

تقدير الكربوهيدرات Carbohydrate Determination

(١١,١) تقدير السكريات بالمعايرة الحجمية بإرجاع النحاس (طريقة لان واينون)
Volumetric 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.

يتبني تحليل 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 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)، مع ١٠٠ مل من MI حمض الكبريتيك في الماء، وأكمل الحجم إلى لتر. ويحفظ المحلول لمدة طويلة.

(ب) أذب ٣٤٦ جم طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم رباعية الماء، ملح روشيل ($\text{KN}_9\text{C}_4\text{H}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) مع ١٠٠ جم 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 الميثيلين

١ جم من الصبغة تذاب في ١٠٠ مل ماء.

كاشفي كاريز ١ و ٢ (Carrez):

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

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

١٠٠ مل.

طريقة العمل

أولاً: المربيات وأصناف المربيات

(أ) تقدير السكريات المختزلة:

- ١- حضر محلولاً من الغذاء الذي يحتوي السكر كالمربيات أو المرملاد، بوزن نحو ٤-٥ جم بدقة من الغذاء في كأس وإضافة ماء ساخن نحو ١٠٠ مل
- ٢- حرك حتى ذوبان المادة ورشح عبر الصوف الزجاجي إلى دورق حجمي ٢٥٠ مل.
- 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 ١٠٠ مل من المحلول المحضر في (أ) إلى دورق مخروطي وإضافة ١٠ مل حمض الهيدروكلوريك المخفف والغليان لمدة ٥ دقائق.
- ٢- بعد التبريد يعدل المحلول بمحلول ١٠٪ هيدروكسيد الصوديوم بوجود الفينول فثالين واستكمال الحجم إلى ٢٥٠ مل. واستعمل هذا المحلول للمعايرة مع محلول فهلنغ.

(ج) المعايرة:

- ١- املاً 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 ١٠ مل أخرى من مزيج محلولي فهلنغ متبعاً الخطوات الآتية: بعد غلي محلولي فهلنغ أضف كمية من السكر حتى تبلغ كمية السكر المضافة مقداراً يتقص ١٢ مل عن الكمية التي لزمتم في المعايرة التقريبية.

٦- أضف ٤ نقاط أشف أزرق المثلين. (٧) أعد غلي المزيج، وتباع إضافة محلول السكر، والمزيج يغلى بدفعات كل منها نحو ٢٥، ٠، 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 ٢٥٠ مل وأضف ٥٠ مل ماء مقطر.

٢- أضف ٥ مل كاشف كاريزا ١ و ٥ مل كاشف كاريزا ٢ لترسيب الدهن والبروتين، ثم أكمل الحجم إلى ٢٥٠ مل بالماء ورشح.

ب) المعايرة:

١- أملأ السحاحة بمحلول اللاكتوز.

٢- خذ بالماصة ١٠ مل محلول فهلنغ في دورق مخروطي وأضف ٤ نقاط كاشف أزرق المثل 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 ١٠ مل 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 ٠,٢٥ مل كل مرة، حتى الوصول إلى نقطة انتهاء المعايرة (اختفاء اللون الأزرق).
الحساب

احسب تركيز محلول السكريات باستخدام العوامل الآتية :

١ مل محلول فهلنغ - ٤,٩٥ ملجم جلو كوز.

• 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:

$$\frac{250 \times 4.95}{10 \times W \times T} = \text{السكريات المختزلة} \% \text{ (على أساس جلو كوز)}$$

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

W = وزن المربى المستعمل (جم)

٢- السكريات الكلية:

$$\frac{25 \times 250 \times 4.95}{10 \times W \times T} = \text{الساكر الكلية} \% \text{ (على أساس جلو كوز)}$$

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

= W وزن المربى المستعمل (جم)

ثانياً : الحليب

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

حيث T = استهلاك المعاييرة (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 ٥،٣- ثنائي نetro 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 تحليلها 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 جلو كوز أساسي (١٥ ملجرام/مل).
- حمض الكبريتيك 1.5M .
- هيدروكسيد الصوديوم ١٠٪.
- كاشف DNS: يحضر بإذابة ١٠ جرام DNS في ٢٠٠ مل 2M NaOH مع التسخين والتحريك الشديد، أذب ٣٠٠ جرام طرطرات الصوديوم والپوتاسيوم رباعية الماء في ٥٠٠ مل 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 ١،٠ - ٠،٢ جرام من المسحوق وضعه في أنبوب اختبار.
 - أضف ١٠ مل من 1.5M حمض الكبريتيك، وسخن في حمام مائي لمدة ٢٠ دقيقة، وحرك أحياناً؛ وذلك لتحلل السكريات المتعددة والساكار الأخرى غير المختزلة.
 - برد وأضف بحرص ١٢ مل من ١٠٪ NaOH.
 - امزج ورشح إلى ١٠٠ مل 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 ١٠ مل من 1.5 M حمض الكبريتيك، وسخن في حمام مائي بدرجة الغليان مدة ٢٠ دقيقة، وحرك بين الحين والآخر؛ وذلك لتحلل السكاكر غير المختزلة.
- برد، وأضف بحذر ١٢ مل هيدروكسيد الصوديوم ١٠٪، وامزج.
- رشح إلى دورق حجمي سعته ١٠٠ مل.
- اغسل الأنبوب بالماء المقطر فوق الدورق الحجمي عدة مرات.
- أكمل إلى الحجم بالماء المقطر ثم امزج بتقليب الدورق الحجمي عدة مرات.
- خفف ١٠ مل من هذا المحلول إلى ٢٥٠ مل مستعملاً دورقاً حجمياً والماء المقطر وامزج بالتقليب عدة مرات.

ج) المربيات، المحتوى من السكر المختزل

- زن بدقة نحو ٣ جرام وضع في دورق مخروطي.
- أضف ٥٠ مل ماء، وسخن وحرك لمدة ١٠ دقائق.
- رشح في دورق حجمي ١٠٠ مل.
- اغسل الأنبوب إلى الدورق الحجمي بكميات قليلة من الماء المقطر.
- امزج جيداً بالتقليب عدة مرات، ثم أكمل ١٠ مل من هذا المحلول إلى ٢٥٠ مل بالماء المقطر مستعملاً دورقاً حجمياً، امزج وقلّب.

٢- تحضير محاليل قياسية من الجلوكوز

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

٣- قياسات الامتصاص:

أ) محاليل الجلوكوز القياسية

- خذ بالماصة ١ مل ماء مقطر في أنبوب اختبار، وضع في أنابيب خمسة أخرى معلّمة ١ مل من كل من محاليل الجلوكوز المعيارية (٠.٢٥ - ١.٥ ملجرام)، أضف ١ مل من كاشف DNS و ٢ مل ماء إلى كل أنبوب مستعملًا الماصة.

ب) نواتج التحلل

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

ج) المحاليل القياسية ونواتج التحلل

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

الحسابات

أ) الحبوب (حبوب الإفطار)

%الكربوهيدرات المتاحة في الحبوب (على أساس الجلوكوز) = $W/10 \times C$

التركيز $\times 10$

وزن العينة (جم)

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

W = وزن الحبوب المستعملة (جرام).

ب) المربيات

$W/250 \times C =$ (على أساس الجلوكوز)

تركيز الجلوكوز $\times 250$

وزن العينة (جم)

حيث $C =$ التركيز مقدراً بالمليجرام من الجلوكوز في ٢٠ مل.

$W =$ 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 الكربوهيدرات. 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 كمحللول 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).

الكيمواويات: جلوكوز-فينول-حمض كبريتيك.

المحاليل

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

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 (مكرر لـ لكل تركيز)، هذه الأنابيب تستخدم لعمل المنحنى القياسي بتركيز من جلوكوز $0-100 \mu\text{g}$ في ٢ مل، $0 \mu\text{g}$ جلوكوز/٢ مل 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 ١٠٠ مل إلى دورق حجمي سعته ٥٠٠ مل ، 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/٢ مل. طريقة التخفيف والأحجام كما يلي :

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

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

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

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

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

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

• إضافة الفينول : لكل أنبوبة من الأنابيب السابقة والتي تحتوي على ٢ مل

أضف ٠,٠٥ مل 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).

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:

$$Y=0.011 + 0.1027$$

$$Y=0.648$$

$$X=78.98 \mu\text{g}/2\text{ml}$$

$$(78.98 \mu\text{g glucose}/2\text{ml}) \times (2\text{ml}/1\text{ml}) \times (2000 \text{ ml}/1\text{ml})$$

$$= 157950 \mu\text{g}/\text{ml}$$

$$= 157.95 \text{ mg}/\text{ml}$$

$$= 157.95 \text{ g}/\text{L}$$

(١١، ٤) تقدير الكربوهيدرات - طريقة لونية
Colorimetric Determination of Carbohydrates

مقدمة

هناك عدة طرق لونية طورت وكلها تعتمد على التفاعل الكيميائي 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 ١,٠ جم 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 (٥٥ جم كلوريد الكالسيوم في ٧٦ مل ماء فقط وتضبط الـ pH بواسطة حمض الخليك الثلجي إلى ٢).
- ٤- محلول حمض الخليك ثلاثي الكلور Trichloro acetic acid (١٠٠ جم من الحمض في ١٠٠ مل ماء مقطر).
- ٥- كحول إيثيلي ٨٠٪.

الطريقة Procedure

- ١- توزن ٤٠٠ ملجم من العينة في أنبوبة اختبار مكررين ويضاف ٢ مل من الكحول إلى العينة إذا كانت جافة.
- ٢- تضاف ١٢ مل 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 كميماً إلى دورق معياري سعته ١٠٠ مل وتغسل الأنبوبة عدة مرات بماء مقطر ويضاف الغسيل إلى الدورق. تضاف ٥ مل 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 ٠,٥ مل من الماء المقطر إلى الأنبوبة التي تحوي ٠,٥ مل من الراشح لتصبح حجم جميع الأنابيب ١ مل.
- ٥- تنقل ٠,٢ ، ٠,٤ ، ٠,٦ ، ٠,٨ و ١ مل من محلول الجلوكوز (٠,٢٪) إلى أنابيب اختبار بايركس. ويضاف الماء المقطر إلى كل أنبوبة ليكمل الحجم إلى ١ مل. أيضاً تحضر أنبوبة ضابطة (بلانك) من ١ مل ماء مقطر وتضع علامة على جميع الأنابيب للتعرف عليها أثناء التسخين والتحليل.

- ٦- تغمر جميع الأنابيب في ماء بارد. تضاف ٥ مل 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، واتباع نفس خطوات الطريقة اللونية لتقدير البروتين.