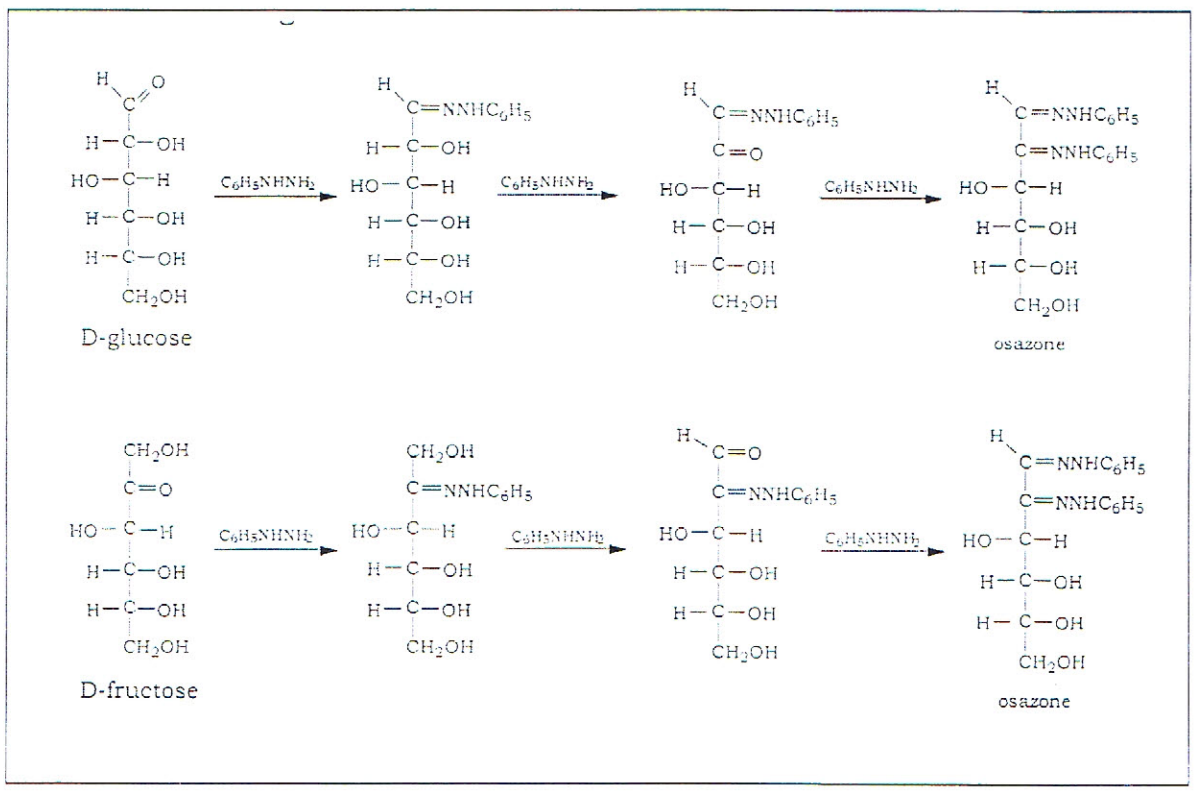
التجربة السادسة / كشف الاوسازون Osazone Test

وهو كشف خاص للسكريات الأحادية والثنائية المختزلة فقط الحاوية على مجاميع الديهايد وكيتون حرة ، يتضمن الكشف تفاعل هذه السكريات مع خليط صلب من (فينل هيدرازين هيدروكلوريد (phenyl hydrazine) وخلات الصوديوم) لتوفر فنيل هيدرازين بوجود التسخين لتتكون بلورات ذات لون أصفر اللون تسمى الاسازون ويعتمد الشكل البلوري الناتج على نوع السكر المستعمل والترتيب الفراغي للهيكل الكاربوني في السكر بعد ذرة كاربون رقم (2) كما في ميكانيكية تفاعلD- الكلوكوز مع فينل هيدرازين .



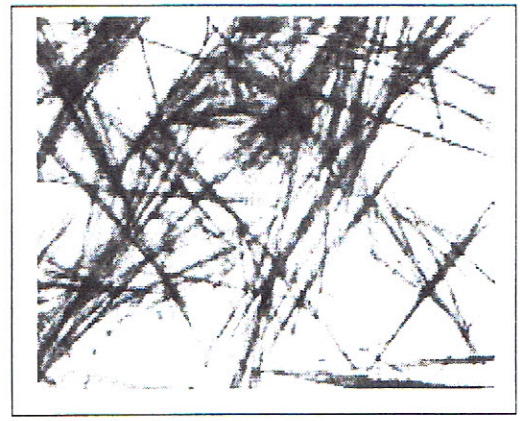
كما يمكن كتابة المعادلات الكيميائية الكاملة في كشف الاوسازون لباقي السكريات الاحادية والثنائية المختزلة.

اشكال بلورات الاوسازون للسكريات الاحادية

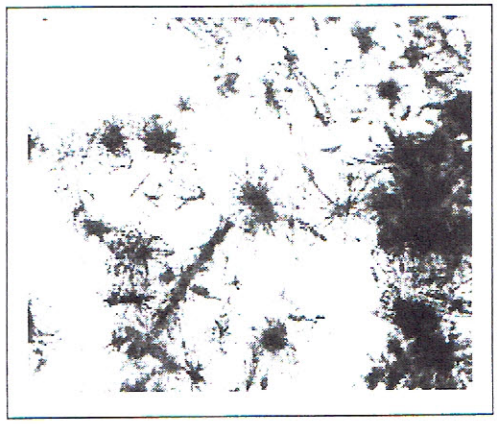
ان الشكل البلوري لبلورة الاوسازون الصفراء لسكريات الكلوكوز والفركتوز والمانوز هو ابرية حادة كما في الشكل الآتي :

فائدة خلات الصوديوم / تعمل كمادة لجعل وسط التفاعل حامضي ضعيف

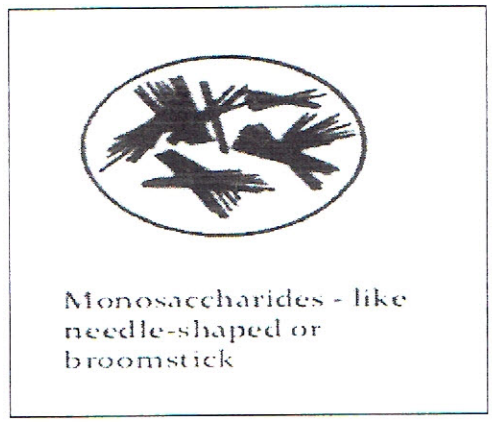
كل جزيئة واحدة من السكر تحتاج إلى 3 مول من الفنل هايدرازين



كلوكوز

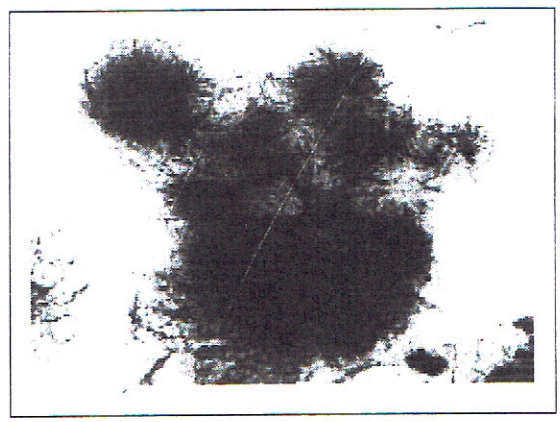


فركتوز



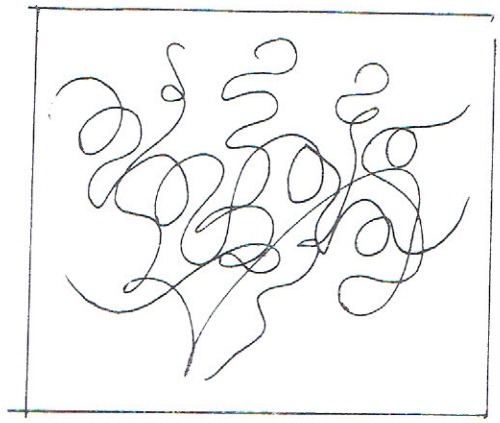
مانوز

وشكل بلورة الاوسازون الصفراء لسكر الكالكتوز هو عش العصفور كما في الشكل الآتي :



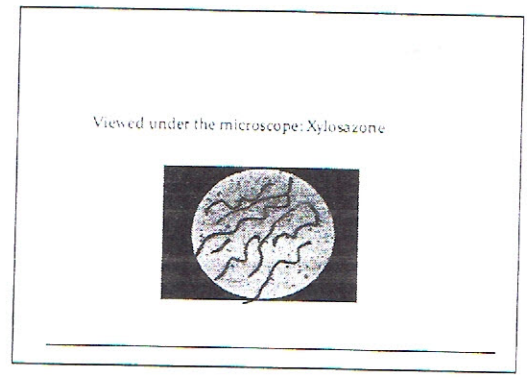
كالاكتوز

اما شكل بلورات الاوسازون الصفراء لسكري الرايبوزوالارابينوز فهو خيوط ملتوية كما في الشكل الآتي :



رايبوز أو أرابينوز

في حين ان الشكل البلوري لبلورة الاوسازون لسكر الزايلوز فهو خيوط مبعثرة كما في الشكل الآتي :



زايلوز

صفات بلورات الاوسازون للسكريات الاحادية :

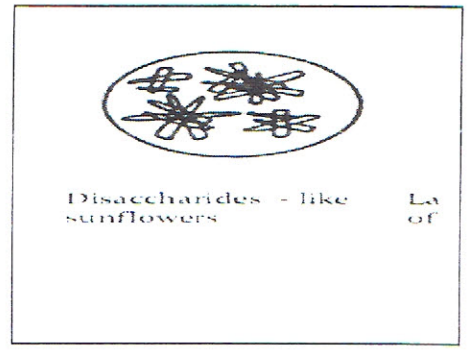
1- تكون غير ذائبة في محاليلها الساخنة (مترسبة)

2- تحتاج الى فترة تسخين قليلة لتكونها مقارنة بالسكريات الثنائية المختزلة.

3- لا تحتاج الى تبريد وانما تتكون تلقائياً بعد اتمام فترة التسخين.

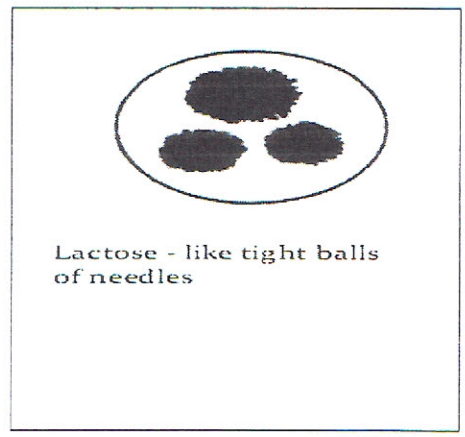
اشكال بلورات الاوسازون للسكريات الثنائية المختزلة

ان الشكل البلوري لبلورة الاوسازون لسكر المالتوز هو زهرة الشمس كما في الشكل الآتي :



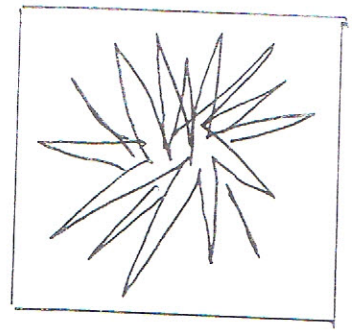
مالتوز

اما الشكل البلوري لبلورة الاوسازون لسكر اللاكتوز فهو عش العصفور ولكن تكون اكبر واوضح من بلورة سكر الكالكتوز ، كما في الشكل الآتي :



لاكتوز

في حين ان الشكل البلوري لبلورة الاوسازون لسكر السيليبايوز هو نجمية الشكل ومركزها غير واضح في المجهر كما في الشكل الآتي :



السليبايوز

صفات بلورات الاوسازون للسكريات الثنائية المختزلة:

1- تكون ذائبة في محاليلها الساخنة (غير مترسبة)

2- تحتاج الى فترة تسخين اطول لتكونها مقارنة بالسكريات الاحادية.

3- تحتاج الى تبريد لتكونها بعد اتمام عملية التسخين.

المواد الكيميائية المستعملة :

1- سكريات احادية وثنائية مختزلة.

2- مادة فينل هيدرازين او هيدروكلوريد فينل هيدرازين.

3- خلات الصوديوم.

طريقة العمل :

1- حضر السكريات الاحادية والثنائية المختزلة بتركيز 5% W/V

2- خذ 3ml من كل سكر في انبوبة اختبار واضف اليه كمية مناسبة من الخليط الصلب (فينل هيدرازين هيدروكلوريد وخلات الصوديوم) بوساطة ملعقة صغيرة spatula حتى يتكون اللون الاصفر الرائق مع الرج جيداً.

3- ضع الانابيب في الحمام المائي المغلي لمدة نصف ساعة للسكر الاحادي و 45-60 دقيقة للسكر الثنائي المختزل.

4- لاحظ تكون بلورات الاوسازون المترسبة للسكر الاحادي في قعر الانبوبة.

5- برد انابيب الاختبار للسكريات الثنائية المختزلة تحت ماء الاسالة حتى تتكون بلورات الاوسازون.

6- ضع البلورات على شرائح زجاجية (slides) وافحصها تحت المجهر الالكتروني.

7- ارسم اشكال البلورات بالقلم الكاربون

ملاحظات حول كشف الاوسازون :

1- يحضر الخليط الصلب بنسبة ثلاثة اجزاء من خلات الصوديوم مع جزئين من هيدروكلوريد فينل هيدرازين ، اذ تقوم خلات الصوديوم بمعادلة حامض الهيدروكلوريك في المادة الثانية ليتحرر فينل هيدرازين الذي يكون وسطاً مناسباً للتفاعل.

2- ان الزيادة اكثر من الكمية المناسبة لخليط (فينل هيدرازين هيدروكلوريد وخلات الصوديوم) تسبب بتكون كميات اكبر من الانيلين بلون بني مما يؤثر على فحص البلورة ويجعلها غير واضحة.

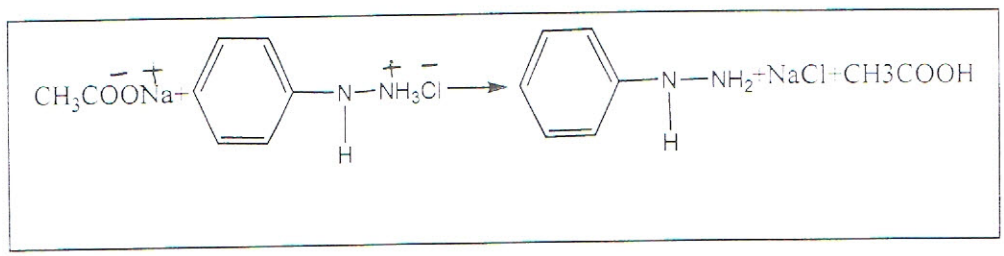
3- ان النقصان اقل من الكمية المناسبة لخليط (فينل هيدرازين هيدروكلوريد وخلات الصوديوم) لا يؤدي الى تكون بلورة الاوسازون.

4- يحدث تفاعل كشف الاوسازون على ذرتي الكاربون الاولى والثانية للحصول على الناتج النهائي للبلورة الناتجة.

5- سكريات الكلوكوز والفركتوز والمانوز تعطي اشكالاً بلورية متشابهة لبلورة الاوسازون وذلك لانهم يمتلكون الترتيب الفراغي نفسه بعد ذرة رقم 2 اي من (3-6) في الهيكل الكاربوني للسكر.

6- كشف الاوسازون خاص للسكريات الاحادية والثنائية المختزلة فقط وهذا يعني ان السكريات الثنائية غير المختزلة مثل السكروز (sucrose) لا تعطي كشف الأوسازون.

7- دور خلات الصوديوم هو لتحرير فينل هيدرازين بعد التفاعل مع هيدروكلوريد فينل هيدرازين كما في المعادلة الآتية :



ليقوم حامض الخليك ببرتنة مجموعة الكاربونيل في السكر ويحرر مزدوج الكتروني .

التجربة العاشرة : Exp. no. 10

كشف عدم التشبع للأحماض الدهنية Unsaturated test of Fatty acids

يتم الكشف عن الاحماض الدهنية بنوعيها المشبعة saturation fatty acid والغير مشبعة Unsaturated fatty acids بأكثر من كاشف ومن هذه الكواشف هو خلات النحاس ،اذا يتكون ملح نحاسي للحامض الدهني المشبع على شكل راسب اخضر- مزرق bluish-green precipitate في الطبقة المائية بينما يتكون الملح النحاسي للحامض الدهني الغير مشبع بلون اخضر ويكون ذائبا في الطبقة العضوية (الايثر البترولي) .

ان هذا الكشف يستعمل للتمييز بين الدهون المتعادلة (الكليسيرات الثلاثية) (الحوامض الدهنية المشبعة والغير المشبعة) اذ ان الدهون المتعادلة لا تتفاعل مع محلول خلات النحاس كما في المعادلات الاتية :

$$CH_3(CH_2)_{16}COOH + Cu(Ac)_2 \longrightarrow 2\ HAc + (CH_3(CH_2)_{16}COO)_2Cu$$

حامض الستيريك (مشبع) ملح سترات النحاس(راسب اخضر- مزرق في الطبقة المائية)

$$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH + Cu(Ac)_2 \rightarrow (CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7CO_2)_2Cu + 2\ HAc$$

حامض الأوليك(غير مشبع) ملح أوليات النحاس(لونه اخضر في الطبقة المائية)

وفي هذا الكشف يراعى عدم الرج الشديد وذلك تفاديا لمنع تكون مستحلب متراكم ،ولذلك ينصح بالرج ببطئ او بعملية المزج وذلك بقلب انبوبة الاختبار .

المواد الكيميائية المستعملة :

١- حامض الستيريك Stearic acid

٢- حامض الأوليك Oleic acid

٣- خلات النحاس Copper Acetate

٤- دهن + او زيت متعادل Neutral liped

٥- بتروليوم ايثر Petroleum ether

طريقة العمل :

١- جهز ثلاثة انابيب وضع في احدها 0.5 ml من الزيت والثانية 0.5 gm من حامض الستيريك والثالثة 0.5 gm من حامض الاوليك .

٢- اضف الى كل انبوبة 3 ml من بتروليوم ايثر مع الرج جيدا .

٣- اضف الى كل انبوبة 3 ml من محلول خلات النحاسيك تركيزه (10 w/v%) ثم اترك الانابيب لفترة قليلة .

٤- لاحظ تكون الراسب الاخضر – المزرق بالنسبة لحامض السيتريك (في الطبقة المائية) واللون الاخضر بالنسبة لحامض الأوليك (في الطبقة العضوية) وعدم حدوث اي تغير في حالة الزيت او الدهن المتعادل .

ملاحظات حول التجربة :

١- قد يكون لون الراسب المتكون ازرق في حالة حامض الستيريك .

٢- قد يكون لون المحلول المتكون ازرق في حالة حامض الأوليك .

التجربة الاولى Exp. No.1

الكشف عن العناصر الاساسية والثانوية في البروتينات : Test of essential and secondary elements in the proteins

البروتينات هي مركبات عضوية نتروجينية ، والوحدة الاساسية لها هي الاحماض الامينية التي ترتبط فيما بينها هي اواصر الببتيدية و لهذا فأن البروتينات تتكون من سلاسل ببتيدية او تسمى سلاسل متعددة الببتيد وتمتاز البروتينات بأوزانها الجزئيية العالية وايضا التعقيد التركيب الكيميائي لها ،أن ابسط بروتين يتالف من 40 الى 50 حامض اميني و تزداد درجة التعقيد كلما زاد عدد الاحماض الامينية الداخلة في تركيب البروتين. يتراوح الوزن الجزيئي البروتينات بين 1000000-5000 دالتون، ان البروتينات هي المكونات الاساسية للخلية الحية و لهذاتعد الخلية الحية بأنها كتلة بروتوبلازمية، ان الوظيفة الكيموحياتية الرئيسية للبروتينات هي البناء الخلوي أي بناء الخلايا وتجديدها في جسم الكائن الحي ،تتواجد البروتينات في المصادر الحيوانية مثل اللحوم والبيض و الاسماك والحليب والصوف والشعر والجلد و المصادر النباتية مثلا البذور والجذور والاوراق و الثمار ، ان الاختلاف بطبيعة وتركيب البروتينات يعود الى اختلاف تعاقب الاحماض الامينية في البروتين المعين وكذلك في نوعية الاحماض الامينية الموجودة في التركيب الكيميائي للبروتين وكذلك عدد هذه الاحماض الامينية .

وللبروتينات وظائف عديدة فهي تعتبر عوامل مساعدة حياتية والمتمثلة بالانزيمات كما ان لها وظيفة الخزن اذ تعد بعض البروتينات مصدرا غذائيا مثل بروتين الحليب (الكاسائين) و بروتين البيض (الالبومين) كما تقوم البروتينات في وظيفة النقل مثل هيموغلوبين الدم الذي ينقل الاكسجين من الرئتين الى الانسجة كما ان بعض البروتينات لها وظائف دفاعية وتساهم بعض البروتينات في عملية التقلص والانبساط في العضلات كذلك فأن بعض البروتينات تعمل كهرمونات تسيطر على الافعال الحياتية لبعض المسارات الايضية مثل هرمون الانسولين الذي ينظم مستوى سكر الكلوكوز في الدم، كما أن للبروتينات وظائف تركيبة (بنائية) لأنسجة وخلايا جسم الانسان مثل بروتين الكولاجين وبروتين الكيراتين .

تتكون البروتينات من العناصر الاساسية هي : الكاربون و النيتروجين و الاكسجين والهيدروجين كما يوجد عنصر الكبريت في بعض البروتينات وخاصة الحاوية على الاحماض الامينية (السستين ، السستائين ، المثيونين) كما تتكون البروتينات من العناصر الثانوية الفسفور و الكبريت و الحديد و الزنك واليود .

ن النسبة المئوية لكل عنصر في البروتينات موضحة بالجدول الأتي :

العنصر	النسبة المئوية
الكاربون	50-55 %
النتروجين	13-19 %
الاوكسجين	19-24 %
الهيدروجين	7-6 %
الكبريت	0 -4 %
الفسفور	0 - 3 %
الزنك	0 - 3 %
الحديد	غير محدد
اليود	غير محدد

جدول يوضح النسبة المئوية لكل عنصر في تركيب البروتينات

يتم الكشف عن الكبريت في تركيب البروتينات باستعمال القاعدة (هيدروكسيد الصوديوم) والتي بوجود التسخين تحول تآصر الكبريت في البروتينات من العضوي الى اللاعضوي بتكوين كبريتيد الصوديوم (ملح ذائب) وبالتالي يكشف على الكبريت بتفاعل هذا الملح الذائب مع خلات الرصاص ليتكون كبريتيد الرصاص و خلات الصوديوم كما في المعادلتين الاتيتين :

$$\text{Portien-S} + \text{NaOH} \xrightarrow{\Delta} \text{Portien} + \text{Na}_2\text{S} + \text{H}_2\text{O}$$

$$\text{Na}_2\text{S} + \text{Pb(CH}_3\text{COO)}_2 \xrightarrow{\Delta} \underset{\text{راسب اسود}}{\text{PbS}\downarrow} + 2\text{CH}_3\text{COONa}$$

يتم الكشف عن الفسفور في تركيب البروتينات باستعمال حامض النتريك المركز والذي بوجود النتروجين يحول تأصر الفسفور في الكاسائين من العضوي الى اللاعضوي بتكوين معقد البروتين وحامض الفوسفوريك و الذي يتفاعل بعد ذلك مع محلول مولبيدات الامونيوم ليتكون معقد فوسفور مولبيدات الامونيوم كما في المعادله الاتية :

$$\text{Portien-S} + \text{HNO}_3 \longrightarrow \text{Protien} + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{NO}_3$$

$$\text{H}_3\text{PO}_4 + (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \longrightarrow (\text{NH}_4)_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$$

المواد الكيميائية المستعملة :

١- بروتين الكاسائين Casein

٢- بروتين الالبومين Albumine

طريقة العمل :

الجزء الاول : الكشف عن العناصر الاساسية في تركيب البروتين : (كشف الحرق)

١- ضع 0.5 غم من مسحوق بروتين (الكاسائين او الالبومين) في انبوبة اختبار نظيفة وجافة تماما .

٢- ضع ورقه زهرة الشمس (litmus paper) المبللة على فوهة الانبوبة .

٣- سخن الانبوبة على مصباح بنزن و لاحظ التغيرات التي تطرأعلى ورقة الشمس وعلى الانبوبة .

٤- تغير لون ورقة زهرة الشمس من الاحمر الى الازرق نتيجة تبخر غاز الامونيا و الذي يدل على وجود النتروجين والهيدروجين في تركيب البروتين .

٥- ترطب وتبلل جدار الانبوب الداخلي نتيجة تكاثف بخار الماء يدل على وجود الاكسجين و الهيدروجين في تركيب البروتين .

٦- وجود لون اسود في قعر الانبوبة نتيجة الحرق يدل على وجود الكاربون في تركيبه الكيميائي .

الجزء الثاني : الكشف عن العناصر الثانوية (الكبريت و الفسفور) في تركيب البروتينات

أولا : الكشف عن الكبريت

١- خذ 1 ml من محلول بروتين الالبومين تركيزه (5 %w/v) وضعه في انبوبة اختبار نظيفة وجافة تماما

٢- اضف الى محلول الالبومين محلول هيدروكسيد الصوديوم تركيزه (40 %w/v) مع الرج جيدا .

٣- سخن في حمام مائي مغلي لمدة 10-5 دقائق .

٤- اضف الى الانبوبة 1 ml من محلول خلات الرصاص تركيزه (5 %w/v) مع الرج جيدا .

٥- سخن مره اخرى لمدة 5 دقائق و لاحظ تكون راسب اسود او بني في قعر الانبوبة دلالة على وجود كبريتيد الرصاص وهذا يدل على وجود الكبريت في الالبومين .

40 100

7.5 X

ثانيا : الكشف عن الفسفور :

١- خذ 1ml من محلول الكاسائين وتركيز (5 %w/v) وضعه في انبوبة اختبار نظيفة وجافه تماما .

٢- اضف الي محلول البروتين 1ml من حامض النتريك المركز مع الرج جيدا .

٣- سخن المزيج في حمام مائي مغلي لمده 5 دقائق ثم برد المحلول .

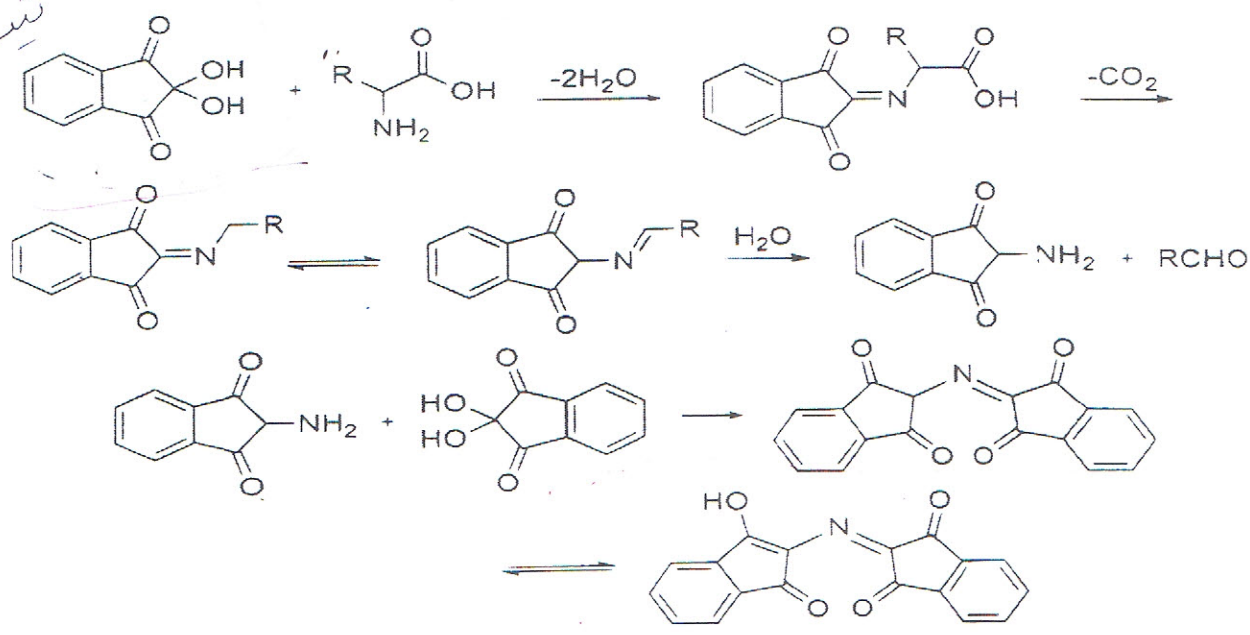
٤- اضف الى المزيج 1 ml من محلول مولبيدات الامونيوم بتركيز (5 %w/v) ثم اعد الانبوبة الى الحمام المائي للفتره من 15-7 دقيقة ولاحظ تكون الراسب المتكتل الاصفر - البرتقالي من معقد الفسفور مولبيدات الامونيوم وهذا يدل على وجود الفسفور في تركيب الكاسائين .

التجربة الثانية عشر : هياشين / كيمياء الاحياء

كشف النهايدرين للاحماض الامينية : Ninhydrin test for amino acids

الاحماض الامينية هي مركبات عضوية نيتروجينية تحتوي على مجموعة كاربوكسيل طرفية ومجموعة امين طرفية وهما المجموعتان المميزتان للأحماض الامينية عن غيرها من المركبات النتروجينية العضوية و تسمى مجموعة الكاربوكسيل بالطرف الحامضي او الطرف الكاربوكسيلي و تسمى مجموعة الامين بالطرف القاعدي او الطرف الأميني. ان الأحماض الامينية هي الوحدات الكيميائية التركيبية للبروتينات و التي ترتبط فيما بينها بواسطة اواصر ببتيدية ، هناك 22 حامض اميني وتصنف الى اصناف مختلفة منها الاليفاتية والاروماتية و منها القاعدية ومنها الحامضية وبعضها ذات تركيب متجانس الحلقة وبعضها حاوي على الكبريت تبعا لنوع الحامض الاميني .

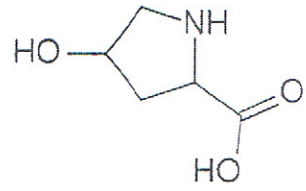
ان الكشف النوعي (اللوني) المميز الاحماض الامينية هو كشف النهايدرين الذي يعد كاشف مؤكسد قوي يقوم بأكسدة مجموعة الأمين الحرة الموجودة في الحامض الاميني ليتحول الحامض الي الدهايد وامونيا وثاني اوكسيد الكاربون و ايضا يتحول النهايدرين الى مركب النهايدرانتين (Ninhydrantin) وبعد ذلك يتفاعل هذا المركب الوسطي مع جزيئة اخرى من الامونيا وبوجود التسخين ويتم ازالة ثلاثة جزيئات ماء ليتكون معقد وسطي (intermediate complex) والذي بدوره يتفاعل مع جزيئة امونيا اخرى ليتكون معقد بنفسجي مزرق يسمى معقد رومان (Ruhemann's complex) كما في الميكانيكية التالية :



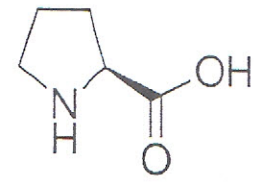
معقد بنفسجي (معقد رومان)

ان تفاعل النهايدرين مع الاحماض الامينية يتم ضمن دالة حامضية (pH=4-8) وان هذا التفاعل حساس جدا اذ ان الكميات القليلة من الاحماض الامينية يمكن الكشف عنها بواسطة كروماتوغرافيا الورقة كما سياتي ذكرها لاحقا .

ان الحامضين الامينين اللذان يعطيان كشفا سالبا مع النهايدرين هما برولين (proline) وهيدروكسي البرولين (Hydroxy proline) وذلك لانهما يمتلكان مجموعتي امين مقيدتين ضمن التركيب الكيميائي الحلقي وبالتالي لا تحصل عمليه الاكسدة عليهما لانهما غير حرتان كما في التركيبين الاتيين :



Hydroxy proline



Proline

المواد الكيميائية المستعملة :

١- احماض امينية مختلفة (كلايسين ، ألانين ، أرجنين ، فنيل ألانين ، سيرين ، تربتوفان ، تايروسين، حامض الاسبارتيك ، حامض الكلوتاميك ، سستين ، سستائين ، برولين)

٢- بروتين الالبومين

٣- بروتين الكاسائين

٤- كاشف النهايدرين

٥- كحول الايثانول

طريقة العمل :

١- حضر محاليل الاحماض الامينية بتركيز (1 %w/v) .

٢- حضر كاشف النهايدرين بتركيز (2 %w/v) باذابة 2 غم من ماده الى النهايدرين في كمية مناسبة من الايثانول ثم اكمل الحجم الى 100 ml في قنينة حجمية سعة 100 ml .

٣- خذ 5 انابيب اختبار وضع في كل منهما 2 ml من الاحماض الامينية (كلايسين ، ألانين ، تربتوفان ، تايروسين، حامض الكلوتاميك) .

٤- اضف الى كل انبوبة 1ml من كاشف النهايدرين .

٥- رج الانابيب جيدا ثم سخن لمدة دقيقة الى دقيقتين عند الحاجة ولاحظ تكون اللون البنفسجي المزرق .

٦- اجري كشف عن النهايدرين على الحامض الاميني البرولين ولاحظ تكون اللون الاصفر مما يدل على سلبية الكشف .

٧- اجري كشف النهايدرين على بروتين الالبومين و الكازائين .

٨- سجل الملاحظات في دفتر التجربة .

ملاحظات حول التجربة :

١- في حالات كثيرة فأن تكون المعقد البنفسجي (معقد رومان) لا يحتاج الى تسخين وهذا يعتمد على تركيز الحامض الاميني .

٢- النهايدرين يعطي كشف موجبا مع الببتيدات الثنائية والثلاثية الحاوية على مجموعة امين حرة اما الببتيدات الرباعية و صعودا فأنها تعطي كشفاً سالباً مع النهايدرين .

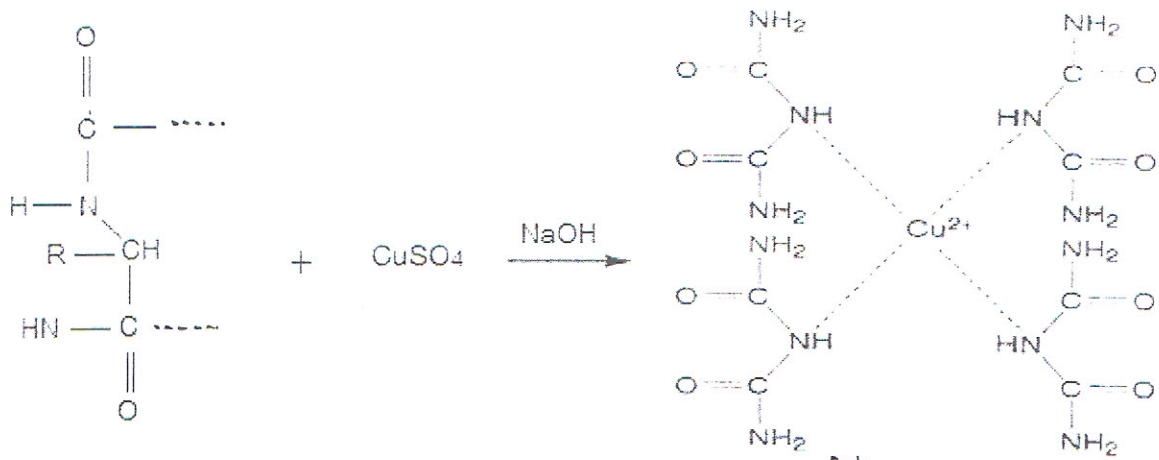
٣- النهايدرين يعطى كشفاً سالباً مع البروتينات .

التجربة الثانية عشر :

كشف بايوريت للببتيدات والبروتينات Biuret test of peptides and proteins

البروتينات هي سلاسل ببتيدية من الاحماض الامينية وتتكون من متعدد الببتيد ذات الاوزان الجزيئية العالية لذلك يتم الكشف عن الاواصر الببتدية في الببتيدات و البروتينات بواسطة كاشف بايوريت الذي يكشف عن الاواصر الببتيدية الموجودة في الببتيدات الثلاثية صعودا و كذلك يكشف عن البروتينات .

يتضمن الكشف تفاعل كاشف بايوريت المتكون من كبريتات النحاس و هيدروكسيد الصوديوم مع الببتيد او البروتين او بصورة ادق تفاعل الكاشف مع الاواصر الببتيدية الموجودة في الببتيد او البروتين فيكون النحاس اربع اواصر تناسقية مع هذه الاواصر الببتيدية (الاميدية) وينتج في النهاية معقد ذو لون بنفسجي يسمى معقد النحاسيك التناسقي كما في التفاعل الاتي :



Protein or peptide

Cu complex (violet color)

وعليه يمكن تقدير البروتينات كميا باستعمال هذا المعقد لونيا عن طريق قياس الامتصاصية للمعقد الناتج بطول موجي 570 نانومتر وحساب تركيز البروتين المعين .

المواد الكيميائية المستعملة :

١- بروتين الكاسائين او الالبومين او الجيلاتين .

٢- كبريتات النحاس

٣- هيدروكسيد الصوديوم

٤- گلايسين او الانين

طريقة العمل :

١- ضع 2 ml من المحلول البروتيني الكاسائين او الالبومين في انبوبة اختبار نظيفة و جافة تماما .

٢- اضف الى المحلول البروتيني 0.5 ml من كبريتات النحاس تركيزها (1 %w/v) مع الرج جيدا .

٣- اضف الى المزيج 2 ml من محلول هيدروكسيد الصوديوم تركيزه (40 %w/v) ولاحظ تكون اللون البنفسجي الذي يدل على وجود البروتين .

٤- اجري الكشف عن الحامض الاميني (كلايسين او الانين) ولاحظ سلبية الكشف .

ملاحظات حول التجربة :

١- الببتيد الثنائي لا يعطي كشف بايوريت .

٢- الاحماض الامينية تعطي كشف سالب مع كاشف بايوريت لعدم أمتلاكها اواصر ببتيدية في تركيبها الكيميائي .

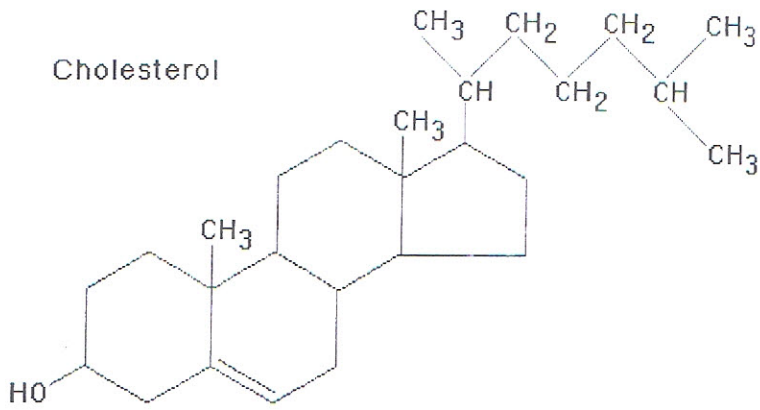
٣- الببتيد الثلاثي (كلايسيل-كلايسيل كلايسين) لا يعطي كشف بايوريت بسبب التدخل بين الاواصر الببتيدية مع مجموعة R الموجودة معها في كل حامض من هذا البيتيد .

٤- بعض المركبات النتروجينية غير البروتينية مثل اليوريا تعطي كشفاً موجباً مع بايوريت .

التجربة التاسعة : Exp. no. 9

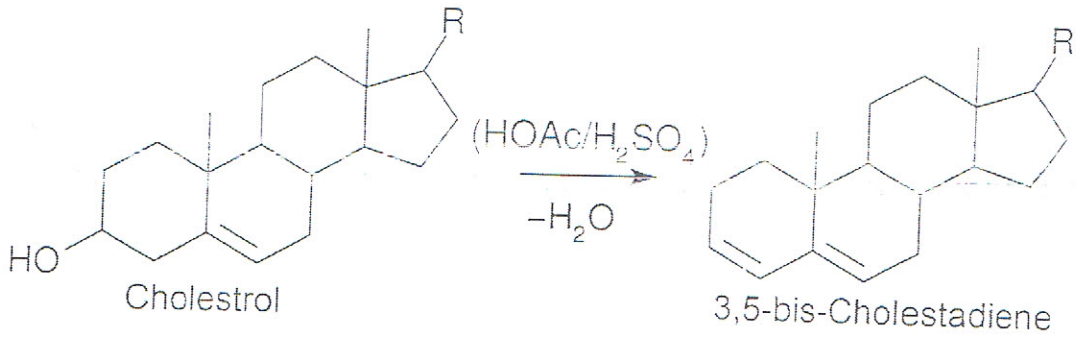
الكشوفات النوعية للكوليسترول Qualitative test of cholesterol

ان الكوليسترول (cholesterol) هو احد انواع الستيرويدات (steroids) والتي هي صنف من اصناف الدهون ، ويتكون الكوليسترول من نواة الستيرويد المتكونة من اربعة حلقات (ثلاثة منها سداسية الكاربون والرابعة خماسية الكاربون) كما في التركيب الاتي :



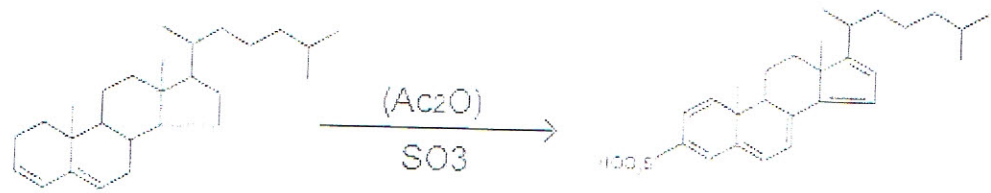
ان الكوليسترول من الدهون الغير قابلة للتصبن بسبب عدم احتوائه على مجموعة كاربوكسيل الفعالة المسئولة عن انتاج الصابون .ان الكشفين اللونيين المميزين للكوليسترول هما كاشف سالكوفسكي (Salkowaski test) المتكون من كلوروفورم وحامض الكبريتيك المركز ، اذ يدل ظهور اللون الاحمر-البنفسجي في الطبقة العليا دلالة على وجود الكوليسترول .

والكاشف الاخر هوا ليبرمان-بورخارد (Lieberman-burchard test) المتكون من الكلوروفورم وانهدريد الخليك (حامض الخليك اللامائي) وحامض الكبريتيك المركز ،واذ يدل ظهور اللون الاخضر- المزرق دلالة على وجود الكوليسترول كما في المعادلات الاتية :



Cholestrol

3,5-bis-Cholestadiene



3,5-bis-Cholestadiene

bis-Cholestadiene mono Sulphanic acid

المواد الكيميائية المستعملة :

١- بلورات كوليسترول

٢- حامض الكبريتيك المركز

٣- كلوروفورم

٤- انهدريد الخليك

طريقة العمل :

اولا : كشف سالكوفسكي :

١- خذ انبوبة اختبار نظيفة وجافة تماما وضع فيها 3 ml من الكوليسترول المذاب في الكلورفورم بتركيز (5 %w/v) .

٢- اضف الى المحلول 3 ml من حامض الكبريتيك المركز مع رج محتويات المحلول بعناية .

٣- اترك انبوبة الاختبار كي تستقر ولاحظ تكون طبقتين هما طبقة الكلوروفورم متلونة باللون الاحمر- البنفسجي دلالة على وجود الكوليسترول، بينما تتلون الطبقة السفلى بلون اخضر متألق .

ثانيا : كشف ليبرمان–بورخارد :

١– خذ انبوبة اختبار نظيفة وجافة تماما وضع فيها 3 ml من الكوليسترول المذاب في الكلورفورم بتركيز (5 %w/v) .

٢– اضف الى المحلول 1.5 ml من انهدريد حامض الخليك ثم 3 قطرات من حامض الكبريتيك المركز مع رج محتويات المحلول جيدا .

٣– لاحظ تلون المزيج باللون الازرق الغامق الذي يتحول تدريجيا الى الاخضر–المزرق دلالة على وجود الكوليسترول .

ملاحظات حول التجربة :

١– يمكن استعمال كاشف Zak للكشف عن الكوليسترول والذي يتكون من محلول كلوريد الحديديك وحامض الخليك الثلجي وحامض الكبريتيك المركز والناتج هو تكون لون بنفسجي والذي يمتاز بالاستقرارية والثباتية العالية اعلى من اللون الناتج في كشفي سالكوفسكي وليبرمان–بورخارد ،وهذا يدل على ان كشف زاك هو اكثر دقة من هذين الكشفين .

٢– يستعمل كشف ليبرمان–بوخارد لتقدير تركيز الكوليسترول في الدم وذلك للحساسية الجيدة للطريقة .