الشحمية في الايثر البترولي وتوضع كل منها في انبوبة اختبار منفصلة ثم يضاف محلول اليود قطرة قطرة.. ، ويلاحظ اختفاء لون اليود في انبوبة حامض الاوليك غير المشبع وظهور اللون عند الاستمرار بالاضافة (لان الاواصر المزدوجة تشبعت) ، بينما يظهر لون محلول اليود مباشرةً عند اضافة القطرة الاولى منهُ الى حامض الستياريك المشبع.

ملاحظة: يجب اضافة اليود قطرة قطرة مع الرج وتجنب اضافة محلول اليود بكمية كبيرة دفعة واحدة ، لان ذلك من شأنه ان يشبع الاواصر المزدوجة وظهور اللون مباشرةً وبالتالي لايمكن تمييز الحامض الشحمي غير المشبع عن الحامض المشبع.

ثانيا/ فصل ، ترسيب، تحلل الصابون:

الصابون هو ملح للحامض الشحمي وله انواع مختلفة وصابون الصوديوم هو الاكثر انتشاراً.

(1)تحلل الصابون:

نضع 1مل من محلول الصابون في T.T+قطرات من HClالمركز عندها نلاحظ قطرات من الحوامض الشحمية المتحررة تطفو على سطح الماء أو تكون بشكل مستحلب.

$$RCOO^{-}Na^{+} + H^{+}Cl^{-} \longrightarrow RCOOH + NaCl$$

حامض شحمي يطفو

على سطح الماء

اذن اضافة حامضHCl الى محلول الصابون الذائب يظهر تعكير (راسب ابيض أو مستحلب)سببهُ تحرر الحامض الشحمي والذي لايذوب بالماء.

(2) ترسيب الصابون: نضع 1مل من محلول الصابون في T.T+1مل من كلوريد الكالسيوم($CaCl_2$ 20%). عند اضافة $CaCl_2$ الى محلول الصابون الذائب يظهر تعكربسبب تحول صابون الصوديوم الذائب الى صابون الكالسيوم غير الذائب (راسب ابيض اسفل الانبوبة).

$$2RCOO^{-}Na^{+} + CaCl_2 \longrightarrow (RCOO)_2Ca\downarrow + 2NaCl$$

(3)فصل الصابون: نضع في انبوبة اختبار 1مل من محلول الصابون مع قليل منNaCl.عند اضافة بلورات NaCl الى محلول الصابون لحد الاشباع نلاحظ ان الصابون يطفو فوق سطح المحلول دلاله على انفصاله..لماذا ؟ لان ملح الطعام اكثر ذوباناًفي الماء من الصابون(يزاحم الصابون)فيسحب الماء من المحلول ويطفو الصابون

$RCOO^{-}Na^{+} + NaCl \longrightarrow$ انفصال طبقة الصابون وتطفو فوق سطح المحلول

ثالثا/تعيين معامل الصوبنة:

معامل الصوبنة هو عدد ملغرامات(KOH) اللازمة لصوبنة أو التفاعل مع(1غم)من الزيت او الدهن

وتدل قيمة معامل الصوبنة على طول سلسلة الحامض الشحمي او الحوامض الشحمية الداخلة في تركيب الزيت لانهُ:

$$\text{معامل الصوبنة} \propto \frac{1}{\text{طول سلسلة الحامض}}$$

فاذا كانت السلسلة قصيرة نحتاج الى KOH كثير والعكس صحيح وسنأتي الى تفصيل ذلك لاحقاً

:Procedure

1-ضع(0.5-1gm) من الدهن في دورق مخروطي ثم اضف اليه(10ml) من محلول (KOH) الكحولي بواسطة السحاحة.

2-سخن الدورق في حمام مائي حوالي(80c) مستخدماًمكثف عاكس لمدة نصف ساعة(فائدة المكثف العاكس هي للمحافظةعلى حجم KOH الكحولي) لان المذيب يتكثف ويتقطر وبهذا سنحافظ عليهِ.

3-بعد انتهاء فترة التسخين, برد الدورق ثم اضف قطرتين من دليل الفينوفثالين الكحولي (Ph.ph) .

سحح محتويات الدورق مع حامض (HCl)بعيارية معلومة حتى يختفي اللون الوردي.سجل حجم الحامض النازلT.

4-أعد التجربة مع البلانك(يمكن اجرائها اثناء فترة التسخين للنموذج)

Blank:كل المواد الداخلة بالتفاعل عدا النموذج.

الحسابات:(1) حجمHCl اللازم لمعادلة البلانك **(B)** يمثل حجم KOH **الكلي** المستخدم لأن جميع القاعدة تفاعلت مع الحامض.

(2) حجمHCl اللازم لمعادلة النموذج **(T)** يمثل حجمKOH **المتبقي** (غير المتفاعل),لأنKOHجزء منهُ(المُتفاعل)أُستخدم لترسيب الدهن كصابون والباقي(غير المُتفاعل) تفاعل مع الحامض النازل.

اذن **(T-B)** = حجم الحامض اللازم لمعايرةKOH **المتفاعل** مع الدهن أو الزيت.

1000(ml)من(1N)HCl =1000(ml) من(1N)KOH=56g

اذن 1(ml)من(1N)HCl =1(ml)من(1N)KOH=56mg

اذاً..معامل الصوبنة = $\frac{N\ of\ HCl\times 56\times (T-B)}{Wt\ of\ Fat(gm)}$

56 هو الوزن الجزيئي لل KOH

رابعاً/تعيين الرقم الحامضي للدهون (الزناخة): **Acid value**

الرقم الحامضي: Acid value

هو عدد ملغرامات(KOH) المائية اللازمة لمعادلة الحامض الشحمي الحُر الموجود في(1غم)من الدهن.

عند خزن الدهن لفترة طويلة مع ارتفاع درجة الحرارة والرطوبة يصبح له رائحة كريهة وطعم غير مقبول وهذا يرجع الى زناخة الدهن.

الزناخة: Rancidity

وهي تغيير كيميائي يحصل للدهون التي تركت لفترة طويلة من الزمن فأصبح لها طعم ورائحة مميزة بسبب الحوامض الشحمية المتحررة منها.والزناخة على نوعين:

(1) زناخة التحلل المائي Hydrolytic Rancidity:

يحدث هذا النوع من الزناخة في الدهون المتكونه من حوامض شحمية مشبعة قصيرة السلسلة.فعند تحرر هذه الحوامض تعطي الرائحة والطعم الغير مستساغ.يساعدفي تحرر هذه الحوامض وجود أحياء مجهرية تفرز انزيم(Lipase) وعوامل مساعدة اخرى مثل الرطوبة والحرارة.

(2)الزناخة التاكسدية: Oxidative Rancidity

يحدث هذا النوع في الدهون الحاوية على حوامض شحمية غير مشبعة طويلة السلسلة.ان سبب حدوث هذا النوع من الزناخة هو مهاجمة الاوكسجين لموضع الاصرة المزدوجة في الحوامض غير المشبعة وتكوين البيروكسيد(ROO) ممايكسبه رائحة وطعم غير مقبولين.

:Procedure

(1)خذ وزن معلوم من زيت قديم اقل من (1gm) في دورق زجاجي جاف ونظيف.

(2)أضف لهُ(10ml) من المذيب(5مل كحول+5مل ايثر), امزج جيداً لفترة لضمان اذابة الدهن.

(3)سحح ضد(KOH) بوجود دليل (Ph.Ph)(10 قطرات)الى ان يتحول المحلول الى اللون الوردي .احسب حجمKOH النازل من السحاحة.نكرر نفس الخطوات مع البلانك(جميع المواد عدا النموذج الدهني)ونعيد العمل مع زيت طازج للمقارنة.

:الحسابات

$$\textbf{Free Fatty acid\%}=\frac{(T-B)\times 28.2\times (0.1\ N)\text{of KOH}}{\text{Wt of lipid(gm)}}$$

T: حجم KOH الذي عادلَ حوامض النموذج الدهني في السحاحة.

B:البلانك{الكحول+الايثر+Ph.Ph }ويمثل حجم KOH الذي عادل البلانك.

28.2:الوزن الجزيئي لحامض الاوليك بالنسبة المئوية(في 100مل) .

حيثُ282غم/لتر= $\frac{282\times 100}{1000}$ = 28.2 غم/100مل

Acid value= Free fatty acid × 1.99

نلاحظ ان B<T لاحتواء النموذج على حوامض شحمية متحررة(نتيجة زناخة الدهن)

اما B فهو كل المواد الداخلة ماعدا النموذج.

خامساً/اختبار الاكرولين للكشف عن الكليسيرول : Acrolein Test

يفقد الكليسيرول(وهو كحول ثلاثي)جزيئتين ماء عند تسخينه مع مادة مجففة مثل كبريتات البوتاسيوم الحامضية($KHSO_4$) حيث يتحول الى الديهايد غير مشبع يسمى الاكرولين , وهذا الكشف مميز للكليسيرول سواء كان حراً ام متحداً بشكل كليسيريد(مع الاحماض الدهنية).

:Procedure نأخذ T.T جافة ونضع بها كمية قليلة من ($KHSO_4$) مع بضع قطرات من الكليسيرول ونسخن تدريجيا ,نلاحظ انبعاث رائحة مخدشة نفاذة هي رائحة الاكرولين (رائحة الدهن المحروق).أعد التجربة مستخدما زيت الزيتون ولاحظ انبعاث رائحة الاكرولين مما يدلل على احتواء الزيت على الكليسيرول وعلى ان هذا الكشف مميزاً للكليسيرول سواء كان حُراً أو متحداً كما في زيت الزيتون.

سادساً/كشف ليبرمان عن الكوليستيرول:

الستيرولات(Sterols) بما يحويهِ تركيبها من خاصية عدم التشبع تعامل في ظروف لامائية مع حوامض قوية لتعطي الوان مميزة.

:Procedure ضع في انبوبة اختبار 2مل من الكوليستيرول المذاب بالكلوروفورم$CHCl_3$ ثم اضف 10 قطرات من حامض الخليك اللامائي مع 2 قطرة من حامض H_2SO_4 المركز ولاحظ ظهور تدرج الالوان وردي ثم ازرق ثم اخضر.

سابعاً/معامل اليـــــــــــود: **Iodine Number**

رقم اليود: هوعددغرامات اليود التي تمتصها(100غم) من المادة الدهنية لاشباع ما بها من اواصر مزدوجة في الاحماض غير المشبعة.(نسبة مئوية).

يتناسب معامل اليود تناسباً طرديا مع مافي المواد الدهنية من احماض شحمية غير مشبعة ولهذا السبب يكون معامل اليود للزيوت اعلى منه للدهون الصلبة

Procedure: زن حوالي(0.1غم) من الدهن بصورة مضبوطة في قنينة معتمه ذات سداد زجاجي ثم اضف لها(5 مل) كلوروفورم كمذيب و(10 مل) من محلول هنس(IBr) , سد القنينة سداً محكماً وضعها في مكان مظلم لمدة نصف ساعة مع الرج المستمر لاتمام التفاعل.اضف بعدها(10مل) من KI(10%) ثم اضف حوالي (50مل) من الماء المقطر وسحح محتويات القنينه مع ثايوكبريتات الصوديوم$Na_2S_2O_3$ (N0.1) (حتى يصبح اللون اصفر باهت)ثم اضف كمية مناسبة من محلول النشأ ولاحظ اللون الازرق.استمر بالتسحيح حتى يختفي اللون الازرق(نقطة نهاية التفاعل) سجل حجم الثايوكبريتات.اعد التجربة مع البلانك الذي يحتوي جميع مكونات الدورق عدا النموذج.

Blank: 5مل كلوروفورم+10مل محلول هنس+10ملKI(10%) +50مل ماء مقطر ثم سحح بنفس الطريقة المستعملة للنموذج تماماً.

الحسابات:

B:هو حجم الثايوكبريتات اللازم للتفاعل او لمعادلة البلانك ويمثل **حجم اليود الكلي**.

T:هو حجم الثايوكبريتات اللازم للتفاعل او لمعادلة النموذج ويمثل **حجم اليود المتبقي**(غير المتفاعل).

لنفرض **T−B=Y** (حجم اليود المتفاعل)

1000 ml من $Na_2S_2O_3$ (N1)=1000 ml من I_2(N1)=127 gm (يود)

1 ml من $Na_2S_2O_3$(N1)= 1 ml من I_2(N1) =0.127 gm (يود)

∴ **Y** ×0.127 gm = وزن اليود المتفاعل مع وزن الدهن المعلوم (Wt)

∴ معامل اليود= **Y** × ×0.127 $\frac{100}{Wt}$ (عندما عيارية الثايو N1)

ولكن عندما تصبح عيارية الثايو(N 0.1) تصبح المعادلة النهائية كما يلي

$$\textbf{Iodine NO=} \frac{Y \times 0.127 \times 0.1(\text{عياريةالثايو}) \times 100}{Wt}$$

Proteins البروتينات

البروتينات:هي مواد عضوية معقدة التركيب تتكون من تعدد الاحماض الامينية المرتبطة باواصر خاصة هي الاواصر الببتيدية peptide bonds. يعتبر الكاربون والهيدروجين والاوكسجين والنتروجين العناصر الرئيسية للبروتينات,واحياناً تحوي بعض البروتينات عناصر اخرى مثل الفسفور والكبريت والحديد والنحاس.

ملاحظات:

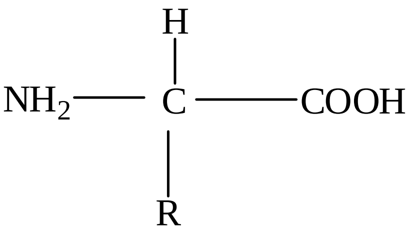
1-تعتبر البروتينات المكون الرئيسي للانسجة الحيوانية والنباتية سواء من ناحية التركيب structureوالوظيفةfunction .

2-تكثر البروتينات في المنتجات الحيوانية والنباتية كالبيض واللحوم البذور كماتوجد بعض البروتينات الخاصة كما في الصوف والشعر وجلود الحيوانات.

3-تختلف البروتينات عن بعضها البعض في عدد ونوعية وتعاقب الاحماض الامينية المكونة لها .

الاحماض الامينية : Amino Acids

هي احماض كاربوكسيلة حاوية على مجموعة امينية متصلة بذرة الكاربون الفا(ذرة الكاربون المتصلة بمجموعة الكاربوكسيل).وتختلف الاحماض الامينية فيما بينها باختلاف السلسلة الجانبيةR.



Ninhydrin Test **اولاً / كشف النينهيدرين:**

يعتمد هذا الكشف على وجود جذر الامين α-Amine وجذر الكاربوكسيل بصورة حرة، لذا فجميع الاحماض الامينية وبالتالي البروتينات تستجيب لهذا الكشف.

النينهيدرين:مادة مؤكسدة قوية جداً,تتفاعل مع الاحماض الامينية في P^H(4-8)لتعطي مركبات ونواتج ملونة.التفاعل حساس جداً ومثالي لكشف الكميات القليلة جداً من الاحماض الامينية في تجارب كروماتوغرافيا الورق.اذن يتفاعل النينهيدرين مع جميع الاحماض الامينية معطياًاللون البنفسجي وفق المعادلة ادناه:

Procedure: اضف 8 قطرات من محلول النينهيدرين الى 2 مل من زلال البيض.سخن لمدة دقيقتين لدرجة الغليان.لاحظ اللون الازرق.

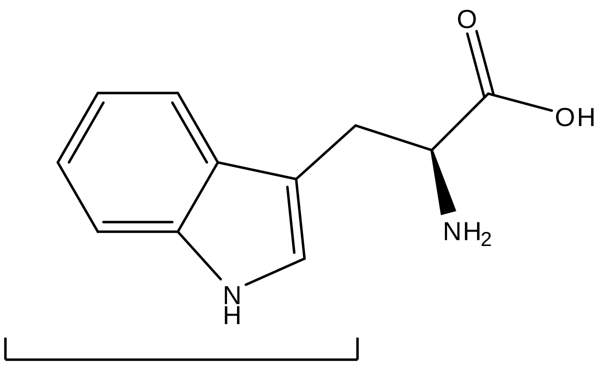
Xanthoproteic Reaction **ثانياً/ تفاعل الزانثوبروتيك:**

يعتمد هذا الكشف على وجود المركبات البنزينية حيثُ تحدث عملية النترجة لحلقة البنزين الموجودة بالحامض الاميني ولان مركبات النترو الناتجة تكون صفراء اللون لذا سمي الكشف بالزانثوبروتيك (xantho=اصفر)

Procedure:اضف بضع قطرات من HNO_3 المركز الى محلول البروتين,سخن لدرجة الغليان(لمدة دقيقة واحدة) لاحظ اللون او الراسب الاصفر المتكون.برد الانبوبة ثم اضف اليها قليل من محلول هيدروكسيد الامونيوم المركز ولاحظ اللون البرتقالي المتكون. ان الاحماض الامينية التي تحوي حلقة اروماتية تكون مشتقات نتروجينية صفراء اللون عندمعاملتها مع HNO3 المركز اما املاح هذه المشتقات فتكون برتقالية اللون.

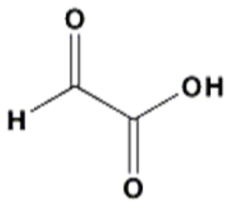
ثالثاً/ كشف هوبكنز كول الخاص بالتربتوفان: Hopkins-col Test

ان حلقة الاندول الموجودة في الحامض الاميني التربتوفان تتفاعل مع حامض الكلايوكسيلك(Glyoxylic acid) بوجود حامض قوي مثل حامض الكبريتيك المركز لتعطي حلقة بنفسجية وهذا دليل على احتواء البروتين على الحامض الاميني التربتوفان.**اذن فهذا الكشف مميز للتربتوفان, لاحتوائه على جذر الاندول**.



Indol Ring

Tryptophan



Glyoxylic acid

Procedure: اضف(2مل) من كاشف هوبكنز كول الى (2مل) من محلول البروتين.امزج جيداً ثم اضف باحتراس حوالي (5مل)من حامض الكبريتيك المركز بحيث ينزلق على جدران الانبوبة الداخلية ولاحظ تكون حلقة وردية او بنفسجية عند سطح الانفصال..

رابعاً /كشف ميلون: Millon's Test (Tyrosine)

يعتمدهذا الكشف على وجود مجموعة الفينول في الحامض الاميني. وبما أن التايروسين هو الحامض الاميني الوحيد الذي يمتلك هذه المجموعة ، لذا يعتبر هذا الكشف خاصاً بالتايروسين.

Procedure:اضف بضع قطرات من محلول ميلون (حديث التحضير) الى (2مل)من محلول البروتين ، ثم سخن في حمام مائي مغلي ولاحظ ظهور اللون الوردي.

خامساً /كشف زاكاكوجي : sakaguchi Reaction

هو تفاعل خاص بجذر الكوانيدين guanidine الموجود في الحامض الاميني Arginine وجميع البروتينات اللتي تحتوي عليهِ ،حيث ان الكوانيدين في المحلول القاعدي يعطي لون احمر زاهٍ عند معاملته مع α -naphthol وهايبوبروميت او هايبوكلوريت الصوديوم.

Procedure: اضف بضع قطرات من محلول(10 %) NaOH مع بضع قطرات من α–naphthol واخيرا قطرات من(10 %)Sodium hypochlorite الى (1 مل)من محلول البروتين حتى يتكون لون احمر زاهٍ.

ملاحظة:هذا الكشف من الدقه والحساسية بحيث يمكن اعتباره كشفاً عاماً لجميع البروتينات؟؟

لان جميع البروتينات المعروفة تحتوي على الحامض الاميني الارجنين والحاوي على جذر الكوانيدين بالقدر الكافي لاعطاء كشف موجب.

سادساً /كشف الكبريت غير المستقر قلويا(تفاعل الاحماض الامينية الكبريتية):

يعتمد هذا الكشف على حقيقة أن غلي محلول البروتين مع (40% NaOH)يؤدي الى ان الكبريت العضوي الموجود في الحامض الاميني السستين (Cystine)والسستائين(Cysteine) يتفاعل معNaOH مكوناً كبريتيد الصوديوم(Na_2S){تحول الكبريت الى كبريت لاعضوي} والذي يتفاعل بدوره مع خلات الرصاص$(CH_3COO)_2Pb$مكونا كبريتيد الرصاص الاسود اللون.

$$R\text{-}SH + 2NaOH \longrightarrow Na_2S + R\text{-}OH + H_2O$$

$$Na_2S + (CH_3COO)_2Pb \longrightarrow PbS\downarrow + 2CH_3COONa$$

راسب اسود اللون
من كبريتيد الرصاص

وعليه يمكن القول بان الكبريت الموجود في الحامضين الامينيين السستين والسستائين هوكبريت **غير** مستقر قلويا

اما الكبريت الموجود في الحامض الاميني الميثونين (Methionine) فهو كبريت مستقر قلويا **ولا** يعطي راسب اسود من كبريتيد الرصاص مع NaOH

:Procedure

امزج قليلاً من محلول البروتين(1مل) مع (1مل)من NaOH%40.اغلي المحلول ثم برده وأضف اليه حامض الخليك (10 قطرات) ثم أضف قليلا من محلول خلات الرصاص , ولاحظ تكون راسب اسود، دلاله على ان البروتينات تحتوي في تركيبها على احماض امينية حاوية على كبريت غير مستقر قلوياً

سابعاً/ كشف بايوريت: **Biuret Test for peptide bonds**

هذا الكشف خاص بوجود الاتصالات او الاواصر الببتيدية(جميع المركبات التي تحتوي على آصرتين من الاواصر الببتيدية على الاقل) , وعليه يعطي هذا الكشف نتيجة ايجابية (لون بنفسجي) مع جميع البروتينات ونواتج تحللها المائي (الببتيدات) وحتى مرحلة الببتيدات الثلاثية (Tri peptides)، اما الببتيدات الثنائية (Dipeptides) والاحماض الامينية فلا تعطي كشفاً موجبالاحتواء الاولى على آصرة واحدة وعدم وجود هذه الاصرة في الحامض الاميني .ويعزى كشف بايوريت الى قوة عمل الاواصر التناسقية لمركب معقد من (Cu^{+2}) واربعة ذرات نتروجين ببتيدية مكونا مايسمى بمعقد النحاس التناسقيCopper coordination complex

Procedure:اضف الى (1مل) من زلال البيض في (T.T) بضع قطرات من (10%)NaOHثم اضف قطرة واحدة من كبريتات النحاس (1%) ولاحظ ظهور اللون البنفسجي .

ترسيب البروتينات Protein's Precipitation

ان قابلية ذوبان البروتينات تعتمد على عاملين:

1-وجود الشحنة التي يتحكم بها الPH .

2-وجود الماء، مع قليل من التسخين في اغلب الاحيان.

وبدون احدهما لايمكن للبروتين ان يكون بصورة ذائبة او مستحلبة .

نقطة التعادل الكهربائي: Iso Electric Point(I EP)

هي عبارة عن الP^H التي يكون فيها البروتين حاملا لعدد متساوي من الشحنات الموجبة والسالبة. وعليه فالبروتينات في نقطة تعادلها الكهربائي لاتتحد مع الحامض او القاعدة.اما فوق(-) او تحت(+)نقطة التعادل الكهربائي فالبروتينات تكون غير متعادلة (مشحونه)ولذلك فهي تتحد مع الايونات المعاكسة لها مكونة املاح يكون كثير منها غير ذائب(راسب)مع البروتين.
ماتقدم فان البروتين يكون غير ذائب في نقطة التعادل الكهربائي(راسب).

طرق ترسيب البروتينات:

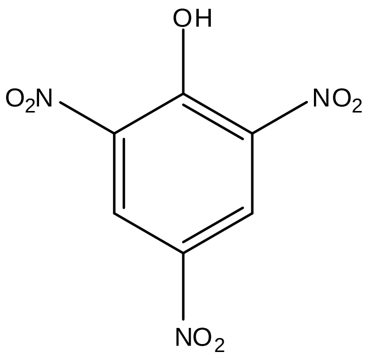
اولا/ الترسيب بواسطة املاح الفلزات الثقيلة {الايونات الموجبة (+)}:

تعتمد فكرة الترسيب على اضافة محلول فلز ثقيل مثل(Pb^{+2},Zn^{+2},Hg^{+2},Fe^{+3},Ag^{+})الى محلول البروتين الحامل لشحنة سالبة(نتيجة معاملته بالقاعدة) وترسيبه على شكل بروتينات الفلز (Metal Protein) , حيث يُعادل الايون الموجب الشحنة السالبة على جزيئة البروتين فيرسبها.

Procedure: يوضع (3مل) من محلول زلال البيض في انبوبة اختبار ونضيف قطرة من محلول NaOH.ثم نضيف(1مل) من احد املاح الايونات الموجبة($FeCl_3$) ثم نكرر التجربة مع كل من $AgNO_3$,$(CH_3COO)_2Pb$,$CuSO_4$,$HgCl_2$.ونسجل ونلاحظ تكون الراسب ولونه في كل مرة

ثانياً /ترسيب البروتينات بواسطة الكواشف القلويدية{الايونات السالبة (-)}:

بالامكان ترسيب البروتينات عندما تحمل شحنة موجبة بواسطة الايونات السالبةAn ions لبعض الحوامض مثل TCA,Picric Acid وتعرف هذه الحوامض بالكواشف القلويدية لانها استخدمت اصلا في ترسيب مجموعة من المركبات العضوية التي تعرف بالقلويدات alkaloids. هذه الطريقة تجد استعمالا واسع النطاق في ازالة البروتينات Deproteinization من الدم قبل اجراء بعض التحاليل عليه. وتعتبر هذه الطريقة اساس للكشف عن البروتينات في الادرار والتقدير الكمي لها في المصل Serum وفي الادرار Urine.



picric acid

$Na^+WO^-_4$ — Sodium Tungstate

CCl_3COOH — TCA(**T**ri **C**hloro **A**cetic acid)

Procedure: يُحمض زلال البيض بقطرات من حامض الخليك ويضاف اليه(1مل) من الايونات السالبة المذكورة في اعلاه ويلاحظ لون الراسب المتكون في كل مرة.سجل ملاحظاتك....

ثالثاً /ترسيب البروتينات عند نقطة التعادل الكهربائى(IEP):

تكون البروتينات ذائبة فوق نقطة تعادلها الكهربائي (عندما تحمل شحنة سالبة في المحيط القاعدي)،وكذلك تحت نقطة تعادله الكهربائي(عندما تحمل شحنة موجبة في المحيط الحامضي).اما في نقطة التعادل الكهربائي فيكون عدد الشحنات الموجبة والسالبة متساوٍ ،وبذا يكون البروتين اقل ذوبانا في هذه الPH(راسب).

Procedure:ضع(1مل)من البروتين وليكن كازئين الحليب في T.T(نقطة تعادله الكهربائي+5.4) ثم اضف له بضع قطرات من صبغة البروموكريزول الاخضر(Green Bromocressol) فاذا ظهر لون ازرق دَلَ ذلك على ان المحيط قاعدي فيجب اضافة قطرة من حامض HCl مع الرج المستمر الى ان يصبح اللون اخضر مزرق مع تكون راسب كثيف دلاله على الوصول الىIEP لكازئين الحليب في (PH 5.4).

اما اذا ظهر اللون الاصفر دَلَ ذلك على ان الوسط حامضي فيجب اضافة قطرة...قطرة من NaOH مع الرج المستمر الى ان يصبح اللون اخضر مزرق مع تكون راسب كثيف , دلالة على الوصول الى نقطة التعادل الكهربائي لكازئين الحليب (PH 5.4)

رابعاً/ الترسيب بالتمليح الداخلي والتمليح الخارجي:

التمليح الداخلي : Salting in

ويقصد به ذوبان البروتين(وليس ترسيبه) في المحلول الملحي عند اضافة تراكيز قليلة من الاملاح المتعادلة بحدود(M0.02) من $\{(NH_4)_2SO_4, NaCl\}$ وفي هذه الحالة تعمل ايونات الملح على زيادة ايونية البروتين وبالتالي تزيد ذوبانه(وعدم ترسيبه).

التمليح الخارجي: **Salting out**

ويقصد به فصل وترسيب البروتين من المحلول على شكل راسب، باضافة محلول مركز(M0.1) من {$(NH_4)_2SO_4$,NaCl)}.ففي هذه الحالة الملح يزاحم البروتين، لانه اكثر ذوبانا من البروتين ويفصلهُ (اي يترسب).

Procedure:

1- اضف محلول مخفف من NaCl الى محلول البروتين وسجل ملاحظاتك.
2- اضف محلول مركز من NaClالى محلول البروتين وسجل ملاحظاتك.
3- اعد الخطوتين 2،1 مستخدما محلول $(NH_4)_2SO_4$.وسجل ملاحظاتك

خامساً / الترسيب بواسطة الكحول(المذيبات العضوية اللاقطبية):

تترسب البروتينات بواسطة الكحول لكونهِ اكثر ذوباناً في الماء من البروتين، وبذا لاتبقى كمية كافية من الماء لذوبان البروتين فينفصل ويترسب.

Procedure:

اضف بضع قطرات من الكحول الاثيلي (95%) الى (1مل) من محلول زلال البيض ولاحظ تكون الراسب الابيض.

س/لماذا يستعمل الكحول في تعقيم الجروح وقتل الجراثيم؟

سادساً / الترسيب بواسطة التجلط الحراري: **Precipitation by Heat Coagulation**

عند تسخين البروتين لدرجة حرارة عالية تتغير سلسلة الاحماض الامينية المكونه للبروتين ممايساعد على تكتلها كما في حالة تعرض البيض للحرارة عند السلق ويعَرف التغير في جوهر البروتين

بالدنترة (denaturation)وهو تحوير(مسخ) في جزيئة البروتين بما يؤدي الى تغير في خصائص البروتين الفيزياوية والبايولوجية.

ويحدث التغيير في التركيب الثانوي والثالثي ولايتاثر التركيب الاولي.(السلسلة الببتيدية).

تشخيص الاحماض الامينية بواسطة كروماتوغرافيا الورق:

Identification of Amino acids by paper chromatography

تعتمد هذه الطريقة بصورة رئيسية على مدى اختلاف سرعة انتقال جزئيات الحوامض الامينية المختلفة على ورق خاص وبواسطة خليط من المحاليل المذيبة التي تسير بفعل الخاصية الشعرية للورق، حيث تختلف سرعة انتقال هذه الحوامض المذابة بالنسبة لنوعية خليط المحاليل المذيبة فتنفصل مكونات الخليط عن بعضها في صورة بُقع (spots)وتُعرف الورقة بماعليها من بقع بأسم الكروماتوغرام chromatogram.

ان حركة المذيب تُعرف بأسم الجبهة (Front) والمسافة التي يتحركها مركب من مكونات الخليط تقاس من خط البداية حتى مركز البقعة ويعبر عنها برمز Rf:

$$\mathbf{Rf} = \frac{\text{المسافة التي يقطعها المركب المجهول}}{\text{المسافه التي يقطعها المذيب}} = \frac{\mathbf{A}}{\mathbf{B}}$$

Rf: **R**etardation **F**actor (عامل الاعاقة)

ان مقدار Rf يعبر عن صفة مميزة لكل مركب عند تثبيت ظروف التجربة .هناك نوعان من كروماتوغرافيا الورق:

(1) الكروماتوغرافيا الهابطة: Descending chromatography

وفيها ينتقل المذيب على الورق بفعل الجاذبية (والخاصية الشعرية) اي من الاعلى الى الاسفل.

(2) الكروماتوغرافيا الصاعدة: Ascending chromatography

فيها ينتقل المذيب على الورق بفعل الخاصية الشعرية من الاسفل الى الاعلى وهي الطريقة المفضلة.

:Procedure

اقطع ورقة ترشيح(No 1)بشكل شريط عرضه أقل من عرض انبوبة الاختبار ثم أشر بقلم الرصاص(لاتستخدم قلم حبر او جاف)خط على بُعد (2Cm)من أحد حافتيها وضع نقطة في منتصف الخط ، بعد ذلك خذ بواسطة انبوبة شعرية محلول الحامض الاميني وضعهُ على النقطة بحيث تكون البقعة على اصغرها.جفف واعد العملية حتى تنقل كمية مناسبة من المحلول في اصغر بقعة ممكنة.ضع قليل من خليط محلول المذيب (1-2ml) في قعر انبوبة الاختبار ثم اغمر الجزء الاسفل من الشريط المحمل بالنموذج في محلول المذيب في الانبوبة (بحيث تكون بقعة النموذج فوق مستوى سطح المذيب).سد الانبوبة بواسطة فلينه واتركها لمدة نصف ساعة (الى ان يصعد المذيب اكثر من نصف المسافة)ومن ثم ارفع الشريط وأشر بالقلم الرصاص الحد الذي وصل اليه المذيب ثم جفف الشريط في فرن درجة حرارته(110c°)وبعد ذلك رُشه بواسطة رشاش يحتوي على محلول النِنهيدرين(كاشف عام عن جميع الاحماض الامينية حيث يلون الحامض الاميني) ،جفف ثانية فتظهر بقعة الحامض الاميني في موقعها المناسب على الشريط بعد ذلك احسب قيمة Rf واستدل منها على الحامض الاميني المجهول.