١١

تقدير الكربوهيدرات
Carbohydrate Determination

(١١,١) تقدير السكريات بالمعايرة الحجمية بإرجاع النحاس (طريقة لان واينون)
Volumatric Determination of Sugars by Copper Reduction (Lane and Eynon Method)

المقدمة

يمكن تقدير السكر بطرق المعايرة الحجمية التي تعتمد على استعمال محلول كبريتات النحاس القلوية التي يختزلها السكر إلى أكسيد النحاس الأحمر. يقدر في هذه الطريقة حجم محلول السكر اللازم لاختزال حجم معلوم من مزيج محلول فهلنغ باستعمال أزرق المثيلين ككاشف داخلي. يعزل الهواء عن المزيج المتفاعل بالمحافظة على السائل في حالة غليان خلال المعايرة.

ينبغي تحلل السكر غير المختزل كالسكروز إلى سكر مختزل قبل إجراء هذه المعايرة.

الهدف: تقدير السكريات باستخدام طريقة لان داينون.

الأجهزة

- سحاحات.
- دوارق حجمية.
- صوف زجاجي.

الكواشف

محلول فهلنغ (أ) و (ب)

(أ) أذب ٦٩,٢٨ جم كبريتات النحاسيك (II) خماسية الماء ($CuSO_4.5H_2O$)، مع ١,٠مل من M1 حمض الكبريتيك في الماء، وأكمل الحجم إلى لتر. ويحفظ المحلول لمدة طويلة.

(ب) أذب ٣٤٦ جم طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم رباعية الماء، ملح روشيل ($KNaC_4H_4.4H_2O$) مع ١٠٠جم هيدروكسيد الصوديوم في الماء وأكمل إلى لتر، رشح خلال الصرف الزجاجي بعد وضع المحلول جانباً لمدة. يحفظ بالمحلول لمدة غير محدودة إذا كان في زجاجة محكمة الإغلاق.

مزج محلول فهلنغ. امزج حجمين متساويين من محلولي فهلنغ (أ) و (ب)، وذلك بأخذ حجم من (ب) إلى دورق زجاجي حذف ثم إضافة حجم مساوٍ من (أ) مع التحريك اللطيف. امزج وسد الدورق لتجنب امتصاص ثاني أكسيد الكربون واخزن في الظلام. ينبغي تحضير وتغيير المحلول المزيج أسبوعياً.

محلول أزرق المثيلين

١جم من الصبغة تذاب في ١٠٠مل ماء.

كاشفي كاريز ١ و ٢ (Carrez):

١- ١٠,٦ جم فرسيانيد البوتاسيوم ثلاثي الماء في ١٠٠مل.

٢- ٢١,٩ جم خلات الزنك الثنائية الماء مع ٢مل حمض الخليك الثلجي في ١٠٠مل.

طريقة العمل

أولا: المربيات وأصناف المربيات

أ) تقدير السكريات المختزلة:

١- حضِّر محلولاً من الغذاء الذي يحتوي السكر كالمربيات أو المرملاد، بوزن نحو ٤- ٥ جم بدقة من الغذاء في كأس وإضافة ماء ساخن نحو ١٠٠مل

٢- حرك حتى ذوبان المادة ورشح عبر الصوف الزجاجي إلى دورق حجمي ٢٥٠مل.

٣- اغسل الكأس في الدورق الحجمي، وأكمل الحجم إلى العلامة. استعمل هذا المحلول في المعايرة.

ب) تقدير السكريات الكلية:

١- اعمل أولاً تحلل السكريات غير المختزلة إلى سكريات مختزلة وذلك بأخذ ١٠٠مل من المحلول المحضر في (أ) إلى دورق مخروطي وإضافة ١٠مل حمض الهيدروكلوريك المخفف والغليان لمدة ٥ دقائق.

٢- يعد التبريد يعدل المحلول بمحلول ١٠٪ هيدروكسيد الصوديوم بوجود الفينول فثالين واستكمال الحجم إلى ٢٥٠مل. واستعمل هذا المحلول للمعايرة مع محلول فهلنغ.

ج) المعايرة:

١- املأ السحاحة بمحلول السكر.

٢- خذ بالماصة ١٠ مل من مزيج محلولي فهلنغ في دورق مخروطي وأضف ٤ نقاط من أزرق الميثيلين.

٣- سخن حتى غليان المحلول.

٤- أضف بالتنقيط أثناء الغليان، محلول السكر من السحاحة حتى يختفي اللون الأزرق. يعطي هذا القيمة القريبة للمعايرة.

٥- أعد المعايرة مع ١٠مل أخرى من مزيج محلولي فهلنغ متبعاً الخطوات الآتية: بعد غلي محلولي فهلنغ أضف كمية من السكر حتى تبلغ كمية السكر المضافة مقداراً ينقص ١٢ مل عن الكمية التي لزمت في المعايرة التقريبية.

٦- أضف ٤ نقاط أشف أزرق المثيلين. ٧) أعد غلي المزيج، وتباع إضافة محلول السكروز، والمزيج يغلى بدفعات كل منها نحو ٠,٢٥، حتى الوصول إلى نقطة انتهاء المعايرة، وهي اختفاء اللون الأزرق.

ثانياً : الحليب

سكر الحليب (اللاكتوز) من السكريات المختزلة ويتم تقديره مباشرة بالمعايرة بعد ترسيب البروتين والدهون في الحليب.

أ) تحضير محلول اللاكتوز :

١- زن بدقة ١٠-١٢ جم حليب في دورق حجمي ٢٥٠مل وأضف ٥٠مل ماء مقطر.

٢- أضف ٥مل كاشف كاريز١ و ٥مل كاشف كاريز٢ لترسيب الدهن والبروتين، ثم أكمل الحجم إلى ٢٥٠مل بالماء ورشح.

ب) المعايرة:

١- أملأ السحاحة بمحلول اللاكتوز.

٢- خذ بالماصة ١٠مل محلول فهلنغ في دورق مخروطي وأضف ٤ نقاط كاشف أزرق المثيل وسخن حتى الغليان.

٣- أضف والمحلول في حالة الغليان محلول اللاكتوز من السحاحة حتى يختفي اللون الأزرق. فتحصل بذلك على القيمة التقريبية للمعايرة.

٤- أعد عملية المعايرة باستعمال ١٠مل أخرى من محلول فهلنغ واتبع الإجراءات الآتية:

أضف إلى محلول فهلنغ وهو في حالة الغليان محلول اللاكتوز حتى تصل إلى مقدار ينقص (١- ٢) مل عن القيمة التقريبية للمعايرة الأولى. أضف ٤ نقاط أزرق المثيلين. تابع غلي المزيج، وأضف محلول اللاكتوز بمعدل ٠,٢٥مل كل مرة، حتى الوصول إلى نقطة انتهاء المعايرة (اختفاء اللون الأزرق).

الحساب

احسب تركيز محلول السكريات باستخدام العوامل الآتية:

١مل محلول فهلنغ = ٤,٩٥ ملجم جلوكوز.

- ٥,٢ ملجم فركتوز.
- ٥,٠٩ ملجم سكر محوّل.
- ٧,٦٨ ملجم مالتوز.
- ٦,٤٦ ملجم لاكتوز.
- ٤,٧٥ ملجم سكروز

أولاً: المربيات والمرملاد

١- السكريات المختزلة:

$$\text{السكريات المختزلة٪ (على أساس الجلوكوز)} = \frac{250\times4.95}{10\times W\times T}$$

حيث T = ما استهلكته المعايرة (مل) من محلول السكر غير المخفف

W = وزن المربى المستعمل (جم)

٢- السكريات الكلية:

$$\text{السكاكر الكلية٪ (على أساس الجلوكوز)} = \frac{25\times250\times4.95}{10\times W\times T}$$

حيث T = استهلاك المعايرة (مل) من محلول السكر غير المخفف

W = وزن المربى المستعمل (جم)

ثانياً : الحليب

$$\text{نسبة اللاكتوز في الحليب٪} = \frac{25 \times 64.6}{W \times T}$$

حيث T = استهلاك المعايرة (مل) من محلول اللاكتوز

W = وزن الحليب المستعمل (جم)

(١١,٢) تقدير الكربوهيدرات المتاحة في الأغذية بالطريقة اللونية لـ DNS

DNS Colorimetric Determination of Available Carbohydrates in Foods

مقدمة

يشكل حمض ٣,٥- ثنائي نترو ساليسيليك (DNS) القلوي نواتج اختزال بنية- حمراء، من حمض ٣- أمينو-٥- ساليسيليك، عندما يسخن بوجود سكر مختزل. وتستخدم شدة اللون الظاهر، الذي يقاس عند طول الموجه ٥٤٠ نانومتر لتقدير الكربوهيدرات المتاحة في الغذاء بعد تحللها إلى سكر مختزل.

الهدف: تقدير الكربوهيدرات المتاحة في الأغذية بالطريقة اللونية لـ DNS.

الأجهزة

- مقياس لوني ذي مرشح أخضر، أو مطياف ضوئي ذي طول الموجه ٥٤٠ نانومتر.
- كؤوس.
- ماصات.
- دوارق حجمية.
- أنابيب اختبار.

الكواشف

- محلول جلوكوز أساسي (١٥ملجرام/مل).
- حمض الكبريتيك 1.5M .
- هيدروكسيد الصوديوم ١٠٪.
- كاشف DNS: يحضر بإذابة ١٠ جرام DNS في ٢٠٠مل NaOH 2M مع التسخين والتحريك الشديد، أذب ٣٠٠ جرام طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم رباعية الماء في ٥٠٠مل ماء مقطر (مثبت اللون. امزج المحلولين السابقين وأكمل إلى لتر واحد بالماء.

طريقة العمل

١- تحضير الأغذية للتحليل

أ) الأغذية الصلبة، كأغذية حبوب الإفطار

- اطحن الغذاء إلى مسحوق ناعم.
- زن بدقة نحو ٠,١ - ٠,٢جرام من المسحوق وضعه في أنبوب اختبار.
- أضف ١٠مل من 1.5M حمض الكبريتيك، وسخن في حمام مائي لمدة ٢٠دقيقة، وحرك أحياناً؛ وذلك لتحلل السكريات المتعددة والسكاكر الأُخرى غير المختزلة.
- برد وأضف بحرص ١٢مل من ١٠٪ NaOH.
- امزج ورشح إلى ١٠٠مل دورق معياري.
- اغسل الأنبوب بالماء المقطر وأضفه إلى الدورق المعياري، واكمل الحجم بالماء المقطر.
- امزج بقلب الدورق.

ب) المربيات...إلخ، المحتوى من السكاكر الكلية

• زن بدقة ١ – ١,٥ جرام من المربى وضعه في أنبوب اختبار.

• أضف ١٠مل من 1.5 M حمض الكبريتيك، وسخن في حمام مائي بدرجة الغليان مدة ٢٠دقيقة، وحرك بين الحين والآخر؛ وذلك لتحلل السكاكر غير المختزلة.

• برد، وأضف بحذر ١٢مل هيدروكسيد الصوديوم ١٠٪، وامزج.

• رشح إلى دورق حجمي سعته ١٠٠مل.

• اغسل الأنبوب بالماء المقطر فوق الدورق الحجمي عدة مرات.

• أكمل إلى الحجم بالماء المقطر ثم امزج بتقليب الدورق الحجمي عدة مرات.

• خفف ١٠مل من هذا المحلول إلى ٢٥٠مل مستعملاً دورقاً حجمياً والماء المقطر وامزج بالتقليب عدة مرات.

ج) المربيات، المحتوى من السكر المختزل

• زن بدقة نحو ٣جرام وضع في دورق مخروطي.

• أضف ٥٠مل ماء، وسخن وحرك لمدة ١٠ دقائق.

• رشح في دورق حجمي ١٠٠مل.

• اغسل الأنبوب إلى الدورق الحجمي بكميات قليلة من الماء المقطر.

• امزج جيداً بالتقليب عدة مرات، ثم أكمل ١٠ مل من هذا المحلول إلى ٢٥٠مل بالماء المقطر مستعملاً دورقاً حجمياً، امزج وقلّب.

٢– تحضير محاليل قياسية من الجلوكوز

• حضر محاليل تحوي ٠,٢٥، ٠,٥، ١، ١,٢٥، ١,٥ملجرام من الجلوكوز؛ وذلك بتخفيف المحلول الأولي الذي يحوي ١٥ ملجرام/مل، مستعملاً الماء المقطر ودوارق حجمية سعة ١٠٠مل.

٣- قياسات الامتصاص:

أ) محاليل الجلوكوز القياسية

• خذ بالماصة ١ مل ماء مقطر في أنبوب اختبار، وضع في أنابيب خمسة أُخرى معلّمة ١مل من كل من محاليل الجلوكوز المعيارية (٠,٢٥- ١,٥ملجرام)، أضف ١مل من كاشف DNS و٢مل ماء إلى كل أنبوب مستعملاً الماصة.

ب) نواتج التحلل

• خذ بالماصة ١مل من نواتج التحلل المحضرة في ١(أ) أو ١(ب) أو ١مل من المحلول المحضر في ١(ج) إلى أنبوب اختبار وأضف ٢مل ماء و١مل من كاشف DNS.

ج) المحاليل القياسية ونواتج التحلل

• سخّن جميع الأنابيب في حمام مائي بدرجة الغليان لمدة ٥دقائق حتى يتفاعل الجلوكوز و DNS، برد وعدل الحجم إلى ٢٠مل بدقة بالماء المقطر، مستعملاً ماصة أو سحاحة، اقرأ الامتصاص لكل محلول في طول الموجة ٥٤٠نانومتر.

الحسابات

أ) الحبوب (حبوب الإفطار)

$$\text{٪الكربوهيدرات المتاحة في الحبوب (على أساس الجلوكوز)} = W/10 \times C$$

$$\frac{\text{التركيز} \times ١٠}{\text{وزن العينة (جم)}}$$

حيث C= التركيز مقدراً بالملجرام من الجلوكوز في ٢٠مل.

W= وزن الحبوب المستعملة (جرام).

ب) المربيات

٪محتوى السكر في المربى (على أساس الجلوكوز) = W/250 x C

تركيز الجلوكوز × ٢٥٠

وزن العينة (جم)

حيث C= التركيز مقدراً بالملجرام من الجلوكوز في ٢٠مل.

W= وزن المربى المستعمل (جرام).

(١١,٣) طريقة الفينول–حمض الكبريتيك لقياس الكربوهيدرات الكلية

Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrate Determination

مقدمة

طريقة الفينول– حمض الكبريتيك طريقة لونية سهلة وسريعة لقياس الكربوهيدرات الكلية في الأغذية، وهذه الطريقة تقيس جميع الكربوهيدرات الأحادية والثنائية والمتعددة السكريات، وهذه الطريقة تقيس تقريباً جميع الكربوهيرات.

في هذه الطريقة حمض الكبريتيك المركز يقوم بتكسير السكريات المتعددة والثنائية إلى سكريات أحادية، هذه المركبات تتفاعل مع الفينول وتعطي اللون الأصفر– الذهبي، ويمكن أن يختلف الطول الموجي لقياس السكريات فمثلاً المركبات التي تحتوي على كمية عالية من الزيلوز مثل: نخالة القمح أو الذرة فإن الزيلوز يستخدم كمحلول قياس لرسم المنحنى ويقاس عند طول موجي ٤٨٠ نانومتر، أما المركبات العالية في الهكسوز فإنه يستخدم الجلوكوز لعمل المنحنى القياسي ويقاس عند طول موجي ٤٩٠ نانومتر.

الهدف: قياس الكربوهيدرات الكلية (المشروبات الغازية–العصائر).

الكيماويات: جلوكوز– فينول– حمض كبريتيك.

المحاليل

- محلول الجلوكوز القياسي ١٠٠ ملجرام/لتر.
- الفينول ٨٠٪ وزن/وزن في الماء ١مل.

ويحضر بإضافة ٢٠ جرام ماء مقطر خالي المعادن (dd) إلى ٨٠ جرام محلول الفينول المعاد تقطيره.

- حمض كبريتيك مركز.

الأجهزة

- جهاز سبكتروفوتوميتر
- حمام مائي
- وحدة خلاط فورتكس Vortex mixer.

طريقة العمل

١- أنابيب المنحنى القياسي

باستخدام محلول الجلوكوز القياسي (١٠٠ ملجرام جلوكوز/لتر) وماء مقطر خالٍ من المعادن (dd)، كما هو مبين في الجدول أسفل. أسحب بالماصة كمية قياسية من الجلوكوز القياسي إلى أنابيب اختبار نظيفة (مكررين لكل تركيز)، هذه الأنابيب تستخدم لعمل المنحنى القياسي بتركيز من جلوكوز µg 0-100 في ٢مل، 0µg جلوكوز/٢مل عينة.

سوف تستخدم لتحضير العينة الضابطة

µg Glucose/2 ml						
0	20	40	60	80	100	
0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	مل جلوكوز من المحلول
2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	مل ماء مضاف

٢- تخلص من الكربون في المشروبات الغازية

أو ما اسكب حوالي ١٠٠مل إلى دورق حجمي سعته ٥٠٠مل، اخلط بهدوء وحرك حتى يتم التخلص من الفقاعات، إذا وجد أي شوائب فإنه يجب ترشيح العينة قبل التحليل.

٣- أنابيب العينة

العينات المختبرة سوف تحتوي على ٢٠- ١٠٠ ميكروجرام جلوكوز/٢مل.

طريقة التخفيف والأحجام كما يلي:

• بعد عملية التخفيف خذ بالماصة ١مل من العينة إلى أنبوبة الاختبار وأضف١. مل ماء مقطر خالي من المعادن (dd) ثم حلل كل عينة مخففه مرتين **duplicate**.

	التخفيف	الحجم المحلل (مل)
العينة (مشروب غازي)		
عادي	١ : ٢٠٠٠	١
خالٍ من السكر	صفر	١

• خذ بالماصة ٥مل من المشروب إلى دورق حجمي ١٠٠مل وخفف باستخدام ماء (dd).

• اغلق الدورق وأخلط جيداً (عبارة عن تخفيف من ١ : ٢٠).

• خذ بالماصة ١٠مل من هذا المشروب المخفف ١ : ٢٠ إلى دورق حجمي سعته ١٠٠مل آخر.

• خفف الحجم باستخدام الماء (dd)، أغلق وأخلط جيداً.

• **إضافة الفينول** : لكل أنبوبة من الأنابيب السابقة والتي تحتوي على ٢مل أضف ٠,٠٥مل من ٨٠٪ فينول، أخلط جيداً باستخدام خلاطه فورتكس.

• إضافة حمض الكبريتيك: إلى كل أنبوبة من الفقرة السابقة أضف ٥ مل H_2SO_4 حمض الكبريتيك (يجب إضافته بسرعة إلى أنابيب الاختبار).

• اخلط باستخدام خلاط فورتكس لأنابيب الاختبار.

• اترك الأنابيب لمدة ١٠ دقائق أخرى.

• اخلط باستخدام خلاط فورتكس أنابيب الاختبار مرة أخرى قبل قراءة الامتصاص.

• انقل العينات من أنابيب الاختبار إلى خلايا الامتصاص.

• اضبط جهاز السبكتروفوتوميتر على الصفر مع عينات المنحنى القياسي والتي تحتوي 0µg جلوكوز/٢مل (الضابطة)، اترك العينة الضابطة للقراءة مرة أخرى.

• اقرأ الامتصاص لجميع العينات عند طول موجي ٤٩٠ نانو متر.

• اقرأ امتصاصية أنابيب المنحنى القياسي من الأقل تركيز ١٪ إلى أعلى تركيز.

• كمثال (٢٠ ميكروجرام/٢مل إلى ١٠٠ميكروجرام/٢مل) ومن ثم اقرأ العينات.

• اعمل المنحنى القياسي لقياس الكربوهيدرات الكلية على أساس الجلوكوز (A_{490} مقابل ميكروجرام جلوكوز/٢مل) ثم احسب معادلة الخط للمنحنى القياسي=Y كما في المثال في الصفحة التالية.

• احسب تركيز الجلوكوز في المشروب الغازي على أساس جرام/لتر.

• احسب السعرات الحرارية على أساس كمية الكربوهيدرات في العينة.

العينة (مشروب غازي)	جرام جلوكوز/العلبة	عدد السعرات الحرارية في العلبة
عادي		
دايت (خالي من السكر)		

ارسم الامتصاصية spectra التي حصلت عليها لقياس الامتصاصية بين ٤٥٠ نانومتر إلى ٥٥٠ نانومتر.

nm	450	460	470	480	490	500	510	520	530	580	550
الامتصاصية											

مثال: قياس الكربوهيدرات بطريقة الفينول – حمض الكبريتيك

#الأنبوب	نوع العينة	التخفيف	ml تخفيف للمحلول القياسي أو العينة غير المعروفة	A490	الجلوكوز µg في الأنبوب	مكافئ g/L في العينة الأصلية
1	Blank					
2	Std. 20µg					
3	Std. 20µg					
4	Std· 40µg					
5	Std. 40µg					
6	Std· 60µg					
7	Std. 60µg					
8	Std. 80µg					
9	Std. 80µg					
10	Std. 100µg					
11	Std. 100µg					
12	مشروب غازي عادي					
13	مشروب غازي عادي					
14	مشروب غازي دايت					
15	مشروب غازي دايت					
2	Std. 20µg	- -	0.2ml	0.243	20	0.10
13	مشروب غازي عادي	1:2000	1ml	0.648	79	158

الحسابات للمشروب الغازي العادي :

Y=0.011 + 0.1027
Y=0.648
X=78.98 µg/2ml
(78.98 µg glucose/2ml) × (2ml/1ml) × (2000 ml/1ml)
= 157950 µg/ml
= 157.95 mg/ml
= 157.95 g/L

(١١,٤) تقدير الكربوهيدرات – طريقة لونية
Colorimetric Determination of Carbohydrates

مقدمة

هناك عدة طرق لونية طورت وكلها تعتمد على التفاعل الكيمائي للكربوهيدرات. وطريقة الأنثرون Anthrone هي واحدة من أسهل هذه الطرق اللونية وهذه المادة تتفاعل مع كل الكربوهيدرات وتنتج لوناً أخضر يميل للزرقة Blue-green. وهذا الاختبار طريقة سريعة ومفيدة في حالة تقدير الكربوهيدرات الكلية أو عند عدم الحاجة لمعرفة أنواع السكريات المختلفة.

الهدف: تقدير الكربوهيدرات بطريقة لونية.

الأجهزة: جهاز قياس الألوان، أنابيب الجهاز، أنابيب اختبار، وحمام مائي يغلي.

المحاليل Reagents

١- محلول الأنثرون (٠,١٪ في حمض كبريتيك ٧٢٪): اذب ١,٠جم من مادة الأنثرون في محلول حمض الكبريتيك (٧٢٪) المبرد، وأكمل إلى ١ لتر. وهذا المحلول يكون ثابتاً لعدة أيام إذا حفظ في درجة حرارة ٤°م، ويجب طرح المحلول إذا تغير لونه إلى الأخضر وعمل محلول جديد.

٢- محلول الجلوكوز (٠,٠٢٪).

٣- محلول كلوريد الكالسيوم (٥٥جم كلوريد الكالسيوم في ٧٦مل ماء فقط وتضبط الـ pH بواسطة حمض الخليك الثلجي إلى ٢).

٤- محلول حمض الخليك ثلاثي الكلور Trichloro acetic acid (١٠٠جم من الحمض في ١٠٠مل ماء مقطر).

٥- كحول إيثيلي ٨٠٪.

الطريقة Procedure

١- توزن ٤٠٠ ملجم من العينة في أنبوبة اختبار مكررين ويضاف ٢مل من الكحول إلى العينة إذا كانت جافة.

٢- تضاف ١٢مل من محلول كلوريد الكالسيوم إلى العينة وتسخن أنبوبة الاختبار في حمام ماء يغلي لمدة ٣٠ دقيقة، حتى تتم جلتنة gelatinization النشا وذوبان الكربوهيدرات.

أ) يجب خلط العينة بواسطة قضيب زجاجي من حين لآخر لتفادي جلتنة المادة الغذائية في قاع الأنبوب. تبرد الأنبوبة في ماء بارد إلى درجة حرارة الغرفة.

ب) تنقل مكونات الأنبوبة كمياً إلى دورق معياري سعة ١٠٠مل وتغسل الأنبوبة عدة مرات بماء مقطر ويضاف الغسيل إلى الدورق. تضاف ٥مل من محلول حمض الخليك ثلاثي الكلور ويخفف بماء مقطر إلى العلامة.

٣- يقفل الدورق المعياري وتخلط المكونات جيداً بواسطة تقليب الدورق عدة مرات ثم ترشح المكونات على ورقة واطمان رقم ٤٢ للتخلص من أي بروتين مترسب.

٤- تنقل ٠,١ ، ٠,٢ ، ٠,٥ مل من الدورق إلى أنبوبة اختبار بايركس pyrex. تضاف ٠,٥مل من الماء المقطر إلى الأنبوبة التي تحوي ٠,٥مل من الراشح لتصبح حجم جميع الأنابيب ١مل.

٥- تنقل ٠,٢ ، ٠,٤ ، ٠,٦ ، ٠,٨ و ١مل من محلول الجلوكوز (٠,٢٪) إلى أنابيب اختبار بايركس. ويضاف الماء المقطر إلى كل أنبوبة ليكمل الحجم إلى ١مل. أيضاً تحضر أنبوبة ضابطة (بلانك) من ١مل ماء مقطر وتضع علامة على جميع الأنابيب للتعرف عليها أثناء التسخين والتحليل.

٦- تغمر جميع الأنابيب في ماء بارد. تضاف ٥مل من محلول الأنثرون وترج الأنبوبة جيداً للتأكد من خلط المكونات كلها حتى قاع الأنبوبة.

تحذير: تذكر أن محلول الانثرون محضر من حمض الكبريتيك المركز.

٧- توضع الأنابيب في حمام ماء يغلي وتسخن لمدة ١٥ دقيقة، ثم تبرد الأنابيب جيداً في ماء بارد.

٨- تأكد من ظهور اللون بطريقة تدريجية حسب تركيز محلول الجلوكوز ويجب أن تكون التجربة الضابطة أخف الألوان.

٩- يشغل جهاز تقدير الألوان (Spectronic 20 Colorimeter) ويترك مدة ١٠ دقائق قبل الاستخدام. ويضبط طول الموجة إلى ٦٢٠ نانومتر، واتبع نفس خطوات الطريقة اللونية لتقدير البروتين.