الفصل الثاني
الدهـــون

وهي مجموعة غير متجانسة من المواد التي تذوب في الداي إيثايل إيثير ، وتعرف بالمستخلص الإيثيري ، وتشمل بجانب الدهون الحقيقية (المتعادلة أو البسيطة) ، كذلك ليبيدات أو دهون معقدة ، مثل الفوسفوليبيدات ، والإستيرويدات ، والكاروتينويدات ، ومواد أخرى مشابهة، وكلها تشترك في ذوبانها في مذيبات الدهون ، سواء كحول إيثايل ساخن، كلوروفورم ، رابع كلوريد كربون ، أسيتون ، إثير ، إثيربترولي وغيرها . ويجرى استخلاصها بأحد المذيبات المذكورة ، أو بالمعاملة بالقلوي الساخن ، ثم التحميض بحمض معدني .

ولاستخلاص الدهن بالمذيبات قد يجرى على العينة الجافة تماماً Dry Extraction بمذيب لا مائي Anhydrous ، أو على العينة غير الجافة Wet Extraction ، وفي الاستخلاص الجاف يستخدم عادة إيثر بترولي ، حيث لا يتأثر بالكميات البسيطة من الرطوبة المتبقية في العينة ، أما الإيثير العادي فإن لم يكن تام الجفاف وخالي الماء والكحول فإنه يستخلص بعض السكريات وغيرها من العينة . أما الاستخلاص الرطب باستخدام الأحماض فيستخدم لتكسير مستحلب الدهن ، نتيجة وجود غلاف بروتيني حول حبيبات الدهن (كما في اللبن) ، فيسهل استخلاص الدهن بتحريره بتكسير المستحلب .

وترجع أهمية دراسة نسبة وصفات الزيت أو الدهن في المواد الغذائية إلى قيمتها الغذائية. ويقدر الدهن الخام بطرق منها :

١ ـ الاستخلاص في جهاز سوكسلت لمدة ٣-١٦ ساعة (حسب نوع المذيب والمحتوى الدهني) باستخدام الإيثير البترولي :

فتوزن ١٠ جم تقريباً من العينة الجافة المطحونة على ورقة ترشيح ، وتوضع العينة بورقة الترشيح في كستبان الجهاز ، سد الكستبان بورق ترشيح ، واملأ جسم الجهاز بالمذيب حتى ينخفض في القابلة عن طريق السفون ، واستمر في إضافة المذيب حتى منتصف الجسم (حوالي ١٥٠ مل) ، وضع المكثف ، واستخلص لمدة حسب المحتوى الدهني (في المتوسط ١٢ ساعة) ، تخلص من المذيب ثم جفف القابلة على ١٠٠°م لمدة ساعة أو على ١٠٥°م لمدة نصف ساعة ، برد في مجفف ، ثم زنها نظيفة جافة ، فالزيادة في وزن القابلة هو وزن الزيت أو الدهن ، فيحول كنسبة مئوية من وزن العينة الأصلي ويلاحظ أنه يمكن إجراء التقدير في العينة الطازجة ، وبمعرفة نسبة الرطوبة في العينة فيمكن حساب نسبة الدهون على أساس الوزن الجاف ، وأنه كلما كان معدل تكثيف المذيب سريعاً كلما

قصرت فترة الاستخلاص ، في حالة انخفاض المحتوى الدهني فيؤخذ وزن أكبر من العينة الجافة (في حدود ١٠٠ جم) ، وتستخلص على البارد في زجاجات واسعة الفتحة لمدة ٧٢ ساعة مع الرج المتكرر ثم يؤخذ الراشح ويستخلص منه الدهون في جهاز سوكسلت .

ويجب أن يكون الفارق بين مكررتي تقدير الدهون الخام لا يتعدى ٠,٣ ٪ دهن .

٢ ـ التحليل المائي قبل استخلاص الدهون (كما في السمك) :

وفي هذه الطريقة يؤخذ ٥ جم عينة ، وتقلب جيداً مع ١٠٠ مل ماء مقطراً مع ٦٠ مل Hcl مدخناً مع إضافة حجر خفاف ، والتسخين ببطء حتى يصل للغليان ، مع التغطية بزجاجة ساعة ، يترك للغليان ٣٠–٦٠ دقيقة . يضاف ٥٠ مل ماءً مقطراً ساخناً ، ثم يرشح على ورق ترشيح مبلل ، فإن صعب الترشيح يعاد التحليل المائي بالحامض . يغسل الراسب جيداً بالماء المقطر الدافئ حتى تعادل الراشح . جفف ورقة الترشيح بالراسب على ١٠٥م لمدة ٢–٤ ساعات ، ثم ضعها في كستبان جهاز سوكسلت ، واستخلصها بالداي إيثيل إيثير . ونفس درجة الدقة بين المكررات يجب ألا تتعدى ٠,٣ ٪ دهن . وفي هذه الطريقة الأخيرة يلاحظ أنه في المواد الغذائية الغنية بالدهون ، وكذلك المواد التي يظهر الدهن في راشحها بعد التحليل بالحامض ، فإنه يفضل معها استخلاص الدهن الخام الذائب في الداي إيثيل إيثير قبل تحليلها بالحامض ، وللاحتياط من فقد الدهن خلال الترشيح فإنه يستخدم ورقتي ترشيح معاً في آن واحد . وتستخدم طريقة التحليل بالحامض المعدني هذه Werner Schmid Method (Weibull - Stoldt Method) مع الأغذية ذات الأصل الحيواني الغنية بالبروتين لتحرير الدهن؛ لأن طريقة سوكسلت تعطي مع مثل هذه المواد نتائج منخفضة .

يؤدي تقدير الدهن بثاني إيثيل الإيثير أو الإثير البترولي بعد أو بدون تحلل مائي بحمض الهيدروكلوريك إلى فروق في المحتوى الدهني للأعلاف ولحساب محتوى الدهن في أعلاف المجترات تستخدم المعادلتان الآتيتان (جم / كجم مادة جافة) :

للأعلاف الخشنة: قيمة الدهن بتحليل بالحامض ثم بالإيثير البترولي= ٣,٠٤+٠,٩١١ قيمة الدهن بثاني إيثيل الإثير .

وللأعلاف المركزة : قيمة الدهن بتحليل بالحامض ثم بالإيثير البترولي =– ٤,٠٢+٠,٩٧٤ قيمة الدهن بالتحليل بالحامض ثم بثاني إيثيل الإيثير .

٣ ـ استخلاص المواد الغنية بالسكر :

مع المواد الغنية بالسكريات تستخدم طريقة Rose Gottlieb لتقدير الدهون باستخدام الكحول والأمونيا لترسيب وإذابة البروتينات على الترتيب فيوزن ١٠ جم عينة في الأنبوبة + ١ مل أمونيا واخلط ثم أضف ١٠ مل كحول (٩٥٪) واخلط ثانية ، أضف ٢٥ مل داى

إيثيل إيثير ، وسد الأنبوبة ورج بشدة لمدة دقيقة أضف ٢٥ مل إيثير بترولي ورج بشدة ٣٠ ثانية . بعد تمام الفصل اسحب الدهن (بأنبوبة زجاجة غسيل) إلى دورق مناسب جاف على ١٠٠م وبارد وموزون . أضف للأنبوبة ٥ مل إثير ثم ٥ مل أخرى بدون رج ، انقلها للدورق لغسيل أنبوبة السيفون كرر الاستخلاص بـ ١٥ مل إثير + ١٥ مل إيثير بترولي ، وكرر ذلك مرة أخرى . بخر المذيبات من الدورق وجففه بالدهن على ١٠٠م ، برد وزن إذا ظهرت أي مواد غير دهنية فاغسل الدهن من الدورق بالإثير البترولي ، جفف وأعد الوزن وصحح النتائج .

٤ ـ طريقة جارتون :

ومن طرق تقدير الدهون كذلك طريقة جارتون ، وفيها يوزن ١ جم عينة في كأس ١٠٠ مل مع ٢٥ مل من مخلوط كلورفورم : إيثانول (٢:١) ، ويوضع الكأس على حمام مائي كهربائي ، ويحسب ٢–٣ دقائق من بدء الغليان ، ويرفع الكأس ويرشح بواسطة قمع بخنر (يرشح الرائق فقط) ، وبملوق معدني يتم نقل الراسب المتبقي على ورقة الترشيح بعناية إلى الكأس مرة ثانية ، ويكرر الاستخلاص ٣ مرات بنفس مخلوط المذيبات ونفس الحجم والمدة كل مرة ، وبين كل مرة والأخرى ترشيح كما سبق . يتم الاستخلاص بعد ذلك بطريقة سوكسلت لمدة ٢٠ دقيقة ، والتجفيف على ١٠٥م لمدة ١,٥ ساعة وتكون نسبة الدهون كالتالي :

$$\% \text{ Fat} = 100 - [\ \% \text{ Moisture} + \% \text{ Residue}\ ]$$

١ ـ ومن الملاحظات الواجب مراعاتها عند استخدام جهاز سوكسلت :

١ ـ سد الكستبان بورق الترشيح المطوى أو بالصوف الزجاجي .

٢ ـ تكون القابلة مغسولة جيداً وجافة حتى ثبات وزنها ، ثم تبريدها ووزنها .

٣ ـ ملاحظة مرور تيار الماء في المكثف من أسفل لأعلى .

٤ ـ استخدام حمام مائي يسخن بالكهرباء ، وعدم استخدام اللهب مطلقاً ، منعاً من اشتعال الإيثير .

٥ ـ تلاحظ تكرار عملية Syfoning ، فإن كانت بطيئة يتمم على وجود الكهرباء من عدمه ، وجود تيار ماء بالمكثف ، عدم إحكام أجزاء الجهاز ، اتجاه تيار الماء في المكثف ، وجود ماء بالحمام المائي .... إلخ .

٦ ـ ملاحظة مستوى الماء بالحمام المائي ، فإذا انخفض فزده بماء ساخن حتى يستمر غليان الإيثير بلا انقطاع (إذا زدته بماء بارد) .

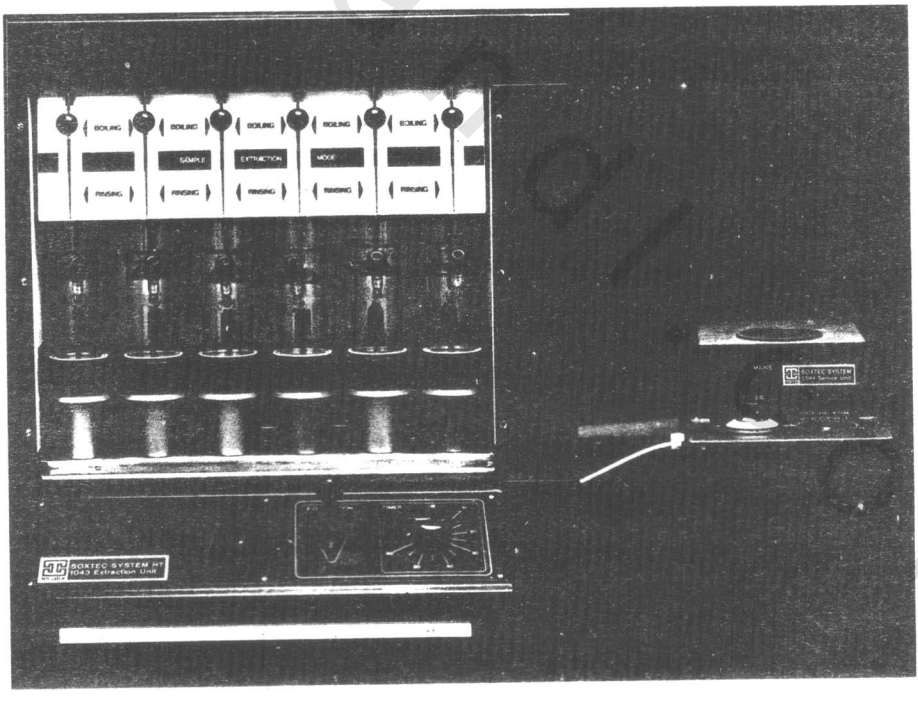
٧ ـ بعد إتمام الاستخلاص أخرج الكستبان من جسم الجهاز ، واستمر في التسخين لتجميع الإيثير من القابلة للجسم ، فيتخلص منه ، ويستمر مرة أخرى في التسخين لتجميع

الإيثير في الجسم ، حتى يبقى الدهن بالقابلة فقط ، فتفصل القابلة للتجفيف على ١٠٥°م لطرد الرطوبة الجوية ، وباقي الإيثير لمدة ١–٣ ساعات ، وتبرد وتوزن لاستنتاج وزن الدهن ونسبته .

$$\text{٪ دهن} = \frac{\text{الفرق بين وزنتي القابلة بعد وقبل الاستخلاص} \times ١٠٠}{\text{وزن العينة}} .$$

٨ ـ قد يستخدم بدلاً من الإيثير البترولي خليط بنسب متساوية من الإيثير البترولي مع الداي إيثيل إثير ، أو يستبدل ذلك الخليط بالكلورفورم .

وعادة في الأغذية الغنية بالدهون تستنتج محتواها الدهني بطرح باقي المكونات من ١٠٠ لحساب النسبة المئوية للدهن . ويحسن تجفيف الدهن المستخلص على ٧٠° م لمدة ١٦ ساعة بدلاً من الحرارة الأعلى . وعند الاستخلاص للدهن بالرج مع المذيبات ونقل المذيب المستخلص لإناء سابق وزنه ، فقد يتكون مستحلب هذا المستحلب يمكن تكسيره بالطرد المركزي . وهناك أجهزة حديثة لتقدير الدهن بنفس فكرة سوكسلت يتم فيها استخلاص عديد من العينات في آن واحد وفي وقت قصير جداً ٣٠–٦٠ دقيقة وهناك أجهزة أخرى تعتمد في قياسها للدهون على اختلاف كثافة مخاليط الدهن / المذيب .



شكل (٣١) جهاز سوكسلت حديث

٥ ـ دهن اللبن :

تقدر نسبة دهن اللبن سواء فى اللبن الخام ، أو المبستر ، أو المجنس ، أو المحفوظ باستخدام أنابيب جربر Gerber القياسية (طول ١٩٠ مم ، طول العنق ١٥ مم ، العنق والجسم اسطوانى ، قطر داخلى للعنق ١١,٥ مم ، حجم الجسم ٢١,٥ مل ، الجزء المدرج طوله ٧٠ مم) كالتالى :

١ ـ قس ١٠ مل حمض كبريتيك مركزاً ، وانقلها إلى أنبوبة جربر ، وانقل إليها بحذر بواسطة ماصة خاصة ١١ مل لبن ، انتظر ٣ ثوان . أضف ١ مل كحول أيزوأميل isoamil alcohol ، وضع سدادة أنبوبة جربر .

٢ ـ امسك أنابيب جربر عند الجزء المدرج ، ورج حتى تمام الهضم ، ثم احذر الحرارة، وامسك عند العنق والسدادة ، واقلبها ٤ مرات على الأقل لخلط الحامض بباقى المحتويات ، ثم رقمها وضعها فى جهاز الطرد المركزى الخاص بهذه الأنابيب للطرد المركزى بسرعة ١١٠٠ لفة / دقيقة .

٣ ـ اطرد مركزيا لمدة ٤ دقائق ثم اقرأ تدريج عمود الدهن بعد وضع الأنابيب فى حمام ماء على ٧٠° م لمدة ٣ ـ ٤ دقائق ، تطرح قراءة الابتداء من قراءة الانتهاء ، وإذا زاد الفرق بين قراءتى المكررتين لنفس العينة عن ٠,١ ٪ يعاد التقدير .

هذا ويمكن تقدير الدهن فى اللبن ومنتجاته (وفى الأغذية الحيوانية) بطريقة روز جوتليب Roese - Gottlieb بالاستخلاص بالإيثير الإيثيلى ، والإيثير البترولى ، إذ يؤخذ ١٠ جم عينة + ١,٢٥ ـ ٢,٠ مل هيدروكسيد أمونيوم + ١٠ مل كحول (٩٥ ٪) ثم ٢٥ مل إيثير دى إيثيلى ، وتسد الأنبوبة المحتوية على العينة والمستخلص ، وترج بشدة لمدة دقيقة ، ثم تبرد ويضاف ٢٥ مل إيثير بترولى ، ويكرر الرج الشديد مع الحذر لزيادة الضغط الداخلى أثناء الرج . أطرد مركزياً على حوالى ٦٠٠ لفة / دقيقة ، أو اتركها تستقر لحين تكون طبقة سائلة عليا رائقة . انقل طبقة الإيثير إلى دورق موزون . اغسل السدادة بمقدارين متساويين من الإيثيرين ، وأضفهما إلى الدورق . كرر الاستخلاص للسائل المتبقى فى الأنبوبة مرتين باستخدام ١٥ مل من كل إيثير كل مرة . بخر المذيبات تماماً على سخان أو حمام مائى . جفف الدهن حتى ثبات الوزن على ١٠٠ ـ ١٠٢° م ، أو تحت تفريغ على ٧٠ ـ ٧٥° م ، أعد الوزن للدورق فالزيادة هى وزن الدهن .

كما يمكن تقدير الدهن فى اللبن بطريقة سوكسلت ، بأن تشبع أوراق آدم الجافة Adam's Paper (بدلاً من الكستبان) بكم معلوم من اللبن ، ثم تجفف هوائياً ثم فى فرن على ٦٠° م لمدة ساعة ، ثم على ١٠٢° م لمدة ٣ ساعات ، ثم تستخدم فى الجزء الأوسط من الجهاز بدلاً من الكستبان ، ويقدر الدهن بالطريقة العادية بالاستخلاص بالإيثير .

٦ ـ الدهون فى البيض والأنسجة الحيوانية :

يقدر دهن البيض بالاستخلاص فى كلورفورم / إيثانول (١/١) كالتالى :

١ ـ يؤخذ ١٢ مل بيضاً كاملاً سائلاً (٥ مل صفاراً سائلاً) فى دورق معيارى ١٠٠ مل + ٢٥ مل مخلوط مذيبات (كلورفورم / إيثانول) ورج ثم أضف ٦٠ مل أخرى من مخلوط المذيبات . رج كل ٥ دقائق لمدة ساعة . أكمل إلى العلامة . اتركه حتى يروق (الألبيومين السائل يؤخذ ٦٠ مل عينة ، وتوضع فى حمام بخار ، ثم تجفف فى فرن لمدة ٩٠ دقيقة على ٩٨ ـ ١٠٠° م ، برد وزن ٥ جم مادة صلبة فى دورق معيارى ١٠٠ مل وعامله كما سبق) (وفى حالة منتجات البيض الجافة يؤخذ ٣ جم بيضاً كاملاً ، أو ٢ جم صفاراً ، أو ١٠٠ جم البيومين) .

٢ ـ يؤخذ ٥٠ مل من الرائق للمذيبات فى كأس وتبخر حتى الجفاف على حمام بخار، ثم تجفف ١٥ دقيقة على ٩٨ ـ ١٠٠° م .

٣ ـ أذب المتبقيات فى ١٠ مل كلورفورم ، ورشحها خلال سدادة من الصوف والقطن فى ساق قمع إلى كأس ١٠٠ مل جافة موزونة ، واغسل بمقدر ١٠ مل كلورفورم أخرى . جفف ٩٠ دقيقة ، وأعد الوزن ، واحسب كمية الدهون .

ويلاحظ أنه يمكن الاستخلاص بجهاز سوكسلت للمنتجات الجافة مع استخدام مخلوط مذيبات من الكلورفورم والإيثانول .

كما يمكن التحليل المائى بالحامض أولا ، إلا أن قيم الدهن المستخلصة بهذه الطريقة حوالى ٩٠ ٪ من قيم الدهن المقدرة مباشرة بالاستخلاص بمخلوط الكلورفورم / إيثانول .

وقد يتم التحليل المائى بالحامض للبيض أو اللبن أو مواد العلف أو السمك وخلافه ، بوضع ١٠ جم عينة فى أنبوبة مع ١٠ مل حمض هيدروكلوريك مركزاً ، ثم تغمس الأنبوبة فى حمام ماء لإزالة البروتين ، ويتحول لون العينة إلى البنى ، ويتجمع الدهن على السطح. برد الأنبوبة تحت ماء جار ، واستخلص الدهن بأى من الطرق المختلفة ، وابسطها بالرج مع ٣٠ مل دى إيثيل إيثير فى قمع فصل ، ونقل المستخلص إلى دورق سبق وزنه . وتساعد عملية الفصل بإضافة قليل من الكحول . كرر الاستخلاص ٣ مرات ، مع جمع المستخلص كل مرة ، وتجفيف الدهن على ١٠٠° م . برد وزن لحساب وزن الدهن .

كما قد يقدر دهن البيض كذلك بطريقة روزجوتليب (ويقدر الليسيثين بضرب محتوى الفوسفور فى ٢٥,٥).

وقد يقدر الدهن فى الأنسجة الحيوانية (مخ ، كبد ، عضلات ، بلازما ...) بتجنيسها مع مخلوط مذيبات من الكلورفورم والميثانول (١/٢) ، ثم غسيل المستخلص هذا (بمقدار ٢٠ ٪ من حجمه) بالماء أو محلول ملحى ، فتنتقل الدهون الخام الكلية إلى الطبقة السفلى،

وتهمل الطبقة العليا بسحبها بماصة .

والدهن فى السمك : يختلف محتواه فى عضلات السمك حسب التغذية والموسم والنوع . وتتركز الدهون فى اللحم الأحمر والبطن .

ويتكون دهن العضلات من مخلوط معقد من دهون متعادلة (جلسريدات ثلاثية) ، ودهون قطبية أو بولارية (فوسفوليبيدات) ، ومركبات أقل (ستيرولات ، وأسترات استيرولات، وأحماض دهنية حرة وخلافه) . ونسبة كل من هذه المركبات تتوقف كذلك على نوع السمك والموسم .

ويقدر المحتوى الدهنى فى عضلات السمك بالتجفيف والتحليل بالحامض ثم الاستخلاص بالهكسان أو الإيثير البترولى ، أو قد تهضم بالحامض وتطرد مركزياً للفصل الكمى ، أو تستخلص سريعاً بالأسيتون أو مخلوط الكلوروفورم والميثانول أو مخلوط كلوروفورم/ ميثانول / ماء (١,٨/٢/٢) .

ويقدر دهن السمك بأخذ مستخلص السمك وخلطه مع كلوروفورم وميثانول وماء (١٠ : ١٠ : ٨) ثم يطرد مركزياً وتؤخذ طبقة الكلوروفورم (أو جزء منها) فى كأس جاف موزون ويبخر ويعاد تجفيفه ووزنه لمعرفة وزن الدهن .

٧ ـ الدهون الكلية فى الدم والأنسجة :

يعامل الدم بمانع تجلط (EDTA) ثم يؤخذ منه ٠,١ مل + ٣ مل حمض كبريتيك مركزا، ويخلط ١٠ ثوان ، ثم يوضع فى حمام ماء يغلى ١٠ دقائق ، ثم تبرد الأنابيب . يجرى نفس الشىء على محلول قياسى (٨جم/لتر مخلوط استرات أحماض دهنية غير مشبعة) . يؤخذ ٠,١ مل من كل من العينة والمحلول القياسى ، وكذلك من حمض كبريتيك مركز (بلانك) فى ٣ أنابيب مختلفة ، ويضاف إلى كل منها ٣ مل دليل (٨٠٠ مل حمض فوسفوريك/لتر فيه ١,٢ جم ڤانيلين/لتر) . اخلط ١٠ ثوان واترك الأنابيب فى ظلام ٣٠ دقيقة ، ثم قدر الكثافة الضوئية (ثابتة لمدة ٢٠ دقيقة) على ٥٢٥ نانومتر

واحسب تركيز الدهون الكلية جم/لتر = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٨}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسى}}$.

وتزيد دهون الدم الكلية إما لزيادة الدهون الحقيقية ، أو لزيادة الكوليسترول ، أو لعرض كلوى، أو لالتهاب البنكرياس ، أو لتليف الكبد الصفراوى ؛ بينما تقل دهون الدم لاضطرابات الامتصاص للدهن ، أو لنقص التغذية أو لفشل البنكرياس .

وتستخدم نفس طريقة السلفوفوسفوڤانيلين لتقدير الدهون الكلية فى الأنسجة ، اعتماداً أيضاً على قدرة نواتج ميتابوليزم الليبيدات غير المشبعة على التفاعل مع دليل الفوسفوڤانيلين وإنتاج معقد ملون تتناسب شدة لونه مع تركيز الليبيدات الكلية ، فيتم تجنيس ٠,١ جم من النسيج فى ٥ مل مخلوط ميثانول / كلوروفورم (١/٢) ، يؤخذ ٠,١ مل من ناتج التجانس

إلى أنبوبة اختبار جافة ، ويضاف إليها ٢,٩ مل حمض كبريتيك مركز ، اخلط جيداً ثم ضعها فى حمام ماء يغلى لمدة ١٠ دقائق ، برد أسفل تيار ماء صنبور ، انقل ٠,٢ مل من محتوى الأنبوبة الباردة إلى أنبوبة أخرى محتوية على ٣ مل دليل فوسفوفانيلين (٤ أجزاء من حمض أورثوفوسفوريك مراكزاً مع ١ جزء من محلول مائى ٠,٦ ٪ فانيلين فى زجاجة قاتمة) . اخلط جيداً واتركها فى مكان مظلم لمدة ٤٥ دقيقة . عد أنبوبة مقارنة من ٠,١ مل محلول ملحى (٠,٩ ٪ ص كل) مع ٢,٩ مل حمض كبريتيك واجر عليه ماسبق كما فى العينة . عد كذلك منحنى قياسياً من عدة حجوم متدرجة (٠,١ ـ ٠,٥ مل) من محلول كوليسترول قياسى (١٠٠ مجم /١٠٠ مل كلوروفورم) وأكمل إلى ٣ مل بحمض الكبريتيك المركز ، وأكمل كما فى العينة والمقارنة . اقرأ الكثافة الضوئية على طول موجة ٥٥٠ نانومتر ، واحسب تركيز الليبيدات الكلية (مجم / جم) = م × ٢٠ حيث (م) الكمية المستخرجة من المنحنى القياسى .

٨ ـ الكوليسترول Cholesterol :

١ ـ زن ١ ـ ٢ جم عينة بالضبط + ١٠ مل هيدروكسيدبوتاسيوم ٦٠ ٪ وترفع على حمام ماء ساخن ٣ ساعات .

٢ ـ برد وأضف إيثانول ورج ، واستخلص ٣ مرات × ٥٠ مل دى إيثيل إيثير واجمع مستخلصات الإيثير .

٣ ـ انقل المخلوط فى قمع فصل مع ١٠٠ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ١٠ ٪ ، ورج واترك لفصل الطبقات .

٤ ـ أضف ٥٠ مل دى إيثيل إيثير للطبقة المائية ، ورج وافصل واجمع طبقات الإيثير .

٥ ـ رج طبقات الإيثير المجتمعة مع ٢٥ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ٢ مولر ، ثم مع ٢٥ مل حمض هيدروكلوريك ٢مولر ، ثم مرتان × ٢٥ مل ماء مقطراً . جفف طبقة الإيثير على كبريتات الصوديوم ، اغسل كبريتات الصوديوم عدة مرات بالإيثير .

٦ ـ بخر الإيثير ، أضف ٢ مل إيثير للذوبان لكل المادة غير المتصبنة ، أضف ٠,٢ مل برومين ، واترك المخلوط فى حمام ثلجى ١٠ دقائق .

٧ ـ أضف بسرعة ١٥مل حمض خليك ٨٠ ٪ ، واستمر ١٠ دقائق أخرى على حمام الثلج .

٨ ـ رشح على بوتقة جوتش Gooch Crucible ، واغسل بحمض خليك بارد كالثلج ، ثم اغسل ٣ مرات بماء بارد كالثلج ، ثم بالكحول (١٠مل) ، ثم ٤ مرات × ٥مل دى إيثيل إيثير ، ثم مرتان × ٥ مل كحول إيثانول .

٩ ـ أضف ١ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ١٠ ٪ إلى مخلوط الإيثير ـ كحول ، وبخر

حتى الجفاف .

١٠ ـ أضف ٥٠ مل ماء إلى المتبقيات ، وعادل بحمض هيدروكلوريك ٦ مولر ، ثم أضف ١٠ جم كلوريد صوديوم + ٣ جم فوسفات صوديوم + ٢٠ مل هيبوكلوريت صوديوم ، اغل ثم ابعد عن اللهب ، وأضف ببطء ٥ مل فورمات صوديوم ٥٠ ٪ .

١١ ـ برد بسرعة ، وأضف ١٠٠ مل ماء + ٥ مل يوديد بوتاسيوم ٢٠ ٪ + نقطتين موليبيدات أمونيوم ٥ ٪ + ٢٥ مل حمض هيدروكلوريك ٦ مولر ، وعاير بالثيوكبريتات صوديوم ٠,٠٢ مولر فى وجود دليل نشا طازج (١ ٪) . استنتج تركيز الكوليسترول حيث إنه = ٠,٥٥ + (٠,٦٨٨×ح) حيث ح هى حجم الثيوكبريتات المستخدمة فى المعايرة .

كما يمكن تقدير الكوليسترول بالتفاعل مع كلوريد الحديديك فى وجود حمض الخليك وحمض الكبريتيك فينتج لون أرجوانى تتناسب شدته مع تركيز الكوليسترول . فيؤخذ ٠,١ مل من البلازما وينقل إلى ٣ مل حمض خليك ثلجى فى أنبوبة اختبار جافة ، ثم يضاف إليها ٢ مل دليل لون (٢مل محلول كلوريد حديديك تركيز ١٠ ٪ فى حمض خليك ثلجى تخفف إلى ٢٠٠ مل بحمض كبريتيك مركزا) ، واخلط وقس الكثافة الضوئية على ٥٦٠ نانومتر . استخدم مقارنة من ٣ مل حمض خليك ثلجى مع ٠,١ مل محلول ملح الطعام ٠,٩ ٪ وأكمل كما فى العينة . قارن بحجوم متدرجة (٠,١ ـ ٠,٥ مل) محلول قياسى من الكوليسترول (١٠٠مجم / ١٠٠ مل حمض خليك ثلجى) مع ٣ مل حمض خليك ثلجى مع ٠,١ مل محلول ملحى مع ٢ مل دليل لون لرسم المنحنى القياسى .

٩ـ جودة الدهون :

يتواجد الدهن طبيعياً فى الأغذية بنسب متفاوتة أقلها فى الأغذية النباتية ، وتلعب نسبة الدهن فى مواد العلف دوراً هاماً من حيث قيمة الغذاء الحرارية ، بل يمتد أثرها عند زيادة نسبتها فى العليقة إلى التأثير على تركيب وكمية دهن المنتجات الحيوانية . إلا أن زيادة الدهن فى العليقة تقلل من قيمة بروتينها المهضوم لقلة القيمة الحرارية للبروتين المهضوم ؛ لذلك فإن إضافة نتائج استخلاص الزيوت من البذور الزيتية فى العلائق أفضل من إضافة الكسب ناتج العصر ، إذ إن الأول يسمح (بجانب الدهن) بأن يمد العليقة ويكملها بروتينياً . وللحكم على مواد العلف الغنية بالدهون أو على الدهون المضافة للأعلاف فإن من الأهمية بمكان تقدير النقاوة والهضم والقيمة الحرارية والطزاجة والمحتوى الدهنى وتأثير الدهن على المنتجات الحيوانية وجودتها .

وللنقاوة فى الدهون تقدر الجزء غير القابل للتصبن ، فالدهون تحتوى على جزء لا يمد العلف بطاقة ، مثل المواد الملونة ، والستروبدات ، والشموع ، والزيوت ، والدهون المعدنية ،

عكس الجليسريدات الثلاثية والفوسفاتيدات ، والأحماض العضوية التى تتصبن بالبوتاسا الكاوية الكحولية الساخنة . فالدهون الحقيقية تحتوى عادة على أقل من ٥ ٪ أجزاء غير قابلة للتصبن ، تلاحظ كذلك المحتوى المائى للدهون ، إذ إن زيادة الرطوبة ، تؤدى للتلف الميكروبى ، فلا ينبغى ارتفاع الرطوبة عن ٢ ٪ .

وتتوقف القيمة الحرارية على الطاقة الكلية والطاقة المهضومة . وتتعلق الطاقة الكلية بطول السلاسل ، ودرجة التشبع للأحماض الدهنية وهى تنحصر مابين ٣٧ ـ ٤١ ميجاجول / كيلوجرام . وتقلل الروابط المزدوجة من القيمة الحرارية للدهن بمقدار حوالى ١٢٦ ـ ٢١٠ كيلوچول/رابطة مزدوجة . وللحكم على أطوال سلاسل الأحماض الدهنية يلزم تعيين رقم التصبن ، ورقم الإستر ، وللحكم على درجة التشبع نعين الرقم اليودى .

وتعيين رقم الحموضة يوضح تحرر الأحماض الدهنية نتيجة التزنخ . ورقم البيروكسيد يوضح الأكسدة فى الروابط المزدوجة . فللحكم على طزاجة الدهن يقدر رقم الحموضة ، ورقم البيروكسيد ، ورقم الألدهيد (بنزيدين) ، والتصبن ، ورقم الإستر ، والعدد اليودى ، وفيما يلى وصف لتقدير بعض هذه الصفات فى الزيوت والدهون .

أ ـ نقطة الانصهار Melting Point :

أحد مقاييس الدهن الواجب تعيينها ، فيصهر الدهن على درجة حرارة أعلى قليلاً بعدة درجات مئوية عن درجة انصهاره ، اغمس أنبوبة زجاج شعرية دافئة فى الدهن السائل ، واسمح للعينة بالارتفاع فى الأنبوبة الشعرية . ارفع الأنبوبة بسرعة ، وامسح سطحها الخارجى وسد طرفها جهة الدهن . جمد الدهن بالتبريد فى ثلج . اترك الأنبوبة بالعينة على ١٥ ـ ٢٠° م لمدة ٢٤ ساعة . اربط الأنبوبة الشعرية بالدهن ملاصقة لمستودع الزئبق لترمومتر بواسطة شريط مطاط ، واغمس مستودع الترمومتر والأنبوبة الشعرية كاملة (بالدهن) فى كأس به ماء بارد ومقلب زجاجى . ارفع درجة الحرارة ببطء ودوّن درجة الحرارة التى عندها يتشكل هلال عند سطح الدهن (وهى درجة الانصهار الأولية) ، ثم التى عندها يبدأ الدهن فى الارتفاع فى الأنبوبة (وهى درجة السيولة Slip Point) . وهاتان الدرجتان تقدران للأنابيب الشعرية المفتوحة ، أما إن كانت الأنبوبة مسدودة فتقدر درجة الانصهار وهى التى تروق فيها العينة تماماً .

ب ـ تصبن الزيوت والدهون :

يستخدم فى تحليل الزيوت مايعرف برقم التصبن Saponification Number ، وهو عدد ملليجرامات KOH اللازمة لتصبن جرام واحد من الزيت أو الدهن . وتقدر بتسخين وزن معلوم من الزيت أو الدهن مع حجم معلوم من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم ذو تركيز معروف ، ثم معادلة ماتبقى من KOH (بمحلول معلوم القوة من حمض) بعد التحليل

المائى للدهن ، وهو الباقى من القلوى دون تفاعل ، وتكون عدد مكافئات الزيت أو الدهن (الإستر) مساوياً لعدد مكافئات القلوى مطروحاً منها مكافئات القلوى المتبقية (أى عدد مكافئات الحمض المستهلكة فى معادلة الزائد من القلوى) . ويفضل استخدام البوتاسا الكاوية عن الصودا الكاوية ؛ لأن فى الأولى يكون صابونها رخواً يمتزج بالماء .

الخطوات :

١ ـ زن بالضبط ٢ ـ ٣ جم عينة زيت أو دهن فى دورق مخروطى سعة ٢٥٠ مل دون تلوث الجدران ، ثم أضف إليها بالماصة ٢٥ مل محلول هيدروكسيد بوتاسيوم كحولية ٠,٥ عيارى (معلومة بالضبط) (تحضر بإذاب ٢٨ جم KOH فى أقل كمية ماء مقطر ، ويترك ليبرد تماماً ، ثم يكمل بالكحل إلى لتر ، ويترك ٢٤ ساعة ، ثم يرشح فى زجاجة بنية اللون وتسد جيداً) .

٢ ـ رج الدورق جيداً ، ثم ثبت على فوهته مكثفاً عاكساً ، وسخن على حمام مائى لمدة نصف ساعة (ساعتين للشموع) ، مع رج الدورق من حين لآخر حتى تمام التصبن برواق لون المحلول تماماً واختفاء حبيبات الدهن من قاع الدورق .

٣ ـ يرفع المكثف ، ويضاف بعد التبريد نقط من دليل فينولفثالين ، ثم يعادل الزيادة من القلوى بواسطة حمض HCl ٠,٥ عيارى (معلوم العيارية بالضبط) .

٤ ـ تعاد نفس الخطوات مع عدم إضافة زيت Blank ؛ وذلك لاستبعاد أثر وجود CO_2 أو لجهل عيارية KOH بالضبط .

الحساب :

رقم التصبن = (ح١ ـ ح٢) × ع × ٥٦,١ × ١٠٠ / وزن الزيت بالجرام .

حيث : ح١ = حجم HCl المستعمل فى التعادل للتجربة الخالية Blank .

ح٢ = حجم HCl المستعمل فى التعادل للتجربة بالزيت .

ع = عيارية HCl .

٥٦,١ = الوزن المكافئ للقلوى .

إذ إن الفرق بين عدد مكافئات الحمض للتجربة الخالية والتجربة بالزيت يعبر عن عدد مكافئات القلوى المستهلك فى تصبن الزيت ، وتستعمل هذه الطريقة فى حالة مجهولية عيارية القلوى .

والطريقة الأخرى فى الحساب :

عند معلومية قوة القلوى ، وهنا لا تجرى تجربة خاوية Blank ،وإن كانت هذه الطريقة أقل دقة من الطريقة الأولى .

رقم التصبن = [(ح١ × ع١) ـ (ح٢ × ع٢)] × ٥٦,١ / وزن الزيت بالجرام .

حيث إن ح١ = حجم القلوى المستعمل فى التصبن .

ع١ = عيارية القلوى .

ح٢ = حجم الحامض اللازم للتعادل بعد تمام التصبن .

ع٢ = عيارية الحامض .

٥٦,١ = الوزن المكافئ للقلوى .

ورقم التصبن = رقم الإستر + رقم الحامض .

جـ ـ رقم الإستر :

ولتعيين رقم الأستر يطرح رقم الحامض من رقم التصبن ، ويعتبر رقم التصبن مساوياً لرقم الإستر إذا كان رقم الحامض مساوياً صفراً . قيمة التصبن من أهم الثوابت للزيت أو الدهن وهو مقياس لمتوسط الوزن الجزيئى للعينة ، فكلما كان رقم التصبن كبيراً ، كلما كان الوزن الجزيئى صغيراً .

د ـ رقم الحامض للزيوت والدهون (رقم الحموضة) :

Acid Value (Number)

ويعرف رقم الحامض Acid number بعدد ملليجرامات KOH اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية المنفردة الموجودة فى جرام واحد من زيت أو دهن .

والزيوت والدهون حديثة التحضير الحيوانية الأصل تكون خالية تماماً من الأحماض الدهنية المنفردة ، بينما الزيوت النباتية تحتوى على كميات بسيطة من هذه الأحماض . وتزداد كمية الأحماض الدهنية المنفردة تدريجياً بتخزينها نتيجة عمليات الانحلال ، فتكسب هذه الأحماض المنفردة طعماً ورائحة كريهتين غير مقبولة للزيوت ، وتعرف الزيوت حينئذ بأنها تزنخت .

الخطوات :

١ ـ يوزن بالضبط ٣ ـ ٥ جم زيتاً أو دهناً فى دورق مخروطى ، ويضاف إليها ٢٥ مل من الكحول أو الإيثير أو رابع كلوريد الكربون (الدهون المتجمدة أو الشموع تذاب أولاً بعد وزنها فى ٢٥ مل إثير ثم يضاف إليها ٢٥ مل كحولا ، والمذيبات يجب أن تكون متعادلة أو يعمل لها تجربة خالية Blank) .

٢ ـ يضاف نقط من دليل فينولفثالين ، ثم نقط بمحلول KOH معلوم القوة بالضبط (٠,٢ عيارى) حتى ظهور أول لون قرمزى ، يستمر بضعة ثوان بعد رج المحلول بهدوء .

ملاحظات :

أ ـ يمكن استعمال قلوى تركيز ١ ,٠ عيارى إذا كانت درجة الحموضة منخفضة .

ب ـ الرج الشديد يساعد على زوال اللون بعد انتهاء التعادل؛ نظراً لأن الكمية الزائدة من القلوى عن معادلة الحمض تستهلك فى تصبن الجليسريدات المتعادلة ، وبذلك يرتفع رقم الحامض وتكون نتيجة التقدير خطأ .

الحساب :

رقم الحامض = حجم القلوى اللازم للتعادل × عياريته × ١ ,٥٦ / وزن العينة جم .

٪ لحمض الأوليك فى العينة = حجم القلوى × عياريته × ٠ ,٢٨٢ × ١٠٠ / وزن العينة جم .

حيث إن ٠ ,٢٨٢ مللى مكافئ حمض أوليك .

١ ,٥٦ مكافئ القلوى

وإن عدد مكافئات القلوى = عدد مكافئات حمض الأوليك .

ورقم الحامض أو الأحماض الدهنية الحرة يعبر عنها فى معظم أنواع الزيوت والدهون كحامض أوليك ، بينما فى زيوت جوز الهند ونوى النخيل يعبر عنها كحامض لوريك ، وفى زيت النخيل كحامض بالميتيك كالتالى :

$$\text{٪ أحماض دهنية حرة كأوليك} = \frac{\text{مل قلوى} \times \text{عياريته} \times ٢٨,٢}{\text{وزن العينة}}$$

$$\text{٪ أحماض دهنية حرة كلوريك} = \frac{\text{مل قلوى} \times \text{عياريته} \times ٢٠}{\text{وزن العينة}}$$

$$\text{٪ أحماض دهنية حرة كبالميتيك} = \frac{\text{مل قلوى} \times \text{عياريته} \times ٢٥,٦}{\text{وزن العينة}}$$

هـ ـ العدد اليودى أو الرقم اليودى :

يكون اليود مركبات إضافية باتحاده مع الروابط الزوجية الموجودة فى الأحماض الدهنية غير المشبعة الداخلة فى تكوين الجليسريدات ، وعلى ذلك فإن كمية اليود المستهلكة تتناسب طرديا مع عدد الروابط الزوجية فى المادة الدهنية . والرقم اليودى مقياس لدرجة عدم تشبع الدهون ، أى مقياس لقدرتها على الأكسدة ، والعدد اليودى Iodine Value هو عدد جرامات اليود التى تتفاعل مع ١٠٠ جرام دهناً أو زيتاً (أى عدد جرامات اليود اللازمة لتشبع الروابط الزوجية) .

المحاليل :

١ ـ محلول ويج Wij اليودى ، ويحضر بإذابة ١٢,٦ جم يود فى حامض خليك ثلجى ، ويكمل إلى لتر بحمض الخليك . يقسم المحلول قسمين متساويين ويمرر كلور جاف فى أحداهما حتى يصبح لونه مائلاً للاحمرار ، وعند تنقيطه بثيوكبريتات صوديوم عيارى يستهلك الحجم منه ضعف الكمية من الثيوكبريتات التى سبق أن استهلكت لنفس الحجم قبل تمرير الكلور ، بعد ذلك يخلط القسمان على بعض ويرج جيداً ، ويكون المحلول محتوياً على هاليد اليود ، الذى يتفاعل مع الروابط الزوجية أسرع من اليود ، فالمحلول عبارة عن ثالث كلوريد اليود مذاباً فى حمض الخليك الثلجى .

٢ ـ محلول ثيوكبريتات صوديوم $Na_2S_2O_3$ ٠,١ عيارى معلوم القوة .

٣ ـ كلورفورم .

٤ ـ دليل ١ ٪ نشا (إذا كان النشا غير ذائب فيرشح قبل الاستعمال) .

الخطوات :

١ ـ زن بالضبط ٠,٢ ـ ٠,٥ جم زيتاً أو دهناً فى دورق مخروطى سعته ٢٥٠ مل محكم الغطاء الزجاجى .

٢ ـ أضف حوالى ٢٥ مل كلورفورم + ٢٥ مل بالضبط من محلول ويج اليودى ، وسد الدورق مباشرة ورجه جيداً ، ثم ضعه نصف ساعة فى مكان مظلم .

٣ ـ نقط محتويات الدورق بعد ذلك بمحلول ثيوكبريتات الصوديوم المعلوم القوة ، وعندما يصل لون المحلول بالدورق إلى اللون الأصفر الفاتح أضف حوالى ١ مل دليل نشا ، ورج الدورق جيداً ، ثم استمر فى إضافة محلول الثيوكبريتات ، مع الرج حتى زوال اللون الأزرق .

٤ ـ اجر تجربة خالية Blank بدون إضافة الزيت ، لتقدير المكافئات الكلية لليود الذى أضيف للتفاعل مع الزيت .

الحساب :

العدد اليودى = (ح١ − ح٢) × ع × ١٢٦,٩ × ١٠٠ / ١٠٠٠ × وزن العينة .

حيث إن ح١ = حجم الثيوكبريتات مل اللازمة للتعادل فى التجربة الخالية .

ح٢ = حجم الثيوكبريتات مل اللازمة للتعادل فى التجربة الأصلية .

ع = عيارية الثيوكبريتات .

١٢٦,٩ = الوزن المكافئ لليود .

ملاحظات :

قد يستبدل الكلورفورم برابع كلوريد الكربون ، كما قد يستبدل محلول ويج بمحلول يود أحادى الكلور : [أ ـ بإذابة ١٣ جم يود فى خليط من ٣٠٠ مل رابع كلوريد كربون + ٧٠٠ مل حمض خليك ثلجى ثم إضافة محلول من ١٥ جم يوديد بوتاسيوم فى ١٠٠ مل ماء إلى ٢٠ مل من هذا الخليط السابق . أو ب ـ بإذابة ٨ جم أيودين ثلاثى الكلوريد + ٩ جم يود فى ٣٠٠ مل رابع كلوريد كربون ، وأكمل إلى لتر بحمض الخليك الثلجى، ويحفظ فى مكان مظلم منخفض الحرارة] ، ويحضر محلول ٠,١ عيارى ثيوكبريتات صوديوم بإذابة ٢٤,٨ جم من المادة النقية ١٠٠ مل ماء وأكمل إلى لتر ، ثم إذابة ٠,٣٥٦٨ جم يودات بوتاسيوم مجففة على ١١٠° م ويكمل الحجم إلى لتر (٠,٠١ عيارى) وتعاير الثيوسلفات باليودات فى وجود دليل نشا .

يجب إذابة العينة أولاً إن لم تكن سائلة ، وترشح إن كانت غير نقية لإزالة الشوائب والماء ، والعينة المأخوذة يجب أن تضمن وفرة اليود في كمية محلول Wij ، لذلك يجب حسابها بالجرام (٢٦/رقم اليود المتوقع) .

محلول Wij حساس للحرارة والرطوبة والضوء فيخزن فى مكان بارد مظلم ولا يجب تعرضه لحرارة أعلى من ٣٠° م .

و ـ الأحماض العضوية :

لها أهمية فى مواد العلف لتأثيرها على طعم العلف وقيمته الغذائية ، ووجودها فى صورة حرة فى الدهون والزيوت دلالة على التحلل المائى للجليسريدات أو تزنخها ، والأحماض العضوية معظمها أحماض هيدروكسيلية ، تحتوى مجموعة أو أكثر من الكربوكسيل ، وهى عديمة الأزوت ، ويمكن استخلاصها بالإيثير من المحاليل المائية المحمضة ، أى يمكن أسترتها ، وبعضها متطاير ؛ لذا من المهم تقدير الحموضة سواء كلية أو ثابتة أو معايرة .

ز ـ الحموضة Acidity أو الحموضة المعاير Titratabel Acidity :

لتقدير حموضة مادة علف ، يؤخذ منها كمية كافية لتعطى تنقيط كاف ، وهذه العينة يتراوح وزنها مابين ١٠ إلى ٥٠ جم ، يضاف إليها ٥٠ مل ماء مقطراً (وإذا كانت العينة غير ذائبة فى الماء فيضاف إليها ٥٠ مل كحولاً متعادلاً) وتقلب . نقط بالصودا الكاوية ٠,١ عيارى فى وجود دليل الفينولفثالين حتى نقطة التعادل (فى العينات الملونة بشدة يجرى التعادل بقياس التغيير فى PH) ، وظهور اللون البنفسجى الثابت [يفضل التنقيط على الساخن ، أو مع التقليب ، والرج المستمر تحت تفريغ ، أو بالغليان وذلك

للتخلص من CO_2 لتجنب زوال لون الدليل عند انتهاء التعادل بتفاعل حمض الكربونيك مع أيونات الهيدروكسيل ، فيفقد الدليل القدرة على إظهار تغييرات اللون . مع عدم التسخين لمدة طويلة حتى لا يفقد جزءاً من الأحماض المتطايرة فيؤثر على النتيجة ، فيكفى التسخين أو الغليان ٣٠ ـ ٦٠ ثانية ، أو قد يضاف ماء مغلى متعادل للمستخلص] ، وفى حالة العينات الملونة بشدة يتم تخفيفها قبل التنقيط ، مع مراعاة عامل التخفيف عند حساب الحموضة . ويتم حساب الحموضة الكلية Total acidity كنسبة مئوية وزنية كالتالى:

٪ حموضة كلية = حجم القلوى المستخدم × عياريته × حجم العينة الكلى × الوزن المكافئ للحامض × ١٠٠ / الحجم من العينة المعاير × وزن العينة × ١٠٠٠ .

وعادة تقدر الحموضة فى مواد العلف فى صورة حمض أوليك الذى وزنه المكافئ ٢٨٢,٤٦ . وفيما يلى الأحماض العضوية وأوزانها المكافئة لكل ١ مل من القلوى ١,٠ عيارى (العامل) :

الحامض	وزنه الجزيئى	وزنه المكافئ	العامل
خليك	٦٠,٠٥	٦٠,٠٥	٠,٠٠٦٠
بيوتريك	٨٨,١٠	٨٨,١٠	٠,٠٠٨٨
لاكتيك	٩٠,٠٨	٩٠,٠٨	٠,٠٠٩٠
ماليك	١٣٤,٠٩	٦٧,٠٥	٠,٠٠٦٧
أوليك	٢٨٢,٤٦	٢٨٢,٤٦	٠,٠٢٨٢
إكساليك	٩٠,٠٤	٤٥,٠٢	٠,٠٠٤٥

وقد يقدر مايعرف بالحموضة الثابتة fixed acidity بتبخير وزن معلوم من العينة مع الماء، ثم معايرة الحموضة الكلية فى العينة ، ثم تقدر الحموضة الطيارة Volatile acidity ، وهى الفرق بين الحموضة الكلية والثابتة ، أو تقدر كحموضة فى ناتج تقطير العينة بالبخار، وذلك كأحماض طيارة فى صورة حمض أوليك ، أو غيره من الأحماض (بالضرب فيما يكافئه الملليلتر من القلوى ١,٠ عيارى من هذا الحمض المعين) .

وتقدر الأحماض الدهنية الحرة فى الأعلاف الزيتية ، كزيت السمك والحبوب الزيتية والتى يجب ألا تتعدى ١ ٪ ، وإذا زادت عن ذلك دلت على تعفن أو تلف الزيت ، وانخفاض قيمته الغذائية ، سواء للزيت أو البذور الزيتية ، أو الأكساب . وتقدر الأحماض الدهنية الحرة بنفس الطريقة السابقة بالتنقيط بقلوى تركيز ١,٠ عيارى فى وجود دليل الفينولفثالين على العينة التى تم رجها بشدة مع الكحول ، ويعبر عنها فى صورة حمض

أوليك ، بتعيين حجم القلوى ٠,١ عيارى ، وضربه فيما يكافئه المليلتر قلوى ٠,١ عيارى من حمض الأوليك (٠,٠٢٨٢جم) ، فيعبر عنها كنسبة مئوية من العينة ، أو قد تحسب فى صورة رقم حموضة ، أى عدد ملليلترات القلوى الأساسى اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الحرة فى ١٠٠ جم عينة ، أو قد تحسب فى صورة قيمة حموضة ، أى عدد ملليجرامات KOH اللازمة لمعادلة الأحماض الحرة فى ١ جم عينة . وتقدر الأحماض الدهنية الحرة فى منتجات الألبان المزنخة فى صورة حمض بيوتريك .

أما الأحماض الدهنية الكلية فتقدر فى العينة التى تم تصبنها بالبوتاسا الكاوية الكحولية، فيجرى تصبن ٥ جم عينة مع ٥٠ مل بوتاسا كحولية بالغليان أسفل مكثف هوائى لتمام التصبن (حوالى ٣٠ دقيقة) ، وتعاير الزيادة من القلوى بحمض HCL فوجود دليل فينولفثالين ؛ لتحديد عدد ملليلترات البوتاسا التى لزمت للتصبن (القلوى والحامض عياريتهما ٠,٥ عيارى) ومنها تقدر المللى لترات الأساسية ، ومن معامل التحويل للحامض تقدر الحموضة ، كأحماض دهنية كلية (أوليك أو بيوتريك مثلا) .

وتقدر النواتج الحامضية فى السيلاج وهى الأحماض الدهنية الطيارة (خليك ، بروبيونيك ، بيوتريك) علاوة على حمض اللاكتيك وذلك بطريقة مايلى :

١ ــ باستخدام العمود Column :

فيؤخذ ٢ مل بالضبط من عصير السيلاج فى كأس سعة ١٠٠ مل + ٢ نقطة دليل أحمر فينول ثم ينقط بالصودا الكاوية ٠,١ عيارى تقريباً حتى التعادل ، ثم تجفف على حمام مائى ثم يضاف عليها ١ جم سليكا چيل ، ويقلب مع الطحن جيداً ، ثم يضاف ٣ــ٥ نقط حمض كبريتيك مركزا حتى يصير لون الدليل أصفر ، فيقلب للتجانس جيداً .

سد العمود من أسفل بورق ترشيح مقطع بكبسه بساق زجاجية ، ويعلم على العمود عند أحجام ٤ مل من أعلى الأنبوبة حتى أسفلها بعلامات واضحة (بين كل علامة والأخرى ٤ مل) . جهز فى كأس ١٠٠ مل ٦ جم سليكا چيل + ٤ مل حمض كبريتيك ٠,٥ عيارى ، ويقلب جيداً حتى تبدو السليكا جافة تماماً ، ثم يضاف عليها كمية من البنزين المشبع بالماء ، وتنقل كمياً بواسطة قمع زجاجى إلى العمود ، وتكبس بضغط الهواء حتى يطرد معظم البنزين إلا حوالى ٠,٥ مل منه فوق عمود السليكا ، ثم يضاف حوالى ٦ مل بنزيناً مشبعاً بالماء (الطبقة العليا) .

تنقل العينة المخلوطة بالسليكا (باستعمال قمع) كمياً إلى العمود باستعمال فرشاة من الشعر ، ويكمل النقل بالبنزين المشبع بالماء ، ويلف العمود بسرعة حول نفسه لطرد فقاقيع الهواء ثم يكبس الهواء لطرد البنزين إلا حوالى مل فوق سطح السليكا منعاً لجفافها . ثم يضاف حوالى ٤ مل بنزين / ١٪ بيوتانول (٩٩ مل بنزين + ١مل بيوتانول) ويكبس الهواء

مع استقبال القطرات النازلة فى دورق مخروطى به نقطتا دليل أحمر فينول (٠,٤ ٪ فى كحول) . يضاف ٣٠ مل بنزين / ١ ٪ بيوتانول ويكبس الهواء ، وتستقبل القطرات النازلة فى أنابيب اختبار بها دليل أحمر فينول بحيث تجمع ٤ مل من القطرات فى كل أنبوبة ، مع مراعاة عدم فقد أى نقطة خارج الأنابيب ، وأن تكون كلها متساوية الحجم (٤مل) ، وعند بقاء ١ مل من المذيب على السليكا يضاف ٣٠ مل بنزين / بيوتانول ٥ ٪ (٩٥ مل بنزين + ٥ مل بيوتانول) ، وتجمع النقط الساقطة **Fractions**، ثم ٥٠ مل من كل من بنزين / ١٠ ٪ بيوتانول ، فبنزين / ٢٠ ٪ بيوتانول ، فبنزين / ٣٠ ٪ بيوتانول على التوالى .

تنقط الأنابيب بصودا كاوية ٠,١ عيارى حتى التعادل ، وتدون كمية الصودا المستعملة لكل أنبوبة على حدة ، ويوقع رسم بيانى لتوضيح العلاقة بين المليمكافئات من الأحماض العضوية الموجودة فى الأنابيب وأرقام هذه الأنابيب . وعادة يظهر حمض البيوتريك ابتداءً من الأنبوبة ٥ حتى ١١ ، بروبيونيك من ١٢ ـ ١٦ ، الخليك من ١٧ ـ ٢٣ ، الفورميك من ٢٥ ـ ٣٣ ، سكسينيك ولاكتيك (متداخلان) ٣٤ ـ ٤٤ .

ويفضل عمل مقارنة مابين القيم المتحصل عليها بهذه الطريقة ومايتحصل عليها من تقدير الأحماض الدهنية الطيارة المقدرة بالتقطير البخارى .

٢ ـ بتقدير أحماض الخليك ، بيوتريك، لاكتيك بالتقطير :

يجرى كالتالى :

الأدوات :

دوارق سعة ١ لتر طويلة العنق ، دورق تقطير سعة ٥٠٠ مل ، دوارق معيارية سعة ١٠٠ ، ٥٠ مل ، مكثف عاكس ، وحدة تقطير (دورق بمكثف) .

المحاليل :

لبن جير (٢٠٠جم أكسيد كالسيوم / لتر ماء) ، كبريتات نحاس (٢٠٠جم / لتر ماء)، حمض كبريتيك (١ : ١) ، حمض كروميك (٤٥,٥ مل كبريتيك مركز + ٤٥,٥ جم أكسيد كروم / لتر ماء) ، صودا كاوية ٠,٠٥ عيارى .

عمل عصير السيلاج :

١٠٠ جم سيلاج تقطع صغيراً ، وتوضع فى دورق معيارى سعة لتر ، ويكمل للعلامة بالماء المقطر ، ويترك ١٢ ساعة على حرارة الغرفة . رج عدة مرات ثم رشح على ورق ترشيح. يكون التخفيف هنا ١ : ١٠ ، أما فى السيلاج الغنى بالسكر فيخفف ١٠ : ٢٠ على أن تضرب نسبة الحامض × ٢ .

إزالة التسكير :

يؤخذ ٢٠٠ مل من الراشح فى دورق معيارى ٢٥٠ مل + ٢٠ مل لبن الجير + ١٠

مل محلول كبريتات نحاس . بعد ساعة يكمل للعلامة بالماء المقطر ، ويرج ويرشح . يختبر تمام إزالة السكر ، بأخذ ٢ مل راشحاً فى أنبوبة اختبار مع نقط من الفا–نافثول ١٥ ٪ فى كحول مطلق (إيثانول) ، وتنفصل طبقاتها بحمض كبريتيك مركز ، فتظهر حلقة بنفسجية غامقة عند حدود الطبقات : دلالة على عدم تمام إزالة السكر ، فتكرر العينة مع ٥٠ جم عينة بدلاً من ١٠٠ جم .

تقدير حمض الخليك وحمض البيوتريك :

يؤخذ ٢٠٠ مل من الراشح الرائق فى دورق مستدير طويل العنق سعة ٥٠٠ مل + ٥ مل H_2SO_4 مخفف (١ / ١) مع عدد كريات زجاج أو حجر خفاف ، ويرج لمدة قصيرة ثم يوصل بمكثف مع وضع دورق معيارى سعة ١٠٠ مل أسفل المكثف . فى خلال ٢٠ دقيقة (من بدء الغليان أدر منظم الموقد لينخفض اللهب) يجمع ١٠٠ مل فى الدورق المعيارى ، ثم يجمع ٥٠ مل أخرى فى دورق معيارى ثانى مباشرة دون وقف التقطير عند تغيير الدوارق . إذا حدث أثناء الغليان فوران فتعاد التجربة بوزن ٥٠ جم عينة (بدلاً من ١٠٠ جم) والتخلص من سكرها بمقدار ٢٠ مل لبن جير + ١٠ مل محلول كبريتات نحاس .

تقدير حمض اللاكتيك :

يؤخذ المتبقى فى دورق التقطير (٥٥مل) مع ٥٥ مل من محلول الكبريتيك والكروميك، ويغلى ٥ دقائق أسفل مكثف عاكس ؛ وذلك لأكسدة حمض اللاكتيك ، وأخيراً يضاف إلى محتويات الدورق ١٠٠ مل ماء مقطراً من خلال المكثف . ثم يوصل الدورق ثانية بمكثف والتقطير ، ويجمع ٥٠ مل متقطراً فى ظرف ١٠ دقائق فى دورق معيارى .

المعايرة :

تتم معايرة الدوارق المعيارية الثلاثة بواسطة NaOH ٠,٠٥ عيارى فى وجود دليل فينولفثالين حتى التعادل ، وتضرب القيم المتحصل عليها من المعايرة × ١,٢٥ (نتيجة التخفيف عند إزالة السكر) ، ويشار إليها بالحرف D1 , D2 , D3 .

حساب المحتوى من الحامض :

هناك ثوابت لتحويل هذه القيم للأحماض : خليك ، بيوتريك ، ولاكتيك ، وهى باستخدام هذا الجهاز للسيلاج كالتالى :

AA in D1 = 37.95 % , in D2 = 24.01 %

BA in D1 = 78.69 % , in D2 = 17.42 %

LA in D3 = 18.28 %

أى أن حمض الخليك AA يوجد بنسبة ٣٧,٩٥ ٪ فى الدورق المعيارى الأول D_1 وبنسبة ٢٤,٠١ ٪ فى الدورق المعيارى الثانى D_2 ، بينما حمض البيوتريك BA يوجد فى نفس الدورقين بنسبة ٧٨,٦٩ ٪ ، ١٧,٤٢ ٪ على التوالى ، وحمض اللاكتيك LA يوجد بنسبة ١٨,٢٨ ٪ فى الدورق المعيارى الثالث D_3 .

ومن هذه الثوابت استنتجت المعادلات التالية لحساب النسبة المئوية لكل من الأحماض الثلاثة وهى :

$$AA\ \% = 0.0962\ D_2 - 0.0213\ D_1$$

$$BA\ \% = 0.0431\ D_1 - 0.0680\ D_2$$

$$LA\ \% = 0.1230\ D_3 - (0.0086\ AA + 0.0029\ BA)$$

أو حورت المعادلات كالتالى :

$$AA\ ml\ 0.05\ n = 6.41\ D_2 - 1.42\ D_1$$

$$BA\ ml\ 0.05\ n = 1.96\ D_1 - 3.09\ D_2$$

$$LA\ ml\ 0.05\ n = 5.47\ D_3 - (0.38\ AA + 0.13\ BA)$$

$$\%\ AA = AA \times 0.0150$$

$$\%\ BA = BA \times 0.0220$$

$$\%\ LA = LA \times 0.0225$$

ويقدر حمض اللاكتيك كذلك بطرق لونية ، إذ يؤدى كلوريد الحديديك (فى وسط حامضى) إلى وجود لون أصفر مع حمض اللاكتيك ، أو يستخدم الفينول كدليل لونى كذلك ، كما أن غليان حمض اللاكتيك مع الكبريتيك المركز يتحول إلى أسيتالدهيد ينتج لونا بنفسجياً مزرقاً عند تفاعله مع باراهيدروكسى ثنائى الفينيل ، وتقاس شدة الضوء على حوالى ٤٥٠ نانومتر . أو قد يقدر اللاكتيك بالتقطير بالبخار بوضع ٥٠ جم عينة فى دورق ٥٠٠ مل ذو فتحتين جانبيتين ، ثم أضف إليها ٢٠٠ مل ٢٠Nacl ٪ وأغلق الفتحة الأساسية (الوسطية) ، وعلّم على الدورق بعلامة تشير لحجم السائل ، ثم وصل إحدى الفتحتين الجانبيتين بتيار بخار ماء ، والفتحة الأخرى بمكثف على أن تكون أنبوبة البخار ممتدة لأسفل سطح السائل بدورق التقطير ، بإمرار البخار تتقطر العينة ويستقبل المتقطر فى دورق مخروطى (لاتترك السائل ينخفض عن العلامة بالدورق الأساسى للتقطير) ، ثم عاير المتقطر بالصودا الكاوية معلومة العيارية فى وجود الفينولفثالين واستنتج كمية حمض اللاكتيك (١مل ١,٠ مولر NaOH= ٠,٠٠٦٠٠٥ جم حمض لاكتيك) .

٣ ـ باستخدام الكروماتوجرافى الغازى :

تقدر الأحماض الدهنية الطيارة فى السيلاج كذلك باستخدام الكروماتوجرافى الغازى (بنفس طريقة تقديرها فى سائل الكرش) ، بأخذ عصير العينة المائى بعد ترشيحه للتحليل الكروماتوجرافى الغازى لتفريد الأحماض الدهنية الطيارة منفردة على عمود Paralith ٢ ,٠ ـ ٠,٣ م ، ومخلوط غازات (نيتروجين / هيدروجين / هواء بسرعة تدفق ٣ ، ٢ ، ٢٠ لتر / ساعة على الترتيب) وبرنامج حرارى ١٦٠° م للفرن ، ٢٤٠°م للحاقن ولمخرج الغازات .

٤ ـ تقييم كيماوى للسيلاج :

فقد وضع نظام يسمى Fliege system لتقييم مواد العلف المسيلجة عن طريق تقدير الأحماض الدهنية الطيارة المنفردة ، ثم ضربها فى معاملات لتحويلها لمكافئات حامضية ، وجمعها معاً ، ثم تنسب مكافئات كل حمض إلى مجموع المكافئات كنسبة مئوية من الحموضة الكلية ، واستخراج نقط Fliege المكافئة لهذه الحموضة ، وجمعها للحكم النهائى كالتالى : فى سيلاج ذرة ، قدرت الأحماض العضوية فوجدت :

النسبة المئوية للحامض	معامل التحويل للذرة	مكافئات حامضية	٪من الحموضة الكلية	نقط Fliege
حمض لاكتيك ٣,٦٦ ٪	× ١,١١٠٥	= ٤,٠٦٤	٧٨,٠	٣٠
حمض خليك ٠,٦٢ ٪	× ١,٦٦٥٨	= ١,٠٣٣	١٩,٨	١٨
حمض بيوتريك ٠,١٠ ٪	× ١,١٣٥٦	= ٠,١١٤	٢,٢	٣٠
		٥,٢١١	١٠٠,٠	٧٨ (جيد)

وقد حسبت معاملات التحويل على أساس التركيز بالمول إذا وجد ١٠٠ جم من كل حمض دهنى فى لتر من ناتج السيلجة أى بقسمة ١٠٠جم على الوزن الجزيئى لكل حمض دهنى كالتالى :

حمض لاكتيك CH3 -- CH -- COOH = 90(MW) ----- 100 : 90 = 1.1105

حمض خليك CH_3 - COOH = 60 ----- 100 : 60 = 1.6658

حمض بيوتريك CH_3 -- CH_2 -- CH_2-- COOH = 88 ----- 100 : 88 = 1.1356

ومن جدول خاص بذلك يقابل كل مدى معين من ٪ حموضة كلية لكل حامض تقدير معين (نقط Fliege) كالتالى :

نقط Fliege المقابلة للنسب المئوية للحموضة :

حمض لاكتيك		حمض خليك		حمض بيوتريك	
٪ حموضة كلية	نقط	٪ حموضة كلية	نقط	٪ حموضة كلية	نقط
صفر ـ ٢٥,٠	صفر	صفر ـ ١٥,٠	٢٠	صفر ـ ١,٥	٥٠
٢٥,١ ـ ٣٦,٠	١ ـ ٥	١٥,١ ـ ٢٥,٤	١٩ ـ ١٥	١,٦ ـ ٨,٠	٣٠ ـ ١٠
٣٦,١ ـ ٤٦,٠	٦ ـ ١٠	٢٥,٥ ـ ٣٢,٠	١٤ ـ ١٠	٨,١ ـ ١٧,٠	٩ ـ ٥
٤٦,١ ـ ٥٦,٠	١١ ـ ١٥	٣٢,١ ـ ٣٨,٧	٩ ـ ٥	١٧,١ ـ ٣٠,٠	٤ ـ صفر
٥٦,١ ـ ٦٦,٠	١٦ ـ ٢٠	٣٨,٨ ـ ٤٥	٤ ـ صفر	٣٠,١ ـ ٤٠,٠	-١ ـ -٥
٦٦,١ ـ ٧١,٢	٢١ ـ ٢٥	وأعلى		أعلى من ٤٠,٠	-١٠
٧١,٣ ـ أعلى من ٧٥	٢٦ ـ ٣٠				

ويكون التحكيم كالتالى :

١ ← ٨١ ـ ١٠٠ نقطة ← جيداً جداً

٢ ← ٦١ ـ ٨٠ نقطة ← جيداً

٣ ← ٤١ ـ ٦٠ نقطة ← مرضى

٤ ← ٢١ ـ ٤٠ نقطة ← معتدل أو مقبول

٥ ← صفر ـ ٢٠ نقطة ← سيئ

وعليه ـ فى مثالنا ـ نجد أن ٧٨ ٪ حموضة كلية فى صورة لاكتيك تعطى ٣٠ نقطة

وأن ١٩,٨ ٪ حموضة كلية فى صورة خليك تعطى ١٨ نقطة .

وأن ٢,٢ ٪ حموضة كلية فى صورة بيوتريك تعطى ٣٠ نقطة

وإجمالى النقط = ٧٨

أى أن تقدير جودة هذا السيلاج هو جيد .

ولتقدير الأحماض الدهنية يجرى لها تفريد على الكروماتوجرافى الورقى أو الغازى ضد محاليل قياسية من هذه الأحماض ، والأخير أكثر دقة وسرعة وحساسية ، وفيما يلى وصف لهذا التحليل :

تحضير العينة :

للتحليل الكروماتوجرافى يلزم استخلاص الدهن من العينة ثم أسترة هذا الدهن :

١ ـ استخلص الدهن بجهاز سوكسلت لمدة ساعة باستخدام مخلوط كلورفورم / ميثانول (١/٢) أو أذب الدهن فى ٢٠٠ مل كلورفورم .

٢ ـ أضف ١٢ مل ماء للمحلول ، وهز واتركه ٥ دقائق .

٣ ـ أضف ٢٠ مل كلورفورم ، وهز واتركه ٥ دقائق وكرر بإضافة ٢٥ مل ماء .

٤ ـ اطرد مركزيا لفصل الطبقات ، ثم اسحب طبقة الكلورفورم السفلى بسرنجة ، وبخرها تحت تفريغ أو نيتروجين .

٥ ـ خذ ٢٠٠ ـ ٥٠٠ مجم دهنا وأسترها مع هيدروكسيد البوتاسيوم أو الصوديوم الميثانولى ٠,٥ عيارى ، أسفل مكثف عاكس لمدة ٣ ـ ٥ دقائق .

٦ ـ أضف والمخلوط ساخن ١٥ مل مخلوطاً (٢جم كلوريد أمونيوم مذاباً فى ٦٠ مل ميثانول + ٣ مل حمض كبريتيك مركزاً ومغلياً أسفل مكثف عاكس ١٥ دقيقة) .

٧ ـ اخلط واغل أسفل مكثف عاكس ٣ دقائق ، برد وأضف الإيثير البترولى وهز .

٨ ـ افصل طبقة الإيثير ، وبخرها أسفل تفريغ أو نيتروجين ، ثم قدر الأحماض الدهنية بالكوماتوجرافى الغازى .

ظروف الكروماتوجرافى :

حجم العمود ١٧,٥٠ سم × ٣ م ، مملوء بواسطة ٢,٥ ٪ DEGS على ChromosorbG عالى الأداء (أو بواسطة بوليمر إيثيلين جليكول مع حمض الأدبيك على السيليت) ، حرارة الفرن ترتفع بمعدل ٤° م/دقيقة ، المدى الحرارى ١٣٠ ـ ٢١٥° م مع العمود الأول (أو ١٤٠ ـ ١٨٠° م مع العمود الثانى) ، الغاز الحامل نيتروجين ، معدل تدفق الغاز ٧٠ سم٣ / ق ، الكاشف بواسطة التأين فى اللهب .

وتقدر درجة الحموضة فى مواد العلف الغنية بالنشا برج ١٠ جم عينة مع ٥٠ مل كحول إيثانول ٦٧ ٪ على ٢٠° م فى كأس زجاجى ٢٠٠ مل ، ثم ترشيحها فى دورق مخروطى ١٠٠ مل ، وعند تجميع ٣٠ مل راشحاً يؤخذ منها ٢٥ مل بماصة فى دورق مخروطى آخر ١٠٠ مل مع ٣ نقط دليل فينولفثالين ، وينقط بالصودا الكاوية ٠,١ عيارى حتى التعادل ، فتكون درجة الحموضة للعينة = حجم الصودا الكاوية ٠,١ ع × ٢ .

فإذا كانت حتى ٣ درجات فلا يسمح بتخطى الفارق بين مكررتين التقدير عن ٠,٢ درجة حموضة ، أما فى حالة الوحدات الأعلى فلا يسمح بأن يتخطى هذا الفارق عن ٠,٣ وحدة درجة حموضة .

الأحماض الدهنية الحرة (ضوئياً) :

تقدر الأحماض الدهنية الحرة فى الزيوت بأخذ عينة (تحتوى ٢ ـ ١٤ ميكرومول أحماض دهنية حرة) فى أنبوبة ذات سدادة وتوضع فى حمام مائى على ٥٠° م لتطاير أى مذيبات ، وذلك فى ظروف من النيتروجين . أضف ٥ مل بنزين لإذابة العينة ، والتى قد

تتطلب تدفئة لتمام الذوبان . أضف ١ مل دليل (٥ ٪ محلول مائى من خلات النحاسيك يتم ترشيحه ، وضبط PH على ٦ ـ ٦,٢ باستخدام البيريدين) ورج لمدة دقيقتين ، اطرد مركزياً ٥ دقائق ، قدر الكثافة الضوئية فى الطبقة العليا على ٧١٥ نانومتر مقارنة بمحلول قياسى من حمض الأوليك .

حموضة اللبن :

تقدر حموضة اللبن بأخذ ١٠ مل بماصة فى بوتقتين ، الأولى مقارنة يضاف إليها ١ مل محلول روز أنيلين (أذب ٠,١٢ جم خلات روز أنيلين فى ٥٠ مل كحول (٩٥ ٪) تحتوى ٠,٥ مل حمض خليك ثلجى ، وأكمل إلى ١٠٠ مل بالكحول ، واحفظه فى ظلام ، خفف ١ مل منه إلى ٥٠٠ مل بالكحول والماء المقطر بنسب متساوية) وقلب . والى البوتقة الأخرى ، أضف ١ مل دليل فينولفثالين ونقط بهيدروكسيد الصوديوم (٠,١ عيارى) ، مع دوام التقليب حتى يظهر لون طوبى مماثل للون المقارنة . احسب الحموضة كحمض لاكتيك .

١ مل صودا كاوية ٠,١ عيارى = ٠,٠٠٩ جم حمض لاكتيك (درجات حموضة) .

الحموضة المعايرة للبول :

يضاف إلى ٢٥ مل بولاً ٥ جرام أوكسالات بوتاسيوم مطحونة ناعمة + ١ ـ ٢ نقطة من دليل فينولفثالين ١ ٪ ورج ١ ـ ٢ دقيقة فى دورق مخروطى ، ثم عاير فى الحال بمحلول هيدروكسيد صوديوم ٠,١ عيارى حتى يظهر لون قرنفلى فاتح . يعبر عن الحموضة بكمية مللى مكافئات الصودا الكاوية فى ٢٤ ساعة ، وهى تتوقف على العليقة ، فهى منخفضة فى آكلات الأعشاب (الحيوانات النباتية) ، ومرتفعة فى آكلات اللحوم . إلا أن الإصابة البكتيرية مثلاً تحلل يوريا البول فى القناة البولية ، فتزيد الأمونيا ، وتقلل حموضة البول ، وهو نفس ما يحدث لو ترك البول فى الهواء . وتزيد الحموضة فى حالة الاضطرابات المختلفة شاملة الحموضة وأمراض القلب والكلى . وتزيد الحموضة فى البول فى حالة زيادة استهلاك الحيوان للأحماض المعدنية والفوسفات وكلوريد الأمونيوم .

ومن المقاييس الأخرى فى تقدير الأحماض الدهنية الطيارة قيم كل من :

ريخرت ، بولنسك ، كيرشنر Reichert - Polenske - Kirschner Values وتقدر هذه القيم الثلاثة كالتالى :

تحضير العينة :

تسخن العينة حتى ينفصل الدهن ، مع عدم رفع الحرارة عن ٥٠° م . رشح الدهن خلال ورق ترشيح جاف .

التقدير :

١ ـ زن ٥ جم من عينة الدهن إلى دورق بولنسك . واجرِ تقدير خاوى Blank للكيماويات فى نفس الوقت مع العينات .

٢ ـ أضف ٢٠ جم جليسرول + ٢ مل ٥٠ ٪ (وزن / وزن) محلول هيدروكسيد صوديوم .

٣ ـ سخن مع الرج على لهب هادى حتى تمام التصبن وروقان السائل ، مع عدم ارتفاع الحرارة المؤدى للتلون . غط فوهة الدورق بغطاء زجاجي .

٤ ـ أضف ٩٣ مل ماء مقطراً يغلى (لطرد CO_2) . المحلول يجب أن يكون رائقا تماماً ولونه لا يتعدى الأصفر الشاحب .

٥ ـ أضف حجر خفاف + ٥٠ مل H_2SO_4 مخفف (٢٥ مل / لتر) . صل لجهاز التقطير المزود بمكثف ودورق لجمع المتقطر .

٦ ـ دفئ المخلوط حتى تذوب أى مادة غير ذائبة . يزداد اللهب ، وقطر ١١٠ مل من المحلول فى مدة ١٩ ـ ٢١ دقيقة .

٧ ـ أوقف التسخين ، وأزل دورق الغليان ودورق جمع المتقطر ، ضع كؤوساً لجمع أى نقط من كلا طرفى المكثف .

٨ ـ سد الدورق المدرج ، وضعه فى حمام مائى على ١٥ْم لمدة ١٠ دقائق .

٩ ـ اخلط ورشح خلال ورق ترشيح وات مان رقم ٤ .

١٠ ـ اغسل المكثف والوصلة الزجاجية والدورق المدرج ٣ مرات فى كل مرة ١٥ مل ماء مقطرا ، ورشحها على نفس ورقة الترشيح ناقلاً معها أى أجزاء غير ذائبة .

١١ـ أذب المادة غير الذائبة فى ١٥ مل إيثانول متعادل ٣ مرات . واجمع الراشح فى ذات الدورق المدرج ١١٠ مل .

قيمة ريخارت : (عدد للملليترات القلوى ١,٠ عيارى اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الطيارة الذائبة فى الماء المقطرة من ٥ جم دهن) :

١٢ ـ خذ ١٠٠ مل من الراشح من خطوة رقم ٩ وضعها فى دورق مخروطى ٢٥٠ مل جافاً .

١٣ ـ نقط بهيدروكسيد الباريوم ٠,٠٥ مولر .

١٤ ـ ارمز للحجم المأخوذ فى المعايرة للعينة من القلوى بالرمز tr وللبلانك بالرمز tb .

فتكون قيمة ريخارت : $Reichert\ Value = 1.1\ (tr - tb)$.

قيمة بولنسك : (عدد الملليلترات القلوى ١,٠ عيارى اللازمة لمعادلة الأحماض

الدهنية الطيارة غير الذائبة فى الماء والمقطرة من ٥ جم دهن) :

١٥ ـ نقط المحلول من خطوة رقم ١١ بهيدروكسيد الباريوم ٠,٠٥ مولر مع استخدام الفينولفثالين كدليل .

١٦ ـ ارمز لحجم القلوى المستخدم فى معايرة العينة بالرمز tp وللبلانك بالرمز tc .

واحسب قيمة بولنسك : (tp - tc) = Polenske Value .

قيمة كيرشنر : (عدد المللليترات القلوى ٠,١ عيارى اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الطيارة الذائبة فى الماء والتى تكون أملاح فضة ذائبة فى الماء والمقطرة من ٥ جم دهن) .

١٧ ـ أضف ٠,٥ جم مسحوقاً ناعماً كبريتات فضة للمحلول ناتج خطوة رقم ١٣ .

١٨ ـ احفظه فى الظلام لمدة ساعة مع الرج من حين لآخر ثم رشح خلال ورق ترشيح وات مان رقم ٤ .

١٩ ـ ضع ١٠٠ مل راشحا فى دورق بولنسك جاف نظيف + ٣٥ مل ماء مقطراً بارداً (سبق غليانه لطرد CO_2) + ١٠ مل حمض كبريتيك مخففاً (٢٥ مل / لتر) + حجر خفاف . صل بجهاز التقطير السابق .

٢٠ ـ قطر ١١٠ مل فى خلال ١٩ ـ ٢١ دقيقة .

٢١ ـ كرر الخطوات ٧ ، ٩ ، ١٢ ، ١٣ .

٢٢ ـ ارمز للقلوى المستخدم فى معايرة العينة والبلانك بالرمزين td , tk على الترتيب واستنتج قيمة كيرشنر :

$$\text{Kirschner Value} = (tk - td)\frac{[100 + (tr - tb)]\ 121}{10\,000}$$

ويلاحظ أنه يمكن استخدام الصودا الكاوية ٠,١ مولر بدلاً من هيدروكسيد الباريوم ٠,١ مولر إذا لم تقدر قيمة كيرشنر .

ح ـ المادة غير المتصبنة :

المادة غير القابلة للتصبن هى الجزء الذائب فى الدهون والزيوت وغير القابل للتصبن بالقلويات ، لكنه يذوب فى مذيبات الدهون ، ويحتوى على الكحولات الأليفاتية العالية ، ستيرولات ، صبغات ، هيدروكربونات .

وتحتوى زيوت الأسماك البحرية على نسبة عالية من المادة غير القابلة للتصبن عن الشحوم الحيوانية الأرضية ؛ لذا تقدر المادة غير القابلة للتصبن فى هذه الزيوت ، والزيوت النباتية ونواتج التقطير وغيرها .

وقد يقدر الجزء من العينة غير القابل للتصبن Unsaponifiable matter كالتالى :

١ ـ زن ٢,٥ جم عينة فى دورق .

٢ ـ صبن العينة بالغليان (أسفل مكثف عاكس) مع ٢٥ مل بوتاسا كاوية كحولية ٠,٥ مولر لمدة ساعة .

٣ ـ برد وانقل محتويات الدورق إلى قمع فصل باستخدام مالا يزيد عن ٥٠ مل ماء .

٤ ـ استخلص بالإيثير الإيثيلى ، وكرر الاستخلاص مرتين أخريين ، واجمع المذيب العضوى فى قمع فصل آخر .

٥ ـ اغسل طبقة الإيثير بثلاث كميات من هيدروكسيد البوتاسيوم المائية ٠,٥ مولر ، ثم مرتين بماء مقطر .

٦ ـ بخر حتى يتبقى حوالى ٥ مل ، انقلهم كمياً إلى دورق مخروطى ٥٠ مل (أو قابلة جهاز سوكسلت) جافاً وموزوناً ، وبخر على حمام مائى ثم أضف ٢ ـ ٣ مل أسيتون لإسراع التجفيف ، وأكمل التجفيف التام حتى ثبات الوزن تحت تفريغ على ٧٥ ـ ٨٠ م. برد فى مجفف ثم زن الدورق .

٧ ـ أذب محتويات الدورق فى ١٠ مل كحول إيثايل متعادلاً (باستخدام الفينولفثالين حتى نقطة اللون القرنفلى الباهت) ، عاير بالصودا الكاوية ٠,٠٢ ع حتى اللون القرنفلى الباهت ، صحح وزن المتبقيات نحتواها من الأحماض الدهنية الحرة (١ مل من الصودا الكاوية ٠,٠٢ ع يكافئ ٠,٠٠٥٦ جم حمض أوليك) . صحح وزن المتبقيات كذلك بعمل بلانك لمحاليل التقدير بدون استخدام زيت أو دهن .

الحساب :

$$\text{المادة غير المتصبنة } \% = \frac{١٠٠ \times (\text{وزن المتبقيات} - \text{وزن الحمض الدهنى} - \text{وزن البلانك})}{\text{وزن العينة}}$$

وهذه المواد غير القابلة للتصبن تشمل الستيرولات ، والكاروتينويدات وكحولات أحادية وخلافها .

ط ـ الزيوت الطيارة :

ولتقدير الزيوت الطيارة Volatile Oils يؤخذ ١٠٠ مل عينة سائلة ، أو ١٠ جم عينة صلبة فى دورق ٥٠٠ مل مسطح القاع . أضف ٢٠٠ ـ ٣٠٠ مل ماء مقطراً (للعينة السائلة ـ الصلبة على الترتيب) ، واخلط وأضف كريات زجاج ونقط سليكون مانع للفوران ، وبخر بالتدفئة مع الدوران ، ثم الغليان لمدة ساعتين فى جهاز تقطير خاص واجمع الزيت المتقطر وقدر حجمه .

$$\% \text{ زيوت طيارة} = \frac{\text{حجم الزيت المتقطر} \times \text{كثافته}}{\text{وزن العينة}} \times ١٠٠ .$$

ي ـ البيروكسيداز :

وللكشف عن إنزيم البيروكسيداز Peroxidase activity يحضر محلول ١ ٪ من

الجوياكول Guaiacol فى الماء ، وكذلك محلول فوق أكسيد هيدروجين (مخفف بخمس حجوم) ، واخلط حجمين متساويين منهما . حضر ٥٠ جم عينة وأضف إليها ٢٠ مل من مخلوط المحاليل السابقة ، وقلب جيداً . اسحب المادة المخلوطة إلى بوتقة بورسلان بيضاء ، ولاحظ تطور اللون الأحمر . إن لم يظهر لون أحمر فى خلال دقيقة واحدة فإنه لا يوجد نشاط لإنزيم البيروكسيداز .

رقم البيروكسيد Peroxide Value يقدر للكشف عن تلف الدهون كالتالى :

١ ـ زن ١ جم بالضبط من عينة مذابة مخلوطة جيداً فى أنبوبة اختبار قوية الجدران ٢٧× ٢ سم .

٢ ـ أضف ١ جم مسحوقاً ناعماً من يوديد بوتاسيوم + ٢٠ مل مخلوط ٢ : ١ من حمض خليك ثلجى : كلوروفورم .

٣ ـ هز حتى ذوبان الدهن الكامل .

٤ ـ سد الأنبوبة بسدادة مطاط ينفذ منها أنبوبتا زجاج عليهما صنبورا زجاج .

٥ ـ مرر CO_2 فى هذا المحلول لمدة ١٠ دقائق .

٦ ـ افتح الصنابير، وضع أنبوبة الاختبار فى حمام ماء يغلى عند ملاحظة بدء تطاير بخار الكلوروفورم من الأنبوبة سد الصنابير وبرد بسرعة .

٧ ـ نقط اليود المحرر بثيوسلفات الصوديوم ٠,٠٠٢ مولر باستخدام محلول طازج من ١ ٪ دليل نشا فى الماء .

٨ ـ اجر عينة خالية Blank على المحاليل ، واخصم قيمة التنقيط من العينات .

٩ ـ عبر عن النتيجة بالملليليترات ثيوكبريتات صوديوم ٠,٠٠٢ مولر اللازمة لكل ١ جم عينة أو عددجزيئات البيروكسيد / كجم دهن = $\frac{\text{٠,٥ × مل ثيوكبريتات × قوتها}}{\text{جم العينة}}$.

كما يقدر رقم البيروكسيد كذلك ضوئياً بطريقة حساسة جداً تعتمد على أكسدة الحديدوز إلى حديديك ، وقياس اللون الأحمر الناتج من الثيوسيانات . يوزن ٠,٣ جم زيتاً أو دهناً فى أنبوبة سعة ١٥ مل مع ٩,٦ مل كلوروفورم / ميثانول (٧٠ / ٣٠) ، واخلط لإذابة العينة . أضف ٠,٦ مل كلوروفورم / ميثانول (٧٠ / ٣٠) ، واخلط ثانية ، ثم أضف ٠,٠٥ مل محلول أمونيوم ثيوسيانات (٣٠٪) واخلط وقدر الكثافة الضوئية على ٥٠٠ نانومتر (Eo) ضد مقارنة من مخلوط الكلوروفورم / ميثانول . أضف ٠,٠٥ مل كلوريد حديدوز (٠,٣٥ ٪ تحتوى ٢ ٪ حمض هيدروكلوريك ١٠ عيارى) ، واخلط وبعد ٥ دقائق تماماً قدر الكثافة الضوئية مرة أخرى (E_2) . اجر بنفس الطريقة تجربة خاوية من العينة(E_1) ، وكذلك تقدير للمحلول القياسى (١٠ مجم حديد / لتر (من كلوريد الحديديك) مع

الكلورفورم /ميثانول وثيوسانات الأمونيوم وحمض الهيدروكلوريك ، واستخرج قيمة m أى ميكروجرامات الحديد [m = E2 - (Eo + E1)] .

ومنها يقدر رقم البيروكسيد = $\frac{m}{\text{وزن العينة} \times ٥٥,٨٤}$ مللى مكافئ / كجم

ك ـ الفينولات :

١ ـ انقل ٥٠ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ٥ ٪ مع ١٠ مل زيت (عينة) إلى دورق سعة ١٥٠ مل ذى ساق مدرجة بدقة ٠,١ مل .

٢ ـ رج على فترات لمدة نصف ساعة ، ثم أضف مزيداً من البوتاسا الكاوية حتى يرتفع الزيت إلى الساق المدرجة . اترك ٢٤ ساعة .

٣ ـ اقرأ حجم الزيت غير الممتص ، واحسب النسبة المئوية للزيت غير الممتص (الفينول) . ولاحظ أن إضافة ٢ مل من الزيلين يساعد فى فصل الزيت (على أن تخصم من حجم الزيت غير الممتص) .

ل ـ اختبار كريزكر :

وللتزنخ يجرى اختبار (كريزكر) Kreis Kerr test بوزن ١ جم عينة ذائبة ، ويضاف إليها كمية متساويةHCl المركز + ١ مل ١ ٪ من فلوروجلوسينول phloroglucin فى الإيثير . التطور البطىء للون الأحمر يشير لاحتمال تزنخ العينة . وقد يعطى زيت القطن الخام تفاعلاً موجباً رغم عدم تزنخه . وللحكم الصحيح يجب أن يكون اللون الناتج عن التزنخ ورديا أو أحمر (وليس ورديا فاتحاً) . وقد نحتاج إلى تخفيف العينة بالإيثير البترولى ، فإذا ظهر اللون رغم التخفيف دل على تمام التزنخ .

ومن دراسة صفات الدهون يتضح أن رقم التصبن يتناسب عكسيا مع متوسط الأوزان الجزيئية للأحماض الدهنية الموجودة ، فكلما زادت كمية الأحماض الدهنية ذات الوزن الجزيئى المنخفض (فى وزن معين من الدهن أو الزيت) فإنها تتطلب كمية قلوى لتصبينها أكبر من اللازمة لتصبن الأحماض الدهنية ذات الوزن التجزيئى العالى(الموجودة فى نفس الوزن من دهن أو زيت آخر) .

ومن العدد اليودى للزيت يمكن تقسيم الزيوت إلى جافة ونصف جافة وغير قابلة للجفاف ، والأولى لها عدد يودى أعلى من ١٣٠ ، والثانية مابين ١٠٠ ـ ١٣٠ ، والأخيرة أقل من ١٠٠ . وفيما يلى بعض الخصائص لبعض الزيوت والدهون :

الزيت أو الدهن	رقم التصبن (مجم / جم)	العدد اليودى (جم/١٠٠جم)	المادة غير المتصبنة (جم / كجم)	رقم الحموضة (مجم / كجم)	رقم البيروكسيد (مجم /)كجم
زيت جوز هند	٢٥٣	٩			
زيت نخيل	٢٠٠	٥٥			
دهن بقر	١٩٥	—			
زيت بذر قطن	١٩٣	١١٠	١٥	٠,٦	—
دهن غنم	١٩٣	—			
زيت فول صويا	١٩٢	١٢٨	١٥	٠,٦	١٠
زيت سمسم	١٩١	١٠٨	٢٠	٤	١٠
زيت ذرة	١٩١	١٢٠	٢٨	٤	١٠
زيت خردل	١٧٣	١٠٤			
زيت عباد شمس	—	١٢٧	١٥	٤	١٠
زيت فول سودانى	١٩١	٩٣	١٠		
زيت كاكاو	—	٣٥			

ونواتج أكسدة الزيوت والدهون هى الهيدروبيروكسيدات ، والبيروكسيدات ونواتج تحللها من الدهيدات وكيتونات وأحماض . وقد تتفاعل الهيدروبيروكسيدات مع الروابط المزدوجة لإحداث أكسدة كيماوية ينتج عنها فقد سريع للروابط غير المشبعة ونقص فى البيروكسيدات للأكسدة الذاتية الحادثة .

م ـ رقم الأسيتيل :

ولتعيين رقم الأسيتيل Acetyl Value (وهو عدد ملليجرامات البوتاسا الكاوية اللازمة لمعادلة حمض الخليك المتولد من تحليل ١ جم دهن مؤستل) ويجرى التقدير كالتالى :

١ ـ يؤخذ ١٠ جم دهناً ، ويغلى مع ٢٠ مل أنهيدريد الخليك فى دورق مستدير القاع تحت مكثف عاكس لمدة ساعتين .

٢ ـ تنقل المحتويات إلى كأس به ٥٠٠ مل ماء ساخناً ، ثم يغلى لمدة نصف ساعة ، ويبرد .

٣ ـ بعد انفصال الطبقتين ، تسحب الطبقة المائية ، ثم يغسل الزيت المتبقى ٣ مرات بالماء لإزالة أى أثر للحامض . اجمع الدهن على ورق ترشيح ويجفف على ١٠٠ م .

٤ ـ خذ ١ جم بالضبط من الدهن المؤستل فى دورق مخروطى نظيف جاف + ٥٠ مل بوتاسا كاوية كحولية ٠,١ عيارى (معلومة العيارية بالضبط بتنقيط حجم معلوم مع وجود الفينولفثالين بواسطة HCl ٠,١ عيارى)ويسخن على حمام مائى نصف ساعة ، أو حتى

تمام التصبن أى بذوبان كل الدهن أو الزيت .

٥ ـ انقل المحلول إلى طبق تجفيف ، وبخر الكحول ، وخذ المتبقى فى ١٠ ـ ١٥ مل ماء .

٦ ـ يضاف HCl ٠,١ عيارى يعادل بالضبط KOH المضافة للتصبن ، وسخن إلى ٧٠ ـ ٨٠° م واسحب الطبقة المائية بتمريرها فى ورقة ترشيح مبتلة .

٧ ـ المتبقى يغسل ٣ مرات بالماء الساخن ، وتضاف كميات الماء هذه إلى الطبقة المائية سابقة الفصل .

٨ ـ نقط الطبقة المائية وما أضيف لها من ماء الغسيل بالصودا الكاوية ٠,١ عيارى ، ومقدار الصودا الكاوية يجب أن يساوى حمض الخليك المنفرد نتيجة التحليل المائى (التصبن) .

عبر عن رقم الأسيتيل بملليجرامات البوتاسا الكاوية / جم دهن مؤستل .

ن ـ الفترة التمهيدية :

تقدير الفترة التمهيدية بواسطة أزرق الميثيلين Methylene blue induction period ،وهى المدة التى تمر على الزيت أو الدهن قبل أن يبدأ فى امتصاص الأوكسجين رغم تعرضه له . والفترة التمهيدية مقياساً للمواد المضادة للأكسدة فى الزيوت والدهون ، فكلما زادت نقاوة الزيت أو الدهن قصرت الفترة التمهيدية ، ويجرى التقدير كالتالى :

١ ـ ينقل ٥ مل زيتا إلى كل من أنبوبتى اختبار .

٢ ـ أضف للأنبوبة الأولى ١ مل محلول أزرق ميثيلين (٠,٠٢٥ ٪ لا مائى خالى الإيثانول) .

٣ ـ يضاف للأنبوبة الثانية ٠,٧٥ مل محلول أزرق ميثيلين وتغطى الأنبوبتان لمنع الضوء عنهما (حافز للأكسدة) .

٤ ـ ترج الأنبوبتان وتوضعان فى حمام مائى على ٧٠° م لمدة دقيقتين وتراقب .

٥ ـ باستخدام ساعة إيقاف ليحدد الوقت اللازم ليصل لون أزرق الميثيلين فى الأنبوبتين إلى مستوى واحد . هذا الوقت بالدقائق هو الفترة التمهيدية ، وهى تتراوح مابين ٤ ـ ٢٩ دقيقة فى الزيت الخام .

١٠ ـ دلائل الجودة المرتبطة بالدهن فى الأسماك :

الأسماك الغنية بالدهن تفقد جودتها بالتخزين خلال عملية التدهور الأكسيدى للمركبات الدهنية ، وتتوقف معدلات الأكسدة على طبيعة الأحماض الدهنية ، فكلما زاد عدم تشبعها زادت أكسدتها . والأكسدة عملية ينتج عنها أصول حرة فى شكل الدهيدات وأحماض وأبوكسيدات وجليسريدات ثنائية وأحادية ونواتج بلمرة . إلا أن نواتج الأكسدة

مستمرة فى تحولها بدخولها فى تفاعلات أخرى ؛ لذلك فقياس درجة الأكسدة شيء صعب . وأهم ثلاث طرق لقياس الأكسدة فى المنتجات السمكية هى اختبار حمض ٢ ـ ثيوباربيتوريك ، قيمة البيروكسيد ، قيمة الكاربونيل ، إلا أنها تزيد إلى أقصى قيمتها ثم تنخفض ؛ لذلك يقدر عادة اختباران للحكم على الأكسدة ، خاصة عند ارتفاع محتوى الأحماض الدهنية الحرة ، وفى النهاية يجرى اختبار حسى بالطبخ للحكم على جودة المنتج.

ورغم شهرة اختبار حمض ٢ ـ ثيوباربيتوريك إلا أنه مازال ينتقض لعدم تخصصه ، ولطبيعة المالونالدهيد المؤقتة ، ولعدم واقعية محتوى المالونالدهيد كدليل أكسدة بوجه عام ، لأن كمية المركب المتكونة تتوقف على نوع الأحماض الدهنية عديمة التشبع الموجودة فى النسيج ، إذ إن المالونالدهيد يتكون فقط من البيروكسيدات المنشقة من الأحماض الدهنية المحتوية ٣ روابط مزدوجة أو أكثر ، كما يوجد عديد من المواد التى تتداخل مع هذا الاختبار.

والبيروكسيدات منتجات أولية للأكسدة ، إلا أنها قصيرة الحياة ، والاستفادة منها كدليل أكسدة محدود ومقصور على المراحل الأولى لتطور التزنخ ، إذ تتكسر البيروكسيدات إلى الدهيدات أو ترتبط بالبروتينات . فيستخدم اختبار قيمة البيروكسيد لقياس المراحل الأولى والمتوسطة لأكسدة الدهون والزيوت المستخلصة من المنتجات البحرية . وأشهر الطرق استخداماً هى طريقة يوديد البوتاسيوم والثيوكبريتات ، مع حماية المستخلص الدهنى من الأوكسچين والضوء والحرارة لحين التقدير ؛ لذا يحفظ بالتجميد .

أ ـ أما قيمة الكاربونيل : فهى مقياس لمنتجات نهائية أكثر ثباتاً من البيروكسيدات التى تتحول إلى منتجات ثانوية تحتوى الكربونيل (C=O) ، وهذه الأخيرة قد تكون أحجار بناء لمركبات طيارة ذات رائحة . وأشهر طرق التقدير هى طريقة الهيدرازون ، لكن لا يمكن الاعتماد على هذا الاختبار بمفرده فلازم تقدير آخر مع تقدير قيمة الكربونيل للحكم على أكسدة الدهن فى السمك المجمد ، أو من منتجات الأسماك المختلفة .

ويجرى التقدير فى عينة الدهن بعد تحطيم محتواها من البيروكسيدات ، باستخدام دلائل ومحاليل خالية الكربونيل كالآتى :

١ ـ يهدم البيروكسيد بإضافة ١٠ مل محلول كلوريد قصديروز ٠,٥ ٪ (٠,٥ جم فى ٥٠ مل ميثانول + ٥٠ مل بنزين) إلى الدهن ، ويحفظ على درجة حرارة الغرفة لساعتين مع الهز من حين لآخر . أضف ٤٠ مل محلول كلوريد بوتاسيوم ٢٠ ٪ (١٠٠ جم كلوريد بوتاسيوم تذاب فى ٤٠٠ مل حمض هيدروكلوريك ١,٢ عيارى ويكمل بالحمض إلى ٥٠٠ مل) وقلب ، وانقل إلى قمع فصل ، وتغسل الآنية بكلوريد البوتاسيوم ٥ مل ثم ٢٥ مل بنزيناً ، وتضاف إلى قمع الفصل ، اخلط واترك لفصل الطبقات . انقل مايمكن نقله

من طبقة البنزين العليا إلى كأس ، أضف ٢٥ مل بنزينا إلى القمع وأعد الرج والفصل واجمع البنزين . أعد طبقات البنزين إلى قمع الفصل بعد سحب الطبقة السفلى (كلوريد بوتاسيوم) ، أضف ٢٥ مل كلوريد بوتاسيوم مائى ٣٠٪ ورج واترك لفصل الطبقات ، اسحب الطبقة السفلى ، كرر الغسيل ٣ مرات ، رشح ببطء البنزين إلى دورق معيارى ١٠٠ مل خلال كبريتات صوديوم لا مائية ، اغسل قمع الفصل بالبنزين واستمر فى غسيل كبريتات الصوديوم حتى تدريج الدورق المعيارى .

٢ ـ يتم تركيز الدهن فى المستخلص ، بوضع ١٠ مل من المستخلص البنزينى فى طبق تقدير رطوبة ألمونيومى (٣ مكررات) ، اسمح للبنزين بالتبخير فى خزانة غازات خالية من التراب حتى يتبقى الدهن (حوالى ١ ـ ١,٥ ساعة) . انقل الأطباق إلى فرن تجفيف على ١١٠° م لمدة ساعة ، وبرد على حرارة الغرفة (١٥ دقيقة) وزن . واحسب محتوى الدهن بالجرام / مل بنزين = وزن المتبقى / حجم المستخلص .

٣ ـ عاير الاسبكتروفوتومتر على ٤٤٠ نانومتر ، بضبط الجهاز على امتصاص صفر للبوتاسا الكاوية ٠,٠٥ مولر ، ثم قدر امتصاص بيكرومات البوتاسيوم (٠,٢٨ جم هيدروكسيد بوتاسيوم تذاب فى ٨٠ مل ماء مقطراً + ٠,٠٣٠٣ بيكرومات بوتاسيوم ويكمل إلى ١٠٠ مل) ويقدر معامل تصحيح الامتصاص (F) = ٠,٥٠٢ / امتصاص البيكرومات .

٤ ـ يقدر الكاربونيل بسحب ٣ مل محلول حمض ثلاثى كلوروخليك ٤,٣ ٪ (٤٣جم فى ١٠٠٠ مل بنزين خالى الكاربونيل) + ٥ مل محلول ٢ ـ ٤ دى نيتروفينيل هيدرازين (٠,٥ جم فى لتر بنزين خالى الكاربونيل هذا المحلول ثابت لعدة شهور) + ٥ مل مستخلص بنزين (يحتوى الدهن) ، أو ٥ مل بنزيناً نقياً للبلانك . سد الأوانى واخلطها وسخن فى حمام مائى نصف ساعة على ٦٥° م . برد على حرارة الغرفة بماء جار ، هذا المحلول ثابت عدة ساعات . أضف إلى كل آنية ١٠ مل محلول ٥ ٪ هيدروكسيد بوتاسيوم، وحضن على حرارة الغرفة ١٠ دقائق بالضبط ثم خفف إلى ٥٠ مل بالإيثانول خالى الكاربونيل (٢ لتر إيثانول ٩٥ ٪ مع ١ جم NaBH4 تحت مكثف عاكس ٢,٥ ساعة ثم قطر مع إهمال أول ٥٠ مل وآخر ١٠٠ مل واحفظ فى زجاجة غامقة من الضوء) . حضن على حرارة الغرفة ١٠ دقائق ثم قدر الكثافة الضوئية .

٥ ـ احسب قيمة الكاربونيل الكلية كوحدات امتصاص / جم دهن =

$$\frac{\text{الامتصاص} \times \text{معامل التصحيح}}{\text{جم دهن/مل} \times \text{حجم البنزين فى الآنية (٥مل)}}$$

ملاحظات :

البنزين خالى الكاربونيل : إذا كانت الكثافة الضوئية للبنزين مقابل الماء على ٤٣٠ نانومتر أقل من ٠,٣٥ يكون البنزين مقبولاً ، وإلا يتم تنقيته بإضافة ٥ جم ٢ ـ ٤ ـ دى نيتروفينيل هيدرازين + ١ جم حمض ثلاثى كلوروخليك إلى لتر بنزين تحت مكثف عاكس لمدة ساعة ثم قطره مع إهمال أول ٥٠ مل وآخر ١٠٠ مل واحفظه فى آنية ملونة بعيداً عن الضوء .

الميثانول خالى الكاربونيل : يضاف ٥ ـ ١٠ جم حبيبات ألمونيوم إلى لتر ميثانول + ٨ ـ ١٠ جم هيدروكسيد بوتاسيوم تحت مكثف عاكس لمدة ساعة ثم قطر واهمل أول ٥٠ مل وآخر ١٠٠ مل واحفظه من الضوء فى آنية ملونة .

ب ـ الأحماض الدهنية الحرة : يختلف إنتاجها طبقاً لدرجة حرارة التخزين ، نوع العضلات ، نوع السمك ، محتوى الدهن ، الموسم . وتستخدم كدليل على جودة السمك والمنتجات الغذائية . وتنتج الأحماض الدهنية الحرة بتحلل الجليسريدات الثلاثية والفوسفوليبيدات ، وتقدر فى الدهون والزيوت والأسماك ومنتجاتها غير المعاملة بالحامض ، وذلك بمعايرة مجاميع حمض الكاربوكسيلك بالصودا الكاوية فى وجود دليل أرجوانى ميتاكريزول ، ويعبر عنها بالميكرومول / جم زيت أو نسيج ، أو كنسبة مئوية وزنية من الزيت (بالتعبير عنها كحمض أوليك) .

١ ـ ويقدر فى المواد الصلبة (لحم أو مسحوق) بأخذ ١٠جم عينة + ٥٠ مل كلورفورم T + ٥٠ مل ميثانول ويخلط فى خلاط دقيقة . رشح ، أضف ٤٥ مل ماء مقطراً إلى الراشح ، انقل إلى قمع فصل ورج واترك ٢ ـ ٣ ساعات رشح الطبقة السفلى (كلورفورم) على كبريتات صوديوم لا مائية إلى دورق معيارى ١٠٠ مل وأكمل بالكلورفورم . اسحب منه ١٠ مل إلى طبق ألمونيوم واتركه يتبخر فى خزانة غازات ، ثم ضع الطبق يجف ساعة على ١٠٣ م ، برد وزن . انقل باقى المحلول من الدورق المعيارى إلى دورق مخروطى مع ٧٠ مل ٢ ـ بروبانول + ٣٥ مل ميثانول + ٨ نقط دليل أرجوانى ميتاكريزول ، عاير حتى نهاية نقطة التعادل البنفسجية بالصودا الكاوية ٠,٠٥ عيارى . مع عمل بلانك من نفس المحاليل .

٢ ـ وللتقدير فى عينات الزيوت أو الدهون ، يوزن ١ جم عينة مع ٧٥ مل كلورفورم / كحول إيزوبروبيل / ميثانول (٢ / ٢ / ١) لإذابة الدهن . أضف ٤ ـ ٥ نقط دليل ، عاير بالصودا الكاوية ، أجر بلانك .

٣ ـ احسب نسبة الدهن من الطريقة الأولى =

$$\frac{\text{(وزن الطبق بالدهن جاف ـ وزن الطبق) × حجم الدورق المعيارى}}{\text{الحجم المسحوب لوضعه فى الطبق × وزن العينة الأصلى}} \times ١٠٠$$

ثم احسب محتوى الأحماض الدهنية الحرة :

$$FFAT = \frac{1000 \times N_1 \times (V_4 - V_5)}{W_2 - \frac{V_2 \times W_2 \times P}{V_3}}$$

$$FFAF = \frac{FFAT}{F} \times 100$$

$$FFA = \frac{FFAT \times 2.82}{F}$$

حيث :

FFA = الأحماض الدهنية الحرة فى الدهن كنسبة مئوية كحمض أوليك .

FFAF = الأحماض الدهنية الحرة فى الدهن كميكرومول / جم دهن .

FFAT = الأحماض الدهنية الحرة فى النسيج كميكرومول /جم نسيج .

P = عدد محاليل راشح الكلوروفورم المسحوبة من الدورق المعيارى .

V_4 = حجم الصودا (مل) المعايرة للعينة .

V_5 = حجم الصودا (مل) المعايرة للبلانك .

F = ٪ دهن ، وزن العينة .

V_1 = حجم الصودا (٠,٠٥ عيارى) المعاير لوزن ٠,٣ جم فثالات بوتاسيوم فى وجود الفينولفثالين (لمعايرة الصودا) .

V_2 = حجم المستخلص المسحوب للطبق .

V_3 = حجم الدورق المعيارى .

N_1 = عيارية الصودا .

٤ ـ احسب الأحماض الدهنية الحرة من الطريقة الثانية كميكرومول / جم دهن =

$$FFAF = \frac{1000 \times N_1 \times (V_4 - V_5)}{W_3 \times F}$$

أو كنسبة مئوية (حمض أوليك) من الدهن =

$$FFA = \frac{N_1 \times (V_4 - V_5) \times 28.2}{W_3}$$

حيث W_3 = وزن الدهن (جم) .

١١ ـ مكونات دهنية مرتبطة بالتمثيل الغذائى :

أ ـ الأحماض الدهنية الطيارة في الدم وسائل الكرش :

الـــدم :

يضاف إلى ٢٠ مل من الدم ٨٠ مل حمض كبريتيك ٢,٠ عيارى ، وبعد ١٠ دقائق يضاف ٢٠ مل تنجستات صوديوم ١٠ ٪ . رشح ثم أضف ١ مل صودا كاوية ٣ عيارى إلى ٥٠ مل من الراشح خالي البروتين . حمض الأملاح بإضافة ٢ مل حمض كبريتيك ١,٦ عيارى (أو بإضافة إيثير أو ميثانول محمضين وهما الأفضل) .

سائل الكرش :

يؤخذ ٥ مل سائل كرش + ١٠ مل حمض ميتافوسفوريك ٢٥ ٪ واترك ٣٠ دقيقة ، واطرد مركزياً ١٠ دقائق بسرعة ٣ آلاف لفة / دقيقة .

وللتقدير : يؤخذ رائق العينات دون أى إجراءات أخرى للتحليل الكروماتوجرافى الغازى تحت ظروف برنامج حرارى من ٢٥٠ْ م للحقن لسرعة تبخيز العينة ، والعمود مليء بمادة Tween 80 (٢٠ ٪) ، وحمض فوسفوريك ٨٥ ٪ (٢ ٪) على كروموسورب ، والعمود بطول ١ م وقطر ٦ م ، وهو من الصلب الذى لا يصدأ ، وحرارة العمود ١٢٠ْ م ، ومخلوط الغازات من النيتروجين (١٢٠مل / دقيقة) والهيدروجين (٣٥ مل / دقيقة) والهواء (٢٥٠ مل/ دقيقة) . فتحت هذه الظروف يمكن خروج منحنيات الأحماض الدهنية الحرة ونظائرها فى ١٨ دقيقة . تقارن منحنيات محاليل قياسية لهذه الأحماض بمنحنيات العينات لتقدير تركيزاتها فى العينات .

ب ـ الأحماض الدهنية الطيارة الكلية فى الدم :

المحاليل :

١ ـ محلول حامض هيدروكلوريك ١,٠ عيارى (١٠مل حامضاً مركزاً فى اللتر) .

٢ ـ حامض أرثوفوسوريك مركزاً .

٣ ـ دليل أحمر الفينول (٠,٠٤ ٪) .

٤ ـ محلول صودا كاوية ٠,٠١ عيارى (٠,٤٢ جم فى اللتر أو 1 مل من ص أ يد ١٠ ٪ على لتر) ، ثم تقدر قوتها بالضبط لرابع رقم عشرى بواسطة حامض يد٢ كب أ٤ ٠,٠١ عيارى معلوم القوة) .

طريقة العمل :

١ ـ **ترسيب البروتين من العينة :** يؤخذ بالماصة ١٠ مل من العينة فى الدورق المعيارى ويضاف عليها ١٠ مل من حامض يدكل ١,٠ عيارى ، ثم يرج جيداً وبعد ٥ دقائق يكمل للعلامة بالماء المقطر ، ثم يفصل راسب البروتين بالترشيح ويؤخذ الراشح فى الدورق

obeikandl.com

المخروطى لتقدّر فيه الأحماض الدهنية الطيارة .

٢ ـ التقطير : يشغل الجهاز Markharm لمدة ٢٠ دقيقة على ماء مقطر لغسله ، ثم يوضع فى الجهاز ٥ مل من العينة ثم يضاف ١ مل من حامض الفوسفوريك وتقفل فتحة العينة بالسدادة ، ويوضع فوقها كمية من الماء المقطر ، ويمرر البخار ، وتقفل فتحة البالوعة وتستقبل القطرات فى القابلة حتى تجمع منها ٥٠ مل .

٣ ـ التنقيط : يوضع فى القابلة نقطتان من دليل أحمر الفينول ثم يغمس داخل القابلة أنبوبة تمرير الهواء الخالى من ك أ٢ أو غاز النيتروجين ، ثم يجرى التنقيط بالصودا الكاوية ٠,٠١ عيارى حتى اللون البرتقالى ، وعدد ملليلترات الصودا ×قوتها = مللى مكافئ أحماض دهنية طيارة .

جـ ـ كوليسترول الدم :

خذ ٠,٥ مل سيرم أو بلازما مع ٥ مل محلول هيدروكسيد بوتاسيوم كحولى محضرة طازجاً (٦ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ٣٣ ٪ + ٩٤ مل كحولاً مطلقاً) ، ورج جيداً ثم حضن على ٣٧° م لمدة ٥٥ دقيقة ، برّد إلى حرارة الغرفة ، ثم أضف ١٠ مل إيثير بترولى واخلط ، أضف ٥ مل ماء ورج دقيقة ، أطرد مركزياً ٥ دقائق . خذ ٤ مل رائق إيثير بترولي في أنبوبة جافة ، وحضنها على ٦٠° م في حمام مائي ، بخر المذيب في الهواء .

حضر محلول قياسي (أذب ١٠٠ مجم كوليسترول جافاً في كحول مطلق ، وأكمل إلي ٢٥٠ مل فيكون التركيز ٠,٤ مجم / مل) بأخذ ٥ مل منه مع ٠,٣ مل محلول هيدروكسيد بوتاسيوم ٣٣٪ ، وأكمل كما سبق مع العينة .

حضن أنابيب العينات (الجافة) ، والمحلول القياسي ، والبلانك (أنبوبة فارغة) ، في حمام ماء على ٢٥° م ، وأضف إلى كل منها ٦ مل دليلا ملوناً (حجم من حمض كبريتيك مركز تضاف إلى ٢٠ حجم أنهيدريد حمض الخليك (تحت ١٠° م) ، ورج واحفظه بارداً ٩ دقائق ، ثم أضف ١٠ حجوم حمض خليك ثلجي ، ودفئ على حرارة الغرفة ، يستخدم في ظرف ساعة واحدة من التحضير) ورج ورجع إلى الحمام المائي ٣٠ دقيقة أخرى ، ثم قدر الكثافة الضوئية على ٦٢٠ ملي ميكرون وقدر تركيز الكوليسترول الكلي مجم / ١٠٠ مل سيرم = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة X تركيز المحلول القياسى X ٥٠٠}}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسى}}$

ترتفع قيم كوليسترول الدم عادة في أمراض الكلى والبنكرياس والمرارة ، بينما انخفاضها غير معروف ، وإن كانت زيادة نشاط الغدة الدرقية تخفض لحد ما تركيز كوليسترول الدم ، كما تنخفض القيم في حالات الأنيميا وسوء الامتصاص والعدوى الحادة .

د ـ الفوسفو ليبيدات فى الدم :

تنقل ١٨ مل مخلوط كحول / إيثير ١/٣ إلى أنبوبة ، وبالتنقيط مع الرج يضاف ١ مل

بلازما أوسيرم ، وتخلط ثم توضع في حمام ماء يغلي حتى تغلي محتويات الأنبوبة . برّد الأنابيب إلى حرارة الغرفة ، وأكمل إلى علامة ٢٠ مل بنفس مخلوط الاستخلاص واخلط ثم رشح . انقل ٨ مل راشحاً إلى أنبوبة أخرى ، وجفف بالتبخير على سخان كهربائي . أضف ٢,٥ مل حمض كبريتيك ٥ عياري إلى متبقيات العينة الجافة ، واهضم على سخان كهربائي في وجود نقط من فوق أوكسيد هيدروچين ٣٠٪ . وأكمل إلى حجم معلوم ، ثم قدر الفوسفور بأي طريقة عادية ، واستنتج تركيز الفوسفور ، فهو فسفور الليبيدات بالمليجرام / ١٠٠ مل عينة . ولما كان الليسيثين هو أهم الفوسفوليبيدات من حيث الكم في بلازما الدم ، فإنه بتقدير الفوسفور الكلي وضربه في ٢٥ (حيث يحتوي الليسيثين على حوالي ٤٪ فوسفور) نحصل على تركيز الفوسفو ليبيدات في البلازما .

ويرتبط عادة تركيز فوسفوليبيدات البلازما بتركيز كوليسترول البلازما ، فتزيد الفوسفوليبيدات بزيادة الكوليسترول ، ويظهر ذلك في أمراض الكبد والقناة الصفراوية والبنكرياس .

هـ ـ الأجسام الكيتونية :

الأجسام الكيتونية في الدم والبول (اختبار نصف كمي) :

يحضر مخلوط أملاح من ١ جم صوديوم نيتروبروسيد (ناعم جداً) + ٢٠ جم كبريتات أمونيوم + ٢٠ جم صوديوم كربونات لامائية ، يخلط المخلوط جيداً في هاون ، ويمكن حفظه للاستخدام في مدى عام .

يوضع قليل من هذا المخلوط (بقطر ٥ م) على ورقة ترشيح ، ثم يضاف عليه نقطة من البول أو السيرم ، يظهر لون بنفسجي نتيجة وجود الأسيتون وحمض أسيتوأسيتيك بأقل تركيز منها (حوالي ١٠ مجم / ١٠٠ مل) ، فإذا ظهر اللون (اختبار موجب) فيخفف البول أو السيرم للضعف ويكرر الاختبار ، فإن ظل موجباً فيخفف أكثر ، ويعاد الاختبار حتى لا يظهر لون ، فإن كان آخر تخفيف يعطي لوناً (× ١٠) يكون تركيز الأسيتون وحمض الأسيتوأسيتيك حوالي ١٠٠ مجم / ١٠٠ مل .

وقد يحضر هذا المخلوط بخلط جزء من نيتروبروسيد صوديوم مع ١٠٠ جزء من كبريتات أمونيوم بالطحن في هاون، ثم ضع حوالي ١جم من هذا المخلوط في أنبوبة اختبار مع ٥ مل بول والخلط لإذابة الأملاح ، ثم إضافة ٢ مل هيدروكسيد أمونيوم ، فإذا وجد الأسيتون ظهرت حلقة بنفسجية اللون ، فهذا الاختبار حساس لوجود كل من الأسيتون وحمض ثنائي الخليك .

كما يمكن إذابة ٣٠ جم نترات أمونيوم + ٢ جم نيتروبروسيد صوديوم في ٨٠ مل ماء، ووضع ٣ مل بول في أنبوبة اختبار مع ١ مل من هذا الدليل والخلط ثم إضافة ١ مل

نشادر بالتنقيط من قطارة ، فيظهر لون البرمنجنات في حالة إذا ما كان اختبار الأسيتون هذا موجباً .

وتظهر الأجسام الكيتونية في البول نتيجة اضطرابات ميتابوليزم الدهون في حالة مرض السكر ، وفي حالات الجوع الطويلة ، وفي التغذية المفرطة على علائق غنية الدهن فقيرة الكربوهيدرات ، وفي الحميات ، وفي مرض تخزين الجليكوچين ، وفي التسممات ، وعند المعاملة بهرمونات النمو ، وعند زيادة جرعة الحقن بالأنسولين .

تقدير الأجسام الكيتونية ضوئياً في الدم :

يتم ترسيب بروتين الدم مباشرة عقب جمع العينات ، فيؤخذ ١ مل دماً في أنبوبة تحتوي ٢ مل ماء + ٣ مل هيدروكسيد باريوم ٠,١٥ عياري ، وتقلب الأنبوبة عدة مرات، وتترك ساعة لتمام الترسيب ، يضاف بعد ذلك ٣ مل كبريتات زنك (٢,٥ ٪) ، وترج وتطرد مركزياً ، يستخدم الرائق للتقدير .

١ ـ تقدير الأسيتون : يؤخذ ٣ مل من رائق العينة في الغرفة الخارجية لوحدة Conway ، ويضاف إليها ٣ نقط من حمض الخليك (٢٠ ٪) ، يضاف ٢ مل دليلا (٠,١ مل ساليسيل ألدهيد تضاف إلى ٨ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ٤ عياري) في الغرفة الداخلية للوحدة ، وتغطي الوحدة وتترك ١٦ ساعة على ٣٠°م . يؤخذ ١ مل من المحلول الملون في الغرفة الداخلية ويضاف إلى ٨ مل ماء ، وتقرأ الكثافة الضوئية على ٤٩٠ نانومتر للعينات المحتوية حتى ٨ مجم / ١٠٠ مل أسيتون ، وعلى ٥٤٠ نانومتر للعينات المحتوية حتى ٨٠ مجم / ١٠٠ مل أسيتون . يجرى عمل تقدير مماثل لمنحنى قياسي لمحاليل أسيتون قياسية .

٢ ـ تقدير الأسيتون وحمض الأسيتوأسيتيك : يوضع ٣ مل من رائق العينة (بعد ترسيب بروتينها) مع ٠,٦ مل حمض كبريتيك ٢٠ عياري + ٠,٥ مل ماء في قابلة صغيرة ، وتغلي تحت مكثف عاكس (مع دهان الوصلات بفازلين) ١٠ دقائق ، ثم تبرد بالماء ، ويؤخذ منها ٣ مل لتقدير الأسيتون ، كما سبق عاليه .

٣ ـ تقدير الأجسام الكيتونية الكلية : يؤخذ ٣ مل من رائق العينة (بعد ترسيب بروتينها) مع ٠,٦ مل حمض كبريتيك ٢٠ عياري في قابلة ، ويغلي ١٠ دقائق تحت مكثف عاكس .

برد الجهاز ، وأضف إلى العينة ٠,٥ مل ثاني كرومات بوتاسيوم (٠,٥ ٪) بواسطة سرنجة ، سد الجهاز ثانية ، واغل ٣٠ دقيقة تحت مكثف عاكس . برد واخلط وقدر الأسيتون ، كما سبق عاليه .

المحاليل القياسية من البيتاهيدروكسي بيوترات تجرى على صوديوم بيتاهيدروكسي بيوترات ؛ بينما لحمض الأسيتوأسيتيك فتحضر من خلات الإيثيل طازجة التقطير

(٢,٦ مل) بإضافتها إلى صودا كاوية عيارية (٢٠ مل) ، وتحضينها ١,٥ ساعة على ٤٠°م، ثم التبريد والرج مع الإيثير ٤ مرات لإزالة أي خلات إيثيل متبقية دون تحويل ، ويحمض المحلول المائي بحمض هيدروكلوريك عياري ، ويرج ٤ مرات أخرى مع الإيثير ، يجمع الإيثير ويجفف على كبريتات صوديوم لامائية على ٤°م ، وبعد ٦ ساعات ترشح المستخلص الإيثيري ويبخر تحت تفريغ على ٣٠-٤٠°م ، تذاب المتبقيات عديمة اللون في ماء ويكمل إلى لتر، المحلول يحتوي حمض أسيتوأسيتيك مكافئاً تقريباً لمحلول أسيتون ١٤مجم / ١٠٠ مل . احفظ في ثلاجة على ٤°م ، يعاير بهدمه كمياً مع حمض كبريتيك ٢٠ عياري وتقدير الأسيتون المتكون بنفس الطريقة المذكورة عاليه .

الفرق بين ٢ ، ١ يعطي تركيز حمض الأسيتوأسيتيك بينما الفرق بين ٣ ، ٢ يشير إلى حمض البيتا هيدروكسي بيوتريك .

وتقدير الأجسام الكيتونية في اللبن بورق دليل سابق التجهيز .

وفي الحيوانات الصحيحة يخلو اللبن تقريباً من الأجسام الكيتونية ، وعادة يكون محتوى اللبن حوالي نصف التركيز في الدم ، أي حوالي ٠,٤-٠,٨ مجم / ١٠٠ مل ، بينما في السيرم ١,٩ ± ٠,٨ مجم / ١٠٠ مل . وبزيادة الأجسام الأسيتونية (كيتونية) في دم الماشية يصاحبه أيضاً زيادتها في كل من اللبن والبول ، وهو دليل اضطراب ميتابوليزم الكربوهيدرات ، وزيادة هدم الدهون . ويصل تركيز الأجسام الكيتونية في البول حوالي خمسة أضعاف ما في اللبن .

و ـ صبغات الصفراء في الدم :

زيادة بيليروبين الدم يدل على وجود انسدادات في القنوات المرارية ، مؤدية إلى إعادة امتصاص المواد الذائبة في الماء والمارة خلال الكبد والمرتبطة به ، فزيادة البيليروبين يصاحبه فشل وظيفي في خلايا الكبد ، أو تحطيم تحليلي لكرات الدم الحمراء . وللتقدير للبيليروبين يجرى التالي :

خفف ٠,٢ مل سيرم أو بلازما إلى ٢ مل بالماء . حضر ٦ أنابيب لتقدير البيليروبين المباشر أو المرتبط في دقيقة وبلانك ، بيليروبين كلي وبلانك ، محلول قياسي وبلانك . أضف إلى الأنابيب ١ ، ٢ ماء مقطرا (٠,٥ مل) ، وإلى الأنابيب ٣ ، ٤ ، ٥ ، ٦ يتم إضافة ٠,٥ مل كحول ميثيل مطلقاً، ثم إلى الأنابيب ٢ ، ٤ ، ٦ مقدار ١ مل دليلا (٦٠ مل حمض هيدروكلوريك مركز / لتر ماء) ، وإلى الأنابيب ١ ، ٣ ، ٥ مقدار ٠,١ مل دليلا (أضف ٦٠ مل حمض هيدروكلوريك مركزاً إلى ٥ جم حمض سلفانيليك وأذب ثم أكمل إلى لتر بالماء ، أذب ٢ جم نيتريت صوديوم في ماء وأكمل إلى ١٠٠ مل ، واحفظه بعيداً عن الضوء ، وقبل الاستخدام مباشرة أضف ١٠ مل من المحلول الأول إلى

٠,٣ مل من المحلول الثاني لتكوين الدليل) ، أضف ٠,٤ مل سيرم مخففاً إلى الأنابيب ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ واخلط . خفف ٠,٢ مل محلولا قياسياً (أذب ١٠٠ مجم بيليروبين في كلورفورم وخفف إلى ١٠٠ مل في إناء غامق ، واحفظ في ثلاجة لحين تحضير التخفيف النهائي قبل الاستخدام مباشرة ، بتخفيف ١ مل منه إلى ١٠٠ مل بكحول الميثيل فيكون التركيز النهائي ٠,٠١ مجم / مل) إلى ٢ مل بكحول الميثيل المطلق . أضف ٠,٤ مل محلولا قياسياً مخففاً إلى كل من الأنابيب رقم ٥ ، ٦ . بعد دقيقة بالضبط (باستخدام ساعة إيقاف) من الخلط قدر الكثافة الضوئية للأنبوبة الأولى على ٥٤٠ نانومتر مع ضبط الجهاز على محتويات الأنبوبة الثانية .

بعد ١٠ دقائق بالضبط من إضافة السيرم ، قدر الكثافة الضوئية للأنبوبة الثالثة على ٥٤٠ نانومتر مع ضبط الجهاز على الصفر باستخدام محتويات الأنبوبة الرابعة . ثم قدر الكثافة الضوئية للأنبوبة الخامسة على نفس طول الموجة مع تصفير الجهاز على محتويات الأنبوبة السادسة .

احسب تركيز البيليروبين المباشر أي المرتبط في دقيقة بالملليجرام / ١٠٠ مل سيرم =

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة (الأنبوبة الأولى)} \times ١}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي (أنبوبة ٥)}}$$

تركيز البيليروبين الكلي مجم / ١٠٠ مل سيرم =

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة (أنبوبة ٣)} \times ١}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي (أنبوبة ٥)}}$$

حيث إن المحلول القياسي الميثانولي مساوٍ للبيليروبين المباشر (المرتبط) في دقيقة والكلي.

تركيز البيليروبين غير المباشر مجم / ١٠٠ مل سيرم = تركيز البيليروبين الكلي – تركيز البيليروبين المباشر .

ز ــ هيدروكورتيزون البلازما :

لما كانت ستيرويدات غدة قشرة الأدرينال تتدخل في ميتابوليزم المعادن والكربوهيدرات ، وهذه الإستيرويدات تدور مع الدم في الجسم وتخرج في البول ، فتقديرها يدلل على وظيفة قشرة الأدرينال (كمكان لتخليقها) وكفاءتها .

انقل ٥ مل بلازما (عينة بعد صيام) إلى ٢٥ مل ثنائي كلورومیثان ، ورج بشدة ١٥ ثانية ، أضف ٢ مل هيدروكسيد صوديوم ٠,١ عياري إلى مستخلص ثنائي كلورومیثان بعد فصل البلازما ورج بشدة ٢٠ ثانية ، واترك لفصل الطبقات ، أهمل الطبقة المائية . انقل

١٠ مل مستخلص ثنائى كلوروميثان إلى أنبوبة اختبار ، وأضف إليها ٠,٢٥ مل دليل لون (أذب ٥٠ مجم فينيل هيدرازين هيدروكلوريد فى ٥٠ مل مخلوط حجمين ، حمض كبريتيك ٦٤٪ مع حجم كحول إيثيل ، يحضر طزجاً يومياً) ورج بشدة ١٥ ثانية ، واترك ٣٠ دقيقة . اعزل واهمل الطبقة العليا ، واترك الطبقة المائية ٨ ـ ٢٤ ساعة على حرارة الغرفة لتطوير اللون .

عدّ بلانك على ٥ مل ماء بدلاً من البلازما ، وعدّ كذلك محلولاً قياسياً (أذب ١٠٠مجم هيدروكورتيزون في ١٠٠ مل كحول مطلقاً ، وخفف منه ١ مل إلى ٢٠٠ مل بالماء ، فيحتوي ٥ ميكروجرام هيدروكورتيزون / مل) بأخذ ١ مل منه + ٤ مل ماء وأكمل كما في العينة والبلانك .

قدر الكثافة الضوئية على ٤١٠ نانومتر لتقدير تركيز الهيدروكورتيزون بالميكروجرام / ١٠٠ مل بلازما = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ١٠٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}}$

ولمزيد من الاطلاع يرجع إلى المراجع التالية :

– شريف صادق إبراهيم (١٩٧١) : مذكرة أساسيات الكيمياء الحيوية والتحليلية والجزء العملى ـ المنصورة .

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

– فتحى أحمد عبد الحافظ (١٩٦٦) : الكيمياء التحليلية الكمية – دار الهنا للطباعة .

– مصطفى صفوت محمد (وآخرون) (١٩٦٣) : كيمياء وتحليل الأغذية ـ دار المعارف بالاسكندرية .

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

- Block, H. J. & Weissbach, F. (1982) Arch. Tierernahrung, 32: 693 .

- Bottcher, W. (1982) Arch. Tierernahrung, 32 : 287 .

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

- Egan , H. etal (1981) pearson's Chemical Analysis of Foods . 8 th Ed., Churchill Livingstone, Edinburg & London .
- Elmer , H. M . (1978) Standard methods for the examination of dairy products . 14 th Ed . American public health Association , Washington .
- Erwin , E. S . et al . (1961) J . Dairy Sci., 44 : 1768.
- Folch, J. et al . (1957) J. Biol . Chem. 22 6 : 497 .
- Gruber, P. (1961) Die Bodenkultur, 12 : 332 .
- Gruenwedel, D. W. & Whitaker, I. R. (1985). Food an alisis, Vol.3, Marcel Dekker, N. Y.
- Holme, D. G. & Peck, H. (1993) . Analytical Biochemistry . 2 nd. Ed., Longman, printed in singapore .
- J. AOAC (1975) Food Analysis , 3 rd Ed., Leonard Hill Book , London .
- Leitgeb, R. (1979) Futtermittelkunde, Vorlesungen, Univ. F. Boku., Wien .
- Lowry , R. R. & Tinsly , I . J. (1976) J. AOCS, 53 : 470 .
- Merck, E. (1974) Klinisches Labor , 12 . Auflage , Merck, Darmstadt.
- Merck, E. (1976) Labordiagnostik in der Tiermedizin , Merck, Darmstadt .
- Merck , E. (1980) Arbeitsanleitungen für die klinisch Chemie . Diagnostica , Merck, Darmstadt .
- Meyer, H. et al . (1980) Supplemente zu Vorlesungen und übungen in der Tierernahrung. 5 . Auflage, Sprungmann Verlag, Hannover
- Oser, B. L. (1979) Hawk's physiological chemistry . 14 th Ed., Tata Me Graw - Hill , N. Y.
- Procos, J. (1961) Clin . Chem . , 7 : 79 .

- Ramsey , H. A. (1963) J. Dairy Sci., 46 : 480 .
- Sanderson , P. (1986) In : Haresign, W. & Cole , D. J. A. (ed) Recent Advances in Animal Nutrition. Butterwarths, London .
- Schmit . M. (1981) Laboruntersuchungen - Veterinarmedizin . Boehriger , Mannheim .
- Soliman, M . K. & Abd El Moty, I. (1979) A modern approach to veterinary clinical & laboratory Diagnosis . The scientific Book Centre , Cairo .
- Stein , E. A. (1986) In : Tietz , N. W. (ed) Textbook of clinical Chemistry , Saunders, Philadelphia .
- The Feeding stuffs (Sampling and Analysis) Regulations 1982 (1982) Agriculture 1982 No 1144 . Her Majesty's Stationery Offic , London .
- Varley , H. (1978) Practical Clinical Biochemistry . 4 th Ed., Arnold - Heienmann , India .
- Watson , D. (1960) Clin . Chim . Acta , 5 : 637 .
- Wells, B. B. (1962) Clinical Pathology . 3 rd Ed. , Saunders, Philadelphia & London .
- Wootton, I. O. P. (1974) Microanalysis in Medical Biochemistry, 5 th Ed . , Churchill, London .
- Woyewoda , A. D. etal. (1986) Can. Tech. Rep. Fish. and Aquatic Sci. No 1448 .

obeikandl.com