

تقدير البروتين Protein Determination

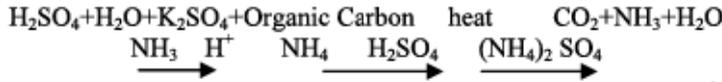
هناك العديد من الطرق لتقدير البروتين في الأغذية ، طريقة كلداهل هي أحد هذه الطرق والتي تعتمد على قياس النيتروجين والتي مازالت من أهم الطرق الرسمية لقياس البروتين.

(١٠,١) تقدير البروتين الخام – بطريقة كلداهل

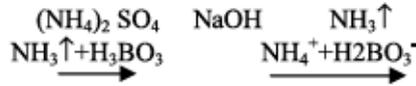
مقدمة

تشتمل طريقة كلداهل على أكسدة المواد العضوية وهضمها بواسطة الحمض بوجود عامل مساعد (Catalyst) وتحويل النيتروجين إلى أمونيا. تتفاعل الأمونيا مع الزائد من الحمض لتكون كبريتات الأمونيوم. يحول الوسط إلى قلوي بإضافة هيدروكسيد الصوديوم وتجمع الأمونيا المتحررة في حمض ضعيف مثل حمض بوريك أو محلول قلوي مخفف وتعاير مع حمض الهيدروكلوريك القياسي.

١- خطوة الهضم:



٢- التقطير:



٣- المعايرة:



الهدف: تقدير البروتين بطريقة كلداهل.

المعدات

- وحدة هضم وتقطير كلداهل.
- دوارق كلداهل.
- سحاحه.

المحاليل

- كبريتات الصوديوم أو البوتاسيوم اللامائية.
- كبريتات النحاس.
- مخلوط الهضم المؤكسد = ١٠ جم من كبريتات الصوديوم أو البوتاسيوم اللامائية + ٥ جم من كبريتات النحاس + ثاني أكسيد التينيوم (ملاحظة: هناك العديد من مخاليط الهضم لكلداهل والتي تحتوي على كيماويات مختلفة).
- حمض الكبريتيك المركز.
- محلول هيدروكسيد الصوديوم (٥٠٪) (أذب ٢٠٠٠ جرام من هيدروكسيد الصوديوم NaOH في ٣,٥ لتر من الماء الخالي من العناصر المعادن (dd) برد ثم اكمل الحجم إلى ٤ لترات).
- محلول حمض البوريك (٢٪):

- ١- في دورق سعة ٤ لتر أذب ٨٠ جرام من حمض البوريك في ٢ لتر من الماء الخالي من العناصر المعدنية المغلي وهو لا يزال حاراً جداً.
- ٢- حرك المزيج ثم أضف زيادة ١,٥ لتر من الماء (dd).
- ٣- برد تحت صنوبر الماء حتى يصل إلى درجة حرارة الغرفة أو اتركه لفترة حتى يبرد.
- ٤- حرك الدورق باستمرار حتى تمنع تكون البلورات من حمض البوريك.
- ٥- أضف ٤٠ مل من محلول بروموكريسول الأخضر bromocresol green (١٠٠ ملجرام من بروموكريسول الأخضر / ١٠٠ مل إيثانول) و ٢٨ مل محلول أحمر الميثايل (١٠٠ ملجرام من أحمر الميثايل / ١٠٠ مل إيثانول).
- ٦- خفف إلى ٤ لتر مع الماء واخلط بحرص.
- ٧- انقل ٢٥ مل من محلول حمض البوريك إلى دورق الاستقبال ثم أعمل التقطير بدون العينة كتجربة ضابطة Blank، مكونات الدورق من المفترض أن تعطي اللون الأخضر المتعادل، إذا لم تكن كذلك سحح مع محلول 0.1N NaOH حتى تحصل على اللون.
- ٨- احسب كمية محلول NaOH والتي تحتاج لضبط محلول حمض البوريك في ٤ لترات بالمعادلة التالية:

$$\text{ml } 0.1\text{N NaOH} = \frac{(\text{ml liter}) \times (4000\text{ml})}{(25\text{ml})}$$

- ٩- أضف الكمية المحسوبة من محلول 0.1N NaOH إلى محلول حمض البوريك.
- ١٠- اخلط جيداً.
- ١١- حمض الهيدروكلوريك القياسي (١، ٤٠ع).

الطريقة

- زن العينة (١-٢ جم) على ورقة ترشيح (واطمأن) صغيرة وتلف وتنقل إلى دورق الهضم. أضف حجر الخفاف و ١٠ جم من مخلوط الهضم المؤكسد ثم أضف ٢٥ مل من حمض الكبريتيك المركز واخلط جيداً.

- أجزء التسخين ببطء في البداية حتى يقف الفوران ثم يجرى الغليان حتى يتم الهضم - تمام الهضم هو تحول المحلول إلى عديم اللون أو أزرق مخضر، ثم يوقف التسخين ويبرد المحلول (أحذر من تكون بلورات الملح).
- يضاف حوالي ٢٠٠ مل ماء إلى دورق الهضم.
- تنقل حوالي ٤٠-٥٠ مل من حمض البوريك (٢٪) إلى دورق مخروطي لاستقبال الأمونيا وتضاف له ٤-٥ نقط من الدليل.
- تنقل حوالي ٦٠-٩٠ مل من محلول الصودا NaOH (٥٠٪) وتصب برفق واحتراس على جدار دورق الهضم لتتجمع في القاع.
- يثبت دورق الهضم على جهاز التقطير ويوصل بالمكثف عن طريق الوصلة الزجاجية ذات المصيدة (Trap).
- يقلب دورق الهضم بهدوء لخلط محتوياته ثم يبدأ التسخين إلى الغليان (بهدوء في البداية).
- تجمع حوالي ١٥٠ مل في دورق الاستقبال.
- تعادل محتويات دورق الاستقبال بمعايرتها بمحلول حمض الهيدروكلوريك (١،٤) القياسي المحتوي على ٣ نقط دليل كلداهل وبحسب الحجم بالضبط من السحاحة.
- تجرى تجربة ضابطة (Blank) وذلك بوضع ورقة ترشيح فارغة في دورق الهضم بدل الورقة المحتوية على العينة.
- تحسب نسبة النتروجين ومن ثم نسبة البروتين.

عامل البروتين

يوفر تقدير البروتين العضوي الأساس لحسابات نسبة البروتين في المواد الغذائية، فبضرب كمية النتروجين في عامل معين Protein Factor نحصل على كمية

البروتين. وتعتمد هذه العوامل على محتوى البروتينات المختلفة من النتروجين. والعامل ٦,٢٥ يستخدم لحساب البروتين لمعظم المواد الغذائية (لحوم، فاكهة، خضر)؛ وذلك لأن معظم البروتينات في هذه المواد تحتوي على ١٦٪ نتروجين ($١٦ \div ١٠٠ = ٠,١٦$). وتستثنى بعض المواد الأخرى مثل الألبان (العامل = ٦,٣٨) والحبوب (٥,٧) والجيلاتين (٥,٥٥).
الحسابات

$$\text{نسبة النتروجين} = \text{عيارية HCl}^* \times \frac{\text{حجم الحمض المصحح}^{**} (\text{مل})}{\text{وزن العينة} (\text{جم})} \times \frac{14 \text{ جم N}}{100 \text{ mol}}$$

* العيارية هي في مول/١٠٠٠ مل

** حجم الحمض المصحح = (مل قياسي حمض للعينة) - (مل قياسي حمض للضابطة)
كمية البروتين = كمية النتروجين (%) × معامل البروتين للغذاء

التجربة	وزن العينة	حجم Hcl المعايير (مل)	%النتروجين	% البروتين على أساس الوزن الرطب	% البروتين على أساس الوزن الجاف
الضابطة	١				
	٢				
العينة	١				
	٢				
	٣				

X'=
SD=

X'=
SD=

(١٠, ٢) تقدير البروتين بطريقة لونية (طريقة برادفورد)

Determination of Protein by Colorimetric Method

مقدمة

تعتمد هذه الطريقة على حقيقة أن صبغة الكوماسي برلينت بلو Coomassie Brilliant Blue 250 توجد بلون أحمر ولكن عند ارتباطها بجزء البروتين تتحول إلى اللون الأزرق.

الهدف: تقدير البروتين بطريقة لونية (طريقة برادفورد).

المحالييل

١- الصبغة:

- أذب ٠,١ جم من صبغة الكوماس برلينت بلو في ٥٠ مل كحول
- أضف ١٠٠ مل من حمض الفوسفوريك (H_3PO_4) (تركيز ٨٥٪)
- ٢- حلول البروتين القياسي (BSA) بتركيز ١٠٠ ملجم / ١٠٠ مل ماء مقطر.
- ٣- محلول هيدروكسيد الصوديوم (٥,٥ ع)

الطريقة

استخلاص البروتين

- ١- زن حوالي ١ جم من العينة بدقة على ورق جلاسين على ميزان حساس وانقل الوزن إلى دورق مخروطي سعة ٥٠ مل.
- ٢- أضف ٢٠ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (٥,٥ ع). اخلط العينة (استخدام قلاب مغناطيسي إن كان ذلك ضرورياً).
- ٣- سخن محتويات الدورق في حمام مائي يغلى لمدة ١٠ دقائق. إذا لم يتم ذوبان العينة (يجب أخذ الحذر حتى لا يتغير لون العينة إلى أسود أو داكن).
- ٤- برد محتويات الدورق في حمام ثلجي مباشر بعد التسخين.

٥- انقل محتويات الدورق كميّاً إلى دورق معياري سعة ٥٠ مل ، وأكمل إلى العلامة بالماء المقطر. رشح على ورقة واطمان رقم ٢.
المنحنى القياسي

- ١- انقل صفر، ١٠، ٢٠، ٣٠، ٤٠، ٥٠، ٦٠ ميكرو لتر من محلول البروتين القياسي إلى أنابيب اختبار.
- ٢- أكمل الحجم إلى ١ مل بالماء المقطر.
- ٣- أضف ٥ مل من محلول الصبغة واخلط جيداً وسريعاً بواسطة الفورتكس.
- ٤- دع الأنابيب لمدة ٢-٥ دقيقة.
- ٥- اقرأ الامتصاصية على موجة ٥٩٥ نانومتر.
- ٦- ارسم المنحنى القياسي (رسم الامتصاصية على التركيز).

التقدير

- ١- انقل ٠,٢٥ ، ٠,٥ مل من العينة إلى أنابيب اختبار
- ٢- اتبع الخطوات ٢-٥ كما في عمل المنحنى القياسي.
- ٣- احسب محتوى العينة من البروتين مستعيناً بالمنحنى القياسي وامتصاصية العينة.

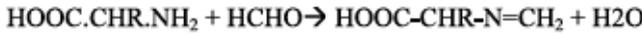
(٣, ١٠) تعيين محتوى البروتين بالمعايرة بالفورمول

Determination of Protein Content by the Formol Titration

المقدمة

يمكن مع بعض الأغذية كالحليب تقدير البروتين فيها بصورة سريعة بالمعايرة بالفورمول.

لا يمكن معايرة البروتين مباشرة مع القلوي لضعف مجموعات الكربوكسيل فيه ، وبإضافة الفورمالين (فورم ألدهيد) الذي يتفاعل مع مجموعات $-NH_2$ ويشكل مجموعات مثيلين-أمينو ($-N=CH_2$) ، تصبح مجموعات الكربوكسيل متاحة للمعايرة.



متعادل

حمضي

المواد

- سحاحة.
- ماصات.
- دوارق حجمية.

المحاليل

- محلول مشبع من أوكسالات البوتاسيوم.
- فينول فثالين.
- ٤٠٪ محلول فورم ألدهيد.
- 0.1M محلول هيدروكسيد الصوديوم.

طريقة العمل

- خذ بالماصة ١٠ مل من العينة (الحليب) إلى دورق مخروطي صغير وأضف ١ مل فينول فثالين و٠,٤ مل محلول مشبع من أوكسالات البوتاسيوم، اتركه لمدة دقيقتين، (تمنع الأوكسالات إعاقاة أملاح الكالسيوم الذائبة).
- عدّل الحليب إلى اللون الوردي الفاتح بمحلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1M الموضوع في السحاحة.
- أضف ٢ مل من محلول فورم ألدهيد ٤٠٪ (الذي سبق تعديله بوجود الفينول فثالين بمحلول 0.1M محلول هيدروكسيد الصوديوم).
- تابع المعايرة إلى النقطة الوردية نفسها التي سبق الحصول عليها، ولا تسجل إلا حجم 0.1M محلول هيدروكسيد الصوديوم التي تحتاجها للمعايرة الثانية.

الحساب

يعطى حساب البروتين بالمعادلة التالية :

$$\% \text{ البروتين} = \text{حجم الألدheid} \times 0,17$$

وتساوي حجم الألدheid عدد ميللترات 0.1M محلول هيدروكسيد الصوديوم التي يحتاجها ١٠٠ مل من الحليب لتعديل الحموضة الناتجة بعد إضافة الفورم ألدهيد.