الفصل الرابع
الكربوهيدرات

وتشمل الألياف الخام Crude Fiber ، والمستخلص الخالي من النيتروجي Nitro-gen Free Extract (NFE) أي الكربوهيدرات الذائبة ، ونظراً لأن التقسيم الغذائي المتبع منذ قرن وربع في التحليل يعتبر أن الألياف الخام هي كل ما لا يهضم بالغليان لمدة نصف ساعة في حامض الكبريتيك ١,٢٥ ٪ ثم في الصودا الكاوية ١,٢٥ ٪ ، وأن الكربوهيدرات الذائبة NFE هي المواد التي تذوب إذا عوملت العينة بالحامض والقلوي المخففين ، ونظراً لأن هذا التقسيم عديم المعنى من الناحية الكيماوية ، وغير دقيق بتاتاً من الناحية الغذائية الفسيولوجية ، إذ لا يوجد مركب يسمى بالألياف لكنها مجموعة مواد تشمل السليولوز والهيميسليلوز واللجنين ، كما أن الكربوهيدرات الذائبة تحتوي على النشا والمواد السكرية الذائبة كالسكريات البسيطة ، فهناك خطأ كيماوي ناتج من احتواء الألياف الخام هذه على بعض الكربوهيدرات الذائبة المفروض وجودها في NFE ، كما أن الأخير يحتوي على جزء من الألياف الخام المقدرة بالطريقة التقليدية القديمة ، فقد يحتوي المستخلص الخالي من النيتروجين على نشويات وسكريات وبنتوزانات ، كذلك على سليلوز ولجنين بنسب متفاوتة.

وتقدر الكربوهيدرات الذائبة أو المستخلص الخالي من النيتروجين بطرح النسب المئوية لتقديرات الرطوبة ، والرماد ، والبروتين ، والمستخلص الإيثيري ، والألياف الخام من مائة . وفيها تتحمل هذه النسبة كل الأخطاء الواقعة في التقديرات الأخرى ؛ لذا تقدر الكربوهيدرات الذائبة الكلية كيماوياً بتحللها إلى سكريات بسيطة ثم تقدير هذه السكريات البسيطة الكلية بإحدى الطرق الواردة فيما يلي .

كما ينصح بتقدير الألياف بالطرق الحديثة التالي الحديث عنها سواء بتقدير كل من السليلوز ، والهيميسليلوز ، واللجنين كل على حدة ، أو باستخدام طريقة المنظفات Deter-gents الواردة فيما بعد .

١ ـ الألياف الخام :

وتقدر الألياف الخام بالطريقة القديمة في العينات الجافة المنزوعة الدهن لسهولة الترشيح، وذلك بغليان وزن معلوم من العينة (٢ جم) مع ٢٠٠ مل H_2SO_4 ١,٢٥ ٪ يغلي، ليبدأ الغليان بعد أقل من دقيقة مع وضع مكثف عاكس للمحافظة على تركيز

الحامض لمدة نصف ساعة ، يعقبها ترشيح على حرير طبيعي أو تيل أو ورق ترشيح مناسب مع تكرار الغسيل لزوال الحموضة ، ثم تنقل رواسب العينة كمياً إلى نفس الكأس أو الدورق ليهضم مع ٢٠٠ مل NaOH ١,٢٥ ٪ يغلي ، ليبدأ الغليان في أقل من دقيقة ولمدة نصف ساعة ، أسفل مكثف عاكس ، والترشيح كما سبق ، والغسيل بالماء والكحول الإيثيلي والإيثير البترولي ، والنقل الكمي لبوتقة ثم التجفيف للرواسب (الألياف والرماد) بالبوتقة لمدة ساعتين على ١٣٥م ، والتبريد والوزن ثم الحرق على ٦٠٠م لمدة ساعتين ، والتبريد والوزن ، والفرق بين الوزنتين هو وزن الألياف الخام . ويجب ألا يتعدى الفرق بين مكررتي التقدير عن ٣٪ من متوسطهما .

وقد سميت الكربوهيدرات Carbohydrates هكذا لوجود الهيدروجين والأوكسجين بها بنسبة تواجدهما في الماء . والكربوهيدرات عبارة عن الدهيدات ، أو كيتونات عديدة الهيدروكسيل ، وتقسم إلى سكريات أحادية ، وبسيطة ، وعديدة التسكر .

ورغم أنه في معظم الأحوال يتم تقدير الكربوهيدرات الذائبة في المستخلص الخالي من النيتروجين NFE بطريقة الفرق ، إلا أنه قد نحتاج لتقدير كمي للنشا ، أو للسكريات المختزلة (جلوكوز) ، أو غير المختزلة (سكروز) بالإضافة للتقدير الكمي للسليلوز والهيميسيليلوز وغيرها .

٢ ـ الجلوكوز :

يؤدي وجود مجموعة الدهيدية أو كيتونية حرة في تركيب السكريات المختزلة مثل الجلوكوز إلى اختزال هيدروكسيدات بعض المعادن كالنحاس والزئبق والفضة ، فإضافة محلول كبريتات النحاس إلى هيدروكسيد الصوديوم يتكون هيدروكسيد نحاسيك .

$$Cu\,SO_4 + 2\,Na\,OH \longrightarrow Cu\,(OH)_2 + Na_2\,SO_4$$

وبتسخين هيدروكسيد النحاسيك المتكون يعطي لوناً راسباً أصفر من أكسيد النحاسوز (بالاختزال لوجود السكريات المختزلة) .

فيحضر محلول فهلنج كالآتي :

فهلنج أ : ٣٤,٦٥ جم كبريتات نحاس متبلورة تذاب في ماء ويكمل إلى ٥٠٠ مل .

فهلنج ب : ٨٢,٥ جم هيدروكسيد بوتاسيوم + ١٧٣ جم طرطرات صوديوم وبوتاسيوم (ملح روشيل) تذاب في ماء ويكمل الحجم إلى ٥٠٠ مل .

ثم يجرى التقدير بأحد طريقتين :

أ ـ يغلي حجم معين من المحلول السكري (العينة) مع كمية زائدة من فهلنج تكفي

لأن تختزل بالسكريات الموجودة بالعينة وزيادة ، بحيث يبقى المحلول أزرق اللون ثم يرشح المحلول ويجفف الراسب الأصفر (Cu_2O) ويوزن ، ومن وزنه يمكن حساب كمية الجلوكوز في المحلول من جداول خاصة (Munson & Walker) .

ب ـ ينقط المحلول السكري من سحاحة على حجم معلوم من فهلنج ، وتغلي حتى تمام الاختزال بزوال اللون الأزرق ، ومنه يمكن حساب كمية الجلوكوز في المحلول ، ويتم ذلك كالآتي :

١ـ املأ سحاحة بالمحلول السكري المخفف ، وثبتها فوق جفنة موضوعة على لهب بنزن.

٢ـ ضع في الجفنة ٥ مل محلول فهلنج أ + ٥ مل محلول فهلنج ب ، وسخن للغليان على لهب منتظم .

٣ـ نقط المحلول السكري من السحاحة على فهلنج وهو يغلي تدريجياً ، فتقل زرقة المحلول تدريجياً حتى يختفي اللون الأزرق تماماً .

ملاحظات :

أ ـ لون أكسيد النحاسوز يكون برتقاليا ، أو أصفر ، أو أحمر حسب حجم جزيئات الراسب ، فكلما كانت صغيرة ودقيقة كان لون الراسب أصفر ، أما إذا كانت الجزيئات للراسب كبيرة كان لونه محمرا .

ب ـ حافظ على ثبات حجم المحلول بالجفنة ، بأن تتعادل كمية المحلول السكري المضافة مع الماء المفقود من محلول فهلنج في الجفنة أثناء الغليان .

جـ ـ لا تقلب حتى لا يفقد جزء من هيدروكسيد النحاسيك على المحرك أو على جوانب الجفنة .

د ـ عدم شدة الغليان لمنع تناثر جزء من محلول فهلنج .

هـ ـ إذا اضطر لإضافة ماء مقطر فيغلي أولاً لطرد الأوكسجين الذي يؤدي وجوده لوقف الاختزال لهيدروكسيد النحاسيك .

و ـ إذا انقطع الغليان أثناء العمل فلا يمكن مواصلة التقدير بل يعاد .

ز ـ تجرى معايرة لنفس الحجم من محلول فهلنج بواسطة محلول سكري قياسي معلوم التركيز لاستنتاج كمية الجلوكوز المعادلة أو المختزلة للحجم المعلوم من فهلنج ومنه يستنتج كمية الجلوكوز بالعينة .

٣ ـ السكريات المختزلة وغير المختزلة :

إذا أريد تقدير ذلك فتقدر أولاً السكريات المختزلة في صورة جلوكوز كما سبق ، ثم

يؤخذ حجم آخر من مستخلص العينة ، وتحلل مائيا لتحويل السكريات غير المختزلة كالسكروز إلى مختزلة ، وبتقدير هذه السكريات المختزلة الكلية كما سبق في تقدير الجلوكوز وبالطرح يقدر كمية كل من السكريات المختزلة والسكريات غير المختزلة .

وللتحليل المائى لتحويل السكريات غير المختزلة إلى مختزلة يجرى التالي :

٢٥ مل محلول عينة في دورق مخروطي سعة ٢٥٠ مل + ٥ مل حامض كبريتيك مخففا وسخن للغليان ، ثم انقل الدورق إلى حمام مائي على درجة حرارة ٦٠م لمدة نصف ساعة ، ثم برد الدورق وعادل الحموضة بالصودا الكاوية في وجود دليل أحمر الفينول ، ثم قدر السكريات المختزلة الكلية .

جدول تحويل راسب أكسيد النحاس إلى سكر محول :

أكسيد نحاس مجم	سكر محول مجم	أكسيد نحاس مجم	سكر محول مجم
٢٠	٨,٣	٢٠٠,١	٨٤,٧
٣٠	١٢,٤	٢١٠,١	٨٨,٥
٤٠	١٦,٥	٢٢٠,١	٩٢,٨
٥٠	٢٠,٧	٢٣٠,١	٩٧,١
٦٠	٢٤,٩	٢٤٠,١	١٠١,٦
٧٠	٢٩,٠	٢٦٠,١	١١٠,٦
٨٠	٣٣,١	٢٧٠,٢	١١٥,٢
٩٠	٣٧,٣	٢٨٠,٢	١١٩,٧
١٠٠,١	٤١,٦	٢٩٠,٢	١٢٤,٢
١١٠,١	٤٥,٨	٣٠٠,٢	١٢٨,٨
١٢٠,١	٤٩,٩	٣١٠,٢	١٣٣,٣
١٣٠,١	٥٤,٢	٣٢٠,٢	١٣٧,٩
١٤٠,١	٥٨,٥	٣٥٠,٢	١٥١,٧
١٥٠,١	٦٢,٧	٤٠٠,٢	١٧٥,٤
١٦٠,١	٦٧,٠	٤٥٠,٣	١٩٩,٦
١٧٠,١	٧١,٢	٥٠٠,٣	٢٢٤,٧
١٨٠,١	٧٥,٥	٥٠٧,٠	٢٢٨,٤
١٩٠,١	٧٩,٩	٥١١,٤	٢٣١,٠

ولتقدير السكر المختزل يجرى التقدير في مستخلص العينة وهو مستخلص مائي أو كحولي.

المستخلص المائي :

وزنة معلومة مطحونة في كأس تغلي مع ٢٠٠ مل ماء + ٢ جم كربونات كالسيوم لمدة ١/٢ ساعة . برد وانقل إلى دورق معياري مع محلول ١٠ ٪ خلات رصاص حتى يشاهد ترسيب راسب حبيبي في القاع ، فيكمل بالماء للعلامة ويرشح مع إضافة مزيد من أكسالات البوتاسيوم .

المستخلص الكحولي :

تستخلص عينة معلومة الوزن في جهاز سوكسلت لمدة ٦ ساعات بالكحول ٨٠ ٪ (محتويات الكستبان توجه لتقدير النشا) ، المستخلص في القابلة يؤخذ ويبخر حتى يبقى ١٠ مل ويبرد ويروق بمحلول خلات رصاص مشبع ، ثم إضافة محلول مشبع من فوسفات ثنائي الصوديوم ، ثم كمية مسحوق فحم ويخلط ويرشح على مسحوق الطلق وينقل كمياً إلى دورق معياري .

هذا وتتعدد طرق تقدير الجلوكوز على أساس اختزاله لهيدروكسيد النحاسيك كما في محلول فهلنج (كما سبق) ، أو في محلول بندكت (كبريتات نحاس ، كربونات صوديوم ، ثيوسيانات بوتاسيوم ، سترات صوديوم ، حديد وسيانيد بوتاسيوم) ، أو بواسطة التقدير اليودي باستخدام محلول الثيوكبريتات صوديوم التي تعادل اليود ، وبمعلومية حجم الثيوكبريتات المستخدم في المعايرة تستخرج كمية الجلوكوز من جداول خاصة (Schorl) .

ولتقدير السكريات الكلية يتم ذلك في مستخلص عينة محللة مائية بالحامض لتحويل كل السكريات إلى سكريات بسيطة يسهل تقديرها .

وحديثاً أصبح فصل السكريات الذائبة وتحديد نوعها وكميتها على الكروماتوجرافي الورقي وكذلك على الكروماتوجرافي رقيق الطبقات TLC من السهولة والدقة بمكان .

٤ ـ الكربوهيدرات الذائبة الكلية :

يتم ذلك كيماويا بتحويل الكربوهيدرات الذائبة إلى سكريات بسيطة ، يجرى تقديرها ضوئيا بعد ذلك .

ولتحويل الكربوهيدرات الذائبة إلى سكريات بسيطة يجري التالي :

١ ـ توزن كمية معلومة من مسحوق المادة الغذائية (٠,٢٥ ـ ١,٠ جم) في أنبوبة اختبار ، ثم يضاف إليها ٢٥ مل ماء مقطراً + ٢٥ مل حامض هيدروكلوريك (٢ عياري) وتخلط جيداً .

٢ ـ توضع الأنابيب في حمام مائي على درجة حرارة ٩٥م لمدة ٣ ساعات مع الرج المستمر ، مع إضافة ماء مقطر إلى الأنابيب إذا انخفض حجم المحلول عن ٥٠ مل .

٣ ـ تبرد الأنابيب ، ثم تنقل محتوياتها كميا إلى دورق معياري سعة ٢٥٠ مل باستخدام الماء المقطر ، ثم يضاف ١٠ مل من محلول كبريتات زنك (١٠٪) + ٣ نقط دليل فينولفثالين (١٪ في كحول إيثيل ٧٠٪) ، وترج محتويات الدوارق .

٤ ـ يضاف إلى محتويات الدوارق محلول صودا كاوية (٠,٥ عياري) إلى أن يبدأ ظهور راسب هيدروكسيد الزنك ، ثم يضاف ببطء وبحرص الصودا الكاوية حتى يتحول لون محتويات الدوارق إلى اللون الوردي .

٥ ـ يضاف حامض كبريتيك (٠,٥ عياري) بالتنقيط حتى تصبح محتويات الدوارق عديمة اللون ، ثم تخفف بالماء المقطر حتى العلامة .

٦ ـ تترك الدوارق بمحتوياتها ١٠ دقائق مع الرج المستمر ، ثم ترشح محتوياتها ويحتفظ بالراشح لحين تقدير الجلوكوز .

ويقدر الجلوكوز بطريقة الأنثرون Anthrone Reagent كالتالي :

١ ـ يضاف ١٠ مل من محلول الأنثرون (١ جم في لتر من حامض الكبريتيك (٧٦٠ مل حامض كبريتيك مركزاً نقيا على ٢٤٠ مل ماء مقطراً) يحضر يوميا أو مرة كل أسبوع على الأكثر) إلى أنبوبة زجاجية سعة ٢٥ مل ، ثم توضع الأنبوبة في حمام ثلجي .

٢ ـ ينقل ١ مل من الراشح (سابق التحضير لتحويل الكربوهيدرات الذائبة إلى سكريات بسيطة ذائبة) إلى الأنبوبة بحيث يلامس طرف الماصة جدار الأنبوبة وينزل السائل مكوناً طبقة رقيقة على سطح محلول الأنثرون .

٣ ـ تحرك الأنبوبة حركة دورانية لتقليب محتوياتها ، ثم توضع في حمام مائي يغلي لمدة ١٠ دقائق .

٤ ـ تبرد محتويات الأنبوبة إلى درجة حرارة الغرفة ، ثم تقرأ كثافة لون المحلول على سبكترو فوتومتر على طول موجة ٣٦٠ ملليميكرون .

٥ ـ تجرى نفس الخطوات السابقة على ١ مل من محلول جلوكوز قياسي (تركيزه ١٠٠ ميكروجرام / مل أي ٠١,٪) .

٦ ـ كمية الجلوكوز الموجودة في١ مل من راشح الكربوهيدرات =

$$\frac{\text{قراءة راشح الكربوهيدرات}}{\text{قراءة المحلول القياسي للجلوكوز}} \times ٠,١ \text{ ملليجرام .}$$

٧ ـ كمية الكربوهيدرات الذائبة في عينة المادة الغذائية (سكريات كلية كسكروز) = كمية الجلوكوز في ١ مل راشح كربوهيدرات × كمية الراشح الكربوهيدراتي الناتج من العينة × ٠,٩٥ .

٥ ـ السكريات الذائبة :

يقصد بها المواد السكرية غير النشوية ، وتقدر كيمائيا باستخلاصها أولاً ، ثم تقديرها لونيا بطريقة الأنثرون سابقة الذكر . ولاستخلاصها يجرى الآتي :

١ ـ يوزن ٠,٥ جم من مسحوق المادة الغذائية وتوضع في دورق معياري سعة ١٠٠مل.

٢ ـ يضاف إلى الدورق ١ جم كلوريد صوديوم + ٢٠ مل كحول إيثيل نقي .

٣ ـ يترك الدورق بمحتوياته ١٠ دقائق مع الرج المستمر لاستخلاص المواد الدهنية .

٤ ـ يضاف ماء مقطر حتى يصل حجم المحلول إلى ٩٠ مل ويغمر الدورق في حمام مائي على درجة حرارة ٢٠م لمدة ٩٠ دقيقة مع الرج المستمر .

٥ ـ ترشح محتويات الدورق (يمكن تركيزه بالغليان على موقد كهربائي حتى يمكن التخلص من الكحول) ، ويمكن التخلص من لون راشح العينات الخضراء بتمريره في عمود (١× ١٠ سم) من أكسيد الماغنسيوم قبل التخلص من الكحول بالغليان ، ثم يجرى التخلص من الكحول بعد التخلص من المواد الملونة ، ويكون المستخلص جاهزاً لتقدير السكريات بالطريقة اللونية .

٦ ـ النشا :

الراسب المتبقي من خطوة رقم (٥) في تقدير السكريات الذائبة يمكن أخذه لتقدير النشا فيه (أو نبدأ من أول خطوة كما سبق في تقدير السكريات الذائبة للحصول على الراسب من خطوة رقم (٥)) بإجراء الآتي :

١ ـ غسيل الراسب عدة مرات بمخلوط الكحول مع كلوريد الصوديوم (١٠ جم كلوريد صوديوم في ٢٠٠ مل كحول إيثيل ، ويكمل بالماء المقطر إلى لتر) ١٥٠ مل .

٢ ـ ينقل الراسب إلى أنبوبة اختبار بالماء المقطر (٢٥ مل) ثم يضاف إلى الأنبوبة ٢٥ مل حامض هيدروكلوريك (٢ عياري) ، وتخلط محتوياتها جيداً .

٣ ـ توضع الأنبوبة في حمام مائي على درجة حرارة ٩٥م لمدة ٣ ساعات مع الرج المستمر .

٤ ـ تبرد محتويات الأنبوبة ، وتنقل كميا بالماء المقطر إلى دورق معياري ٢٥٠ مل ، ثم يضاف ١٠ مل محلول كبريتات زنك (١٠ ٪) مع ٣ نقط من دليل فينولفثالين .

٥ ـ تضاف صودا كاوية (٠,٥ عياري) حتى يتحول اللون إلى الوردي ، ثم يضاف حامض كبريتيك (٠,٥ عياري) بالتنقيط حتى يزول اللون ، ويكمل الحجم إلى العلامة.

٦ ـ يترك الدورق ١٠ دقائق مع الرج المستمر ، ثم ترشح محتوياته ويقدر فيها الجلوكوز بطريقة الأنثرون .

٧ ـ كمية النشا = كمية الجلوكوز × ٠,٩

ولتقدير النشا في مادة علف تعامل المادة الجافة بالحامض والتسخين للانحلال المائي أولاً حتى يمكن تقدير النشا في صورة جلوكوز كالآتي :

١ ـ زن حوالي ٣ جم بالضبط من مادة العلف ، ثم استخلصها عدة مرات بالإثير ، ثم اغسلها بالكحول ١٠ ٪ ، ثم تغسل بكحول مركز .

٢ ـ انقل مادة العلف بعد ذلك إلى دورق مخروطي بواسطة ٥٠ مل ماء مقطراً ، وسخن لمدة ١٥ دقيقة على حمام مائي مع التقليب المستمر حتى التجانس التام .

٣ ـ أضف إلى الدورق ٢٥ مل من حامض هيدروكلوريك مركز ثم قلب جيداً ، واترك على حمام مائي إلى أن يتم انحلال كل النشا ، ويمكن التأكد من ذلك بخلط نقطة من المحلول مع نقطة من اليود المذاب في محلول يوديد بوتاسيوم .

٤ ـ يرشح المحلول في دورق معياري سعة ٢٥٠ مل ويغسل المتبقي على ورقة الترشيح عدة مرات ويكمل بالماء المقطر للعلامة .

٥ ـ يقدر الجلوكوز في جزء معلوم من محتويات الدورق المعياري بعد معادلته تماماً بهيدروكسيد صوديوم مركز (٥ عياري) في وجود دليل أحمر الفينول .

٦ ـ يحسب النشا بضرب كمية الجلوكوز × ٠,٩ لاستنتاج كمية النشا التي وجدت قبل عملية الانحلال المائي ثم تحسب نسبتها المئوية في العينة .

ومن المعروف أنه يمكن تقدير السكريات والنشا بعد تحللها بواسطة ظاهرة الاستقطاب الضوئي بأجهزة البولاريمتر أو السكاريمتر .

٧ ـ اللاكتوز :

١ ـ زن عينة حوالي ١ جم بالضبط في دورق سعة ١٠٠ مل ، ثم أضف ٢٥–٣٠ مل ماء وضعها في حمام مائي يغلي ٣٠ دقيقة . برد إلى ٣٥°م تقريباً . أضف ٥ مل معلق خميرة (٢٥ جم خميرة طازجة Saccharomyces Cerevisiae تعلق في ١٠٠ مل ماء وتصلح لمدة أسبوع إذا حفظت في ثلاجة) أو أكثر إذا احتوت العينة أكثر من ٤٠ ٪ سكر قابل للتخمر.

٢ ـ ضع الدورق على ٣٨–٤٠°م لمدة ساعتين . برد حتى ٢٠°م تقريباً ، ثم أضف ٢,٥ مل محلول كاريز رقم ١ (٢١,٩ جم خلات زنك ثنائي الماء تذاب في ماء ، ثم يضاف ٣ مل حمض خليك ثلجي ، ويخفف إلى ١٠٠ مل بالماء) . قلب ٣٠ ثانية ، ثم أضف ٢,٥ مل محلول كاريز رقم ٢ (أذب ١٠,٦ جم حديد وسيانيد بوتاسيوم في ماء وخفف إلى ١٠٠ مل) ، وقلب ثانية لمدة ٣٠ ثانية .

٣ ـ أكمل إلى ١٠٠ مل بالماء ، واخلط ثم رشح ، وانقل بماصة حجماً معلوماً يحتوي ٤٠–٨٠ مجم لاكتوز ، وأكمل بالماء إلى ٢٥ مل في دورق .

٤ ـ أجر تجربة خالية من العينة بنفس الخطوات السابقة .

٥ ـ قدر اللاكتوز بنقل ٢٥ مل محلول لف شورل Luff - Schorl (محلول كبريتات نحاس (٢٥ جم كبريتات نحاس سباعي الماء في ماء وخفف إلى ١٠٠ مل) ، محلول حمض سيتريك (٥٠ جم حمض سيتريك أحادي الماء في ماء وخفف إلى ٥٠ مل) ، محلول كربونات صوديوم (١٤٣,٨ جم كربونات صوديوم لامائية تذاب في ٣٠٠ مل ماء دافئ ، تترك لتبرد ، قلب بحذر ، أضف إليها محلول حمض السيتريك ، ثم أضف إليهما محلول كبريتات النحاس ، وأكمل إلى لتر بالماء . اتركه ليلة ثم رشح)) إلى محتويات الدورق في نهاية خطوة رقم ٣ (العينة) ، ثم أضف عدد ٢ حجر خفاف لمنع الفرقعة . سخن مع التقليب حتى يبدأ الغليان في ظرف دقيقتين ، ثم ضع مكثفاً عاكساً على الدورق ، واغل ١٠ دقائق بالضبط . برد في ماء بارد في الحال ، وبعد ٥ دقائق أضف ١٠ مل يوديد بوتاسيوم (٢٠٪) ، وفي الحال أضف ٢٥ مل حمض كبريتيك (٦ عياري) بحذر . عاير بمحلول ثيوكبريتات صوديوم (٠,١ عياري) حتى يظهر لون أصفر باهت عندئذ أضف دليل النشا (أذب ٥ جم نشا ذائب في ٣٠ مل ماء ، ثم أضف ذلك إلى لتر ماء يغلي ، ثم اغل ٣ دقائق . اتركه يبرد ، ثم أضف ١٠ مجم يوديد زئبقيك كمادة حافظة) وأكمل المعايرة .

٦ ـ أجر معايرة مقارنة على دورق به ١٠ مل محلول يوديد بوتاسيوم مع ٢٥ مل حمض كبريتيك + ٢٥ مل دليل لف شورل + ٢٥ مل ماء ، وعاير كما سبق في العينة لكن بدون غليان .

٧ ـ احسب الفرق بين حجم الثيوكبريتات للمقارنة والعينة بالمليلتر ٠,١ عياري .

ومن الجدول التالي يمكن حساب كمية اللاكتوز في حجم المستخلص المستخدم ، مع الأخذ في الاعتبار التجربة الخاوية ، ويعبر عن النتيجة كنسبة مئوية من العينة .

حجم ثيوكبريتات البوتاسيوم ٠,١ عياري (مـل)	اللاكتوز (مجم)
١	٣,٦
٢	٧,٣
٣	١١,٠
٤	١٤,٧
٥	١٨,٤
٦	٢٢,١
٧	٢٥,٨
٨	٢٩,٥
٩	٣٣,٢
١٠	٣٧,٠
١١	٤٠,٨
١٢	٤٤,٦
١٣	٤٨,٤
١٤	٥٢,٢
١٥	٥٦,٠
١٦	٥٩,٩
١٧	٦٣,٨
١٨	٦٧,٧
١٩	٧١,٧
٢٠	٧٥,٧
٢١	٧٩,٨
٢٢	٨٣,٩
٢٣	٨٨,٠

وفي اللبن المحتوي نسبة طبيعية من الجوامد غير الدهنية Solids - not - fats (SNF) أو non - fatty solids (NFS) أي حوالي ٨,٤-٨,٧٪ فإن نسبة اللاكتوز إلى البروتين إلى الرماد تكون ١٣ : ١٩ : ٢ ، وهذه تعرف بنسبة ڤيث Vieth ∂ ratio ، وهي لا تتأثر بإضافة أو نزع الماء ؛ لذلك فهي مفيدة في الكشف عن أي شواذ في اللبن السائل والمكثف والجاف والكريمة .

ويمكن حساب جوامد اللبن غير الدهنية من المكونات التالية :

$$\text{اللاكتوز} \times \frac{٢٤}{١٣}$$

$$\text{البروتين} \times \frac{٢٤}{٩}$$

$$\text{الرماد} \times \frac{٢٤}{٢}$$

٨ ـ التقسيم الحديث للكربوهيدرات :

قد يطلق على السكريات الأحادية Monosaccharides سكريات بسيطة ، كما يطلق على السكريات المحتوية ٢ – ٦ وحدات سكر أحادي بالسكريات البسيطة Oligosaccharides ، أما السكريات العديدة Polysacchrides فتضم تحتها مجاميع عديدة تشمل البنتوزان ودكسترين ونشا وسليلوز وجليكوچين وخلافها من صموغ وهيميسليلوز واللجنين (وإن كان اللجنين فينولي التركيب وليس كربوهيدراتي إلا أنه يقع في هذا التقسيم تحت الكربوهيدرات الخام) .

ونظراً لأهمية الكربوهيدرات (كأكبر جزء من علائق الحيوانات) لأنها تشكل ٧٥٪ من المادة الجافة النباتية ، وكونها مصدر طاقة للحيوان ، فقد اهتم بتقسيمها وتقديرها . فقد طورت طريقة للتحليل الروتيني للكربوهيدرات مستحدثة لتناسب التقسيم الحديث للكربوهيدرات ، وفيما يلي وصفها :

١ ـ تجفد أو تجفف Freeze dried or dried مادة العلف على درجة حرارة ٦٠°م أو أقل ، وتطحن لتمر من منخل نمرة ٢٠ Mesh (أو أنعم) ، مع استخلاص دهن العينات الغنية بالدهن قبل تحليلها .

٢ ـ يوزن ١ جم عينة في أنبوبة طرد مركزي سعة ٥٠ مل ، ويضاف إليها ٢٥ مل كحول إيثايل ٨٠٪ . سخن الأنبوبة على حمام ماء يغلي لمدة ٣٠ دقيقة . برد إلى حرارة الغرفة ، واطرد مركزياً ، واجمع الطبقة الرائقة العليا . أضف ٢٥ مل (إيثانول) أخرى ، وسخن ثم برد واطرد مركزياً ، واجمع الرائق كله معاً في دورق معياري ، وخفف للعلامة، وقدر فيه السكريات الذائبة في صورة جلوكوز بطريقة Phenol - Sulfuric acid على طول

موجة ٤٩٠ نانومتر .

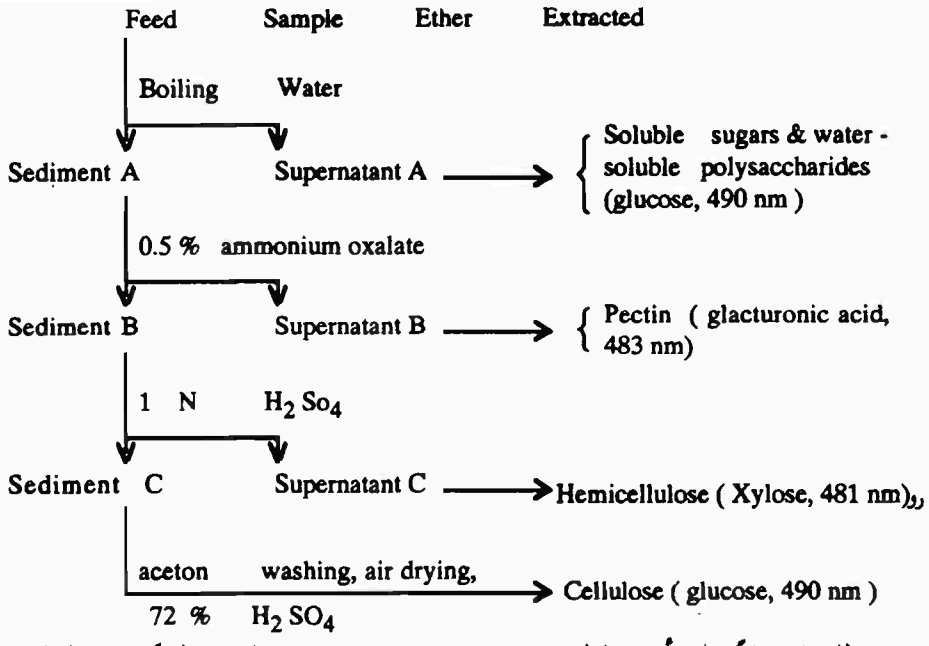
٣ ـ أضف ٢٥ مل ماء مقطراً للراسب في أنبوبة الطرد المركزي ، واغل ١٠ دقائق في حمام مائي. برد واطرد مركزياً ، ثم كرر عملية الاستخلاص بالماء ، واجمع هذه المستخلصات الرائقة ، وخففها في دورق معياري لتقدير السكريات العديدة الذائبة في الماء ، في صورة جلوكوز على طول موجة ٤٩٠ نانومتر .

٤ ـ أضف للراسب ٢٥ مل محلول ٠,٥ ٪ أكسالات أمونيوم ، وسخن ٣٠ دقيقة على حمام ماء يغلي، وبرد واطرد مركزياً،كرر الاستخلاص بالأكسالات، واجمع الرائق، وخففه في دورق معياري لتقدير البكتين كحمض جالاكتورنيك على طول موجة ٤٨٣ نانومتر .

٥ ـ اخلط الراسب مع ٢٥ مل حمض كبريتيك عياري ، وسخن ٣٠ دقيقة على حمام ماء يغلي ، وبرد واطرد مركزياً ، وكرر الاستخلاص ، ثم اجمع الرائق في دورق معياري لتقدير الهيميسليلوز كزيلوز على طول موجة ٤٨١ نانومتر .

٦ ـ اغسل الراسب بالماء المقطر الساخن عدة مرات ، ثم مرتين بالأسيتون ، واترك أنبوبة الطرد المركزي في فرن تجفيف لمدة ليلة . اصحن الراسب الجاف بساق زجاجية ، ثم أضف ١٠ مل حمض كبريتيك ٧٢٪ (وزن / وزن) ، واترك الأنبوبة على حرارة الغرفة ٤ ساعات . أضف ٤٠ مل ماء مقطراً ، واخلط وسخن لمدة ساعة على حمام ماء يغلي . برد واطرد مركزياً . استخلص الراسب مرة أخرى بمقدار ٢٥ مل ماء مقطراً ، واطرد مركزياً ، واجمع الرائق كله ، وخففه في دورق معياري لتقدير السليلوز كجلوكوز على طول موجة ٤٩٠ نانومتر .

٧ ـ انقل الراسب لقمع ترشيح واغسل ٦ مرات بالماء، ومرتين بالأسيتون. خفف الراسب المغسول ، وزنه ثم رمده وزنه ، ومن الفقد في الوزن استنتج اللجنين غير الذائب في العينة. وإذا كان الوضع لا يحتاج تقدير اللجنين، وكذلك الفرق بين السكريات الذائبة والسكريات العديدة التسكر الذائبة في الماء ، فإن في هذه الحالات يمكن اختصار الخطوات كما في الرسم الإيضاحي التالي :



وذلك اعتماداً على أن محلول Phenol - Sulfuric Acid يتفاعل مع السكريات المختلفة ، معطياً ألواناً عند أقصى امتصاص مميز على أطوال موجات محددة . وكذلك على أن النشا يتحلل إلى جلوكوز ، كما أن السليلوز عبارة عن سلاسل جلوكوز ، والهيميسليلوز يتحلل بالأحماض المخففة إلى سكريات بسيطة (زيلوز) ، على عكس السليلوز الذي لا يتأثر إلا قليلاً بالأحماض المخففة، لكن يتأثر بالأحماض المركزة ، بينما اللجنين لا يذوب في الحمض المركز ($72\% H_2 SO_4$) ؛ لذا يقدر بالترشيح . ونظراً لأن اللجنين مركب عطري فينولي ليس كربوهيدراتي ، كما أن جزءاً منه يذوب في الحامض المركز ، وآخر لا يذوب، أي أن الجزء الذائب يذهب مع الكربوهيدرات الذائبة ، وغير الذائب يذهب مع الألياف الخام في التحليل الروتيني العادي (Weende - Analysis) ، فقد وجد حديثاً فصله على حدة في التحليل الغذائي العام .

٩ ـ السليلوز :

ونظراً لأهمية السليلوز في الأعلاف النباتية لكبر نسبته ، فأصبح من المهم تقديره ومعرفة مدى استفادة الحيوان منه وهضمه له . ويقدر السليلوز بإذابة ما دونه من مركبات عضوية ، ليبقى السليلوز والرماد ، وبالحرق نستنتج وزن السليلوز كالتالي :

١ ـ يوزن حوالي ١ جم بالضبط من العينة وتوضع في أنبوبة غليان ٥٠ مل أو كأس ١٠٠ مل .

٢ ـ يضاف للعينة ١٥ مل مخلوط هضم (حامض خليك ثلجي وحامض نيتريك مركز

بنسبة ١/٥) ويغلي على حمام مائي لمدة ٢٠ دقيقة .

٣ ـ رشح خلال بواتق جوتش ، واغسل الأنابيب عدة مرات بالماء المغلي ، ويضاف للبواتق .

٤ ـ تغسل محتويات البواتق ٣ مرات بماء مغلي ، ثم مرتين بكحول إيثايل ساخن ، ثم مرة ببنزين بارد ، ثم مرتين بكحول ساخن ، ثم مرة بالإيثير البارد .

٥ ـ جفف بواتق جوتش على درجة حرارة ١٠٥°م لمدة ٥ – ٦ ساعات ، ثم توزن .

٦ ـ تحرق البواتق على ٦٠٠°م لمدة ساعتين ، وتبرد وتوزن ، والفارق هو وزن السليلوز .

١٠ ـ الهيميسليلوز :

يستخلص الدهن بالمذيبات العضوية ، وينزع اللجنين بكلوريت الصوديوم ، ثم يذاب الهيميسليلوز في ص أ يد ١٠ ٪ ، ويعاد ترسيبه بالكحول ، ويفصل بالترشيح والتجفيف . فتؤخذ وزنة (٤ جم) جافة مطحونة ، وتستخلص بكحول الميثايل ٨٠ ٪ لمدة ساعتين على ٤٠°م ، ويرشح على بوتقة جوتش ، وتنقل المحتويات إلى كأس به ٨٠ مل مذاب فيها ١,٨٨ كلوريت صوديوم ، ٠,٤ جم حمض خليك ، وتظل ٥ ساعات على ٧٥ – ٨٠°م ، ثم يرشح ويغسل عدة مرات بالماء المقطر على بواتق جوتش . تنقل المحتويات ثانية إلى كأس به ٤٠ مل ص أ يد ١٠ ٪ لمدة ٤ ساعات على ٢٥°م مع الرج كل حين ، ويرشح على بواتق جوتش في دوارق نظيفة للاحتفاظ بالراشح بدقة . انقل محتويات البوتقة إلى كأس به ٢٠ مل ص أ يد ١٠ ٪ على درجة حرارة ٨٠ – ٩٠°م ، ورشح واجمع الراشح . عادل الراشح بحمض خليك ٥٠ ٪ في حمام من الثلج . أضف ٤ أمثال الراشح (حجماً) من كحول الإيثايل ٩٥ ٪ ، ويحفظ في الثلاجة حتى يرسب الهيميسليلوز ، فيرشح في بواتق جوتش ، ويغسل بالإيثانول ، ثم بالإيثير ثم بالإيثير البترولي . جفف تحت تفريغ على ٥٠°م وبرد وزن. احرق وبرد وزن ، فالفارق هو وزن الهيميسليلوز .

١١ ـ اللجنين :

تؤخذ عينة (٢ جم) جافة مطحونة في دورق مخروطي سعة لتر ، ويضاف إليها ٢٥ مل H_2SO_4 ٧٢ ٪ (بإضافة ٤٠٠ مل حمض مركز إلى كمية ماء ثم يكمل إلى لتر) ، واتركها على ٢٥°م لمدة ٧٥ دقيقة مع التحريك من حين لآخر . أكمل الحجم إلى حوالي ٦٠٠ مل بالماء المقطر ، واغل على حمام رملي أسفل مكثف عاكس . رشح على بوتقة جوتش ، واغسل الراسب بالماء المقطر للتخلص من الحموضة جفف البوتقة بمحتوياتها على ١٠٥°م ، برد واوزن ثم احرق ، وبرد واوزن والفارق هو وزن اللجنين .

وهناك طريقة أخرى تتوقف على الهضم بإنزيم البيسين في حمض HCL .

وهناك طريقة أخرى لتقدير اللجنين بأخذ عينة جافة (٥٠ ـ ١٠٠ مجم) معلومة المحتوى من الرماد يتم تسخينها مع ماء مقطر (٢٠ مل) نصف ساعة على ٧٠°م مع الرج، ترشح على بوتقة جوتش ، تغسل على البوتقة بماء ساخن ثم ٦ مرات X ٥ مل إيثانول و ٤ مرات X ٥ مل أسيتون و ٤ مرات X ٥ مل دى إيثايل إيثير ، تنقل مكونات الجدر الخلوية مع ورق الترشيح إلى أنبوبة اختبار بغطاء وسخنها على ١٠٠ °م لمدة ١٥ دقيقة . أضف ٥ مل أسيتيل بروميد ٢٥ ٪ وأغلق الأنبوبة بلطف وسخن نصف ساعة على ٧٠°م ، برد على درجة حرارة الغرفة بسرعة فى حمام مائى ، ضف ٢٠ مل حمض خليك وسد ورج ثم ضف منها ١ مل إلى ١,٢ مل خلات صوديوم ثلاثية الماء (٢,٠٦ ٪) فى أنبوبة طرد مركزى بغطاء مع ٧,٥ مل كحول إيثايل + ٠,٣٠ مل هيدروكسيل أمونيوم كلوريد ، سد ورج واطرد مركزيا ١٠ قائق على ١٥٠٠ لفة / دقيقة ، اترك نصف ساعة واقرأ الكثافة الضوئية على ٢٨٠ نانومتر ضد بلانك من الدلائل لمعرفة قيمة (A) الامتصاص حيث :

$$A = \frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} - \text{الكثافة الضوئية للبلانك}}{\text{(C) تركيز المادة العضوية الجافة فى المحلول النهائى (جم / لتر)}}$$

$$\text{حيث } C = \frac{\text{٪ مادة عضوية X وزن العينة X ٤}}{١٠٠}$$

$$A = \frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} - \text{الكثافة الضوئية للبلانك}}{\text{٪ مادة عضوية X وزن العينة X ٤}} \times ١٠٠$$

وتستخدم قيمة اللجنين هذه (A) فى التنبؤ بمعامل هضم المادة العضوية (DOMD) حيث :

DOMD للسيلاج = ٨٨,٣٠ - ٩,٧٣ (A)

DOMD للحشائش = ٩٧,٨٧ - ١٢,٣٠ (A)

إذ إن هناك معامل ارتباط معنوى سالباً بين معامل الهضم ومحتوى اللجنين = -٠,٩٧٩ للسيلاج و - ٠,٩٣٩ للحشائش) .

١٢ ـ نظام المنظفات :

نظراً لأن نظام Weende لتحليل الأعلاف لا يمكن من تقدير اللجنين ، سليلوز ، هيمي سليلوز فقد فكر فريق عمل في تعويض هذا النقص في نظام تحليل الأعلاف المتبع منذ زمن ، والذي يعيبه في هذا المقام أن تقدير الألياف الخام غير دقيق بالمرة ، إذ تؤدي

المعاملة بالحامض والقلوي إلى زوال حوالي ٨٠٪ من البنتوزات ، ٥٠ – ٩٠٪ من اللجنين ، ٢٠ – ٥٠٪ من السليلوز ، مما أدى إلى حساب معاملات هضم للألياف الخام مساوية ، أو تفوق معاملات الهضم للمستخلص الخالي النتروجين (لإضافة هذا الفقد في استخلاص الألياف الخام إلى المستخلص الخالي الأزوت المحسوب بالفرق) .

وحيث إن الجدر الخلوية Neutral detergent residue (NDR) (اللجنين ، والسليلوز ، والهيمي سليلوز) غير متجانسة التركيب الكيماوي ، فإنها كذلك غير موحدة القيمة الغذائية . وغالباً ما يفسر ذلك وجود اللجنين بالأنسجة ؛ إذ يرتبط اللجنين كيماوياً مع السكريات العديدة الدعامية ، ويخفض معدلات هضمها .

ومن ذلك وجد أن نظام المنظف detergent system لتجزىء Fractionating المادة الجافة للمرعى قد مكن من تقسيم أجزاء المرعى طبقاً لخواصها الغذائية ، ومكن من تقدير النفع منها ، أو هضمها في الحيوانات المجترة Ruminants كما هو موضح في الجدول التالي .

ولقد وجد أن سليلوز المادة الجافة للمراعى جزء منه مهضوم والآخر غير مهضوم ، ودرجة الهضم للجزء المهضوم تتوقف على سرعة المرور في الكرش Rumen ، إذ إن حوالي ٩٠٪ من هضم السليلوز يتم في الكرش (بينما ٦٦ – ٦٩٪ من هضم الهيميسيليلوز يتم في الكرش) والباقي يتم في الجزء السفلي من القناة الهضمية ، وفي الخيول يتم ٤٧٪ من هضم السليلوز في القولون ، فكلما طالت فترة بقاء السليلوز في الكرش كلما وصلنا لأقصى استفادة من طاقة الألياف .

والألياف الخام Crude Fibers المقدرة بالطريقة العادية دائماً قيمتها أقل بكثير من قيم الجدر الخلوية Cell wall المقدرة بطريقة المنظفات (NDR) ، والتي تشمل اللجنين والسليلوز والهيميسيليلوز ، والسبب راجع لما ذكر من فقد مع الهضم في الحامض والقلوي في الطريقة العادية .

النظام الأساسي في تحليل المراعى باستخدام المنظفات Detergents .

المكون	النفع الغذائى	المحاليل	المعاملة	الناتج
محتويات الخلية	كامل الهضم تقريباً		يحسب بخصم ١٠٠ – جدر الخلية	ليبيدات ، سكريات ، أحماض عضوية ، نشا، بروتينات ذائبة ، أحماض نووية ، بكتين .
جدر الخلية NDR بقايا المنظفات المتعادلة	مفيد جزئياً طبقاً لدرجة اللجننة Lignification	سلفات لوريل صوديوم EDTA بورات PH7	غليان لمدة ساعة	جدر الخلايا النباتية أقل في البكتين
بقايا المنظفات الحامضية ADR	مفيد جزئياً حسب درجة اللجننة	ستيل ثلاثي ميثيل أمونيوم بروميد في حمض كبريتيك عياري	غليان لمدة ساعة	لجنو سليلوزمعادن غير ذائبة
لجنين	غير مفيد	حمض كبريتيك ٧٢٪	٣ ساعات على ٢٠°م	لجنين خام
لجنين	غير مفيد	برمنجنات بوتاسيوم PH_3	– ١ ساعة على ٢٠°م	لجنين كفقد في الوزن بالأكسدة
سليلوز	مفيد جزئياً حسب درجة اللجننة	—	بقايا الرماد من خطوة اللجنين $\frac{١}{٢}$	فقد في الوزن
كيوتين	غير مفيد	حمض كبريتيك ٧٢٪	معاملة السليلوز ٣ ساعات على ٢٠°م	الفضلات هي الكيوتين
سيليكا SiO_2	غير مفيد	حمض بروميك ٤٨٪	معاملة الرماد بالتنقيط لمدة ساعة على ٢٠°م	البقايا هي السيليكا
هيميسيليلوز	مفيد جزئياً حسب درجة اللجننة	—	يحسب بالفرق بين NDR-ADR	—

ADR = Acid detergent residue

EDTA = ethylene diamine tetra - acetic acid

NDR = neutral detergent residue

وفيما يلي وصف لنظام المنظفات والمنسوب إلى العالم Van Soest .

المحاليل المستعملة لهذا التكنيك تتلخص فيما يلي :

أولا : محاليل المنظفات المتعادل : Neutral detergent solutions :

١ ـ أذب ٧٢ جم NaOH في حوالي ٣ لتر ماء مقطراً ، ثم أضف ٢٦٣ جم EDTAو ١٢٢,٦ جم بورات صوديوم $Na_2 B_4 O_7 . 10H_2O$.

٢ ـ أذب ٨٢,١ جم فوسفات صوديوم ثنائية $Na_2 HPO_4$ في حوالي ٤٠٠ مل ماء على حرارة .

٣ ـ أضف كل ما أذيب في إناء سعة ٢٠ لتراً .

٤ ـ أضف ٥٤٠ جم كبريتات لوريل صوديوم Sodium Layryl Sulfate (المذابة في حوالي ٤ لتر ماء) إلى الإناء السابق .

٥ ـ يضاف ١٨٠ مل Ethylene glycol monoethyl ether لمنع الفوران .

٦ ـ أضف ماء حتى ١٨ لتراً للإناء ، واخلط جيداً .

٧ ـ اختبر PH المحلول ثاني يوم ، فيجب أن تكون في مدى ٦,٩ – ٧,١ وإلا فتضبط بإضافة NaOH أو HCl .

ثانياً : محاليل المنظفات الحامضية : Acid detergent solutions :

مكونة من حمض الكبريتيك ١ عياري ١٨ لتراً مذاباً فيها ٣٦٠ جم Cetyltrimethyl ammounium bromide .

ثالثًا : محاليل البرمنجنات المثبعة:

مكونة من ٩٠٠ جم برمنجنات بوتاسيوم $KMnO_4$ + ٠,٩ جم كبريتات فضة $Ag_2 SO_4$ في ماء حتى ١٨ لتراً . وكبريتات الفضة تعمل هنا على نزع الهالوجينات .

رابعًا : محلول منظم لتقدير برمنجنات لجنين :

يذاب نترات الحديديك $Fe (NO_3)_3 . 9 H_2O$ (٧٢ جم)مع نترات الفضة (١,٨ جم) في الماء (١,٢ لتراً) ، ثم يضاف حمض الخليك الثلجي (٦ لتر) ، وتذاب خلات البوتاسيوم (٦٠ جم) ، ثم أضف ٤,٨ لتراً tertiary buty alcohol واخلط .

خامسًا : محلول نزع المعادن :

يذاب ٦٠٠ جم أوكساليك $(CO_2H)_2 . 2 H_2O$ في كحول الإيثايل ٩٥٪ (٨,٤ لتراً)

ثم يضاف ٦٠٠ مل HCl ١٢ عياري و ٣ لتراً ماء ويخلط .

سادساً : كحول إيثايل ٨٠٪ :

٨,٤٥ لتراً كحول إيثايل ٩٥٪ مع ١,٥٥ لتراً ماء واخلط .

سابعاً : محلول تنظيف :

مكون من ملح EDTA ثنائي الصوديوم ١٠ جم + فوسفات ثلاثي صوديوم ١٠٠جم + هيدروكسيد بوتاسيوم ٤٠٠ جم في ٢ لتر ماء ، مع الحذر لأن هذا المحلول كاوٍ .

ولإجراء هذا التكنيك يجرى كالتالي :

تقدير (ألياف العليقة) جدر الخلايا : Cell wall (dietary fiber) :

والتي تشمل السليلوز والهيميسليلوز ، واللجنين ، وبعض البروتين المرتبط بالألياف ، ويطلق عليها معاً بالألياف غير الذائبة في المنظفات المتعادلة أي Neutral detergent fibre (NDF) . أو مخلفات المنظفات المتعادلة (NDR) :

١ ـ نصف حجم عينة جافة هوائية مطحونة ناعمة في كأس + $\frac{1}{2}$ جم كبريتيت صوديوم لامائي + حوالي ١٠٠ مل محلول منظفات متعادلة واغل في ٥ – ٦ دقائق ، واستمر في الغليان ساعة تحت عاكس .

٢ ـ رشح على بوتقة جوتش باستخدام تفريغ مناسب لمساعدة الترشيح . انقل كافة محتويات الكأس بأقل ما يمكن من الماء الذي يغلي إلى البوتقة . اغسل بالأسيتون ، جفف البوتقة ٨ ساعات أو ليلة على ١٠٠°م (وزن للحصول على جدر الخلايا) ، ثم رمد على ٥٠٠°م لمدة ٣ ساعات على الأقل . الفقد في الوزن بين بعد التجفيف وبعد الترميد ، هو وزن جدر الخلايا (العضوية) أو الألياف غير الذائبة في المنظفات المتعادلة .

الصعوبة في هذا التكنيك هو عملية الترشيح ، ولا ينبغي ترشيح العينة مباشرة على البوتقة الفارغة تحت تفريغ ؛ لذا يشغل التفريغ على أقل ما يمكن ، وبعد إضافة العينة ، وتوضع العينة قليلاً فقليلاً في البوتقة . وإذا كانت العينة غنية بالبروتين فيضاف بروتياز مع محلول المنظفات المتعادل ، أو قد ترشح على ورق ترشيح بدلاً من بواتق جوتش . زيادة المدة في الغليان أسفل العاكس تزيد من احتمال حدوث تفاعلات Maillard . غنى العينة في النشا وبرودتها يعيق الترشيح ، فيضاف الفا أميلاز بكتيري للبوتقة . وفي غنى العينة بالمخاط والصمغ ، فإنها تؤدي لوجود جيل يستلزم إجراء تحلل مائي حامضي .

مخلفات المنظفات الحامضية: Acid detergent residue أو Acid detergent fi-bre (ADF):

ويشمل اللجنين، والكيوتين، والسليلوز ، والسيليكا . وهو خطوه أساسية في تقدير

اللجنين:

١ ـ زن ١ جم عينة جافة هوائياً مطحونة ناعمة في كأس + ١٠٠ مل محلول منظفات حامضية ، واعمل على أن تغلي في ظرف ٥ – ٦ دقائق ، واضبط الحرارة ، واستمر ساعة في الغليان تحت عاكس .

٢ ـ رشح كما سبق في تقدير جدر الخلايا ، وكرر الغسيل مرتين زيادة بالماء الساخن لإزالة الحموضة ، ثم بالأسيتون حتى زوال أي لون ، ثم بالهكسان . جفف ٨ ساعات أو ليلة على ١٠٠°م ، فالمتخلف هو مخلفات المنظفات الحامضية .

وعادة ADR يكون أكبر من NDR لفعل المنظفات على السليكا . لكن لو لم تحتوي العينة هيميسليلوز فإن ADR سيكون أقل من NDR .

ويتم التصحيح للرماد ، كما تصحح NDR للسليكا لاختلاف ذوبانها ، وذلك بتقدير السليكا في كل من NDR ، ADR . كما قد يرجع سبب ارتفاع قيمة ADR لأثر الحامض على المركبات العضوية الذائبة في المنظفات المتعادلة كالتانينات وحمض الأسبرجيلك ، والتي ترسب في المحاليل الحامضية . وللتصحيح لهذه الترسيبات يجرى تقدير NDR على المتبقي من ADR ، إلا أن اللجنين والكيوتين يذوبان جزئياً في كبريتيت الصوديوم الموجود في تقدير NDR ، إلا أن نقص اللجنين لا يقارن بعدم اكتمال إزالة البروتين (بالكبريتيت) ويتلاشى ذلك في خطوات تالية .

تقدير الهيميسليلوز : بالطرح بين ADR من الجدر الخلوية ، مع عمل حساب الرماد والأزوت واللجنين والكيوتين التي قد توجد في ADR وجدر الخلايا NDR . وإذا بدأ بتقدير NDR بدون إضافة كبريتيت صوديوم ثم ADR فقد تعطي الفرق بينهما أفضل محتوى من الهيميسليلوز.

لجنين حمض الكبريتيك ٧٢٪ : يجرى هذا التقدير على ٢٠ – ٢٢°م :

١ ـ أعدّ بقايا المنظفات الحامضية ADR .

٢ ـ انقل المحتويات بالبوتقة لإناء Enamelled مع إضافة كمية من الأسبستوس (المغسول بالحامض والمرمد ١٦ ساعة) مساوية لكمية ADR ، واخلط بساق زجاجية ، وأضف حمض الكبريتيك ٧٢٪ لتغطية المحتويات ، وقلب وأكمل بالحامض حتى ثلثي البوتقة ، وكل ساعة املأ البوتقة بالحامض وقلب (لمدة ٣ ساعات) ، ورشح تحت تفريغ . اغسل بالماء الساخن للتخلص من الحامض . جفف على ١٠٠°م لمدة ٨ ساعات أو ليلة وزن .

لجنين البرمنجنات ، سليلوز ، سليكا ، كيوتين : تقدر على ٢٠ – ٢٢°م :

١ ـ أعدّ ADR .

٢ ـ اخلط محلول البرمنجنات المشبعة مع محلول منظم لجنين البرمنجنات بنسبة ١/٢ بالحجم (٤٠ مل / تقدير) ، والمخلوط ثابت لمدة يوم واحد .

٣ ـ ضع البوتقة بمحتوياتها ADR في إناء Enameled وضع ماء بارداً في الإناء بحيث لا يلمس ADR . أضف حوالي ٢٠ – ٢٥ مل من المخلوط السابق ، وعندئذ أضف ماء للإناء ليقلل نزول المخلوط من البوتقة . اخلط بساق زجاجي ، أضف مزيداً من مخلوط السوائل لارتفاع ثلثي البوتقة . اترك البوتقة حوالي ٩٠ دقيقة . قلب من حين لآخر . يجب أن يظل المحلول بنفسجياً خلال خطوة إزالة اللجنين . وإذا تحول المحلول للبني أو الطوبي يلزم إضافةمحلولٍ الجديد خاصة في العينات الغنية في اللجنين . وإذا تغير المحلول مع عينات فقيرة اللجنين أو نباتات غير ناضجة فإنه يحدث فقد في الكربوهيدرات السليلوزية . رشح وانقل البوتقة لإناء نظيف ، وأضف حوالي ٢٠ مل محلول إزالة معادن . رشح بعد ٥ دقائق ، وأضف ٢٠ مل أخرى وقلب ، وكرر إزالة المعدنة مرة أخرى ، إذ تستمر إزالة المعدنة ٣٠ – ٦٠ دقيقة .

إزالة اللجننة تتم إذا كان لون الألياف بالبوتقة أبيض إلى رمادي (حسب نوع العينة) مع عدم وجود أي بقايات سوداء من الكيوتين . رشح جيداً ، واغسل مرتين بكحول إيثايل ٨٠٪ ، ثم بالأسيتون ، وجفف على ١٠٠م لمدة ٨ ساعات أو ليلة ، والفقد في الوزن من ADR هو لجنين البرمنجنات .

٤ ـ إن لم يوجد كيوتين فيمكن ترميد البوتقة على ٥٠٠م لمدة ٣ ساعات ، وبرد وزن . فالفقد بالحرق يقدر السليلوز .

٥ ـ بعض العينات غنية بالسليكا ، فيلزم تقديرها بمعاملة الرماد بحمض الهيدرو برميك HBr ٤٨٪ بما لايزيد عن ٤ مل ، لمجرد البلل ، وتترك ١ – ٢ ساعة ثم يسحب حمض الهيدروبرميك ، وتغسل مرتين بالأسيتون ، وترمد على ٥٠٠م . برد وزن ، فالوزن الباقي في البوتقة هو السليكا .

٦ ـ أكسدة باقي الكيوتين بالبرمنجنات ، والتحلل المائي بحمض الكبريتيك ٧٢٪ . إذا تواجدت كميات كيوتين ، كما في أغلفة البذور ، فإن تحليل لجنين حمض الكبريتيك سيشمل كذلك الكيوتين في جزء اللجنين ، وإذا استعمل تقدير لجنين البرمنجنات ، فإن الكيوتين سيقدر ضمن السليلوز ؛ لذا كان مهماً تقدير الكيوتين .

فبعد إجراء الخطوة رقم ٣ في لجنين البرمنجنات ، يعامل الباقي بحمض كبريتيك ٧٢٪ كما في طريقة لجنين حمض الكبريتيك بدون أسبستوس . جفف البوتقة بمحتوياتها على ١٠٠م لمدة ٨ ساعات أو ليلة وزن ، فالفقد في الوزن هو السليلوز . رمد على ٥٠٠م لمدة ٣ ساعات وبرد وزن ، فالفقد في الترميد هو الكيوتين .

نيتروجين المنظفات الحامضية :

١ ـ أعـدّ ADR كـمـا سبق لكن بالترشيح على ورق ترشيح وليس في بوتقة جوتش باستخدام ٢ جم عينة جافة .

٢ ـ قدر النيتروجين في ADR على ورقة الترشيح (رقم ٥٤) ، كأزوت أو كبروتين (× ٦,٢٥) بالنسبة لوزن العينة الجافة .

التجفيف الساخن على حرارة أعلى من ٥٠ – ٥٥م يؤدي إلى زيادة معنوية في جدر الخلايا وفي ADR وفي اللجنين . هذه الزيادة ترجع أساساً لتخليق لجنين عن طريق تفاعلات Maillard (التلون اللاإنزيمي) بين الكربوهيدرات والبروتينات ، مكثفة بوليمرات غير ذائبة، ويلعب الماء فيها كعامل مساعد .

وإذا حدث أو توقع حدوث لجنين مخلق ، فيمكن تقديره بإجراء تقدير نيتروجين على بقايا ADR ، ثم يجرى التصحيح بموجب معادلة التصحيح التالية :

$$Lc = 1.208\ Lo - 10.75\ No + 0.42$$

حيث إن Lc هو اللجنين المصحح (لحمض الكبريتيك ٧٢٪) .

Lo هو اللجنين الملاحظ (لحمض الكبريتيك ٧٢٪) .

No كمية النيتروجين في ADR مقدرا بالنسبة لوزن العينة .

أو بالمعادلة

$$Lc = 1.10\ Lo - 7.6No + 0.3$$

ثم من :

لجنين مخلق = لجنين ملحوظ أو مقدر – لجنين مصحح

ADR المصحح = ADR المقدر – اللجنين المخلق .

١٣ ـ الطاقة الكلية لمواد العلف :

إذا لم يتوفر جهاز المسعر الحراري ، الذي يحرق المادة كهربائيا في جو من الأكسجين، ويقيس الحرارة الناتجة عن هذا الاحتراق ، فإنه يمكن تقدير طاقة الغذاء كيماويا بأكسدته بحامض الكبريتيك في وجود ثاني كرومات البوتاسيوم (كمصدر للأكسجين) وذلك على النحو التالي :

١ ـ يوزن حوالي ١ جم بالضبط من عينة جافة مطحونة ناعماً جداً ، وتوضع في دورق غليان ذي علامة عند حجم ١١٠٠ مل .

٢ ـ يضاف ٨٠ مل محلول ثاني كرومات بوتاسيوم (١,٥ عياري ، بإذابة ٣٦٧,٧٢٥ جم ثاني كرومات بوتاسيوم عالية النقاوة في ٥ لتر ماء مقطراً) .

٣ ـ يضاف ١٦٠ مل حامض كبريتيك مركزاً عالي النقاوة ، وترج محتويات الدورق ، ويترك ١,٥ ساعة ، مع الرج من حين لآخر .

٤ ـ يكمل حجم المحلول بالماء المقطر إلى العلامة ، ثم يترك ليبرد ، مع الرج للتجانس .

٥ ـ يؤخذ ١٠٠ مل بدقة في دورق مخروطي ، ويضاف عليها ٤٠ مل يوديد بوتاسيوم (يحضر يومياً بإذابة ١٠٠ جم يوديد بوتاسيوم عالي النقاوة مع ٣٢ جم بيكربونات صوديوم في ٥٠٠ مل ماء مقطراً) .

٦ ـ يحفظ في الظلام لمدة ٢٥ دقيقة ثم يخفف بإضافة ٢٠٠ مل ماء مقطراً .

٧ ـ يضاف ٣-٥ مل دليل نشا (بإذابة ٥ جم نشا ذائب في ١٠٠ مل ماء مقطراً ، أو يغلي ٧ جم حبيبات نشا في ١٠٠ مل ماء مقطراً لمدة دقيقة ، ثم يبرد المحلول ويرشح ويستعمل الراشح) .

٨ ـ ينقط بمحلول ثيوكبريتات الصوديوم (٠,١٥ عياري ، بإذابة ٣٧,٢٣ جم ثيوكبريتات في لتر ماء مقطر) ، محضرة في نفس اليوم ، حتى يزول اللون الأزرق الدال على وجود اليود .

٩ ـ يجرى عمل الخطوات السابقة على عينة خالية Blank بها كل الإضافات بدون عينة .

١٠ ـ حجم ثاني كرومات مستعملة للعينة الخالية =

$$\frac{\text{١١ × حجم الثيوكبريتات المستعملة في تنقيط ١٠٠ مل × قوة الثيوكبريتات}}{\text{قوة ثاني الكرومات}}$$ مل .

١١ ـ حجم ثاني كرومات زائدة عما لزم لأكسدة العينة =

$$\frac{\text{١١× حجم الثيوكبريتات المستعملة في تنقيط ثاني الكرومات الزائدة في١٠٠ مل× قوة الثيوكبريتات مل}}{\text{قوة ثاني الكرومات}}$$

١٢ ـ حجم ثاني الكرومات المستعملة في أكسدة العينة = خطوة ١٠ - خطوة ١١ .

١٣ ـ ثبت أن خارج قسمة $\frac{\text{مل ثاني كرومات مستوعبة في أكسدة الوزنة}}{\text{الطاقة الكلية بالوزنة بالكيلو كالوري}}$ = ثابت

وهذا الثابت يتوقف على محتوى العينة من الدهن والبروتين كنسب مئوية على أساس المادة الجافة ، ويستخرج هذا الثابت من المعادلة :

٢٣,٥٩ - ٠,٠٨٥٩ × بروتين العينة ٪ + ٠,٠٠٠٤٥٥ × (بروتين العينة ٪)٢ + ٠,٠٠٧٥ × دهن العينة ٪

وبمعرفة هذا الثابت وحجم ثاني الكرومات تحسب طاقة العينة .

١٤ ـ جلوكوز الدم (طريقة الأورثوتولويدين) :

يرسب بروتين الدم بأخذ ٠,١ مل دم + ١ مل حمض ثلاثي كلورو خليك (٣٪) ، واخلط وبعد دقائق اطرد مركزياً . خذ ٠,٥ مل رائق + ٤,٥ مل دليلا ملوناً (١,٥ جم ثيوبوريا تذاب في ٩٤٠ مل حمض خليك ثلجي + ٦٠ مل أورثوتولويدين ، ويحفظ بعيداً عن الضوء والمعادن والمطاط ، فيكون صالحاً لمدة شهرين) واخلط وحضن في حمام مائي يغلي ٨ دقائق . برد وقس الكثافة الضوئية للمحلول الأخضر المزرق على ٦٣٠ نانومتر ضد بلانك من حمض ثلاثي كلوروخليك بدلاً من الرائق للعينة . يجري تقدير لمحلول جلوكوز قياسي (١٠٠ مجم جلوكوز في ١٠٠ مل محلول حمض بنزويك ٠,٢ ٪) بنفس الخطوات لتقدير تركيز الجلوكوز بالمليجرام / ١٠٠ مل

$$= \frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة}}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}} \times \text{تركيز الجلوكوز في المحلول القياسي .}$$

ويزيد تركيز جلوكوز الدم في حالة زيادة نشاط غدد الدرقية والنخامية والأدرينال والبنكرياس ، وكذلك في بعض الأمراض المعدية ، والتهاب المخ والسرطانات ، والنزيف ، وتحت تأثير التخدير . بينما نقص الجلوكوز في الدم يسببه زيادة إفراز الإنسولين ، كما في حالة خراج البنكرياس ، وكذلك فى حالة نقص نشاط غدد النخامية ، والأدرينالين ، وكذلك للإجهاد العضلى ، واستنزاف جليكوجين الكبد ، أو لأمراض الكبد ، وكذلك لعدم قدرة تحويل الجليكوجين إلى جلوكوز ، لغياب إنزيم جلوكوز – ٦ – فوسفاتاز .

١٥ ـ سكر البول :

٢٥ مل من محلول بنيديكت [٢٠٠ جم سترات صوديوم + ٧٥ جم كربونات صوديوم + ١٢٥ جم ثيوسيانات بوتاسيوم في ٦٠٠ مل ماء مع التسخين البسيط ، والترشيح والتبريد ، ثم إضافة ١٨ جم كبريتات نحاس مذابة في ١٠٠ مل ماء . أضف ٥ مل حديد وسيانيد بوتاسيوم ٥ ٪ ، وأكمل إلى لتر بالماء المقطر . إن لم يكن المحلول رائقاً فرشح] في دورق دائري القاعدة سعة ١٠٠ مل أو كأس ، ثم أضف ٣ – ٤ جم كربونات صوديوم ، واغل ، وأثناء الغليان أضف البول ببطء من سحاحة وهز جيداً . يترسب لون أبيض ، ويختفي اللون الأزرق تدريجياً . قلل معدل إضافة البول عندما تقترب من نقطة النهاية حتى تصير تنقيطاً . ونقطة النهاية تصل إليها حال ما يختفي اللون الأزرق كلية . أفضل تقطير يكون ما بين ٨ – ١٢ مل بولاً ، وهذا يعادل حوالي ٠,٥ ٪ جلوكوز .

وحيث إن ٠,٠٥ جم جلوكوز تختزل ٢٥ مل محلول نحاس قلوي ، فإن كمية الجلوكوز جم / ١٠٠ مل بول = $\frac{N \times ١٠٠ \times ٠,٠٥}{\text{مل لزمت للتقطير}}$

حيث N عدد مرات تخفيف البول (إن خفف) .

ويتواجد السكر في البول في حالة زيادة استهلاك الكربوهيدرات بشدة ، لكن يوجد في حالات مرضية كمرض السكر ، وأمراض الجهاز العصبي المركزي ، وبعد الذبحة الصدرية ، وفي التسممات ، وبعد تناول جرعات عالية من الكورتيكويد .

١٦ ـ جليكوچين الكبد والعضلات :

المحاليل :

١ ـ دليل الأنثرون : يحضر محلول يحتوي ٠,٠٥ ٪ أنثرون ، ١ ٪ ثيويوريا و ٧٢ ٪ بالحجم حمض كبريتيك . فلكل لتر من الدليل يوضع ٢٨٠ مل ماء مقطراً ، وبحذر يضاف إليها ٧٢٠ مل حمض كبريتيك مركزاً عالي النقاوة . وفي إناء آخر يوضع ٥٠٠ مجم أنثرون نقي + ١٠ جم ثيويوريا عالي النقاوة + لتر حمض كبريتيك ٧٢ ٪ . دفئ المخلوط على ٨٠–٩٠°م مع الرج من حين لآخر . برد واحفظ في ثلاجة ، فيستمر صالحاً للاستخدام لمدة أسبوعين .

٢ ـ حمض ثلاثي كلوروخليك ٥ ٪ .

٣ ـ إيثانول ٩٥ ٪ .

٤ ـ محلول قياسي جلوكوز : أذب ١٠٠ مجم جلوكوز جافاً عالي النقاوي في ١٠٠ مل محلول حمض بنزويك مشبعاً . خفف منه ٥ مل إلى ١٠٠ مل بمحلول حمض البنزويك المشبع فيكون تركيزه ٠,١ مجم جلوكوز / ٢ مل .

ويجرى التقدير كالتالي :

١ ـ تجنس العينة معلومة الوزن مع حجم معلوم من حمض ثلاثي كلوروخليك لمدة ٣ دقائق ، ثم اطرد مركزياً ، ورشح الرائق على ورقة ترشيح مغسولة بالحامض في قمع على مخبار . انقل كمياً المتبقي إلى خلاط مع حجم معلوم من حمض ثلاثي كلورو خليك ، وجنس ثانية لمدة دقيقة . اطرد مركزياً ، ورشح الرائق على نفس ورقة الترشيح . أكمل إلى حجم معلوم بحمض ثلاثي كلورو خليك واخلط .

٢ ـ انقل ١ مل من المستخلص السابق إلى أنبوبة طرد مركزي مع ٥ مل كحول إيثيل ٩٥ ٪ ، واخلط بحذر ، ثم سد الأنابيب بسدادة مطاط ، واتركها ليلة على حرارة الغرفة (أو ضعها في حمام مائي ٣٧–٤٠°م لمدة ٣ ساعات) .

٣ ـ بعد تمام الترسيب ، اطرد مركزياً ١٥ دقيقة بسرعة ٣٠٠٠ لفة / دقيقة واسكب الرائق بحذر ، واقلب الأنابيب للتخلص من السائل لمدة ١٠ دقائق .

٤ ـ أذب الجليكوچين الراسب في الأنابيب بإضافة ٢ مل ماء على الجدران ، ورج لتمام الذوبان .

٥ ـ تجرى تجربة خالية على ٢ مل ماء في أنبوبة نظيفة ، كما يجرى تقدير لمحلول قياسي بسحب ٢ مل محلول جلوكوز قياسي في أنبوبة أخرى.

٦ ـ أضف ١٠ مل دليل أنثرون إلى كل الأنابيب ، مع سدها وتبريدها تحت صنبور مياه ، ثم ضعها في حمام ماء يغلي ١٥ دقيقة ، ثم انقلها إلى حمام ماء بارد على درجة حرارة الغرفة ، ثم اقرأ الكثافة الضوئية على ٦٢٠ نانومتر بعد تصفير الجهاز على التجربة الخالية .

٧ ـ احسب تركيز الجليكوچين مجم / ١٠٠ جم =

$$\frac{\text{قراءة العينة} \times ٠,١ \times \text{حجم المستخلص} \times ١٠٠ \times ٠,٩}{\text{قراءة المحلول القياسي} \times \text{وزن العينة جم}}$$

حيث إن ٠,٩ = معامل تحويل الجلوكوز إلى چليكوچين .

هذا وينصح بالرجوع للمراجع التالية لمزيد من المعلومات :

ـ عبد القادر راشد أبو عقادة ، مصطفى محمد أبو النجا (١٩٧٠) : طرق التحليل الغذائى ـ دار المعارف بالإسكندرية .

ـ مصطفى مرسى (وآخرون) : أساسيات البحوث الزراعية ـ مكتبة الأنجلو المصرية (١٩٦٨) .

- Carroll, N. V. et al. (1956) J. Biol. Chem., 220 : 583.

- Close, W. & Menk, K. H. (1986) Selected topics in animal nutrition . Deutsche stiftung fur Internationale Entwicklung, Feldafing, Germany .

- Egan, H. et al. (1981) pearsonɔs chemical Analysis of Foods . 8th Ed., Churchill, Edinburgh & London .

- Englyst, H. N. & Cummings, J. H. (1984) Analyst, 109 : 937.

- Farid, M. F. A. (1976) Alex . J. Agric. Res., 24 : 457 .

- Golding, E. J. et al (1985) J. Dairy sci., 68 : 2732 .

- Gruenwedel, D. W. & Whitaker, J. R . (1985) Food Analysis. Vol. 3. Marcel Dekker, N. Y.

- Holme, D. J. & peck, H. (1993) Analytical Biochemistry . 2 nd Ed., Longman, Printed in Singapore .

- Hyvarinen, A. & Nikkila, E. A. (1962) Clin . Chim . Acta, 7: 140 - J. AOAC (1975) Journal of the Association of official Agricultural Chemists 12 thEd Washington .

- Johnson, D. R, et al, (1961) Tappi , 44 : 793 .

- Lees, R. (1975) Food Analysis . 3 rd Ed . Leonard Hill Books, London .

- Leitgeb, R. (1979) Futtermittelkunde , Vorlesungen, Univ . f. Boku, Wien .

- Merck, E. (1974) Klinisches Labor . 12 . Auflage, Merck, Darmstadt

- Minson, D. J. & Mclead , M. N. (1972) Division of tropical pastures, tech. paper. No. 8 Commonwealth scientific & industrial research organization, Australia.

- Rodertson, J. B. (1978) In : Spiller, G. A. & A men , R. J. (ed.) . Topics in dietary fiber research . Plenum press , N. Y .

- Spiller, G. A. & Amen . R. J. (1978) Topics in dietary fiber research, plenum press , N. Y .

- Sudekum, K. _ H. et al. (1993) Proc . Soc., Nutr . Physiol., 1 : 13 .

- The Feeding stuffs (Sampling and Analysis) Regulations 1982 . Agriculture 1982 No. 1144. Her Majesty as Stationery Office, London.

- Tilley , J. M. A. & Terry, R. A. (1963) J. Br. Grassl . Soc., 18 : 104

.- Varley, H. (1978) Practical Clinical Biochemistry . 4 th Ed . Arnold

- Heinemann, India .

- Walker, M. (1965) AOAC . 29 : 039 & 43 : 012 .

- Wootton , I . O. P. (1974) Microanalysis in Medical Biochemistry, 5 th Ed., Churchill . , London .