الفصل الثالث

البروتينات والمركبات النيتروجينية

يوجد الأزوت بشكل كبير في صورة عضوية ، والقليل منه في صورة نشادر ونترات ونيتريت خاصة في الأعلاف النباتية . ويشمل هذا القسم البروتينات البسيطة والمركبة والمشتقة ، ونواتج انحلالها وهدمها من ببتيدات وأحماض أمينية وأميدات وكرياتنين وكرياتينين وبيرميدين وبيورين (سواء حرة أو ضمن تركيب مركبات كالأحماض النووية والفيتامينات والقلويدات والجليكوزيدات والفسفوليبدات والصبغات والإنزيمات) .

ويقدر النيتروجين بغرض تقدير البروتين الخام Crude Protein ، لكون البروتين أهم المركبات الأزوتية وأكثرها وجوداً . ونظراً لأن معظم البروتينات تحتوي ١٦ ٪ نيتروجين ، فبضرب النيتروجين المقدر في مادة ما × ٦,٢٥ $\left(\frac{١٠٠}{١٦}\right)$ نحصل على النسبة المئوية للبروتين في العينة .

ويقدر النيتروجين بالحرق الجاف (في جومن CO_2 ومادة مؤكسدة كأكسيد النحاس في أنبوبة احتراق ، ويقاس غاز النيتروجين بجهاز Nitrometer ، وهي طريقة غير عملية لاحتياجها كثير من الوقت وهي صعبة الأداء) ، أو بالتسخين مع قاعدة (وهي غير مستعملة في التحليل الغذائي ؛ لأن بعض المركبات الأزوتية لا تعطي نشادراً مع الصودا الجيرية) ، أو بطريقة كلداهل وهي المستعملة في التحليل الغذائي وتتلخص في هضم المادة رطباً بحامض قوي (كبريتيك أو مخلوط مع البيركلوريك ، أو مع الفوسفوريك) يتحول على أثرها الأزوت إلى كبريتات أمونيوم . وتتلخص طريقة كلداهل فيما يلي :

١ ـ الهضم :

بأكسدة المادة العضوية إلى المكونات المختلفة مثل CO_2 ، H_2O ، NH_4 ، $(NH_4)_2SO_4$ ، وتتحول المعادن إلى أملاح كبريتات ، وذلك بحمض الكبريتيك ، ولا يفضل استخدام حمض البيركلوريك لأنه مؤكسد قوي ، فيؤدي إلى فقد بعض الأزوت فلا يستخدم إلا مع المواد المقاومة للأكسدة . وقد يستخدم H_2O_2 كذلك كعامل مؤكسد .

ويحتاج الهضم إلى عوامل مساعدة Catalysts ككبريتات البوتاسيوم (لا تزيد عن ١٠ جم لكل ٢٥ مل حمض كبريتيك مركزاً ، وإلا تجمدت الكتلة بعد التبريد من الهضم) لرفع درجة الغليان ، وقصر وقت الأكسدة ، أو قد يستخدم كبريتات نحاس (كبر تركيزها يكون معقداً مع الأمونيا صعب التحلل) ، أو الزئبق (يتحد كذلك مع الأمونيا فيلزم إضافة ثيوكبريتات صوديوم لتكسير المعقد ، أو يخلط الزئبق مع كبريتات النحاس) ،

والأفضل استخدام مخلوط كبريتات بوتاسيوم / كبريتات نحاسيك (٩٥/ ٥) ، أو كبريتات نحاسيك / أكسيد زئبقيك (٠,٧/١) ، أو كبريتات النحاس / كبريتات بوتاسيوم (٤/١) + ٠,٥٧ جم أكسيد سيلينيوم أو ١,٨ جم سلينات صوديوم / ٤٠٠ جم مخلوطاً . ويستمر الهضم ٦– ٨ ساعات ، أو حتى يروق المحلول ، إذ إن خفض مدة الهضم لا يتحول معها كل الأزوت بالعينة إلى أمونيا ، كما إن زيادة مدة الهضم يؤدي إلى فقد في الأمونيا .

٢ ـ التقطير :

بعد الهضم يترك الدورق يبرد ثم يجفف بحذر بماء مقطر (مع ترسيب الزئبق أو أكسيد الزئبقيك إذا استعملا كعاملين مساعدين وذلك قبل إضافة القلوي ، وإلا اتحدا مع الأمونيا مكونين معقدات ؛ لذا يرسبان أولاً بإضافة ٢٥ مل أو أكثر من كبريتيد بوتاسيوم ، أو صوديوم ٤ ٪ ، أو ثيوكبريتات صوديوم ٨ ٪) مع إضافة خارصين محبب أو حجر خفاف لمنع الانفجارات أثناء الغليان مع ٠,٥ جم زيتاً معدنياً لمنع الفوران Frothing خاصة في وجود الدهن ، ثم إضافة القلوي ١٢ عياري أو مشبعاً مع عدم زيادته ، منعاً للنقل الميكانيكي للقلوي أثناء التقطير ، ويوصل الدورق بمكثف عن طريق مصيدة Trap تمنع وصول رذاذ الصودا الكاوية إلى المكثف أو إلى القابلة . امزج الدورق بالهز مع الحذر ، ويجرى التقطير حتى انتهاء تصاعد النشادر (١٥٠ مل متقطراً أو تغيير لون محتويات الدورق بالهز من الأزرق إلى البني في نهاية مدة التقطير لتطاير الأمونيا وتكوين هيدروكسيد ثم أكسيد نحاسيك (إذا استخدم النحاس كعامل مساعد) أو لمدة ساعة .

٣ ـ التنقيط :

يستقبل المتقطر في حجم معلوم من حامض معلوم القوة مع دليل مناسب ، ويجب أن تكون الأنبوبة التي تصل بالمكثف طرف القابلة مزودة بانتفاخ ، ويغمر طرف الأنبوبة في الحامض ، حتى إذا شفط الحامض من الدورق لا ينتقل إلى المكثف ودورق الهضم ، ويجب أن تكون كمية الحامض بالقابلة أكبر من كمية الأمونيا المتقطرة .

بعد التقطير يغسل طرف الأنبوبة على القابلة ، وينقط الحامض الزائد للمعادلة ومن ذلك تحسب كمية الأمونيا المتولدة . وقد يستخدم حمض بوريك H_3BO_3 ٥ ٪ مع دليل برتقالي ميثيل أو أحمر كونجو لاستقبال الأمونيا ، وحجم الحامض هنا ليس له تأثير فلا داع لقياس كميته بالضبط ، فتتفاعل الأمونيا مع البوريك مكونة ميتابورات أمونيوم .

$$NH_4 + H_3BO_3 \longrightarrow (NH4)_3\ BO_3$$

يتم معادلتها بحمض Hcl معلوم العيارية مباشرة .

ويجرى حساب مقدار الأزوت من مكافئات النشادر المتولدة .

ورغم اعتمادنا الكبير على طريقة كلداهل هذه منذ عام ١٨٨٣ وحتى اليوم وغداً ، إلا

أنها لا تخلو من العيوب التي نحصرها في التالي :

١ ـ المعامل ٦,٢٥ لتحويل الأزوت إلى بروتين يحمل نسبة خطأ ترجع إلى أن المواد المختلفة تحتوى مواداً أزوتية غير بروتينية ، مثل الأمونيا والأحماض الأمينية التي ترتفع فيها نسبة الأزوت إلى أكثر من ٨٠٪ ، وبذلك فالمعامل ٦,٢٥ يعطي تقديرا خاطئاً في هذه الحالات .

٢ ـ نسبة الأزوت في البروتينات المختلفة ليست ثابتة بل تختلف كذلك في البروتين الواحد على حسب تصحيح التقدير بالنسبة للرطوبة أو للرماد .

٣ ـ من الصعوبات كذلك اختيار أحسن العوامل المساعدة (المسرعة للهضم والأكسدة لقابليتها حمل الأوكسجين) بأفضل النسب ، وكذلك تحديد أنسب مدة هضم لا تؤدي إلى أخطاء في التقدير .

وعموماً لا ضرر كبير في استعمالها في مواد العلف التي ستتغذى عليها الحيوانات المجترة لاستفادتها من المواد الأزوتية غير البروتينية .

وفيما يلي بعض طرق تقدير الأزوت :

١ ـ طريقة الماكرو كلداهل Macro Kjeldahl للمواد الغذائية :

وتجرى كالتالي :

١ ـ زن ١ جم مادة غذائية بالضبط على ورقة ترشيح ، وانقلها إلى دورق هضم (دورق كلداهل) جاف (على ألا يعلق شيء منها برقبة الدورق) سعة ٥٠٠ مل .

٢ ـ أضف ببطء وحذر من مخبار حوالي ٢٠ مل حمض كبريتيك مركزاً على جدران الدورق ليأخذ منه ما قد يعلق من العينة على رقبة الدورق . رج لخلط العينة بالحمض واترك الدورق ١٠-١٥ دقيقة .

٣ ـ أضف نقطة واحدة من الزئبق كعامل مساعد ، وارفع الدورق على حامل جهاز الهضم بخزان الغازات .

٤ ـ ابدأ التسخين بلهب هادئ ، وارفع الدورق عند حدوث فوران ، مع رجه دائرياً في مستوى أفقي باحتراس حتى يهبط المحلول إلى القاع ، فيعاد الدورق على اللهب مع ملاحظته .

٥ ـ سخن ١٥ دقيقة بعد انتهاء الفوران ، ثم أضف ١٠ جم كبريتات بوتاسيوم أو صوديوم لا مائية لرفع درجة الغليان .

٦ ـ استمر في التسخين الهين حتى بدء ظهور تغيير في لون المادة وظهور أبخرة بيضاء لحمض الكبريتيك ، بعد ذلك سخن بلهب قوي حتى تبيض محتويات الدورق ، واستمر في التسخين لمدة ساعة بعد ذلك .

٧ ـ أطفئ اللهب ، واترك الدورق يبرد لحد ما (لا يبرد نهائياً فتجمد المادة وتلتصق بالقاع) .

٨ ـ أضف قليلاً من الماء المقطر باحتراس (إذا كانت المادة لاصقة بالقاع فسخن أولاً على لهب ضعيف حتى الغليان والتفتت) .

٩ ـ انقل محتويات الدورق كمياً باحتراس إلى دورق التقطير ، ثم يغسل الدورق بالماء وينقل ماء الغسيل كمياً إلى دورق التقطير ، ويستمر الغسيل حتى خلو الغسيل من الحموضة ، وألا يتعدى الحجم الكلي النهائي ٢٥٠ مل .

١٠ـ ضع قطعاً صغيرة من الحجر الخفاف أو الفخار لتنظيم الحرارة ومنع الفوران (أو قطع الزنك التي تمنع الغليان الانفجاري لتوليدها للهيدروچين) .

١١ـ جهز دورق استقبال (قابلة) بها ٢٥ مل حمض كبريتيك ٠,٢ عياري معلوم القوة بالضبط + نقطتي دليل أحمر ميثايل ، على أن تظل أنبوبة التوصيل منغمسة في الحامض باستمرار وأثناء فترة التقطير .

١٢ـ يخلط ١٢٠ مل هيدروكسيد صوديوم ٤٣٪ (٤ مل / ١ مل حمض كبريتيك مركز) لمعادلة الحامض المركز وطرد النشادر ، مع ٢٥ مل كبريتيد صوديوم أو بوتاسيوم ٤٪ لكل نقطة زئبق .

١٣ـ يضاف المخلوط السابق لدورق التقطير بسرعة بواسطة قمع ذي ساق واسعة طويلة ، ويسد الدورق بسرعة ويوصل جهاز التقطير .

١٤ـ سخن تسخيناً هيناً مستمراً ، وتستمر عملية التقطير لمدة نصف ساعة أو انتهاء خروج غاز الأمونيا (يكشف عن انتهاء خروج غاز الأمونيا بغمس طرف أنبوبة التوصيل في محلول نسلر) ، افصل دورق الاستقبال أولاً ثم أطفئ اللهب .

١٥ـ اغسل أنبوبة التوصيل أسفل المكثف بماء مقطر على القابلة ، وعادل الحامض الباقي بها بواسطة هيدروكسيد صوديوم معلوم القوة واحسب النتروچين كالتالي :

ـ عدد مكافئات حمض الكبريتيك بالقابلة = عدد مكافئات الأمونيا المتصاعدة من العينة + عدد مكافئات هيدروكسيد الصوديوم المستعملة في التعادل الرجعي .

ـ وزن الأمونيا جم = عدد مكافئات الأمونيا + الوزن المكافئ للأمونيا .

ـ وزن النيتروچين جم = وزن الأمونيا × ١٤ / ١٧ .

ـ وزن البروتين جم = وزن النيتروچين × ٦,٢٥ .

ملاحظات على الطريقة السابقة :

١ ـ يجب خلو جميع الكيماويات المستخدمة من عنصر النتروچين ، وتجرى تجربة خاوية باستخدام ١ جم سكر قصب بدلاً من العينة ، وتعامل كالعينة ويخصم ما يستخرج

معها من أزوت من العينات .

٢ ـ إضافة كبريتور البوتاسيوم أو الصوديوم في دورق التقطير لترسيب الزئبق المستعمل كمادة مساعدة في الهضم فى صورة كبريتور زئبق .

٣ ـ يمزج هيدروكسيد الصوديوم والكبريتور وإضافتهما معاً ، لأنه لو أضيفت الصودا الكاوية أولاً والكبريتور ثانياً يحتمل حدوث فقد في النشادر خلال الفترة بين الإضافتين ، وإضافة الكبريتور أولاً والصودا ثانياً يؤدي لتفاعل الكبريتور مع الحامض وينتج غاز كبريتور الهيدروجين ويمر لدورق الاستقبال ويختلط بالحامض الذي به فيغير من قوته .

٤ ـ يمكن استخدام وزنة عينة ٠,٥ – ٥,٠ جم حسب محتواها الأزوتي . ولعدم الفقد في العينة يمكن وزنها على ورقة ترشيح ووضعها بورقة الترشيح للهضم .

٥ ـ بدلا من الزئبق يمكن استخدام ١٠ جم كبريتات بوتاسيوم وعدة بلورات كبريتات نحاس كعامل مساعد .

٦ ـ في الحساب كل ١ مل ٠,١ عياري H_2SO_4 = ٠,٠٠١٤ جم نيتروجين .

ولاختصار وزن العينة وكمية الكيماويات ووقت التقطير يجرى التقدير كالتالي .

٢ ـ الميكرو كلداهل Micro kjeldahl :

١ ـ زن ورقة سجاير بالضبط ، وضع بها حوالي ٠,٠٣ جم مسحوق عينة بالضبط ، ثم تنقل إلى دورق هضم كلداهل سعة ٥٠ مل .

٢ ـ أضف ٢ مل H_2SO_4 مركزاً وسخن حتى تتصاعد الأبخرة السوداء ثم اتركه يبرد .

٣ ـ أضف ٠,٣ جم مسحوق حديد مختزلا + ٠,٣ جم مخلوط هضم ثم ٤ مل H_2SO_4 مركزاً ، ثم ضعها على لهب لمدة ١,٥ ساعة ، أو حتى يروق المحلول .

٤ ـ ضع ١٠ مل حمض بوريك ٤٪ في دورق مخروطي سعة ١٠٠ مل + ٣–٤ نقط دليل وثبته أسفل مكثف جهاز التقطير .

٥ ـ انقل مكونات دورق الهضم كمياً إلى جهاز التقطير مستخدماً الماء المقطر .

٦ ـ أضف ٢٠ مل Na OH ٤٠٪ ، واسمح لبخار الماء بالمرور في العينة واجمع المتقطر ٧–١٠ دقائق حتى تمام طرد الأمونيا (حجم الصودا يتناسب مع حجم الحامض المركز في الهضم) .

٧ ـ اسحب الدورق المخروطي ، واغسل الساق المتصل بالمكثف والمغموسة فيه بالماء المقطر، ثم أبعد اللهب استعداداً لعينة أخرى بعد سحب مكونات العينة السابقة إلى البالوعة.

٨ ـ أجر عملية التعادل بالتنقيط لمحتويات الدورق المخروطي بحامض مخفف ٠,٠١٤٣ عياري واحسب تركيز النيتروجين بالعينة بعد طرح التجربة الخاوية Blank .

٩ ـ كل ١ مل $H_2 SO_4$ (أو HCl) ٠١٤٣ ,٠ عياري = ٠,٢ ملليجرام أزوتا أو ١ مليمكافئ حامض = ٠,٠١٤ جم أزوتا .

٪ نيتروچين = عدد ملليلترات الحامض×عيارية الحامض×٠,٠١٤×١٠٠/وزن العينة جم .

= عدد ملليلترات الحامض ٠,٠١٤٣عياري بالضبط×٠,٢×١٠٠/وزن العينة جم ×١٠٠٠ .

ملاحظات :

حامض البوريك يكون تركيزه ٢-٥٪ بالذوبان في الماء المقطر مع التسخين قليلاً لتمام الذوبان .

مخلوط الهضم مكون من كبريتات نحاس + كبريتات بوتاسيوم بنسبة ١:٣ وزناً ، مع طحنها قبل خلطهما .

دليل بروموكريزول جرين + أحمر ميثايل بنسبة ٢ :٣ حجماً . تركيز البروموكريزول جرين ٠,١ ٪ وأحمر الميثايل ٠,٠٢ ٪ والمذيب كحول إيثايل ٦٠٪ .

حمض $H_2 SO_4$ ٠,٠١٤٣ عياري يحضر بإضافة ٠,٣٨ مل $H_2 SO_4$ مركز / لتر ماء مقطر مع ضبط العيارية بكربونات الصوديوم اللامائية .

دليل حمض البوريك يحضر بإذابة ٢٠مجم دليل أحمر ميثيل + ٦٠ مجم دليل أخضر بروموكريزول في ١٠٠ مل كحول إيثايل . يذاب ٤٠ جم بلورات حمض بوريك في ٤٠٠ مل ماء مقطراً مع الرج الشديد . يخلط محلول الدلائل ومحلول الحمض ويضاف إلى المخلوط ١٥٠٠ مل كحول إيثايل .

الفرق المسموح به بين مكررتي التقدير يجب ألا يتعدى ٠,٢ ٪ مطلقاً في حالة نقص البروتين الخام عن ٢٠ ٪ ، ويجب ألا يتعدى هذا الفرق عن ١,٠ ٪ نسبياً في حالة نسبة البروتين الخام في العينة ما بين ٢٠-٤٠ ٪ ، وألا يتعدى هذا الفرق عن ٠,٤ ٪ مطلقاً في حالة زيادة البروتين الخام بالعينة عن ٤٠ ٪ عموماً يجب ألا يزيد الفرق عن ٣-٥ ٪ من متوسط قيمتي التقدير .

هذا وهناك تكنيك بسيط آخر لقياس العناصر الهامة الغذائية في الأعلاف والنباتات ، بتحضير مستخلص منها بالهضم المبتل ، أي بأكسدة مادتها العضوية باستخدام فوق أوكسيد الهيدروجين ، مع تحويل الأزوت إلى كبريتات نشادر كالتالي :

تحضير مستخلص نباتي :

بهضم ٠,١ - ٠,٢ جم عينة جافة مطحونة مع ١ مل يد٢ كب أ٤ مركزاً ، وبعد تصاعد الغازات يبرد الدورق ويضاف ١ مل محلول كبريتات نحاس ١ ٪ + ٤ مل حمض

كبريتيك مركزاً وتسخن حتى تسود العينة ، فنترك لتبرد ، ونقط بـ H_2O_2 ٥ نقط ثم سخن، وكرر إضافة H_2O_2 حتى تروق العينة ، فأكمل لدورق معياري . أو قد يجرى تحضير هذا المستخلص كالتالي :

تقطع العينة النباتية بحيث لا يزيد سمكها عن ٢ م تقريباً بشفرة حادة ، ثم يوزن منها ٣ جم في كأس ١٠٠ مل، ويضاف إليها ٣ مل محلول مورجان Morgan's Reagent (٣٠ مل حمض خليك + ١٠٠ جم خلات صوديوم تذاب حتى لتر ماء مقطر)+ ١/٢ جم فحماً حيوانياً نشطاً ، وتقلب لمدة ١٥ دقيقة ، ثم يرشح وينقل الراشح إلى دورق معياري ويكمل بالماء . يؤخذ من هذا المستخلص لتقدير الأزوت الكلي (من المستخلص الأول) ضوئياً باستخدام دليل نسلر ، أو لتقدير الأزوت النتراتي (من المستخلص الثاني) بدليل Phenol disulphonic acid ضوئياً ، كذلك يقدر في هذه المستخلصات كل من الصوديوم والبوتاسيوم والفوسفور والكالسيوم والماغنسيوم .

٣ ـ طريقة نسلر :

ولتقدير الأزوت بطريقة نسلر يحضر أولاً محلول نسلر بوزن ٣٧,٥ جم يوديد بوتاسيوم ، تذاب في ٢٥ مل ماء مقطراً ، ٢٨,١ جم يودا ، تذاب في محلول اليوديد السابق + ٣٧,٥ جم زئبقاً يرج الكل في دورق معياري جيداً حتى ظهور اللون الأحمر الفاتح ، ثم برده أسفل تيار ماء بارد ، مع الرج الدائري حتى ينفرد الزئبق ويصفر اللون بخضار . صب المحلول المكون من يوديد البوتاسيوم ويوديد الزئبق (بحيث يستبعد الزئبق المنفرد) في دورق معياري ٢٥٠ مل ، وأكمل بالماء المقطر للعلامة . أضف محتويات الدورق السابق إلى ١٢١٩ مل NaOH ١٠ ٪ خالية الكربونات .

ويحضر محلول قياسي من النيتروجين المعلوم التركيز بإذابة ٠,٤٧١٤ جم كبريتات أمونيوم نقية جافة في لتر ماء مقطر يعطي محلول تركيز الأزوت فيه ١٠٠ جزء في المليون.

وللتقدير : يؤخذ ١ مل من كل من العينة ، المحلول القياسي ، الماء المقطر (Blank) كل في أنبوبة ، ويوضع بكل أنبوبة ٢ مل ماء مقطراً ، ثم ٢ مل محلول نسلر مع الرج ، وقراءة الكثافة الضوئية Colorimetric على طول موجة ٤٨٠ ميكرون ، بضبط صفر الجهاز على Blank ، وبمعلومية تركيز والكثافة الضوئية للمحلول القياسي والكثافة الضوئية للعينة تستخرج كمية الأزوت بالعينة وتحول لنسبة بروتين .

٤ ـ البروتين الخام القابل للهضم معملياً :

وفي هذا التكنيك يتم تقدير البروتين الخام القابل للهضم بواسطة الببسين وحمض الهيدروكلوريك تحت ظروف معينة .

فيوزن حوالي ٢ جم مادة غذائية بالضبط في كأس سعة ٦٠٠ مل + ٤٨٠ مل ماء

مقطراً + ١ جم بيبسين (٢٠٠٠ وحده / جم) + ١٠ مل حمض HCl ٢٥ ٪ . يحفظ هذا المعلق في حضان أو على حمام مائي على درجة ٤٠م للتحضين لمدة ٢٤ ساعة ، بعدها يضاف ١٠ مل أخرى من حمض HCl ٢٥ ٪ ، ويحضن لمدة ٢٤ ساعة أخرى . يحتوي المحلول حوالي ١ ٪ HCl ، ودرجة الحموضة يجب أن تكون أقل من ١,٧ . أثناء التحضين يتم خلط العينة ٥ مرات بالتقليب . بعد التحضين السابق هذا (٤٨ ساعة) يتم الترشيح على ورق تشريح خشن ، ويتم الغسيل بالماء المقطر الساخن حتى يصبح الراشح متعادلاً (باستخدام ورق الدليل) . تنقل ورقة الترشيح بالراسب لتقدير الأزوت بطريقة كلداهل المعتادة وذلك لحساب كمية الأزوت غير المهضوم ، وضربها في ٦,٢٥ لتقدير البروتين الخام غير المهضوم .

٪ بروتين خام كلي – ٪ بروتين خام غير مهضوم = ٪ بروتين خام مهضوم .

معامل هضم البروتين الخام = ٪ بروتين خام مهضوم / ٪ بروتين خام كلي .

٥ ـ البروتين الحقيقي :

وهو من الأهمية لأن جزءاً من البروتين الخام (وهو الجزء غير الحقيقي أو المكونات الأزوتية غير البروتينية Non protein - Nitrogen) في مواد العلف تستفيد منه المجترات ، بينما لا تستفيد منه الحيوانات وحيدة المعدة ؛ لذا كان من المهم للحيوانات الأخيرة تقدير البروتين الحقيقي الذي تستفيد منه هذه الحيوانات في مواد العلف .

وتبني هذه الطريقة على أن المواد الأزوتية غير البروتينية لا ترسب بإضافة هيدروكسيد النحاس ، بل ما يرسب هو البروتين الحقيقي الذي يقدر فيه الأزوت لتقدير البروتين الحقيقي بطريقة كلداهل . وأبسط طرق تقدير البروتين الحقيقي تجرى بأخذ وزنة من مادة العلف حوالي ١ جم بالضبط في كأس + ٥٠ مل ماء مقطراً ، ويغلي الكأس بمحتوياته مع التقليب المستمر (في حالة الأعلاف النشوية تغلى على حمام مائي ١٠–٢٠ دقيقة خوفاً من الفوران) . بعد انتهاء الغليان يضاف ٢٥ مل محلول كبريتات نحاس (٦٠ جم / لتر) ثم ٢٥ مل محلول هيدروكسيد صوديوم (٦,٥ جم / لتر) مع استمرار التحريك . يترك الكأس حتى يتم الترسيب ثم يختبر لوجود النحاس (بمحلول سيانور حديدوز وبوتاسيوم) في عينة من السائل الرائق ، يجب أن يكون المحلول الرائق حامضياً . انقل الراسب كمياً إلى ورقة ترشيح ، واغسل الراسب جيداً بماء ساخن حتى يخلو الراشح من الكبريتات (بتكوين راسب على كلوريد الباريوم) انقل ورقة الترشيح بما عليها من راسب إلى دورق كلداهل ، واهضم وقدر الأزوت واضربه في ٦,٢٥ للحصول على كمية البروتين الحقيقي .

ملاحظات عامة على تقدير البروتين :

١ ـ يراعى ترتيب فتح وغلق محابس جهاز الماركهام للتقطير (للميكرو كلداهل) ، وبعد انتهاء تقطير عينة واستبعاد دورقها المستقبل للمتقطر ، يمنع مرور البخار من الجهاز

بالضغط على الوصلة الكاوتشوك بين دورق البخار والجهاز بماسك ، ثم فتح فوهة البخار لخروجه للخارج ، مع إنزال كمية من الماء المقطر من فتحة العينة ، وتقفل ثانية ليحدث شفط ، وتغسل العينة إلى اتجاه فتحة البالوعة ، ويكرر إضافة الماء من فتحة العينة ، والصرف من فتحة البالوعة لتصريف الناتج من الغسيل .

٢ ـ قد يتم الهضم بنقع العينة الموزونة في ٤ مل H_2SO_4 مركزاً لمدة ١٢ ساعة ، ثم على حمام رملي لمدة ٢ ساعة ، وتبرد ويضاف ١ مل مخلوط أحماض مركزة من الكبريتيك / بيركلوريك (١/١) وإكمال الهضم .

٣ ـ هناك طريقة أوتوماتيكية (آلية) معتمدة على نفس فكرة وأساس طريقة كلداهل باستخدام جهاز Kjel - Fass Automated Macro Kjeldahl Analyzer والذي يعمل بكفاءة ٢٠ عينة / ساعة واستخدم بكثرة في المواد الغذائية .

٤ ـ طريقة لونية سريعة مستخدمة في الأغذية المختلفة، باستخدام تفاعل البيوريت Biuret Reaction في وجود قلوي ، فيخلط ٥٠٠ مل محلولا مائياً من كبريتات النحاس (٣٪) مع ٥٠٠ مل محلولاً مائياً طرطرات كالسيوم وصوديوم (١٢٪) ، ثم يضاف مع التقليب ٥٠٠ مل محلولاً مائياً من هيدوركسيد كالسيوم (١١,٢٪) . يضاف لهذا المخلوط ٤١ مل ماء مقطراً + ٤١ مل أيزوبروبيل ، ١٠٠ مل من المخلوط تخلط مع ٢ جم مسحوق عينة وتحفظ على ٧٠م لمدة ٤,٥ دقيقة ، ثم ترشح وتقاس كهروضوئياً على ٥٥٠ نانومتر .

٥ ـ يمكن تقدير الأزوت غير البروتيني بإضافة ٢٠ مل ماء مقطراً إلى ٢٠ جم عينة في أنبوبة اختبار + ٥ جم حمض ٥٠٪ Trichloroacetic acid ، واطرد مركزياً لمدة ١٠ دقائق على ٢٠٠٠ لفة / دقيقة ، واسحب١٠ مل رائق إلى دورق كلداهل كتقدير الأزوت عادياً، وذلك لحساب الأزوت غير البروتيني غير المترسب بحمض ثلاثي كلوروخليك .

٦ ـ معامل تحويل الأزوت إلى البروتين معامل افتراضي لمتوسط محتوى البروتينات المختلفة من الأزوت ، ويستعمل للتبسيط إلا أنه في الواقع عبارة عن :

٦,٧٠ لبياض البيض	٦,٢٥ لمواد العلف
٦,٦٢ لصفار البيض	٦,٣٨ بروتين اللبن
٦,٦٨ للبيض الكلي (أو المجمد)	٦,٠٠ لمنتجات الصويا
٥,٧٢ للسمك	٥,٧٠ دقيق القمح (قمح)

٦,٢٥ للبروتين (بوجه عام) ، بينما بالنسبة لمحتوى اللحوم فإنه يمكن حساب البروتين في صورة لحم أحمر كنسبة مئوية = $\frac{\text{٪ للنيتروجين الكلي في اللحم} \times ١٠٠}{\text{عامل}}$

وهذا العامل = ٣,٣٥ للعجول الرضيعة

٣,٥٥ للبقر

٣,٧ للدجاج (كامل)

٣,٦ لعضلات الورك للدجاج

٣,٩ لعضلات الصدر للدجاج

٢,٧ للكُلى

٣,٠ للسان

٣,٦٥ للرومي (كامل)

٣,٥ لعضلات ورك الرومي

٣,٩ لعضلات صدر الرومي

٣,٥٥ للكبد .

كما يمكن حساب اللحم الأحمر في البقر من تحليل النيتروجين الكلي (٪) والدهن (٪) والكربوهيدرات (٪ بالفرق) من المعادلة :

٪ لحم أحمر = [١١٢,٥ (٪ نيتروجين كلي) – ٠,٤٤٣٧ (محتوى الدهن ٪) – ٢,٢٥ (كربوهيدرات جافة ٪)] / ٣,٥٥

٦ ـ البروتين في السمك :

يشكل البروتين في السمك الحي أهم المكونات المسؤولة عن التركيب الطبيعي والنشاط، وبعد موت السمك يشكل أهم المكونات في السمك كغذاء للإنسان لقيمته الغذائية وخصائصه الوظيفية . ويتراوح محتوى عضلات السمك من البروتين ما بين ١٥–٢٠ ٪ في السمك اللحمي شحيح الدهن Lean ، ويتباين محتواه بين الأنواع وداخل النوع .

ويحتوي بروتين السمك في المتوسط ١٦ ٪ نيتروجين ، ويتم تقديره بنفس الطريقة التي وضعها العالم الهولندي Kjledahl سنة ١٨٨٣ والتي طورت عدة مرات لكن على نفس الأساس ، أي هضم المادة العضوية بحامض قوي حتى يتحول كل النيتروجين إلى كبريتات أمونيوم ، وتتحرر الأمونيا بإضافة الصودا الكاوية والتي تقطر على حامض بوريك أو حامض قياسي لمعايرتها . والبروتين الكلي يتضمن البروتين الحقيقي وغير الحقيقي (ثالث ميثيل أوكسيد الأمين، يوريات تورين، ببتيدات ، أحماض أمينية، نيوكلوتيدات ، ومركبات أساسها البيورين) .

ويشكل النيتروجين غير البروتيني في السمك مجموعة من المركبات المسؤولة غالباً عن

طعم السمك ، وهي مركبات غير بروتينية وإن احتوت على النيتروجين ، إذ لا تترسب في حمض ثلاثي كلورو الخليك (١٠ ٪) ، وتشكل ٠,٥-١ ٪ من وزن عضلات السمك .

ويقدر بترسيب البروتين بالخلط مع حمض ثلاثي كلورو الخليك (١ :٢) ، ويحلل النيتروجين في المستخلص (حمض ثلاثي كلورو الخليك) بطريقة الميكرو كلداهل ، وإذا حفظت العينة أو مستخلصها لحين التقدير فيكون ذلك بالتجميد (-٢٠°م) .

٧ ـ بروتين اللبن :

ورغم تقدير البروتين في اللبن بطريقة الماكرو كلداهل ، إلا أنه يستخدم في اللبن كذلك طريقة سريعة لتقدير بروتين اللبن الطازج ، وهي طريقة الفورمول Formol : يضاف ٠,٥ مل دليل فينول فثالين (٠,٥ ٪) + ٠,٤ مل أوكسالات بوتاسيوم مشبعة متعادلة إلى ١٠ مل لبنا ، وتترك تستقر عدة دقائق بسيطة ،ثم عادل بالصودا الكاوية ١ ,٠ عياري حتى يظهر لون طوبي ، أضف ٢ مل فورمالين إلى ما سبق ، واتركه دقائق قليلة ، ثم نقط الحموضة الجديدة الناتجة بالصودا الكاوية ١ ,٠ عياري إلى ظهور لون طوبي . نقط منفصلاً ٢ مل فورمالين + ١٠ مل ماء بواسطة ١ ,٠ عياري صودا كاوية كمقارنة . وعليه فالمحتوى البروتيني في اللبن ٪ (والمكافئ للأزوت × ٦,٣٨) عبارة عن ١,٧ × (كمية قلوي العينة – كمية قلوي المقارنة) .

ونظراً إلى أنه لم يعد بعد تقييم اللبن على أساس الدهن فقط بل ينظر إلى الدهن والبروتين معاً ، فيقدر البروتين بطريقة كلداهل أو الفرمول . كما يقدر الكازين بوزن ٥ جم لبن في كأس ١٠٠ مل مع إضافة ٥٠ مل ماء دافئاً (٤٠°م) + ٠,٥ مل حمض خليك (١٠ ٪) وبعد ١٠ دقائق يضاف ٠,٥ مل محلول خلات صوديوم عيارية ، واخلط ثم برد ورشح ، واغسل الراسب ٣ مرات على ورقة الترشيح ، ثم اهضم ورقة الترشيح بالراسب لتقدير الأزوت (أزوت الكازين) بطريقة كلداهل .

٨ ـ التقييم للمركبات النيتروجينية في الأغذية :

تشكل البروتينات أهم المجاميع الغذائية الأساسية كميا . نقص أي حمض أميني يحدد من تخليق البروتين في الجسم ، كما تضر الزيادة في واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية (عدم اتزام الأحماض الأمينية)، فليس المهم فقط كم البروتين بل محتواه من الأحماض الأمينية . ويتم تقييم البروتين على أساس ميزان الأزوت ، أو تحليل الأحماض الأمينية ، أو نسبة كفاءة البروتين ، أو نسبة البروتين الصافي ، أي عن طريق تجارب على الحيوان (لمعرفة التأثير المتجمع أو الشامل لبروتين علف ما وهذا يتطلب كثير من العمل والمواد الغذائية، كما يجرى على عدد محدود من العينات الغذائية) ؛ أو بتقدير البروتين الحقيقي، أو البروتين الخام وإن كانا لا يعطيان فكرة عن ما يمكن الاستفادة به من الأحماض الأمينية

التي قد تتعرض للتغيرات نتيجة المعاملات المختلفة كالتجفيف بالتسخين أو طول التخزين فتتحول إلى مركبات غير مهضومة ولو جزئياً لارتباطها بالمجاميع الجانبية على البروتين أو بمجاميع الألدهيد للسكر (اشتباك وتقاطع جزئيات البروتين، Fructoselysin). ومن اختبارات تقييم المركبات النيتروجينية ما يلي :

أ ـ الليسين :

بإنتاج وتخزين المواد الغذائية وفي وجود السكريات المختزلة والكربوهيدرات فإنه تتراكم نواتج تفاعلات Maillard ، والتي فيها تتداخل أولاً مجاميع الألفا أمين الحرة لليسين ، وعلى درجات الحرارة الأعلى تتواجد ارتباطات في الجزيئات لها مقاومة إنزيمية ناتجة من مجاميع الأمين الحرة ومجاميع الهيدروكسيل مع مجاميع الكربوكسيل والمجاميع الجانبية على شريط البروتين ، وهذا تفاعل لا يشترط وجود الكربوهيدات وعلاوة على ذلك يلاحظ تكاثف الأحماض الأمينية الحرة مع نواتج هدم الأحماض الدهنية المؤكسدة أثناء التخزين . وعلى ذلك فتقدير الليسين الكلي كيماوياً لا يعطي الضوء على مثل هذه الأضرار بالبروتين. إلا أنه يمكن تقدير الليسين الممكن الاستفادة به عن طريق قابلية تفاعل مجاميع الألفا أمين التي مازالت موجودة لليسين مع dinitrofluorbenzol .

ب ـ اختبار اليورياز (امتصاص أحمر الكريزول) :

يمكن تقدير الأحماض الأمينية الموجودة في مواد غذائية بطريق غير مباشر ، كما في مخلفات فول الصويا واستخدام اختبار اليورياز على سبيل المثال . فالصويا الخام يحتوي مثبطاً إنزيمياً (Enzyme Inhibitor (Trypsin Inhibitor يتأثر بالحرارة ، ووجوده يخفض من القيمة الحيوية للبروتين ، ويخفض من معاملات الهضم ، لذا تعرض مخلفات الفول الصويا للتحميص بالتسخين بالبخار ، ويكشف عن تمام هذه العملية بتقدير نشاط إنزيم اليورياز الذي يتأثر بالحرارة وهو موجود بالصويا أساساً ، وهو قادر على تحرير ٣-٥ مجم نيتروچين/حم من محلول يوريا على ٣٠م لكل دقيقة ، وينخفض هذا المعدل إلى ٠,٥ مجم أزوت/حم بعد التحميص .

وترتفع مقدرة بروتين الصويا على الارتباط بمجاميع الفثالين في مادة ملونة بارتفاع حرارة التحميص ، ووجد أن القدر الأمثل لوجود البروتين كان عند امتصاص ٥,٤ – ٦,٦ مجم أحمر كريزول / جم مخلفات صويا .

وعلى ذلك وجد أنه لتقييم البروتين قد يحلل البروتين الخام الكلي ، والبروتين الحقيقي والبروتين الذائب أو الأزوت غير البروتيني ، والبروتين الخام المهضوم معملياً ، وتقدير الليسين الممكن الاستفادة منه ، ومقدرة الاستفادة من بروتين الصويا باختبار اليورياز ، لكن ليس هذا كل ما يمكن إجراؤه لتقييم بروتين مادة غذائية بل قد نضطر إلى تحليل مكونات

أزوتية أخرى لأهميتها في عائلات نباتية معينة أو لارتباطها بنظام زراعي معين مرتبط بالتسميد أو التربة أو غزارة النباتات أو خلافه من العوامل الأخرى البيئية ، ومن هذه الاختبارات :

جـ ـ الأمونيا فى المستخلصات المائية للمواد الغذائية :

ومن أبسط طرق تقديرها هي استخدام وحدات Conway المكونة من طبقين بتري داخل بعض تامي الالتصاق ، قطر الخارجي ١٠,٥ سم والداخلي ٦,٥ سم ، والغطاء مفرد بقطر ١٢ سم . وفيه تدهن طبقة كثيفة من الفازلين قرب حواف الغطاء ، وطبقة رقيقة جداً على قمة جدار الحجرة الداخلية ، وذلك لمنع أي من المحلولين داخل وخارج الغرفة الداخلية من الامتزاج . تسند الأطباق كلها على شيء يجعلها مائلة إلى أحد الجوانب ميلاً خفيفاً ، ثم يوضع في الحجرة الخارجية ١ مل كربونات بوتاسيوم مشبعة مع مراعاة صب هذه الكمية عند أسفل ميل للطبق ، ثم يوضع في الحجرة الداخلية ٢ مل محلولا منظماً (دليل حمض بوريك مع دليلي أحمر الميثيل والبروموكريزول جرين) ، ثم يوضع الغطاء ذو الفازلين على الطبق ، مع مراعاة ترك مسافة صغيرة مفتوحة عند أعلى ميل للطبق ليصب منها ٠,٥ مل عينة مقاسة بالضبط ، ثم يحكم الغطاء على الطبق كله ويعدل الطبق ، مع لفه بخفة مرتين أو ثلاثة ، لضمان امتزاج الكربونات بالعينة ليبدأ انطلاق الأمونيا التي يمتصها المنظم فيتغير لونه . يترك الطبق مع وضع ثقل خفيف عليه لإحكام قفله ٦ ساعات. ارفع الغطاء بحذر ونقط المنظم في الحجرة الداخلية بحمض كبريتيك ٠,٠١ عياري حتى التعادل . كمية الأزوت في صورة أمونيا جم = عدد ملليلترات الحامض × عياريته × ٠٠,٠١٤ وقد صممت وحدات أخرى سميت بجهاز Van Slyke ، حلت الأنابيب بدلا من الأطباق ، واستخدم فيها نفس المحاليل إلا أنها قد تتطلب مجهوداً أكبر من الطريقة السابقة.

كما قد يقدر الأزوت الأمونيومي كذلك في العينة الصلبة بتقطيرها (٢جم) مع هيدروكسيد كالسيوم (٢جم مسحوق خالي الكربونات) والماء المقطر (٣٠مل) في دورق على حمام مائي (٤٠-٥٠م) ، على أن يتصل بالدورق تيار هواء خالي الرطوبة والأمونيا (مار على حمض H_2SO_4 ١٠ ٪) ومتصل كذلك بمكثف ليبج منهي بدورق استقبال به دليل حمض البوريك ، ويستقبل المتقطر لمدة ساعة ، ويعادل بحمض ٠,٠١ عياري بنفس الطريقة .

د ـ الأمونيا والقواعد الأزوتية الطيارة (عياريًا):

١ ـ زن حوالي ٥جم بالضبط من العينة ، وانقلها إلى دورق مدرج سعة ٢٥٠ مل .

٢ ـ أضف ماء إلى العلامة ، ورج الدورق بمحتوياته ١٠ دقائق لإذابة الأملاح القابلة

للذوبان .

٣ ـ رشح واجمع الراشح في دورق نظيف ، وانقل منه حجماً معلوماً بماصة إلى دورق جاف . ثم أضف ٥٠ مل حمض كبريتيك (٠,١ عياري) في دورق مخروطي مع نقط من دليل أحمر ميثيل (٠,٢ جم أحمر ميثيل في ١٠٠ مل كحول إيثيل ٩٥-٩٦٪ ، ٠,١ جم أزرق ميثيلين في ١٠٠ مل إيثانول ٩٥-٩٦٪ واخلط الحجمين معاً) وكمية من الماء ليرتفع سطح المحلول عن فتحة الساق الزجاجية التي سينزل منها الأمونيا (من الدورق الذي به الراشح بعد إمرار الهواء) .

٤ ـ أكمل الحجم المأخوذ من راشح المستخلص للعينة إلى ٥٠ مل بالماء ، وأضف إليه نقطتين من الأوكتانول لمنع الفوران ، ثم أضف ٥٠ مل محلول كربونات بوتاسيوم مشبعة ، وسد بسرعة لمنع تسرب الأمونيا .

٥ ـ مرر تياراً هوائياً بمعدل ٣لتر / دقيقة على أن ينقى الهواء بتمريره خلال دوارق غسيل تحتوي حمض كبريتيك مخففاً وهيدروكسيد صوديوم مخففاً .

٦ ـ يجب تحرير الأمونيا كاملاً خلال ٣ ساعات ، فك الدورق المخروطي ، واغسل الساق الزجاجية بماء . عاير الزيادة من الحامض بهيدروكسيد صوديوم ٠,١ عياري .

٧ ـ أجر عمل تجربة خاوية بنفس الخطوات دون إضافة عينة ، واحسب أزوت الأمونيا كنسبة مئوية من العينة = (حجم القلوي المستخدم في معايرة التجربة الخاوية – حجم القلوي المستخدم في معايرة العينة) × ٠,١٤ / وزن مستخلص العينة بالجرام الموجود في الجزء المأخوذ للتحليل .

هـ ـ اليوريا :

اليوريا في مواد العلف المركزة من الأهمية لما يضاف إليها من يوريا لإغنائها في البروتين الخام كغش تجاري لرخص اليوريا وغناها في الأزوت (٤٢٪) ، إلا أنها تفيد الحيوانات المجترة لكن زيادتها تؤدي إلى تسمم إذا استهلك منها كمية كبيرة دفعة واحدة في التغذية؛ لذا يعمل مستخلص مائي للعينة ثم يقدر في جزء منه كمية الأمونيا بالطريقة السابقة . خذ جزءاً آخر من المستخلص + ٤ أمثال حجمه من محلول إنزيم منشط [٠,٢٥ جم مستخلص فول صويا + ٢٥ مل ماء مقطراً في حضان على ٤٠م لمدة ٢٠ دقيقة لتنشيط الإنزيم فيسمى بمستخلص فول الصويا Jackbeans ، لكن في تقدير يوريا الدم أو الكبد فيلزم إنزيم يوريا نقي ؛ لأن الدم والكبد يحتويان أرجيناز يؤثر على أرجنين الصويا ويحوله إلى يوريا فيكون التقدير زائداً عن الواقع ؛ لذا يستخدم مستخلص فول الصويا كمصدر لليورياز عند تقدير يوريا مواد العلف أو عصير الكرش أو السيرم لخلوها من الأرجيناز] . تترك العينة واليورياز لمدة ٦ ساعات على حرارة الغرفة ، ثم تضاف كربونات بوتاسيوم مشبعة

وتتبع باقي خطوات تقدير الأمونيا . تطرح كمية أزوت الأمونيا المقدرة في أول الطريقة من المقدرة بعد التحلل الإنزيمي ، والفرق يمثل الأمونيا التي مصدرها اليوريا المنطلقة بفعل الإنزيم .

تقدير اليوريا ضوئياً :

١ ـ يوزن عينة بالضبط حوالي ٢ جم (تحتوي ٥٠-٢٠٠مجم يوريا) ، وتوضع في دورق مدرج ، ثم يضاف ١٥٠ مل حمض هيدروكلوريك (٠,٠٢ عياري) ، ويرج ٣٠ دقيقة ثم يضاف ١٥ مل محلول خلات صوديوم (١٣٦ جم خلات صوديوم ثلاثي الماء/ لتر ماء) ، اخلط ثم أضف ١ جم فحماً نشطاً ، ثم رج واترك الدورق لمدة ١٥ دقيقة . أضف ٥ مل محلول كاريز رقم ١ Carrez Solution (أذب ٢١,٩ جم خلات زنك ثنائي الماء في ماء ، ثم أضف ٣ مل حمض خليك ثلجي ، وخفف إلى ١٠٠ مل بالماء) يليها ٥ مل محلول كاريز رقم ٢ (١٠,٦ جم حديد وسيانيد بوتاسيوم / ١٠٠ مل) ، واخلط بين كل إضافة وأخرى . خفف إلى حجم معلوم بالماء ، واخلط ثم رشح جزءاً من المحلول إلى كأس نظيف سعة ٢٥٠ مل .

٢ ـ انقل ١٠ مل من الراشح إلى أنبوبة اختبار ذات سدادة ثم أضف إليها ١٠ مل محلول التلوين (أذب ١,٦ جم ٤- دي ميثيل أمينو بنزالدهيد في ١٠٠ مل كحول إيثايل ٩٦٪ ، ثم أضف إليها ١٠ مل حامض هيدروكلوريك كثافة ١,١٨ جم / مل) .اخلط ثم اتركه ١٥ دقيقة ، وقس الامتصاص الضوئي على ٤٣٥ نانومتر ضد عينة خاوية من نفس محاليل التحضير لكن بدون عينة [١٠ مل محلول تلوين + ١٠ مل ماء] .

٣ ـ خفف ٥ ، ١٠ ، ٢٠ ، ٣٠ ، ٤٠ مل محلول يوريا (٠,١ جم يوريا / ١٠٠ مل) إلى ١٠٠ مل بالماء ، وانقل من كل منها ١٠ مل إلى أنبوبة اختبار ذات سدادة ، ثم أضف ١٠ مل محلول تلوين ، واخلط واتركها ١٥ دقيقة ، ثم قس الامتصاص على طول موجة ٤٣٥ نانومتر ضد نفس العينة الخاوية Blank ، ووقع منحنى العلاقة بين الامتصاص وكميات اليوريا التي تحتويها أنابيب المحلول القياسي لليوريا .

٤ ـ قدر كمية اليوريا في العينات باستخدام المنحنى القياسي السابق رسمه في الخطوة السابقة، وعبر عن النتيجة كنسبة مئوية من العينة (٪ يوريا × ٠,٤٦٦٥ = ٪ أزوت يوريا) .

ولتقدير اليوريا في مواد العلف بطريقة المونوكسيم تجرى الخطوات التالية :

١ ـ يوزن ١ جم عينة بالضبط (علف مخلوط ، أعلاف خشنة ، سيلاج) في دورق معياري ١٠٠ مل ، ويضاف عليها حوالي ٧٥ مل ماء مقطراً . يستخلص بالرج لمدة ٠,٥ ساعة ، ثم يستكمل إلى العلامة ويخلط .

٢ ـ يؤخذ من الدورق ٢٠ ميكرولتر ، وتنقل إلى أنبوبة صغيرة ١,٥ مل بها ١ مل حمض بيركلوريك (١٢ مل حمض بيركلوريك مركز تستكمل بالماء حتى ٢٥٠ مل) ، وتسد الأنبوبة وتخلط جيداً ثم تطرد مركزياً . اسحب ٢٠٠ ميكروليتر من الرائق إلى أنبوبة أخرى ٧ مل ويضاف إليها ٢٠٠ ميكروليتر دي أسيتل مونوكسيم (١ جم دي أسيتيل مونوكسيم أو دي أسيتيل دي أو كسيم في ٩١ مل إيثانول مطلق + ٢٣ مل ماء مقطراً . احفظ في ثلاجة ، يظل صالحاً بالشهور) + ١ مل دليل (٠,٥ جم ١- فينيل - ٢-٣- دي ميثيل بيرازولون + ٠,٤٥ جم كبريتات حديديك أمونيوم (٢٤ جزء ماء) في ٦٠ مل ماء مقطراً + ١٥ مل حمض كبريتيك مركزاً ويكمل بالماء إلى ١٠٠ مل . يظل ثابتاً لشهور بحفظه في ثلاجة) . اخلط لمدة ٣٠ دقيقة على ٩٥°م على سخان .

٣ ـ تجرى خطوة رقم (٢) على محلول قياسي (٢٠ ميكروليتر محلول ٤٠ مجم يوريا/ ١٠٠ مل) وعلى مقارنة (٢٠ ميكروليتر ماء مقطراً) .

٤ ـ بعد التبريد تحت تيار ماء بارد يتم قياس الكثافة الضوئية على ٤٧٠ نانومتر .

٥ ـ لحساب تركيز اليوريا في العينة (جم/كجم) = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٤٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}}$

و ـ النترات :

والنترات هام جداً في بعض المراعي ومواد العلف نتيجة التلوث من المصانع ، وزيادة وعدم تجانس التسميد الأزوتي ، ولظروف التربة وغيرها من إضافات ومصادر التلوث . ومن أبسط طرق تقدير الأزوت النتراتي طريقة شبيهة بطريقة تقدير الأزوت الكلي مع استبعاد مخلوط الهضم. فيؤخذ ٥ مل بالماصة من المحلول المائي للعينة في دورق كلداهل ٥٠ مل+ ٠,٣ جم حديد مختزل + ٣ مل حمض كبريتيك مركزاً . اهضمها على لهب لمدة ٥ دقائق ثم بردها . انقلها كمياً لجهاز التقطير ، واستقبل الأمونيا في حمض بوريك ٤٪ وعادل كما سبق . تعمل عينة خالية ، وتضاف نقطة زيت برافين للتحكم في الفوران ، وتعمل التقديرات مزدوجة .

وهناك طريقة أخرى لونية تعتمد على دليل Phenol disulphonic acid الذي تعامل به المستخلصات النباتية بمحلول مورجان 'Morgan وقياس اللون كهروضوئياً على ٤٣٥-٤٨٠ نانومتر ومضاهاة القراءة على منحنى قياسي لمعرفة التركيزات .

تقدير الأزوت النتراتي :

١ ـ يجهز مستخلص عينة بأخذ ٣ جم عينة في كأس ١٠٠ مل مع ٣٠ مل محلول مورجان + ٠,٥ جم فحماً نشطاً ، وتترك ١٥ دقيقة مع التقليب بمحرك مغناطيسي . رشح وانقل الراشح إلى دورق معياري ١٠٠ مل ، وأكمل إلى العلامة بالماء .

٢ ـ يحضر محلول قياسي بإذابة ٣,٦٠٨٥ جم نترات بوتاسيوم في لتر ماء مقطر ، ويؤخذ منه ٢ مل في دورق معياري ١٠٠ مل + ٣٠ مل محلول مورجان ، ويكمل إلى العلامة بالماء فيكون كل ١ مل منه محتوياً على ١٠ ميكرو جرام أزوت نتراتي أي ١٠ جزء في المليون .

٣ ـ يحضر مقارنة من ٣٠ مل محلول مورجان + ٧٠ مل ماء مقطراً .

٤ ـ يؤخذ من كل من مستخلص العينة ، محلول قياسي ، مقارنة ٥ مل في كؤوس منفصلة ، ويضاف إلى كل منها ٢ مل حامض فينول دي سلفونيك ، واتركها ١٥ دقيقة . يضاف بعدها إلى كل كأس ٥ مل ماء مع الرج الخفيف والتبريد تحت مياه صنبور ، ثم يضاف ١٠ مل أمونيا مع الرج الخفيف والتبريد تحت مياه صنبور . أضف ٣ مل ماء ليصير مجموع حجوم السوائل في كل كأس ٢٥ مل . اخلط جيداً وبعد أن تبرد المحاليل تقدر كثافتها الضوئية باستخدام مرشح أزرق ٤٣٥–٤٨٠ نانومتر .

ز ـ النيتريت Nitrite :

١ ـ زن ٥ جم عينة مطحونة (أو مفرومة) في كأس ٥٠ مل ، ثم أضف ٤٠ مل ماء مقطراً في درجة الغليان ، وقلب بساق زجاجية .

٢ ـ انقل إلى دورق معياري ٥٠٠ مل بالغسيل بماء مقطر ساخن (٢٠٠ مل) ، مع العناية بتمام نقل العينة كمياً ، واتركه ٥ ساعات على ٢٠°م .

٣ ـ أضف ٥ مل محلول كلوريد زئبقيق مشبع ، اخلط وأكمل إلى العلامة بالماء المقطر . ثم رشح .

٤ ـ استقبل حجماً معيناً من الراشح في دورق معياري ٥٠ مل ، ثم أضف إليه ٢ مل حمض سلفانيليك الفانافثيل أمين (محلول يحضر بإذابة ٠,٥ جم حمض سلفانيليك Sul-phanilic في ١٥٠ مل حمض خليك ثلجي ١٥ ٪ ، ويضاف إلى هذا المحلول ٠,١٢٥ جم الفانافثيل أمين naphthylamine – في ٢٠ مل ماء مقطراً يغلي ويخزن في مكان مظلم.

٥ ـ خفف إلى العلامة ، اتركه يستقر ساعة بالضبط ، ثم قدر الكثافة الضوئية على ٥٢٠ نانومتر ضد مقارنة من ماء مقطر .

٦ ـ قدر كذلك الكثافة الضوئية لمحلول قياسي من النيتريت (أفضلها ما حضر من نيتريت فضة في محلول كلوريد صوديوم) معامل بالخطوتين (٤، ٥) .

وهذا الاختبار هام لمواد العلف الملوثة بالنيتريت ، إما لزيادة تسميدها الأزوتي ، أو لزراعتها في أرض مطبلة غدقة ، أو زراعتها كثيفة ، أو لريها من مياه آبار ، أو لزراعتها بالقرب من مصانع أسمدة كاليوريا . كذلك يقدر في الأنسجة البيولوجية من دم ولبن

وسائل كرش كمؤشرات لحالة تسمم نيتريتي ، ربما للتغذية على أعلاف غنية بالنيترات / نيتريت أو اليوريا ، أو لشرب مياه آبار .

ح ـ النيتروچين الأميني :

يقدر في مستخلص مائي للعينة بعد الترشيح ، فيؤخذ ٢٥ مل محلول عينة +٢ مل محلول فورمالدهيد متعادل (فورمالدهيد ٣٧٪ يعادل بالقلوي المستعمل في التقدير في وجود الفينولفثالين حتى اللون الأحمر الباهت) ، ويرج جيداً ثم يضاف ١ مل فينولفثالين ويجرى التعادل بالصودا الكاوية المخففة ٠,٠١ عياري حتى اللون الوردي الخفيف الثابت لمدة دقيقة. ويكون عدد ملليجرامات النيترچين الأميني في ١٠٠ جم عينة = حجم القلوي× عياريته × ١٤ × حجم العينة (المستخلص الكلي) × ١٠٠ / وزن العينة × ٢٥.

وهناك طرق أخرى لتقدير الأزوت الأميني كطريقة فان سلايك ، أو طريقة معلق النحاس ، لكن هذه أبسطها .

تقدير الأحماض الأمينية كروماتوجرافيا :

يتم التقدير كمياً بعد الاستخلاص والفصل على الكروماتوجرافي الورقي ، ثم الاستخلاص من الورق لتقديره لونياً بالمقارنة بمحلول قياسي على منحنى قياسي .

١ ـ زن ٢–١٠ جم بالضبط من النسيج حسب محتواه البروتيني والمائي .

٢ ـ تستخلص إما بالحامض acid hydrolysis (بالتسخين مع HCl تركيز ٦ عياري تحت مكثف عاكس على١٠٥م لمدة ٢٢ ساعة ، ثم التبخير والغسيل بالماء لإزالة أثر الحامض) (وفيها تهدم الأحماض الأمينية كالتيروسين والتربتوفان) ، أو بالقلوي Alkaline Hydrolysis (بالتسخين مع محلول مشبع من أيدروكسيد الباريوم على ١٠٥م لمدة ساعتين ثم المعادلة بالكبريتيك العياري والغسيل بالماء) ، أو قد تستخلص بكحول الإيثايل ٩٥٪ (١٥–٢٠ مل) بالغليان على حمام مائي ١٠ دقائق .

٣ ـ رشح باستخدام الصوف الزجاجي ، واستقبل الراشح في دورق معياري ٢٥٠ مل ، وأكمل للعلامة بنفس الكحول .

٤ ـ خذ حجماً معلوماً بماصة ميكرومترية (٠,٠١ مل) ، وضعها على خط الابتداء على شكل دائرة لايزيد قطرها عن ٠,٥ سم . توضع العينات في مكررتين بجانب بعضهما على مسافة ٥–٧سم من ورق Whatman No. 1 بمساحة ٤٥×٤٠سم (أو شرائط) حيث خط الابتداء على مسافة ٢,٥ سم من حافة الورق ، وتحاط العينة بالتحديد بقلم رصاص مناسب مع عدم الخروج بالعينة عن حدود الدائرة ، وألا تمس العينة محلول التطوير .

٥ ـ ضع كأسا به ماء في أحد جوانب إناء التطوير لتشبيع جو الإناء بالماء قبل وضع الكروماتوجرام فيه .

٦ ـ تجفف نقطة العينة ، وتطوى ورقةالترشيح لتكون إسطوانة (بحياكة حافتي الورقة) وتوضع قائمة في الإناء الزجاجي (عادة مجفف عادي) ، أو تعلق الورقة في الإناء مستخدماً الطريقة الصاعدة (وقد تستخدم الطريقة الهابطة لجودة الفصل ، أو الطريقة ثنائية الاتجاه Two dimensional) . جهز ورقاً آخر بمحلول الأحماض الأمينية كل حمض أميني على حدة . يحتوي إناء التطوير على المذيب (كحول بيوتايل ن / حمض خليك ـ ماء بنسبة ٥/٣/١٢ إذا كان التطوير في اتجاه واحد ، أو ماء / بيوتانول / حمض خليك بنسب ١/٤/٥ بخلطها في قمع فصل وتركها ٢٤ ساعة مع تكرار الرج على فترات ، ثم سحب الطبقة السطحية وترشيحها لامتصاص باقي الماء وذلك كمذيب للاتجاه الأول ، وكمذيب للاتجاه الثاني يستخدم الفينول المشبع بالماء (٨٠٪) مع الأمونيا (٠,٣٪) حتى يصير قلويا) .

٧ ـ يتم التطوير لمدة ١٢– ٢٢ ساعة (أو لمسافة ١٥ سم في اتجاه أول ، وتفك الحياكة، وتحاك في اتجاه عمودي ، وتطور بعد الجفاف في الاتجاه الثاني لنفس المسافة) ، وتجفف في الهواء لمدة ساعة ، ويعاد تعليقها لمدة ١٢– ٢٢ ساعة أخرى في نفس المذيب والاتجاه ، وتجفف الكروماتوجرام بمروحة كهربية ، أو مجفف شعر ، أو على حرارة الغرفة ، ثم ترش أو تغمس في محلول إظهار (ننهيدرين ٠,٢٪ في أسيتون أو بيوتانول / أسيتون (١/١) أو بيوتانول / حمض خليك (٩٥٪) كمحلول للغمس ، أو ٠,٥٪ في كحول إيثايل للرش) .

٨ ـ تترك الورقة لتجف في الجو العادي ، أو على ٦٠–١٠٥°م لمدة ١٠–١٥ دقائق ، فتظهر نقط بنفسجية اللون ، كل واحدة منها تمثل حمض أميني .

٩ ـ يعلم بالقلم الرصاص حول البقع لتحديد قيمته R_F لكل نقطة ، لتقارن بالـ R_F للأحماض الأمينية القياسية المعروفة ، والمعاملة على نفس الكروماتوجرام ، وذلك لتمييز بقع العينة ، وتحديد نوع أحماضها الأمينية ، وهناك خرائط وجداول موضوعة للأحماض الأمينية القياسية ، تبين قيم RF لها في مختلف المذيبات .

١٠ـ تقطع البقع الخاصة بكل حمض أميني على حدة ، قطعاً صغيرة جداً ، وتوضع في أنبوبة اختبار ، وكذلك يفعل نفس الشيء لبقع المحاليل القياسية ، في أنابيب أخرى . ضع في كل أنبوبة ١٠ مل من كحول الإيثايل ٥٠٪ ، وترج بشدة لمدة ١٠ دقائق ، ورشح خلال صوف زجاجي إلى دورق معياري ٢٥ مل ، مع تكرار الاستخلاص ٣ مرات ، في كل مرة ٥ مل أخرى مع الرج ، واجمعها في الدورق المعياري ، وأكمل بنفس الكحول

للعلامة .

١١ـ قدر الكثافة الضوئية لكل أنبوبة على طول موجة ٥٦٠ نانومتر ، ماعدا الحمض الأميني برولين ، هيدروكسي برولين ، فتستخدم طول موجة ٤٤٠ نانومتر ، وبمقارنة O.D. للمحلول المجهول بمثيلتها للمحلول القياسي ، يمكن حساب كمية الحمض الأميني في العينة بالملليجرام / ١٠٠ جم عينة = قراءة المحلول للعينة × تركيز الحمض الأميني القياسي (جزء / مليون أو ميكروجرام / جرام) / قراءة المحلول القياسي × ١٠ × وزن العينة جم .

١٢ـ قد يعمل محلول قياسي من كل حمض أميني بتركيزات مختلفة ، وتتم عليه الخطوات (٥–١٠) وتقرأ الكثافة الضوئية ، ويرسم منحنى قياسي للعلاقة بين تركيز الحمض بالجزء في المليون وقراءة الجهاز ، ثم يتعرف على تركيز العينة باستخدام المنحنى القياسي حيث تركيز الحمض الأميني بالعينة مجم / ١٠٠ جم =

$$\frac{\text{القراءة بالجزء في المليون}}{١٠٠٠} \times \text{التخفيف} \times \frac{١٠٠}{\text{وزن العينة جم}}$$

ملاحظات :

١ ـ هذه أبسط طريقة لتقدير الأحماض الأمينية ،وهي أكثر الطرق استعمالا وانتشاراً ، وذات دقة مقبولة لو تم الفصل التام لكل حمض أميني على حدة .

٢ ـ يستخدم قلم رصاص جاف ، لتحديد مناطق البقع وخطي البداية والنهاية والتخطيط لشرائح لكل نقطة .

٣ ـ يجرى الرش أو الغمس في خزانة زجاجية ، مع عدم الإفراط في الرش حتى لا تنزل نقطة المحلول من أسفل الكروماترجرام .

٤ ـ إذا استخلص الحمض الأميني (أي العينة) بكحول الإيثايل في دورق معياري ٢٥ مل ، وأخذ منه ٠٥, مل على الكروماتوجرام أي أن التخفيف = $\frac{٢٥}{٠٥,}$ = ٥٠٠ مرة .

٥ ـ محلول الإظهار بالرش (٠,٢ – ٠,٥ ٪ من النهيدرين في كحول إيثايل ، أو ماء مشبع بالبيوتانول) أو بالغمس (٠,٢ – ٠,٥ ٪ نهيدرين في أسيتون) .

٦ ـ قدرت R_F للأحماض الأمينية (عند استخدام مذيب مكون من حجم بيوتانول مع حجم ماء والخلط جيداً ، ثم يؤخذ منها ٥٠٠ مل يضاف إليها ٦٠ مل حمض خليك ثلجي ، وتهمل الطبقة السفلى للمخلوط) فوجدت كالتالي :

Alanine	0.62	Arginine	0.53
Aspartic Acid	0.25	Glutamic acid	0.39
Glycine	0.49	Histidine	0.81

Isoleucine	0.85	Lysine	0.41
Methionine	0.74	Phenylalanine	0.87
Proline	0.87	Serine	0.33
Threonine	0.57	Tryptophan	0.81
Tyrosine	0.51	Valine	0.82

٧ ـ استخدمت أعمدة الكروماتوجرافي Columns لفصل الأحماض الأمينية ، إلا أنها تحتاج لغسيل بكميات كبيرة من الحامض ، وتحتاج محاليل منظمة عديدة ، كما تحتاج هذه الطريقة وقتاً طويلاً ٤–٥ أيام ، إلا أنها طورت حديثاً لاختصار الوقت .

٨ ـ استخدم TLC ، GC لتفريد الأحماض الأمينية وقياسها كمياً ، إلا أن الجهاز المتخصص في تقديرها هو Amino Acid Analyser ، والذي يغذي بمحاليل منظمة مختلفة درجة الحموضة PH لتناسب فصل الأحماض المختلفة ، وقد تطور كثيراً هذا الجهاز ، ووصل من الدقة والبرمجة للحد الكبير ، ويمدنا بكروماتوجرامات عليها منحنيات للأحماض الأمينية المختلفة ومعها كذلك تركيز كل حمض مطلق ونسبي .

٩ ـ المركبات النيتروجينية ذات الأهمية الفسيولوجية :

أ ـ الهيموجلوبين (طريقة بيرسلفيت) :

يحتوي الهيموجلوبين على ٠,٣٤٪ حديداً ، وقد وجد أن ٩٨–٩٩٪ من حديد الدم يوجد في الهيموجلوبين . ويقدر الهيموجلوبين عن طريق تقدير الحديد كالتالي :

١ ـ ينقل ٠,٥ مل دم مخلوط بالأكسالات مع ٢ مل حمض كبريتيك نقي خال من الحديد مع الرج ١–٢ دقيقة . أضف ٢ مل محلولاً مشبعاً من بوتاسيوم بيرسلفيت ثم اخلط جيداً . أضف ٢٥ مل ماء مقطراً + ٢ مل محلولا ١٠٪ من تنجستات صوديوم ، ورج ثم برد إلى حرارة الغرفة ، وأكمل في دورق معياري إلى علامة ٥٠ مل بالماء المقطر . رشح واجمع الراشح .

٢ ـ أضف ٢٥ مل ماء مقطراً في دورق معياري ٥٠ مل ، ثم أضف ٢ مل حمض كبريتيك مركزاً + ٢ مل محلول مشبع بوتاسيوم بيرسلفيت + ٢,٥ مل محلول حديد قياسي يحتوي كل ١ مل منه على ٠,١ ملجم حديداً ، ثم برد على درجة حرارة الغرفة ، وأكمل إلى العلامة بالماء .

٣ ـ في دورق معياري ٥٠ مل ضع ٢ مل حمض كبريتيك مركزاً + ٢ مل محلولاً مشبعاً من بوتاسيوم بيرسلفيت ، وأكمل بالماء إلى العلامة كمقارنة لضبط الجهاز عليها .

٤ ـ يؤخذ ١٠ مل من الراشح الناتج من العينة (أو من المحلول القياسي للحديد ، أو من

المقارنة ، خطوة رقم ٣) في أنبوبة سعة ٢٥ مل + ٠,٥ مل محلولاً مشبعاً من بوتاسيوم بيرسلفيت + ٢ مل محلول بوتاسيوم ثيوسيانات واخلط جيداً ثم اقرأ الكثافة الضوئية في ظرف ٣٠ دقيقة على طول موجة ٤٨٠ نانومتر ، واحسب تركيز الهيموجلوبين جم / ١٠٠ مل دم =

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٠,٢٥ \times ١٠٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي} \times ٠,٥ \times ٣,٤}$$

تحضير المحاليل :

١ ـ بوتاسيوم بيرسلفيت مشبعة : أذب ٧٠ – ٨٠ جم بوتاسيوم بيرسلفيت خالية الحديد في لتر ماء مقطر .

٢ ـ تنجستات صوديوم ١٠ ٪ : أذب ١٠٠ جم تنجستات صوديوم نقية في لتر ماء .

٣ ـ محلول حديد قياسي : أذب ٠,٧٠٢ جم من كبريتات أمونيوم حديدوز في ١٠ مل ماء + ٥ مل حمض كبريتيك مركزاً ، وسخن ببطء ثم أضف نقطة برمنجنات بوتاسيوم مشبعة ، لتكوين لون قرمزي ثابت ، وينقل إلى دورق معياري سعة لتر ويكمل بالماء .

٤ ـ ثيوسيانات بوتاسيوم : أذب ١٤٦ جم منها في ماء وأكمل إلى ٥٠٠ مل بالماء ، إذا وجدت عكارة فيرشح ويضاف ٢٠ مل أسيتون نقياً .

تقدير الهيموجلوبين (طريقة سيانو ميتهيموجلوبين) :

ضع ٥ مل دليل هيموجلوبين (أذب ١ جم بيكربونات صوديوم + ٠,٢ جم حديدي سيانيد بوتاسيوم + ٠,٠٥ جم سيانيد بوتاسيوم في ماء مقطر ، وأكمل إلى لتر في إناء بني بعيداً عن الضوء) في أنبوبة وأضف إليها ٠,٠٢ مل دماً ، واخلط جيداً . واتركها ١٠ دقائق ، ثم اقرأ الكثافة الضوئية على ٥٤٠ نانومتر ، مع ضبط الجهاز على الصفر بدليل الهيموجلوبين . يجرى نفس التقدير على محلول قياسي ، ويقدر تركيز الهيموجلوبين بالجرام / ١٠٠ مل دم =

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times \text{تركيز الهيموجلوبين في المحلول القياسي ٪}}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}}$$

وبدون استخدام محلول قياسي يمكن حساب تركيز الهيموجلوبين بهذه الطريقة بضرب الكثافة الضوئية للعينات × ٤٥٤,٥٤٥ ، بينما بأكسدة الهيموجلبين (٠,٠٢ مل دم) بمحلول حديدي سيانيد البوتاسيوم (٠,٦ ملي مولر) وتفاعله مع سيانيد البوتاسيوم (١ ملي مولر) (٥ مل من محلول التفاعل) والقياس على ٥٤٠ نانومتر تضرب القراءة في ٣٦,٨ لحساب تركيز الهيموجلوبين جم / ١٠٠ مل دم أو في ٢٢,٨ لحساب تركيز الهيموجلوبين كحديد ملي مول / لتر .

تقدير الميتهيموجلوبين :

في ظرف ٥ دقائق من جمع العينات يؤخذ ٠,٣ مل دم بالهيبارين ، وتخلط مع ٢٠ مل محلولاً منظماً درجة حموضته ٦,٩ (يحتوي ٤,٠٤ جم فوسفات بوتاسيوم أحادية + ٦,٥ جم فوسفات صوديوم ثنائية في اللتر) + نقطتان عن محلول سابونين ١٠٪ ، وبعد دقيقتين تقاس الكثافة الضوئية على طول موجة ٦٣٠ نانومتر في نصف المحلول . أضف إلى نصف المحلول الباقي نقطتين من محلول سيانيد بوتاسيوم ١٠٪ ، وقس الكثافة الضوئية على نفس طول الموجة . الفرق بين قراءتي الجهاز لكل عينة يضرب في ١٠٢,٥٦٤ للحصول على تركيز الميتهيموجلوبين (جم / ١٠٠ مل دم) .

ب ـ البروتين الكلي (طريقة البيوريت) في الدم والأنسجة :

المحاليل :

١ ـ محلول كبريتات / كبريتيت : أذب ٢٠٨ جم كبريتات صوديوم لامائية و ٧٠ جم كبريتيت صوديوم لا مائية في ٩٠٠ مل ماء + ٢ مل حمض كبريتيك مركزاً ، ويجب أن تكون قيمة PH أعلى من ٧ ، ثم تنقل إلى دورق معياري ٢ لتر، ويكمل للعلامة بالماء .

٢ ـ دليل البيوريت Biuret : يذاب ٤٥ جم ملح روشيل Rochelle في ٤٠٠ مل صودا كاوية ٠,٢ عياري ، ويضاف إليها ١٥ جم كبريتات نحاس خماسي الماء مع التقليب المستمر لتمام الذوبان ، ثم يضاف ٥ جم يوديد بوتاسيوم ، ويكمل الحجم إلى لتر بالصودا الكاوية ٠,٢ عياري . يخفف الدليل بأخذ ٢٠٠ مل وتخفيفها إلى لتر بالصودا الكاوية ٠,٢ عياري المحتوية ٥ جم يوديد بوتاسيوم / لتر .

٣ ـ محلول بروتين قياسي : أذب ٥,٥ جم بروتين سيرم جافاً في ١٠٠ مل ماء .

اجر التقدير كالتالي :

١ ـ يؤخذ من العينة ٠,٤ مل ، وتضاف إلى أنبوبة محتوية ٦ مل محلول كبريتات / كبريتيت ، وتخلط ويؤخذ منها ٢ مل ، تضاف إلى ٥ مل محلول بيوريت . توضع الأنابيب في حمام مائي على ٣٧°م لمدة ١٠ دقائق ، ثم تبرد لمدة ٥ دقائق على حرارة الغرفة ، تقاس الكثافة الضوئية على ٥٥٥ نانومتر .

٢ ـ تجرى تجربة خالية (بلانك) بإضافة ٢ مل محلول كبريتات / كبريتيت إلى ٥ مل دليل بيوريت ويكمل الخطوات كما في العينة .

٣ ـ يجرى عمل تقدير للبروتين القياسي بأخذ ٠,٤ مل من المحلول القياسي مع ٦ مل محلول كبريتات / كبريتيت . ويؤخذ من هذا المخلوط ٢ مل في أنبوبة أخرى مع ٥ مل دليل بيوريت ويكمل كما في العينة .

ويحسب تركيز البروتين في السيرم أو البلازما بالجرام/١٠٠ مل = $\frac{\text{قراءة العينة} \times ٥,٥}{\text{قراءة المحلول القياسي}}$

وتستخدم نفس طريقة البيوريت كذلك في تقدير البروتين الكلي في الأنسجة الطازجة كما في البلازما ، بأخذ ٠,١ جم عينة وتجنس مع ٥ مل ملح طعام تركيز ٠,٩ ٪ ، وترسيب البروتين فيها بإضافة ٥ مل محلول ١٠ ٪ من حمض ثلاثي كلورو الخليك ، يذاب البروتين المترسب في ٢ مل ماء ، ويقدر البروتين بعد ذلك كما في البلازما أي بإضافة ٥ مل من دليل البيوريت (المتكون من محلول أ : ٩ جم / لتر طرطرات صوديوم وبوتاسيوم + ٨ جم / لتر يوديد بوتاسيوم ، محلول ب : ١٥ جم / لتركبريتات نحاس ، يضاف ٥ مل من محلول أ إلى ٢٤٥ مل من محلول ب)، اخلط جيداً ثم اغل دقيقة ثم برد واقرأ الكثافة الضوئية بعد نصف ساعة على طول موجة ٥٥٠ نانومتر باستخدام مقارنة (٠,١ مل محلول ملح طعام + ٥ مل دليل بيوريت وأكمل كما في العينة) وكذلك محاليل قياسية متدرجة الحجوم ٠,٢–١,٠ مل (من محلول البيومين ماشية تركيز ١٠ مجم / ١٠ مل ماء) وأكمل إلى ١ مل بالمحلول الملحي واجر عليها كما في العينة والمقارنة .

جـ ـ الأزوت غير البروتيني في الدم :

يجرى ترسيب البروتين في الدم بتنجستات صوديوم (١٠ ٪) ، أو حامض ثلاثي كلورو خليك (١٠ ٪) ، ويؤخذ ١ مل من راشح الدم هذا مع ٠,٢ مل حمض كبريتيك مخففاً (١:١) محتوى ١ جم ثاني أوكسيد سلنيوم / ١٠٠ مل ، ويسخن على لهب بسيط حتى يروق المحلول ، فيبرد ويخفف إلى حوالي ٦ مل ، ويضاف إليها ٣ مل محلول نسلر ، وتخلط وتكمل بالماء إلى ١٠ مل ، وتقاس كثافتها الضوئية على ٤٨٠ نانومتر ضد عينة خالية (بلانك) من الأدلة والماء بدل العينة .

كما تقدر الكثافة الضوئية لمحلول قياسي من كبريتات الأمونيوم (٠,١٤١٤ جم / ١٠٠ مل وتخفف ١ : ١٠ فيحتوي ٠,٠٣ مجم أزوت / مل) بأخذ ١ مل منه مع ٦ مل ماء + ٣ مل محلول نسار والرج والتقدير .

الاختلافات في النيتروجين غير البروتيني في الدم ترجع أساساً للاختلافات في أهم مكوناتها وهي اليوريا .

د ـ يوريا الدم (طريقة الأمينو بنزالدهيد) :

يخلط ٣ مل دم مع ١٢ مل محلول ١٠ ٪ من ثلاثي كلورو خليك ، وتترك ٥ دقائق ثم يرشح على ورق ترشيح عليه فحم نباتي ، ثم أضف ٠,٥ جم فحم إلى الراشح ، واخلط جيداً ، وأعد الترشيح . أضف ٥ مل راشحاً إلى ١ مل دليل بنزالدهيد (٥ جم بارا دي ميثيل أمينو بنزالدهيد تذاب في ٢٠ مل حمض هيدروكلوريك مركزاً ، ويضاف إليها بحذر

٨٠ مل ماء مقطراً ، وقلب ثم برد قبل الاستخدام ، واحفظ في زجاجة بنية اللون ، إذ يظل المحلول صالحاً للاستخدام لمدة شهر) ، واتركه يستقر ٥ دقائق على الأقل على درجة حرارة الغرفة .

عدّ تجربة مقارنة من ٤ مل حمض ثلاثي كلورو خليك (١٠٪) + ١ مل ماء + ١ مل دليل بنزالدهيد . بعد ٥ – ٦٠ دقيقة من إضافة الدليل تقرأ الكثافة الضوئية على ٤٢٠– ٤٣٠ نانومتر للعينة مع تصغير الجهاز على التجربة المقارنة ، وذلك ضد محلول قياسي (٦,٤٣ جم يوريا نقية جافة في ماء مقطر ، أضف ٤ مل كلورفورم ، وأكمل إلى لتر بالماء . خفف ٥ مل منه إلى ١٠٠ مل بالماء ، واستخدم هذا المحلول كمحلول قياسي تركيزه ٠,٣ مجم يوريا / مل . هذا التخفيف الأخير صالح لمدة أسبوع) يجرى عليه نفس الخطوات التي أجريت على التجربة بإحلال ٠,٠٥ مل محلولاً قياسياً محل الدم . احسب

تركيز اليوريا مجم أزوت يوريا / ١٠٠ مل دم = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٣٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}}$

ولما كانت يوريا الدم تشكل حوالي نصف تركيز النيتروجين غير البروتيني ، فإن تقدير يوريا الدم يعطي نفس المعلومات كما لو قدرنا النيتروجين غير البروتيني ، بل البعض يفضل استخدام يوريا الدم ، وإن كان في حالة المرض الشديد للكبد يميل الدم لاحتواء تركيز منخفض من اليوريا وتركيز مرتفع من الأحماض الأمينية ، مما يجعل اليوريا تشكل نسبة أقل من النيتروجين غير البروتيني .

يوريا الدم (طريقة دي أستيل مونوكسيم) :

خذ ٠,١ مل دماً مع ٣,٣ مل ماء + ٠,٨ مل تنجستات صوديوم ١٠٪ + ٠,٣ مل حمض كبريتيك ٠,٦ عياري ، واخلط واطرد مركزياً . خذ ١ مل رائقاً مع ١ مل ماء + ٠,٤ مل دليلاً (٢ جم دي أسيتيل مونوكسيم تذاب في ٦٠ مل ماء + ٢ مل حمض خليك ثلجي ، ورج للذوبان مع التدفئة البسيطة ، وأكمل بالماء إلى ١٠٠ مل) + ١,٦ مل مخلوط أحماض (١٥٠ مل حمض فوسفوريك ٨٥٪ تضاف إلى ١٤٠ مل ماء ، وتخلط ثم يضاف ٥٠ مل حمض كبريتيك مركزاً ببطء مع التقليب) . ضع في حمام ماء يغلي لمدة ٣٠ دقيقة ، ثم برد واقرأ الكثافة الضوئية على ٤٨٠ مليميكرون . اجر نفس الاختبار على ١ مل من محلول قياسي (٢٥٠ مجم يوريا تذاب في ١٠٠ مل ، ثم يخفف ١ مل منه إلى ١٠٠ مل فيكون تركيزه ٠,٠٢٥ مجم يوريا / مل) .

احسب تركيز اليوريا مجم / ١٠٠ مل = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٠,٠٢٥ \times ١٠٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي} \times ٠,٠٢٥}$

ويلاحظ أن اليوريا $CO(NH_2)_2$ وزنها الجزيئي ٦٠ ، وتحتوي ذرتي نيتروجين ، وعليه

فمن الخطأ التعبير أحياناًعن اليوريا بأزوت اليوريا ، إذ إن مجم يوريا

$$= \text{مجم نيتروجين اليوريا} \times \frac{٦٠}{٢٨}$$

= نيتروجين اليوريا × ٢,١٤

ويزيد تركيز يوريا الدم في حالات أمراض الكلى المختلفة ، وارتفاع ضغط الدم ، والتسمم الزئبقي ، وزيادة نشاط غدد جارات الدرقية ، وزيادة ڤيتامين D ، وزيادة اختزان الكالسيوم. بينما نقص يوريا الدم نادر الحدوث ، وقد يرافق أمراض الكبد الشديدة والحمل.

وللحكم على كفاءة عمل الكلى ، يجب كذلك تحليل البول لمحتواه من اليوريا ، فزيادة محتوى البول من اليوريا تشير إلى كفاءة عمل الكلى ، إذ لا يتوفر ذلك في وجود فشل كلوي ، إلا أنه قبل الفشل الكلوي ، وفي حالات الجفاف ، وانسدادات الأمعاء المزمنة ، أو الإسهال لمدد طويلة يصاحبها ارتفاع تركيز يوريا الدم والبول معاً .

يوريا الدم (طريقة الهيبوكلوريت) :

حضن ٠,٠٢ مل سيرم أو بلازما مع ٠,٢ مل محلول منظم يورياز (أذب ١٥٠ مجم يورياز (نشاطه ١٠٠٠ وحدة / جم) في ١٠٠ مل محلول ١٪ EDTA (حامض) في ماء مضبوط درجة تركيز أيون الهيدروجين ٦,٥ ، ويمكن حفظه في ثلاجة لمدة شهر) على ٣٧°م لمدة ١٥ دقيقة ، ثم أضف ٥ مل محلول نيتروبروسيد صوديوم فينول (٥٠ جم فينول + ٠,٢٥ جم نيتروبروسيد صوديوم في لتر وتخفف منه ١ : ٥ عند الاستعمال ، ويحفظ لمدة شهرين في ثلاجة في زجاجة بنية) ، واخلط وأضف ٥ مل محلول هيبوكلوريت (٢٥ جم هيدروكسيد صوديوم + ٢,١ جم هيبوكلوريت في لتر ماء ، ويخفف ١ : ٥ عند الاستعمال وهو صالح لمدة شهرين في زجاجة بنية في ثلاجة) ، وضعها في حمام مائي على ٣٧°م لمدة ١٥ دقيقة . يجرى عمل تجربة خالية ، وكذلك نفس الخطوات تجرى على محلول قياسي (١ مجم / مل) واقرأ الكثافة الضوئية على ٦٣٠ نانومتر ، واحسب تركيز اليوريا مجم / ١٠٠ مل = $\frac{\text{قراءة العينة} \times ١٠٠}{\text{قراءة المحلول القاسى}}$

يوريا الدم والبول (طريقة دي أسيتيل مونوكسيم) :

يؤخذ ٠,١ مل بلازما أو سيرم وتخفف إلى ١٠ مل بالماء ، يؤخذ منها ١ مل ويضاف إليها ١ مل ماء . يجرى نفس الشيء مع محلول قياسي . كما يؤخذ في أنبوبة ثالثة ٢ مل مقطراً للتجربة الخالية يضاف إلى كل من أنابيب العينة ، والمحلول القياسي ، والتجربة الخالية ٢ مل دليلاً ملوناً مخلوطاً ، واخلط جيداً ، ثم أضف ٢ مل دليل حامض مخلوط ، واخلط ثانية ، ضع الأنابيب في حمام ماء يغلي ٢٠ دقيقة ، واقرأ الكثافة الضوئية على ٥٢٠ نانومتر . اللون ثابت لمدة ٢٤ ساعة في الظلام على حرارة الغرفة .

احسب تركيز يوريا البلازما مجم / ١٠٠ مل = $\frac{\text{قراءة العينة} \times ٢٠٠}{\text{قراءة المحلول القياسي}}$

لتقدير يوريا البول تجرى نفس الخطوات على بول مخفف ٢٠ مرة ، ويحسب التركيز بنفس المعادلة مضروبة في ٢٠ .

الدلائل :

١ ـ دليل الحمض المخلوط : ٠,٥ مل دليل أ (٥ جم كلوريد حديديك مذابة في ٢٠ مل ماء ، ويضاف إليها ببطء ١٠٠ مل حمض فوسفوريك ٨٥٪ ، وأكمل إلى ٢٥٠ مل بالماء) تضاف إلى لتر من دليل ب (٢٠٠ مل حمض كبريتيك مركزاً يضاف ببطء إلى ٥٠٠ مل ماء ، وأكمل إلى ٢ لتر بالماء) .

٢ ـ دليل ملون مخلوط : أضف ٦٧ مل دليل ملون أ (٥ جم دي أسيتيل مونوكسيم تذاب في ٢٥٠ مل ماء وترشح) مع ٦٧ مل دليل ملون ب (٥ جم ثيوسيمي كاربازيد تذاب في لتر ماء) ويكمل الحجم بالماء إلى لتر .

٣ ـ محلول قياسي : ٥٠ جم يوريا تذاب في لتر ماء يؤخذ منها ١٠ مل وتخفف إلى ٢٥٠ مل بمحلول مخفف حافظ (٠,٠٤ جم خلات زئبقيك فينيل تذاب في ٢٥٠ مل ماء بالتسخين ، ويضاف إليها ٠,٣ مل حمض كبريتيك مركزاً ، وأكمل إلى لتر بالماء) .

هـ ـ أمونيا الدم والبول :

يتأكسد الفينول بواسطة هيبوكلوريت الصوديوم ، ويكون لوناً أزرق مع الأمونيا في وجود نيتروبروسيد الصوديوم كعامل مساعد .

يؤخذ ٠,١ مل دماً (مضافاً إليه الهيبارين) ، وتضاف مباشرة إلى ١,٠ مل محلول ثالث كلورو خليك ، واخلط واطرد مركزياً . يؤخذ من الرائق ٠,٠٥ مل ويضاف إليها ٠,٥ مل دليل فينول + ٠,٥ مل دليل هيبوكلوريت . يجرى نفس الشيء على محلول قياسي ، وكذلك على ماء (كتجربة خالية) . اترك كل الأنابيب لمدة ٣٠ دقيقة على ٣٧م ، ثم اقرأ الكثافة الضوئية على ٦٢٣ نانومتر ، واحسب تركيز الأمونيا كنيتروجين أمونيومي بالميكروجرام / ١٠٠ مل دم = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٢٠٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}}$

تقدر أمونيا البول بنفس الأسلوب ، باستخدام بول بدون أي مادة حافظة ، ويخفف ١٠٠ مرة قبل إجراء أي خطوة ، ويحسب التركيز كذلك من نفس المعادلة السابقة مضروبة في ١٠٠ (التخفيف) .

الدلائل المستخدمة :

١ ـ دليل الفينول : ١٠ جم فينول مبلور + ٥٠ مجم نيتروبروسيد صوديوم تذاب في

ماء مقطر ، وأكمل إلى لتر .

٢ ـ هيبوكلوريت صوديوم : ٢٠ جم هيبوكلوريت كالسيوم تعلق في ١٠٠ مل ماء ، وتخلط مع ٢٥ جم كبريتات صوديوم (١٠ جزيئات ماء) مذابة في ٥٠٠ مل ماء . بعد الترسيب اسحب الرائق واحفظه في ثلاجة ، فهو صالح لمدة أسبوع واحد . اختبر تركيز الكلور النشط في هذا المحلول بأخذ ١ مل منه + ٥ مل ماء مقطراً وملوق من يوديد البوتاسيوم ، وتخلط معاً في دورق مخروطي ، وحمض بحمض الكبريتيك ٥ عياري ، نقط بمحلول ٠,١ عياري ثيوكبريتات صوديوم (٢,٤٨ جم في ٥٠ مل ماء ، وأكمل إلى ١٠٠ مل ، وعاير ضد محلول ثاني كرومات بوتاسيوم ٠,١ عياري) حتى زوال اللون البني، أضف نقطاً من دليل نشا ١ ٪ وأكمل المعايرة . احسب إجمالي حجم الثيوكبريتات الذي ينبغي أن يكون ٢,٨٢ مل ، فإن زاد أو قل ، تزيد أو تقل كمية هيبوكلوريت الصوديوم المستخدمة في تحضير دليل الهيبوكلوريت .

٣ ـ دليل الهيبوكلوريت : ٩٠ جم فوسفات صوديوم ثنائية + ٦ جم هيدروكسيد صوديوم تذاب في ٥٠٠ مل ماء ، ويضاف إليها ١٠٠ مل هيبوكلوريت صوديوم ، وأكمل إلى لتر بالماء .

٤ ـ محلول حمض ثلاثي كلورو خليك : ١٠ جم منه مع ١,٣ جم هيدروكسيد صوديوم تذاب في ١٠٠ مل ماء ، وتحفظ في ثلاجة .

٥ ـ محلول قياسي : ٤٧٢ مجم كبريتات أمونيوم جافة تذاب في ماء ، وتكمل إلى لتر بالماء ، ويؤخذ منها ٢ مل وتكمل إلى ١٠٠ مل بالماء (٢٠٠ ميكروجرام أزوت أمونيومي / ١٠٠ مل) .

وترتفع أمونيا الدم لفشل الكبد في تحويلها إلى يوريا ، كما في أمراض تليف الكبد ، والغيبوبة الكبدية مما يؤثر على المخ وتنشأ اضطرابات عصبية .

و ـ حمض اليوريك في الدم :

اخلط ١مل سيرم مع ٨مل ماء + ٠,٥ مل حمض كبريتيك ٠,٦٦ عياري + ٠,٥ مل تنجستات صوديوم ١٠ ٪ . اترك ١٠ دقائق لتمام ترسيب البروتين . رشح وخذ ٤ مل من الراشح مع ١ مل كربونات صوديوم ١٤ ٪ + ١ مل دليلاً (١٠٠ جم تنجستات صوديوم يوضع عليها ٣٢ مل حمض فوسفوريك ٨٥ ٪ مخلوطة مع ١٥٠ مل ماء ، واخلط واغل ساعة تحت مكثف عاكس ، وقبل نهاية فترة الغليان يضاف قليل من البروم لإزالة اللون ، واغل لطرد الزيادة من البروم ، ثم برد وخفف إلى ٥٠٠ مل) ، اترك ١٥ دقيقة على حرارة الغرفة ، واقرأ الكثافة الضوئية على ٦٨٠ نانومتر ، مع ضبط الجهاز على تجربة ،

خالية ، وعمل نفس التقدير على محلول قياسي (زن ١ جم حمض يوريك في دورق ، وفي دورق آخر ٠,٦ جم كربونات ليثيوم مع ١٥٠ مل ماء ، ورج ٥ دقائق ورشح وسخن على ٦٠°م ، أيضاً سخن الدورق الذي به حمض اليوريك بتيار ماء دافئ ، انقل محلول كربونات الليثوم الدافئ إلى حمض اليوريك ، ورج لذوبان حمض اليوريك ، مع استمرار التدفئة أسفل صنبور ماء ساخن ، والرج المستمر ٥ دقائق ، ثم أكمل الرج أسفل تيار ماء بارد ، وأضف ٢٠ مل فورمالين ٤٠٪ ، وأضف ٣٣٠ مل ماء ، ومع الرج أضف ٢٥ مل حمض كبريتيك عياري ، وأكمل بالماء إلى لتر . هذا المحلول يحتوي ١ مجم حمض يوريك لكل ١ مل، ويجب حفظه بعيداً عن الضوء، فيستمر صالحاً على الأقل ٥ سنوات. خفف ١ مل منه بالماء إلى ٢٥٠ مل ، يستمر المخفف صالحاً للعمل عدة أيام وتركيزه ٠,٠٢ مجم حمض يوريك / ٥ مل) .

يزيد حمض اليوريك في الدم في حالات النقرس ، والفشل الكلوي ، والروماتزم (إذ تترسب اليورات الصلبة في وحول المفاصل) ، وهدم أنوية الخلايا نتيجة زيادة ميتابوليزم البروتينات النووية (كما في مرض سرطان الدم Leukaemia) وفي حالة تسمم الحمل .

ز ـ الأحماض الأمينية في البلازما :

تبقع رقائق كروماتوجرافي بالبلازما ، ومحاليل قياسية من الأحماض الأمينية، بمقدار ٢ ميكروليتر من كل منها ، وتطور في مخلوط بيوتانول / أسيتون / حمض خليك / ماء (٢٣/٧/٣٥/٣٥) لمدة حوالي ساعة ، أو مسافة حوالي ٨ سم على الأقل ، ثم تستخرج الرقائق ، وتجفف بالهواء الساخن . يخلط مخلوط التطوير بمقدار ٣ مل دليلاً (٤٠٠ ملي مولر ننهيدرين في بيوتانول / أسيتون ٥٠/٥٠ ، يحفظ في ثلاجة ، ويصير صالحاً حتى ٣ شهور) ، وتوضع فيه الرقائق الجافة ثانية ، وتطور لنفس المدة والمسافة . تستخرج الرقائق ، وتجفف بالهواء الساخن ، ثم في فرن تجفيف على ٨٠°م لمدة دقيقة ، فتظهر الأحماض الأمينية (عدا البرولين والهيدروكسي برولين) كمناطق زرقاء اللون . ولتقييم الرقائق تترك بعد خروجها من الفرن ١٠ دقائق في الضوء (إذا لم تفحص الرقائق في الحال فتجفف هوائياً فقط وتحفظ في ثلاجة والرقائق وجهها لبعض) ، وإذا كان لون شرائط الأحماض الأمينية باهتاً فتطول فترة التجفيف ، وإذا كانت الأرضية داكنة فتكون درجة حرارة التجفيف أو مدة التجفيف أعلى من اللازم .

ولإظهار البرولين والهيدروكسي برولين تبلل فُرشة رسم بدليل البرولين (٥٧ ملي مولر بارا – دي ميثيل أمينو بنزالدهيد في مخلوط خلات إيثيل / حمض فوسفوريك ٨٥٪ / حمض خليك / ماء (١٠/٣٤/٦/٥٠)) ، وتمسح بها الرقيقة سابقة المعاملة بالننهيدرين عند ارتفاع منطقة الألانين والجليسين بموازاة خط النهاية الذي وصل إليه مخلوط التطوير

من قبل ، وتسخن الرقيقة ٣ دقائق في فرن تجفيف على ١١٠م ، تظهر مناطق البرولين والهيدروكسي برولين بلون أحمر واضح إذا كانت بتركيز كاف .

حدود الكشف عن الأحماض الأمينية بالملليجرام / ١٠٠ مل هي ٣ (تربتوفان ، هيدروكسي برولين) ، ٤ (إيزوليوسين ، تيروزين ، برولين ، أرجنين ، سيستين) ، ٥ (ميثونين ، جليسين ، سيرين ، أورنيثين)، ٦ (ليوسين) ٧ (جلوتاميك ، ثريونين)، ١٠ (ألانين ، فالين) ، ٣٠ (هيستيدين) . هذا وتذاب الأحماض الأمينية القياسية في بروبانول / ماء ٧٠/٣٠ . وتضطرب صورة الأحماض الأمينية في البلازما والبول في كثير من الأمراض خاصة في اضطرابات الميتابوليزم المرافقة للجنون ، وأمراض الكبد ، فيزيد تركيز معظم الأحماض الأمينية في حالات الجنون ، بينما تزيد تركيزات الأسبارتيك والجلوتاميك والجليسين والميثونين والفينيل ألانين والسيرين في حالات التهاب الكبد ، وتزيد الأحماض الميثونين وفينيل ألانين والبرولين والسيرين والثريونين والتيروزين والسيترولين في حالة تليف الكبد .

نيتروجين الأحماض الأمينية في الدم :

يحضر راشح دم معامل بالتنجستات (١٠:١) كما هو متبع في تحاليل الدم المختلفة ، وينقل ٥ مل من هذا الراشح خالي البروتين إلى أنبوبة اختبار ، وفي أنبوبة أخرى ينقل ٥ مل محلول قياسي للأحماض الأمينية يحتوي ٠,٠٣ مجم أزوت أحماض أمينية (يحتوي جليسين وحمض جلوتاميك : ٠,٢٦٨ جم جليسين نقي جاف مذاب في ماء + ٣٥ مل حمض هيدروكلوريك عياري + ١ جم بنزوات صوديوم ، وأضف ماء حتى ٥٠٠ مل . أذب ٠,٥٢٥ جم حمض جلوتاميك جاف نقي في ماء + ٣٥ مل حمض هيدروكلوريك عياري + ١ جم بنزوات صوديوم وخفف إلى ٥٠٠ مل بالماء . اخلط هذين المحلولين القياسيين فيحتوي ١ مل من المخلوط على ٠,١ مجم أزوت أحماض أمينية، وللعمل خفف ٣مل من هذا المخلوط بالماء إلى ١٠٠ مل ، فيحتوي هذا المخفف على ٠,٠٣ مجم أزوت أحماض أمينية / ٥ مل ، وهو ثابت لمدة أسبوع واحد إذا حفظ في ثلاجة ، بينما المخلوط الأول ثابت بلا حدود) ، وفي أنبوبة ثالثة (بلانك) أضف ٥ مل ماء ، ثم أضف إلى كل أنبوبة نقطة واحدة من محلول ٠,٢٥ ٪ فينولفثالين كحولي ، ثم نقط بالصودا الكاوية ٠,١ عياري حتى يظهر لون قرنفلي ثابت ، اضبط حجم الأنابيب إلى حجم واحد فيها جميعاً ، بإضافة الماء إذا لزم . أضف إلى جميع الأنابيب ١ مل محلول بوراكس (١,٥ ٪ صوديوم تترابورات يحتوي ١٠ جزيئات ماء يذاب منه ١٥ جم في لتر ماء)، واخلط ثم أضف ١مل محلول نافثوكوينون طازجاً التحضير (٠,٢٥ جم بيتا – نافثوكوينون – ٤ – حمض سلفونيك تذاب في ماء وتخفف إلى ٥٠ مل) واخلط ، وضع الأنابيب في حمام ماء يغلي ١٠ دقائق ، ثم برد في حمام ماء بارد ٥ دقائق . أضف ١ مل محلول

فورمالدهيد حمضي (خفف ١١,٣ مل فورمالدهيد ٤٠٪ إلى لتر بالماء ، ثم اخلط ٤ حجوم منه مع ٣ حجوم حمض هيدروكلوريك ١,٥ عياري + حجم حمض خليك ثلجي) اخلط ثم أضف ١ مل محلول ثيوكبريتات ٠,١ عياري (أذب ٢٥ جم بلورات ثيوكبريتات صوديوم في ماء وخفف إلى لتر) خفف في التو إلى ١٥ مل بالماء ، واخلط ثم اترك نصف ساعة، ثم اقرأ الكثافة الضوئية على ٤٩٠ ملي ميكرون ، واحسب، تركيز الأحماض الأمينية في العينة مجم نيتروجين أحماض أمينية / ١٠٠ مل دم أو بلازما =

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٠,٠٣ \times ١٠٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي} \times ٠,٥}$$

يرتفع تركيز الأحماض الأمينية في الدم في حالة تليف الكبد ، ونكرزة الكبد الحادة ، وفي الفشل الكلوي المتقدم ، بينما ينخفض بحقن الأنسولين .

ح ـ أزوت النترات فى الدم واللبن والبول والكرش :

الدم :

يجمع الدم في وجود ملح ثنائي صوديوم EDTA كمانع للتجلط (٢ مجم / مل) ، ويجمد أو يحفظ في ثلاجة لحين التحليل . انقل ٥ مل دم مع ٣٥ مل ماء واخلط ، ثم أضف ٥ مل تنجستات صوديوم ١٠٪ واخلط ، ثم أضف ٥ مل حمض كبريتيك ٠,٦٦ عياري (١٩ مل تخفف إلى لتر بالماء) واخلط ، واترك ٢٠ دقيقة ، ثم اطرد مركزياً أو رشح على ورق ترشيح خالي النترات . اسحب ٢٥ مل من الرائق ، وأضف إليها ١ مل دليل فضة / نحاس (أذب ٢٠ جم كبريتات نحاس خماسي الماء مع ١ جم كبريتات فضة في ١٠٠ مل ماء) ، واخلط واترك ٢٠ دقيقة ، أضف حوالي ٠,٣ جم كالسيوم هيدروكسيد + ٠,٣ جم كربونات ماغنسيوم ، واخلط واترك ١٠ دقائق ، واطرد مركزياً . انقل ١٠ مل رائقاً للتقدير .

اللبن :

أضف ثاني كرومات صوديوم كمادة حافظة (٦٤ مجم / لتر) ، وخزن العينات في ثلاجة لحين التحليل ، أو تحلل العينات طازجة في الحال ، فيخفف ١٠ مل لبناً بمقدار ٢٠ مل ماء مقطراً ورسب البروتين بإضافة ١٠ مل تنجستات صوديوم ١٠٪ + ١٠ مل حمض كبريتيك ٠,٦٦ عياري واخلط عقب كل إضافة . اترك ٢٠ دقيقة ، ثم اطرد مركزياً أو رشح . انقل ٣٥ مل رائقاً مع ٢ مل دليل فضة / نحاس ، واخلط ثم اترك ٢٠ دقيقة ، ثم رسب الزيادة من الفضة وكذلك النحاس بإضافة ٣٣ مجم هيدروكسيد كالسيوم ومثلها كربونات ماغنسيوم . استخدم ١٠ مل من الرائق للتقدير .

البول وسائل الكرش :

انقل ٢ مل بولاً ، أو ناتج ترشيح سائل كرش مع ٢ مل دليل فضة / نحاس ، ثم خفف إلى ٢٠ مل بالماء المقطر ، واخلط واترك ٢٠ دقيقة أضف ٣٣ مجم هيدروكسيد كالسيوم ، ومثلها من كربونات ماغنسيوم ، واخلط عدة مرات خلال ١٠ دقائق ، ثم اطرد مركزياً . انقل ١٠ مل رائقاً للتقدير .

وللتقدير في هذه العينات : ينقل حجم معلوم من الرائق للعينة إلى قمع فصل ، وتخفف إلى ٢٠ مل بالماء المقطر ، وأضف ١ مل دليل زيلينول (٢ جم من ٣-٤ زيلينول ٣-٤- دي إيثيل فينول تذاب في ١٠٠ مل أسيتون) ، واخلط ثم أضف ٦٠ مل(٣+١) حمض كبريتيك (٣٠٠ مل حمض مركز تضاف إلى ١٠٠ مل ماء مقطراً وبرد قبل الاستخدام) ، واخلط واترك ٢٠ دقيقة . خفف بمقدار ٢٠ مل ماء مقطراً ، واخلط واترك ليبرد . أضف ٢٥ مل رابع كلوريد كربون ، ورج بشدة ٣٠ ثانية ، واترك لفصل الطبقات. انقل طبقة رابع كلوريد الكربون إلى كأس ، واسكب الطبقة المائية ، اغسل قمع الفصل بماء مقطر واسكبه ، واسمح للقمع بالجفاف بالتصفية . انقل إلى القمع ١٠-٥٠ مل (حسب محتوى النترات) صودا كاوية ٠,٤ ٪ ، وأضف إليها مستخلص رابع كلوريد الكربون ، ورج بشدة ٣٠ ثانية . أهمل طبقة رابع كلوريد الكربون ، ورشح مستخلص هيدروكيسد الصوديوم أصفر اللون ، وقدر كثافته الضوئية على ٤٢٠ نانومتر ضد ماء ، مع تقدير الكثافة الضوئية لمحلول نترات قياسي (٠,٠٤٠٨ جم نترات بوتاسيوم / لتر ماء + ١ مل كلورفورم كمادة حافظة ، يحتوي هذا المحلول على ٢٥ ميكروجرام نترات / مل) .

ط ـ الكرياتينين Creatinine :

يقدر الكرياتينين بعد ترسيب البروتين في العينات (سيرم أو بلازما من دم مضافاً إليه الهيبارين) . ولترسيب البروتين يوضع ١ مل سيرم (أو بلازما) في أنبوبة طرد مركزي + ١,٥ مل ماء مقطراً + ٠,٥ مل محلول تنجستات صوديوم ١٠ ٪ + ١ مل حمض كبريتيك ٠,٦٦ عياري واخلط واطرد مركزياً .

وللتقدير : يؤخذ في أنابيب اختبار ١,٥ مل رائقاً من العينة التي تم ترسيب بروتينها (أو من المحلول القياسي ١٠ مجم / لتر ، أو من الماء المقطر للعينة الخالية) + ٠,٥ مل محلول هيدروكسيد صوديوم ٠,٧٥ عياري + ٠,٥ مل محلول حمض بيكريك ٠,٠٤ عياري . اخلط وانتظر ٢٠ دقيقة بالضبط ، ثم قدر الكثافة الضوئية على ٥٢٠ نانومتر

$$\text{تركيز الكرياتينين مجم / لتر} = \frac{\text{قراءة الجهاز للعينة} \times ٤٠}{\text{قراءة الجهاز للمحلول القياسي}}$$

$$\text{ميكرومول / لتر} = \frac{\text{قراءة الجهاز للعينة} \times ٣٥٣,٦}{\text{قراءة الجهاز للمحلول القياسي}}$$

وفي البول يتم التقدير مباشرة دون ترسيب البروتين ، لكن تخفف العينة بنسبة ١ :١٠٠ ، ويؤخذ منها مباشرة ١,٥ مل + ٠,٥ مل صودا كاوية ٠,٧٥ عياري + ٠,٥ مل حمض بيكريك ٠,٠٤ عياري ، وتخلط وتترك ٢٠ دقيقة ، ثم تقدر كثافتها الضوئية على ٥٢٠ نانومتر وبحسب التركيز بنفس الطريقة مع الأخذ في الاعتبار معامل التخفيف .

ولتقدير الكرياتينين في اللحوم ومنتجاتها تجنس عينة معلومة الوزن مع حجم معلوم من الماء البارد خالي الأمونيا ، ثم يرسب بروتين ناتج التجنيس بالغليان مع حمض ، ثم رشح وخفف إلى حجم معين ، واجر عليه كما هو عاليه ، ثم يحسب الكرياتين بضرب الكرياتينين فى ١,١٦ .

ي ـ النيتروچين الكلى للبول :

يقدر نيتروچين البول الكلي بالجرام / ٢٤ ساعة ، بعد تقديره في عينة (٠,٥ – ٥ مل حسب الطريقة) بأي من طرق الميكروكلداهل ، أو الماكروكداهل ، وقد يتم التقدير بمحلول نسلر (ضوئياً) أو بالمعايرة . وينقسم النيتروچين الكلي في البول إلى نيتروچين يوريا (حوالي ٨٥٪) ، ونيتروچين أمونيا (حوالي ٣٪) ، وكرياتينين (حوالي ٧٪) ، وفي حيوانات أخرى (كالطيور) يكون حمض اليوريك الجزء الأعظم من أزوت البول .

وقد ينخفض أزوت البول في حالة انخفاض بروتين العليقة ، كما يرتفع تركيز أزوت البول في حالة غنى العليقة بالبروتين . وفي الحالات الطبيعية يكون إخراج الأزوت الكلي في البول والروث (في الحيوانات البالغة) مساوياً للنيتروچين المأكول وهذا ما يطلق عليه بالاتزان الأزوتي (ميزان محايد) . وأزوت البول مفترض خلوه من البروتين ، فإذا وجد البروتين في البول دل على أمراض الكلى والجهاز البولي والقلب .

ك ـ يوريا البول :

تقدر بنفس طريقة تقديره في الدم ، سواء بالمونوكسيم ، أو باليورياز ، أو بطريقة الانتشار.

ويزيد تركيز اليوريا في البول في حالات الاضطرابات المرتبطة بزيادة هدم الأنسجة وفي الحميات ، بينما تقل اليوريا في البول في حالات اضطرابات الكلى والكبد ، نتيجة خفض تكوينها وضآلة القدرة على إخراجها .

وتقدير اليوريا في البول ينبغي أن يصاحبه تقدير لليوريا في الدم ، لما له من قيمة كدليل في وظيفة الكلية (في اختبار تنقية اليوريا) .

وتتراوح قيمة أزوت اليوريا ما بين ٨٠–٩٠٪ من الأزوت الكلي في البول ، حسب مستوى بروتين العليقة ، فزيادة بروتين العليقة يرفع تركيز يوريا البول إلى حوالي ٩٠٪ ، بينما النقص الشديد في بروتين العليقة مع ارتفاع طاقتها الحرارية يؤدي إلى خفض أزوت

يوريا البول إلى حوالي ٦٠٪ من الأزوت الكلي في البول .

ل ـ أمونيا البول :

تقدر بنفس طرق تقديرها في الدم ، والأمونيا التي تخرج في البول هي الأيون الحر NH_4^+، والذي يتكون في الطلائية نتيجة نزع مجاميع الأمين من الأحماض الأمينية ، وانتشار الأمونيا حرة في البول ، حيث تتحد مع أيون الهيدروچين مكونة الأيون الحر ، الذي لا يمكنه الانتشار عكسياً للجسم. ويتحكم مستوى أمونيا الدم في معدل تكوين الأمونيا NH_3، والتي هي الأخرى يتحكم فيها تركيز أيون الهيدروچين ، وعليه فيتأثر إخراج الأمونيا في حالة القلوية ، أو في حالة التغذية على أعلاف تكون قواعد ، بينما يزيد إخراج الأمونيا في حالة الحموضة (فيما عدا الحموضة الكلوية الناتجة من هدم الأنابيب الكلوية) واستهلاك أعلاف تكون الأحماض .

م ـ حمض اليوريك فى البول :

يقدر بطرق تقديره في الدم ، ويزيد إخراجه في البول نتيجة تناول أعلاف غنية بالبيورينات ، أو ما يطلق عليها بحمض اليوريك الخارجي (أعلاف بروتينية) ، أو يزيد إخراجه لهدم أنسجة الجسم وما يحتويها من مواد نووية (حمض يوريك داخلي) . وتركيز حمض اليوريك في البول ذو أهمية في تكوين حصوات حمض اليوريك ، والتي تذيبها الكربونات القلوية ، وكذا السترات ، التي ترفع قيمة PH البول ، فتقلل القدرة على تكوين هذه الحصوات .

خذ ١٥٠ مل بولاً في كأس ، وأضف إليها مع التقليب ٣٠ مل محلول ٠,٦ ٪ كلوريد حديديك ، رشح وانقل ١٢٠ مل راشحاً إلى كأس جاف يحتوي ٢٥ جم كلوريد أمونيوم. بعد تمام الذوبان يضاف ٥ مل أمونيا مركزة . قلب ١٠ دقائق ، وتترك تستقر ١٠ دقائق أخرى لتكوين يورات أمونيوم ، فترشح ويغسل الراسب مرتين بمحلول كبريتات أمونيوم ١٠ ٪ (قلوية بالأمونيا) . ينقل الراسب الجاف تماماً بماء ساخن إلى دورق معياري ، ويكمل بالماء إلى ١٠٠ مل . يضاف ٢٠ مل حمض كبريتيك ٤٥ ٪ عندما يكون المحلول على حوالي ٦٥م ، ويعاير المحلول ببرمنجنات البوتاسيوم ٠,٠٥ عياري حتى نقطة الانتهاء البنفسجية الفاتحة التي يستمر لونها ١–٢ ثانية .

١ مل برمنجنات بوتاسيوم ٠,٠٥ عياري تعادل ٣,٧ مجم حمض يوريك ، فإذا كان حجم البرمنجنات المستخدمة في المعايرة = ح ، فإن تركيز حمض اليوريك مجم / ١٠٠ مل بول = ح × ٣,٧ .

ن ـ كرياتينين البول :

يقدر بنفس طرق تقديره في الدم ، ويختلف تركيزه في البول بتأثير العليقة لحد بسيط

فقط ، وفي حالة احتواء العلائق على كميات معنوية من الكرياتينين (ارتفاع محتوى العليقة من اللحوم) ، وهو مخلف غير قابل لاستفادة الجسم منه ، وهو لا يتأثر بمستوى ميتابوليزم النيتروجين ؛ لذلك فهو ثابت تقريباً ، ويعكس ثبات العمليات الميتابوليزمية في الجسم ، والتي يدخل فيها كرياتين الجسم (والذي يكون غالباً الكرياتينين) . وإخراج الكرياتينين يرتبط بوزن الجسم (لأنه يخلق من كرياتين العضلات) لاحتوائها على الفوسفوكرياتين ، ويزيد إخراجه بكثرة العمل العضلي ، نتيجة تحرره من مخزون العضلات؛ لذلك يعبر عن إخراج الكرياتينين بالملليجرام / كجم وزن جسم / يوم أكثر من التعبير عن تركيزه في بول ٢٤ ساعة بالمليجرام . ويختلف إخراج الكرياتينين بالعمر ، إذ يزيد بزيادة العمر ، كما يزيد بضعف العضلات ، ويزيد جداً بضمور العضلات ، ويرتفع إخراجه كذلك في الحميات . ويعبر عن تركيزي الكرياتينين والكرياتين معاً بالمليجرام نيتروجين خارج في البول / كجم وزن جسم ويعبر عنه بمعامل الكرياتينين . هذا ويزيد إخراج الكرياتين في حالات الحمل ، والصيام ، وكثرة شرب الماء ، وسوء التغذية ؛ وليس لإخراج الكرياتين علاقة بكرياتين العليقة ؛ لأنه يمتص تماماً .

س ـ اختبارات الترويق :

وقد يجري اختبار من اختبارات التنقية، والتي يقدر فيها تركيز مادة ما (كاليوريا ، أو الكرياتينين ، أو كلوريد الأمونيوم ، أو الأنيولين ، أو الثيوكبريتات ، أو بارا أمينوهيبورات أو غيرها) سواء الموجودة بالجسم أو تحقن في الوريد، ويقدر تركيزها في الدم وفي البول ، مع تقدير حجم البول الخارج في الدقيقة ، ويحسب الترويق أو التنقية Clearance من المعادلة :

$$\text{الترويق} = \frac{\text{مجم / ١٠٠ مل بول} \times \text{مل بول خارج / دقيقة}}{\text{مجم / ١٠٠ مل دم}}$$

وذلك للاستدلال على كفاءة عمل الكلى وأنابيبها ، ولما كان الجلوكوز يعاد امتصاصه كاملاً في الأنابيب الكلوية ، فإن ترويقه مساوي للصفر ، بينما المواد التي تخرج من الأنابيب الكلوية وترشحها الحويصلات الكلوية يكون ترويقها عال ، وهذه المواد غالباً تكون غريبة ، وتحقن في الدم مثل أحمر الفينول ، وديودراست Diodrast ، وبارا أمينوهيبورات (والمركبان الأخيران ترويقهما أعلى كثيراً عن أحمر الفينول) ، وأنيولين ، ومانيتول ، وثيوكبريتات الصوديوم؛ لأنها لا توجد طبيعياً في الجسم .

وأبسط التقديرات تتم باستخدام محلول معقم من ثيوكبريتات الصوديوم (١٠ ٪) ويحقن في الوريد ببطء واستمرار طول مدة الاختبار ، ويجمع الدم والبول لتقدير تركيز الثيوكبريتات كالتالي:

الدم :

يضاف ٢ مل بلازما إلى ١٤ مل ماء ، واخلط ثم أضف ٢ مل تنجستات صوديوم

٠,٣٣ عياري + ٢ مل حمض كبريتيك ٠,٦٧ عياري . اترك دقائق قليلة ، ثم اطرد مركزياً أو رشح . اسحب ١٠ مل راشحاً ، وأضف إليها ١٠ مل يودات بوتاسيوم ٠,٠١ عياري (٠,٣٥٦٧ جم / لتر ماء) + ٢ مل حمض هيدروكلوريك ٢ عياري . اترك ٥ دقائق ، ثم أضف ٢ مل يوديد بوتاسيوم (١٠ ٪ طازج) ، وعاير اليود المتحرر في الحال بواسطة محلول ثيوسلفات صوديوم ٠,٠١ عياري (محضر طازج من محلول ٠,١ عياري) في وجود دليل نشا (١ ٪) . اجر معايرة قياسية على ماء بدلاً من الراشح . احسب تركيز الثيوكبريتات مجم / ١٠٠ مل بلازما =

(حجم الثيوكبريتات في المعايرة القياسية–حجم الثيوكبريتات في معايرة العينة) × ١,٥٨×١٠×١٠٠×١٠

حجم الثيوكبريتات في المعايرة القياسية × ١٠ × ٨

البول :

خذ ٥ مل بول ، وأضف إليها نقط دليل فينولفثالين ونقط صودا كاوية عيارية حتى يصير قلوي . أضف ٢٥ مل يودات ٠,٠١ عياري + ٢ مل يوديد + ٢ مل حمض هيدروكلوريك ، وعاير بالثيوكبريتات ٠,٠١ عياري . عاير ٢٥ مل يودات ٠,٠١ عياري كمحلول قياسي ، واحسب تركيز الثيوكبريتات مجم / ١٠٠ مل بول =

(حجم الثيوكبريتات في معايرة المحلول القياسي–حجم الثيوكبريتات في معايرة العينة)× ١,٥٨×٢٥×١٠٠

حجم الثيوكبريتات في معايرة المحلول القياسي × ٥

اختبار التخفيف :

من أبسط الاختبارات التي تجرى للكشف عن أمراض الكلى ، أو وظيفة الكلى هو اختبار التخفيف ، أي قدرة الكلى على إنتاج بول مركزاً أو إخراج بول مخففاً . فيبعد ماء الشرب من المساء ، ويستبعد البول الساعة السابعة صباحاً ، ثم يقدم ١٢٠٠ مل ماء للشرب لمدة نصف ساعة . يجمع البول كل ساعة ، أي الساعة ٨ ، ٩ ، ١٠ ، ١١ صباحاً ويقدر حجم كل جمعة ، وكثافتها النوعية . في حالة تلف وظائف الكلى يفشل الحيوان في إخراج بول مخففاً (ولا جمعة على الأقل تعطي كثافة منخفضة تصل إلى ١,٠٠٣ أو أقل) ، كما يخرج حجم قليل من البول قد لايصل إلى ٨ ٪ (مما استهلكه في الشرب) ، وكثافته عالية قد تصل إلى ١,٠١٠ أو أعلى .

ع ــ أزوت الزرق :

نظراً لخروج حمض اليوريك (البول) مع زرق الدواجن فإنه لتقدير أزوت الزرق لحساب معامل هضم البروتين ينبغي أولاً التخلص من أزوت البول ، وذلك على النحو التالي :

١ ـ يؤخذ ٢ جم مخلفات دواجن جافة ، ويضاف إليها ٧٠ مل ماء مقطراً في كأس ٣٠٠ مل + ٢٠ مل بورات صوديوم (أذب ٥٠ جم حمض بوريك + ١٠٠ جم هيدروكسيد صوديوم في ٣٥٠ مل ماء مقطراً) + ٦ مل برمنجنات بوتاسيوم (أذب ٣١,٦ جم برمنجنات بوتاسيوم في ٩٧ مل ماء) .

٢ ـ ضع الكأس على حمام مائي (٥٠°م) ، وقلب لمدة ساعة بساق زجاجية .

٣ ـ اترك الكأس ساعة يستقر على درجة حرارة الغرفة .

٤ ـ أضف ٣٠ مل محلول حامض ثلاثي كلوروخليك (١٠٪) ، وقلب بساق زجاجية.

٥ ـ اترك الكأس ساعة أخرى على درجة حرارة الغرفة ، ثم رشح على ورق ترشيح خالي الرماد ، واغسل ٤ مرات كل مرة ٢٥-٣٠ مل محلول حامض ثلاثي كلوروخليك (٢٠٪) مع الضغط على ورق الترشيح بالساق الزجاجية لتخليص الراسب من المحلول .

٦ ـ ورقة الترشيح المحتويه على العينة يتم تجفيفها في فرن (٩٠°م) ، ثم تهضم الورقة بمحتوياتها باتباع طريقة كلداهل لتقدير النيتروجين (أي نيتروجين الزرق بعد التخلص من أزوت البول) .

وهناك طريقة أخرى لفصل حمض اليوريك (بأكسدته) من زرق الدواجن لتقدير بروتين الزرق وهذه الطريقة تعتمد على أكسدة الحمض إلى allantoin ببرمنجنات البوتاسيوم، ثم ترسيب البروتين بخلات اليورانيل . البروتين المرسب يعكس البروتين الخام غير المهضوم في الزرق . ويجرى التقدير بأخذ ١ جم زرق مطحون جاف يوزن في كأس ٢٥٠ مل ، ويبلل بقليل من الميثانول لتشتيت الحامض acid dispersion . يضاف ٥٠ مل ماء مقطراً ، ثم ٤٠ مل محلولاً منظماً PH_8 (٦١ جم حمض يوريك + ٤ جم هيدروكسيد صوديوم / لتر) ، وكم كاف من محلول برمنجنات البوتاسيوم ١,٠ عياري ليعطي ٢ مل لكل ١٠ مجم أزوتاً كلياً في العينة . يوضع الكأس في حمام مائي على ٥٠ ± ٠,٥°م ، ويقلب ميكانيكياً ٣٥ دقيقة، وبعد ذلك مباشرة يضاف ٢٥ مل محلول خلال يورانيل (٦٨ جم / لتر) ، وتغلى العينة وتترك ليلة لتبرد وتترسب .

ثاني يوم ترشح العينة ، ويغسل المتبقي بمقدار ٢٥٠ مل خلال يورانيل (١٪) على حرارة الغرفة . وتنقل ورقة الترشيح بالمتبقي عليها إلى دورق كلداهل للهضم بحمض الكبريتيك باستخدام عامل مساعد من كبريتات البوتاسيوم والنحاس . ويضرب المحتوى الأزوتي في ٦,٢٥ ليعطي بروتين الزرق الخام غير المهضوم .

ف ـ حمض اليوريك (لونيا) :

يتم تقديره في زرق الطيور ، والعلائق المحتوية على زرق الطيور على النحو التالي :

١ ـ تؤخذ عينة علف بالضبط (٤ – ٥ جم) ، ويستخلص منها الدهن بالإيثير البترولي (نقطة غليانه ٤٠–٦٠°م) ثم تنقل العينة منزوعة الدهن كمياً إلى دورق مستدير القاعدة سعة ١٥٠ مل ، ثم يزال المذيب بواسطة الهواء .

٢ ـ تؤخذ عينة العلف منزوعة الدهن (أو ٠,٤ جم زرق طيور جاف مباشرة دون نزع الدهن) ويضاف عليها ٦٠ مل محلول فورمالدهيد إيثانولي (يؤخذ حجم من محلول الفورمالدهيد يحتوى ١٧,٥ جم فورمالدهيد مع ٢٥٠ مل ماء + ٥٠٠ مل إيثانول ، ويضبط تركيز أيون الهيدروچين في المحلول إلى PH ٧ بمحلول هيدروكسيد صوديوم ٠,١ عياري ، ثم يخفف إلى لتر بالماء ويخلط ويعاد اختبار PH ويجرى أولاً اختبار قوة محلول الفورمالدهيد ، بخلط ٣ مل من محلول الفورمالدهيد مع ٥٠ مل هيدروكسيد صوديوم عياري مع ٢٥ مل محلول فوق أكسيد الهيدروچين ٢٠٪ ، ويسخن حتى يقف الفوران ، فيبرد ويعاير بحامض هيدروكلوريك عياري في وجود دليل فينولفثالين ، مع إجراء معايرة مقارنة Blank بوضع ٣ مل ماء بدلاً من الفورمالدهيد حيث إن :

١ مل هيدروكسيد صوديوم ١ ع ≡ ٠,٠٣ جم فورمالدهيد ،

قوة محلول الفورمالدهيد ≡ (المقارنة – العينة) × $\frac{٠,٠٣ \times ١٠٠}{٣}$ جم / ١٠٠ مل

أي ≡ الفرق بين حجمي الحامض المستخدمين في معايرة المقارنة والعينة .

٣ ـ ضع مكثفاً عاكساً على الدورق وسخن على حمام بخار لمدة ساعة . برد ورشح على دورق معياري ١٠٠ مل مع غسيل الدورق الأول ٣ مرات × ١٠ مل من محلول فورمالدهيد ميثانولي ، وينقل الغسيل على بوتقة الترشيح إلى الدورق المعياري ، وأكمل إلى العلامة بالفورمالدهيد الإيثانولي واخلط .

٤ ـ انقل بواسطة ماصة ٢٠ مل من مستخلص العينة إلى أنبوبة طرد مركزي سعة ٥٠ مل ، وأضف إليها ١٠ مل دليل بنيديكت وهيتشكوك Benedict and Hitchcock (اخلط ٣٥ مل لاكتات فضة (أذب بالتسخين ٣ جم لاكتات فضة في ٥٠ مل ماء + ١ مل حمض لاكتيك ، وخفف إلى ١٠٠ مل بالماء ، ورشح واحفظ في آنية داكنة ولا تعرض لضوء شديد) مع ١٥ مل محلول ماغنسيوم أمونيومي (أذب ١٧,٥ جم كلوريد أمونيوم في ٥٠ مل ماء وأضف ٣٠ مل محلول أمونيا كثافة ٠,٨٨ جم / مل ، واخلط وخفف إلى ١٠٠ مل بالماء) ثم أضف ٥٠ مل محلول أمونيا كثافة ٠,٨٨ جم / مل ، واخلط جيداً مع تحضيره ، مباشرة قبل الاستخدام) .

٥ ـ اخلط جيداً ، واتركه في الظلام لمدة ساعة . اطرد مركزياً على ٢٠٠٠ لفة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقة ، ثم اسحب الطبقة الرائقة ، واجعلها تصفى لمدة ١٠ دقائق ، مع سحب أي سوائل متبقية دون اضطراب الراسب ، ثم أضف ٢٠ مل محلول ثيوكبريتات صوديوم (٢٥

جم ثيوسلفات صوديوم خماسي الماء / لتر) .

٦ ـ أذب الراسب بالتقليب بساق زجاجية ، وانقل بماصة ٥ مل من هذا المحلول إلى دورق مدرج سعة ٢٠٠ مل يحتوي ٤٠ مل محلول منظم سكسينات (أذب بالتسخين ٢٩,٥ جم حمض سكسينك في ٧٥٠ مل ماء + ٢٠ مل محلول هيدروكسيد صوديوم (٥٠ جم / ٥٠ مل ماء) . برد ثم أضف كمية محلول فورمالدهيد تحتوي ١٧,٥ جم فورمالدهيد، اخلط جيداً ، ثم اضبط PH إلى ٦ بمحلول هيدروكسيد الصوديوم (١٠٠ ٪)، خفف إلى لتر بالماء ، واخلط وأعد ضبط PH إلى ٦ إذا لزم) .

٧ ـ خفف إلى ٢٠٠ مل بالماء ، واخلط وقس الامتصاص على ٢٩٤ نانومتر ضد مقارنة (محضرة بخلط ٥ مل محلول ثيوكبريتات الصوديوم مع ٤٠ مل محلول منظم سكسينات ، وخفف إلى ٢٠٠ مل بالماء) . وقدر كمية حمض اليوريك الموجودة في العينة من منحنى قياسي .

٨ ـ تحضر أنابيب سعة ٥٠ مل ينقل إليها ٢، ٤، ٦، ٨، ١٠، ١٢ مل من محلول قياسي حمض اليوريك (٢٥٠ مجم حمض يوريك تنقل إلى دورق مستدير القاعدة سعة ١٥٠ مل ، ويثبت عليه مكثفاً عاكساً، وأضف ١٠٠ مل محلول فورمالدهيد إيثانولي واغلي تحت المكثف العاكس لمدة ٣٠ دقيقة مع الرج باستمرار . برد ثم انقل إلى دورق ٢٥٠ مل واغسل الدورق الأول بالفورمالدهيد الإيثانولي ، واجمع الغسيل مع محلول حمض اليوريك ، وخفف إلى ٢٥٠ مل بالفورمالدهيد الإيثانولي واخلط ، ١ مل يحتوي ١ مجم حمض يوريك) وأكمل إلى ٢٠ مل بالفورمالدهيد الإيثانولي . أضف إلى كل أنبوبة ١٠ مل محلول بنيدكيت وهيتشكوك واخلط جيداً ، واتركها ساعة في ظلام ، وأكمل كما في العينات بداية من خطوة رقم ٥ حتى خطوة رقم ٧ ، وارسم المنحنى القياسي للعلاقةبين التركيز والامتصاص .

٩ ـ محتوى أزوت حمض اليوريك كنسبة مئوية في العينة = مجم حمض يوريك في مستخلص العينة / (وزن العينة بالجرام × ٦) .

ص ـ كولاچين Collagen :

قد يستدعي الأمر تقدير الكولاچين في مستخلص عظام الحيوانات فيقدر بتقدير الحمض الأميني هيدروكسي برولين وضربه في ٧,٢٥ ، وبقسمة الكولاچين على ٥,٥٥ ينتج نيتروچين الكولاچين ، كما أن البروتين غير الكولاچيني عبارة عن أزوت البروتين غير الكولاچيني مضروباً في ٦,٢٥ ، والنيتروچين البروتيني غير الكولاچيني عبارة عن النيتروچين الكلي مطروحاً منه نيتروچين الكولاچين والنيتروچين غير البروتيني .

١٠ ـ دلائل جودة السمك المبرد والمثلج :

أ ـ ثلاثي ميثيل أمين :

تحتوي معظم الأسماك البحرية على أوكسيد ثلاثي ميثيل أمين للتنظيم الأسموزي ، وتختلف تركيزاته حسب النوع والقطيع والمنطقة والوقت من السنة .

وأثناء تبريد السمك البحري يختزل أوكسيد ثلاثي ميثيل الأمين بفعل بكتريا الجهاز الهضمي إلى مركب عطري (ذي رائحة) هو ثلاثي ميثيل أمين ، ويتناسب مستوى هذا المركب طردياً مع أعداد بكتريا Pseudomonads ؛ لذلك يؤخذ من هذا المركب دليل على التلف البكتيري في الأسماك .

وتعد طريقة حمض البكريك هي أكثر الطرق استخداماً في تقدير ثلاثي ميثيل الأمين ، رغم بعض التداخل الذي قد ينشأ من الأمينات وبخاصة ثاني ميثيل الأمين إذا كانت العينة متجمدة أو إذا كانت في مرحلة متقدمة من التلف ؛ لذا يستخدم معها محاليل بوتاسا كاوية أو كربونات بوتاسيوم لتحرير ثلاثي ميثيل الأمين ، أو يستخدم التحليل بأجهزة الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء (أو الضغط) .

وللتقدير بحمض البكريك تجرى الخطوات التالية :

١ ـ اخلط ٥٠ جم عينة مع ١٠٠ مل محلول ثلاثي كلورو الخليك ٧,٥ ٪ ، ثم اطرد مركزياً على ٤°م لمدة ١٥ دقيقة بسرعة ٤٠٠٠ لفة / دقيقة ، (ويمكن الترشيح بدلاً من الطرد المركزي) ويرشح الرائق على صوف زجاجي ، ويمكن تجميد (-٢٠°) المستخلص حتى التقدير .

٢ ـ انقل من المستخلص في أنبوبة ذات غطاء حجماً معلوماً ، وفي أنابيب أخرى حجوم متدرجة (١-٣ مل) من محلول قياسي ١٠ ميكروجرام أزوت ثلاثي ميثيل أمين / مل بإذابة ٠,٦٨٢ جم ثلاثي ميثيل أمين - حمض هيدروكلويك (مجفف ليلة في مجفف) في ١٠٠ مل ماء مقطراً ويخفف منه ١ مل إلى ١٠٠ مل ويحفظ في ثلاجة .

٣ ـ أضف ماء إلى كل الأنابيب حتى يصل الحجم الكلي إلى ٤ مل ، وللبلانك استخدم ٤ مل ماء مقطراً .

٤ ـ أضف ١ مل فورمالدهيد ١٠ ٪ (بتخفيف ٢٦,٨ مل فورمالين إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر) و ١٠ مل تولوين مجففاً خلال كبريتات صوديوم لامائية و ٣ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ٢٥ ٪ (٢٥ جم بوتاسا كاوية في ٧٥ مل ماء) . وتأكد من درجة الحرارة لتكون ٣٠°م .

٥ ـ اخلط ١٥ دقيقة على هزاز ، انقل ٧ مل من الطبقة العليا (تولوين) إلى أنبوبة تحتوي ٠,٣ - ٠,٤ كبريتات صوديوم لامائية وهزها برفق .

٦ ـ اسحب ٥ مل من حمض البكريك (٢ جم حمض بكريك مجففة ليلة في مجفف على حرارة الغرفة تذاب في تولوين خالي الرطوبة وتخفف إلى ١٠٠ مل بالتولوين الجاف ثم يخفف منها ١ مل إلى ١٠٠ مل بالتولوين الجاف) في أنبوبة جافة نظيفة (وألا يظهر لون أصفر دليل تلوث الأنبوبة) ، وعليها ٥ مل تولوين من خطوة رقم ٥ السابقة ، اخلط برفق ، وقدر الكثافة الضوئية على ٤١٠ نانومتر .

ب ـ القواعد الطيارة الكلية Total Volatile bases :

أثناء تبريد وتخزين السمك تنشط العمليات الميكروبيولوجية والتغييرات الكيماوية مؤدية إلى تدهور الخواص الحسية للسمك ، وعلى الأخص الهدم الإنزيمي (بكتيري وطبيعي أي ذاتي) للبروتينات وأوكسيد ثلاثي ميثيل الأمين في الأنواع البحرية مؤدياً إلى تكوين مركبات عطرية هي الأمونيا ، أحادي ميثيل أمين ، ثالث ميثيل أمين ، وأمينات طيارة أخرى .

وتقدير القواعد الطيارة الكلية يشمل قياس القواعد الطيارة منخفضة الوزن الجزيئي والمركبات الأمينية الناتجة من عملية نزع مجاميع الكربوكسيل من الأحماض الأمينية ميكروبيولوجيا ، وذلك للحكم على جودة الأسماك الطازجة ؛ إذ ترتبط هذه المكونات بالجودة الحسية للسمك Organoleptic quality ، فهناك ارتباط بين القواعد الطيارة الكلية وثلاثي ميثيل أمين الذي يزيد تركيزه بإطالة فترة حفظ السمك .

ويتلخص التقدير في تقطير المركبات الأمينية على حمض بوريك ، ومعايرته بحمض عياري ، وتحضر العينة في شكل مستخلص إيثانولي أو في حمض ثلاثي كلوروخليك أو حمض بيركلوريك . وأكثر الطرق استخداماً هي بأوكسيد الماغنسيوم أو كبريتات الماغنسيوم، مع الحرص على سرعة التقدير للعينة المحفوظة في ثلج في ظرف ساعتين وإلا تجمد (−٣٠م) فتظل صالحة حتى أسبوعين للتحليل .

ويجري التقدير باستخدام أوكسيدالماغنسيوم على النحو التالي :

١ ـ ضع ١٠ جم عينة + ٣٠٠ مل ماء مقطراً ، واخلط في خلاط ، ثم انقلها إلى دورق تقطير مع ٢ جم أوكسيد ماغنسيوم ، وصل للتقطير .

٢ ـ دورق مخروطي يحتوي ٢٥ مل من حمض البوريك ٢ ٪ ونقط من دليل أحمر الميثيل / بروموكريزول جرين ، لاستقبال ناتج التقطير .

٣ ـ يعمل على تسخين دورق التقطير ليغلي في ١٠ دقائق بالضبط ، وعلى نفس معدل التسخين يستقبل المتقطر في القابلة لمدة ٢٥ دقيقة .

٤ ـ عاير المتقطر المستقبل باستخدام حمض كبريتيك ٠,٠٥ عياري .

٥ ـ اجر عينة بلانك واحسب القواعد الطيارة الكلية بالملليجرام نيتروجين/ ١٠٠ جم عينة:

$$= \frac{\text{(حجم الحامض للعينة – حجم الحامض للبلانك) × العيارية × ١٤ × ١٠٠}}{\text{وزن العينة جم}}$$

وتتماثل طريقة كبريتات الماغنسيوم مع الطريقة المذكورة سابقاً ، غير أنه في طريقة الكبريتات يستخدم ٣٠ جم عينة ، ويستخدم في الخلط والاستخلال محلول كبريتات ماغنسيوم ٢٠٠ مل (٦٠٪ في محلول مائي محمض بحمض كبريتيك ٦ عياري ٢٠ مل للتر) ، ثم يجرى الترشيح وضبط الحموضة بحمض كبريتيك ١ عياري إلى PH ٢ (أو بصودا كاوية ١ عياري) ، ويتم تقطير ٢٥ مل من المستخلص بالطريقة السابقة ، مع المعايرة بحمض هيدروكلوريك ١ ,٠ عياري ويجرى الحساب كالتالي :

مجم أزوت قواعد طيارة كلية / ١٠٠ جم =

$$\frac{\text{(حجم الحامض للعينة – حجم الحامض للبلانك) × العيارية × ١٤ × ١٠٠ × عامل}}{\text{وزن العينة جم}}$$

جـ ـ هيبواكزانثين Hypoxanthine :

أحد النيوكليوتيدات المستخدمة في الحكم على جودة السمك وهو أكثر امتيازاً عن القياسات الكيماوية الأخرى كثلاثي ميثيل أمين ، ثنائي ميثيل أمين ، قواعد طيارة كلية وغيرها مما يشير للتلف البكتيري في السمك ؛ إذ إن تراكم الهيبواكزانثين في الأنسجة يعكس أول أطوار الهدم الذاتي Autolytic deterioration وآخر أطوار التلف البكتيري ، علاوة على أن الهيبواكزانثين لا يتأثر في تقديره بالحرارة أو الإشعاع ، وهو يناسب كذلك الأسماك في المياه العذبة منخفضة أو منعدمة المحتوى من أوكسيد ثلاثي ميثيل أمين ما يجعل تقدير ثلاثي ميثيل أمين عديم الأهمية في هذا الحال .

ويشجع نقص الأدينوزين ثلاثي الفوسفات على بدء التيبس الرمي وما يصاحبها من تغييرات كيماوية حيوية كالتالي :

أدينوزين ثلاثي الفوسفات ← أدينوزين ثنائي الفوسفات

إينوسين أحادي الفوسفات ← أدينوزين أحادي الفوسفات

إينوسين ← هيبواكزانثين ← إكزانثين ← حمض يوريك.

فبتقدير هيبواكزانثين نقف على معدل التدهور الحادث في عضلات السمك ، وعادة يجرى التقدير بإنزيم إكزانثين أوكسيداز Xanthine oxidase الذي يحول هيبواكزانثين إلى اكزانثين ثم إلى حمض يوريك . وتطورت طرق التقدير باستخدام صبغة دليل redox ، أو شرائط ورق ، أو بالتحليل الإنزيمي الضوئي . وتقديره كروماتوجرافيا أكثر دقة من تقديره إنزيمياً . وتختلف قيم الهيبواكزانثين باختلاف أجناس السمك ، وطرق تحضير العينات ، وبالاختلافات في العوامل البيئية .

وللتقدير الإنزيمي تجرى الخطوات التالية :

١ ـ اخلط ٥٠ جم عينة سمك مجنسة لمدة ٢ دقيقة مع ٢٠٠ مل حمض بيركلوريك ٦٪ ، اترك المخلوط يستقر عدة دقائق ، رشح المستخلص ، واجمع من الراشح ٥٠ مل وعادلهم وجمدهم (−٣٠°م) لحين التحليل .

٢ ـ قبل التحليل لابد من معادلة المستخلص بقدر مساو من محلول منظم فوسفات / هيدروكسيد بوتاسيوم (٢٧,٢٢ جم بوتاسيوم هيدروچين أورثوفوسفات مع ماء + ١٧١ مل هيدروكسيد صوديوم ١ مولر واضبط PH إلى ٧,٦ بحمض الأورثوفوسفوريك أو الصودا الكاوية ثم أضف ٥٥٧ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ١ مولر وأكمل بالماء إلى ١ لتر) إلى PH ٧-٧,٦ مع العلم أن الأمينات يمكن فقدها في الوسط القلوي . والمستخلص المتعادل غير ثابت لفترة طويلة بالتبريد ؛ لذا يحفظ بالتجميد (−٣٠°م) .

٣ ـ ضع في أنبوبة (أ) ١ مل من المستخلص المتعادل + ٢ مل محلول منظم فوسفات (٠,٠٥ مولر PH ٧,٦ بإذابة ١٧,٠١ جم بوتاسيوم هيدروچين أورثوفوسفات في ماء ويضبط PH بالصودا الكاوية ١ مولر ويخفف بالماء إلى ٥٠٠ مل . التخفيف خمسة أضعاف يعطي تركيزاً ٠,٠٥ مولر) + ٢ مل ماء .

٤ ـ في أنبوبة أخرى (ب) ضع ١ مل مستخلصاً متعادلاً + ٢ مل محلولاً منظماً + ١,٥ مل ماء + ٠,٥ مل إنزيماً (يخفف ١٠ مجم/مل إكزانثين أوكسيداز تجاري بمحلول منظم فوسفات تركيز ٠,٠٥ مولر ، ويجرى التخفيف مباشرة قبل الاستخدام ، والإنزيم المخفف يحفظ بالتجميد فيصير صالحاً حتى ٦ شهور ، والتخفيف يجرى بنسبة ١ : ٥٠) .

٥ ـ حضن الأنابيب في حمام مائي ٣٠ دقيقة على ٣٧°م ، ثم قدر الكثافة الضوئية على ٢٩٠ نانومتر ، واحسب الزيادة في الامتصاص = امتصاص الأنبوبة (ب) + امتصاص البلانك (ماء ٣ مل + محلول منظم ٢ مل)− امتصاص بلانك آخر (٢,٥ مل ماء + ٢ مل محلول منظم + ٠,٥ مل إنزيم) − امتصاص الأنبوبة (أ) ثم احسب تركيز الإكزانثين بالمول / جم عينة بمعلومية كمية الهيبواكزانثين بالميكروجرام المستخرجة من المنحنى القياسي والمقابلة للزيادة في الامتصاص المحسوبة =

$$\frac{\text{ميكروجرام هيبواكزانثين من المنحنى القياسي} \times [\text{ مل حمض بيركلوريك للاستخلاص} +}{[\ (\text{٠,٠١} \times \text{٪ رطوبة في السمك} \times \text{وزن العينة جم})\ ]}$$

$$\frac{}{\text{مل مستخلص مضافاً للأنبوبة} \times \text{وزن العينة جم}}$$

$$\times \frac{\text{مل محلول منظم فوسفات/ بوتاسا كاوية للمعادلة + مل مستخلص تم معادلته بالمحلول المنظم/ بوتاسا}}{\text{مل مستخلص تم معادلته بالمحلول المنظم / بوتاسا}}$$

× ١ / وزن جزيئي جرامي للهيبواكزانثين (١٣٦,١)

٥ ـ ولعمل المنحنى القياسي تحضر الأنابيب التالية :

الأنبوبة	مل هيبواكزانثين قياسي	مل ماء مقطر	مل محلول منظم	مل إنزيم	ميكروجرام تركيز الهيبواكزانثين
١	٠,٢	٢,٣	٢,٠	٠,٥	١٠
٢	٠,٤	٢,١	٢,٠	٠,٥	٢٠
٣	٠,٦	١,٩	٢,٠	٠,٥	٣٠
٤	٠,٨	١,٧	٢,٠	٠,٥	٤٠
٥	١,٠	١,٥	٢,٠	٠,٥	٥٠
٦	٠,٢	٢,٨	٢,٠	—	—
٧	—	٢,٥	٢,٠	٠,٥	—
٨	—	٣,٠	٢,٠	—	—

وتحضن الأنابيب ٣٠ دقيقة في حمام مائي على ٣٧°م ثم يقاس الامتصاص على طول موجة ٢٩٠ نانومتر واحسب الزيادة في الامتصاص للمحاليل القياسية في الأنابيب ١–٥ بجمع امتصاص كل أنبوبة على حدة (من أنابيب ١–٥) على امتصاص أنبوبة ٦ ويطرح منهما امتصاص كل من أنبوبة ٧ و ٨ .

وتوقع الزيادة في الامتصاص في الأنابيب ١–٥ على محور صادي ، بينما التركيزات المقابلة بالميكروجرام على المحور السيني ويمد الخط الممثل للعلاقة بين الزيادة في الامتصاص والتركيز ، ومن هذا المنحنى ستستخرج تركيزات العينات بالميكروجرام لاستخدامها في حساب تركيزات العينات بالمول / جم كما سبق ذكره . علماً بأن المحلول القياسي تركيز ٥ مجم / ١٠٠ مل يحضر بإذابة ٥ مجم هيبواكزانثين في ١٠٠ مل ماء ويقلب ليلة لتمام الذوبان .

ولا تختلف طريقة الكروماتوجرافي إلا في الجهاز المستخدم للفصل والتقدير ؛ إذ يحقن الجهاز (كروماتوجرافي سائل عالي الأداء) بالمحاليل القياسية التي يتم تطويرها وفصلها على العمود (RP-8 Reverse Phase) بواسطة محلول منظم بوتاسيوم فوسفات PH ٤,٥ ، ويقدر على كاشف الجهاز على طول موجة ٢٥٤ نانومتر ، ومنها يرسم المنحنى القياسي.

obeikandi.com

وتستخلص العينات كما سبق في الطريقة السابقة ، وتقدر كما في المحلول القياسي ، وتستخلص تركيزات العينات بالميكرو مول / جم =

١٤,٧١ (ثابت للتخفيف عند المعادلة ١ : ١) × ارتفاع المنحنى للعينة (م) × حجم البيركلوريك المستخدم في الاستخلاص × عامل التخفيف للمستخلص المتعادل / ميل المنحنى القياسي (م / ميكروجرام) × الحجم المحقون في الجهاز (مكيرولتر) × وزن العينة (جم) .

د ـ تقدير واحد لثلاثي ميثيل أمين / ثنائي ميثيل أمين :

يمثل أكسيد ثلاثي ميثيل أمين في عديد من الأنواع البحرية مركباً ذا وظائف فسيولوجية تشبه وظائف اليوريا وحمض اليوريك في الحيوانات الأرضية ، أي يخرج من الحيوان لحفظ ميزان الأزوت ، إلا أن هذا المركب نادراً ما يوجد بل قد يغيب من الأسماك للمياه العذبة ، فهو بأعلى تركيزاته في كلاب البحر والقروش ، ومتوسط التركيز في الأسماك العظمية ، ومنخفض جداً في الرخويات . ومن الأسماك العظمية ، ما يحتوي أعلى التركيزات (أسماك القد ، pollock ، haddock ، whiting ، hake ، Cusk) بينما الأسماك المفلطحة (موسى) فتركيز أكسيد ثلاثي ميثيل الأمين بها هي الأقل ، وأسماك المياه العذبة قيمها مهملة لشدة انخفاضها .

وينهدم هذا المركب تلقائياً بواسطة إنزيم ثلاثي ميثيل أمين أكسيداز الموجود طبيعياً إلى ثاني ميثيل أمين وفورمالدهيد . ووجود الفورمالدهيد يخفض قابلية البروتين للاستخلاص ، ويضر بقوام السمك وخواصه الطبيعية (الحسية) . ولما كان الفورمالدهيد صعب الاستخلاص كمياً ، فإن قيمة ثاني ميثيل الأمين يعتبر دليلاً على جودة السمك المجمد من الأنواع مرتفعة النشاط الإنزيمي (ثلاثي ميثيل أمين أكسيداز) .

وتحت ظروف التثليج تعمل إنزيمات البكتريا على هدم أكسيد ثلاثي ميثيل أمين إلى مركب برائحة الأمونيا (ثالث ميثيل أمين) والذي يعبر مستواه عن جودة السمك وصلاحيته للاستهلاك .

وفي تقدير ثالث ميثيل أمين بطريقة البيكرات يحدث فيها تداخل من ثاني ميثيل أمين ، إلا أن ذلك غير مهم ، لأن ثالث ميثيل أمين يقدر للسمك المبرد وليس للسمك المجمد ، إلا أنه في الحقيقة قد يحتوي السمك المجمد كذلك كلٌ من ثالث وثاني ميثيل أمين ؛ لذلك يؤدي استخدام هيدوركسيد البوتاسيوم ٢٥ ٪ بدلاً من كربونات البوتاسيوم إلى إزالة معظم تداخل ثاني ميثيل أمين .

وقد استخدمت معاملات إذابة ثالث وثاني ميثيل أمين في الكربونات وهيدوركسيد البوتاسيوم في طريقة البيكرات كأساس لتقدير واحد لكل من ثالث وثاني ميثيل أمين في

السمك المخزن لفترة طويلة بالتبريد ثم بالتجميد خاصة على درجة حرارة تشجع على تكوين ثاني ميثيل أمين (عادة أعلى من -٣٠م) . فتتفاعل الأمينات مع حمض البيكريك منتجاً لوناً أصفر من البيكرات التي تستخلص بالتولوين ، ومع كربونات البوتاسيوم يتطلب ثاني ميثيل أمين قدر ٥ أضعاف المطلوب من ثالث ميثيل أمين لإحداث التفاعل اللوني مع حمض البيكريك ، ومع البوتاسا الكاوية يتطلب قدراً أكبر . وللتقدير تجرى الخطوات التالية :

١ ـ يحضر مستخلص العينة بخلط ٥٠ جم عينة مع ١٠٠مل حمض ثالث كلورو خليك ٧,٥ ٪ ، ثم تطرد مركزياً على ٤م لمدة ١٥ دقيقة بسرعة ٤٠٠٠ لفة / دقيقة (أو ترشح) ويرشح الرائق على صوف زجاجي ويحفظ بالتجميد (-٢٠م) لحين التحليل.

٢ ـ أول تحليل بطريقة البوتاسا الكاوية ، بسحب ٠,١ - ٤ مل مستخلصاً في أنبوبة بغطاء . عد محاليل قياسية منفصلة لكل من ثالث وثاني ميثيل أمين بسحب صفر ، ٠,٥ ، ١,٠ ، ١,٥ ، ٢,٠ ، ٢,٥ مل من المحاليل القياسية (ثالث أو ثاني ميثيل أمين ٠,٠١ مجم أزوت / مل في ماء) في أنابيب بأغطية لتعطي صفراً ، ٠,٠٠٥ ، ٠,٠١ ، ٠,٠١٥ ، ٠,٠٢٠ ، ٠,٠٢٥ مجم أزوتاً أمينياً . أضف ماء إلى كل الأنابيب حتى حجم ٤ مل ، مع عمل بلانك من ٤ مل ماء مقطراً . أضف ١ مل فورمالدهيد ١٠ ٪ ، ١٠ مل تولوين ، ٣ مل بوتاسا كاوية ٢٥ ٪ ، مع الحرص أن تكون الحرارة على ٣٠م .

غطِّ الأنابيب واخلطها على جهاز لفاف ١٥ دقيقة . اسحب ٧ مل من طبقة التولوين العليا إلى أنبوبة تحتوي ٠,٣ - ٠,٤ جم كبريتات صوديوم لامائية ، رج برفق حتى روقان المحلول .

اسحب ٥ مل من حمض البيكريك (٠,٢ مجم / مل في تولوين) في أنبوبة جافة نظيفة (وألا يظهر لون أصفر لتلوثها) . اسحب ٥ مل محلول تولوين من الخطوة السابقة (المجفف بالكبريتات) إلى الأنبوبة المحتوية على حمض البيكريك واخلط برفق ، قدر الكثافة الضوئية على ٤١٠ نانومتر .

٣ ـ ثاني تحليل بطريقة كربونات البوتاسيوم ، يجرى كما سبق في خطوة (٢) لكن بإحلال الكربونات ٥٠ ٪ محل البوتاسا الكاوية ٢٥ ٪ .

٤ ـ وقع تركيزات النيتروجين الأميني بالمليجرام للمحاليل القياسية على محور سيني ، وعلى المحور الصادي قيم الامتصاص على ٤١٠ نانومتر بطريقتي الاستخلاص (بوتاسا كاوية ، كربونات بوتاسيوم) .

٥ ـ احسب القيم التالية :

$$K_1 = \frac{R - S}{A/B - C/D} \quad (1)$$

و

$$K_2 = S - \frac{C \times K_1}{D} \quad (2)$$

حيث K_1 = مجم أزوت ثاني ميثيل أمين في الأنبوبة ، K_2 = مجم أزوت ثالث ميثيل أمين في الأنبوبة ، R = قيمة الأمين (مجم) من منحنى قياسي ثالث ميثيل أمين بطريقة الكربونات والمتحصل عليها عند امتصاص مساو للعينة بطريقة الكربونات ، S = قيمة الأمين (مجم) من منحنى ثالث ميثيل أمين القياسي بطريقة البوتاسا الكاوية والمقابلة لامتصاص العينة بطريقة البوتاسا الكاوية ، A = الامتصاص من منحنى ثاني ميثيل أمين القياسي بطريقة الكربونات عند ٠,٠١ مجم نيتروچين أميني ، B = الامتصاص من المنحنى القياسي لثالث ميثيل أمين بطريقة الكربونات عند ٠,٠١ مجم نيتروچين أميني ، C = الامتصاص من المنحنى القياسي لثاني ميثيل أمين بطريقة البوتاسا الكاوية عند ٠,٠١ مجم نيتروچين أميني ، D = الامتصاص من المنحنى القياسي لثالث ميثيل أمين بطريقة البوتاسا الكاوية عند ٠,٠١ مجم نيتروچين أميني .

٦ ـ احسب التركيز النهائي لكلا الأمينين مجم / ١٠٠ جم سمك :

$$DMA - N = \frac{K_1 \times [\, V_1 + (0.01 \times M \times W)\,]}{V_2 \times W} \times 100$$

$$TMA - N = \frac{K_2 \times [\, V_1 + (0.01 \times M \times W)\,]}{V_2 \times W} \times 100$$

حيث إن K_1 = مجم أزوت ثاني ميثيل أمين المتحصل عليه من معادلة (1)

K_2 = مجم أزوت ثالث ميثيل أمين المتحصل عليه من معادلة (2)

M = محتوى الرطوبة (٪) في عينة السمك

V_1 = حجم ثالث كلورو الخليك (مل) المستخدم للاستخلاص

V_2 = حجم (مل) المستخلص الموضوع في الأنبوبة للتقدير

W = وزن العينة المستخلصة من الأول (جم) .

١١ ـ دلائل جودة السمك غير المرتبطة بالدهن :

أ ـ أزوت البروتين القابل للاستخلاص :

تعتبر ذائبية البروتين في المحاليل الملحية مقياساً في تصنيف البروتين والحكم على التغييرات البروتينية الراجعة للدنترة أثناء التخزين بالتجميد والتي تؤثر على قوام السمك بعد الطبخ ، فانخفاض البروتين المستخلص بالملح أثناء التخزين بالتجميد يعكس زيادة صلابة السمك بعد الطبخ ، وهذا راجع للفورمالدهيد الناتج من التغييرات الإنزيمية (أثناء التخزين

بالتجميد) في أكسيد ثلاثي ميثيل أمين .

ويمكن إذابة البروتين الخلوي في محلول ٥ ٪ كلوريد صوديوم منظماً بمحلول ٠,٠٠٣ مولربيكربونات صوديوم على ٥م ، ثم يقدر البروتين في المستخلص بطريقة البيوريت؛ لذلك تقطع العينة (٢٢جم) بدون إذابة (وهي مجمدة) بسكين حاد إلى مكعبات صغيرة وتضرب في خلاط مع ٤٣٠ مل محلول استخلاص (٠,٢٥٢ جم بيكربونات صوديوم + ٥٠ جم كلوريد صوديوم في لتر ماء في ثلاجة ثم في فريزر حتى تظهر بلورات الثلج ويستخدم في هذه الصورة) مع حفظ وعاء الخلاط في ثلج ليبرد قبل بداية التحليل ، اخلط دقيقتين ونصف . وانقل للطرد المركزي ٣٠ دقيقة بسرعة ١٣ ألف لفة / دقيقة . قدر البروتين في الحال أو تخزن في ثلاجة لمدة يوم أو بالتجميد (-٣٠م) حتى التحليل . وعبر عن البروتين المستخلص بالملح Salt Extractable Protein كنسبة مئوية للبروتين أو جم بروتين مستخلص / ١٠٠ جم عينة عضلات سمك .

ب ـ ثاني ميثيل أمين :

يوجد هذا المركب في نفس الوقت مع الفورمالدهيد تحت ظروف التخزين بالتجميد (بأقصى تكوين على حوالي - ١٠م) في الأسماك وذلك يرتبط بنقص أكسيد ثالث ميثيل أمين (الذي يتحلل إنزيمياً إلى ثاني ميثيل أمين وفورمالدهيد) . ويقدر ثاني ميثيل أمين (مع ثالث ميثيل أمين) باختبار حمض البيكريك واستخدام البوتاسا الكاوية وكربونات البوتاسيوم ، كما يقدر كذلك باستخدام أجهزة الكروماتوجرافي الغازي والسائل عالي الأداء (مع ثالث ميثيل الأمين والأمونيا معاً) . ويعد اختبار ثاني ميثيل أمين دليلاً غير مباشر لجودة قوام السمك ، إذ يتكون ثاني ميثيل أمين والفورمالدهيد بكميات متساوية مولاريا . وللتقدير يجرى التالي :

١ ـ استخلص ٥٠ جم عينة في ١٠ مل حمض ثلاثي كلورو خليك ٧,٥ ٪ في خلاط، اطرد مركزياً على ٤م ١٥ دقيقة بسرعة ٤٠٠٠ لفة / دقيقة (أو رشح) ، اسحب الرائق للتحليل (أو التجميد على -٢٠م لحين التحليل) .

٢ ـ اسحب ١ - ٤ مل مستخلصاً في أنبوبة بغطاء وأكمل بالماء المقطر حتى ١٠ مل (بلانك ١٠ مل ماء مقطراً) + ١ مل دليلاً أمونيا / نحاس (٢٠ جم خلات أمونيوم + ٠,٢ جم كبريتات نحاس في ٣٠ مل ماء ، ١٠ جم صودا كاوية في ٢٥ مل ماء ، أضف الخلات إلى الصودا ، أضف ٢٠ مل نشادر مركزاً ، أكمل إلى ١٠٠ مل بالماء) اخلط ، ثم أضف ١٢ مل ثاني كبريتيد الكربون (٢٥ مل وتكمل بالبنزين إلى نصف لتر) ، وسخن في حمام مائي ٥ دقائق على ٣٧ - ٤٠م . أغلق الغطاء واخلط الأنابيب ٥ دقائق . أضف في الحال ١ مل حمض خليك ٣٠٪ (١٥٠ مل حمض خليك ثلجي مع ماء

مقطر حتى ٥٠٠ مل) واخلط دقيقة (إذا بردت الأنابيب فتدفأ قبل وضع الحامض) . اسحب طبقة البنزين العليا إلى أنبوبة أخرى وجففها بإضافة كبريتات صوديوم لامائية ، اقرأ الامتصاص الضوئي على ٤٤٠م .

٣ ـ اجر نفس الخطوات على محاليل قياسية من ثاني ميثيل أمين تحتوي ٢ ، ٤ ، ٦ ، ٨ ، ١٠ ، ١٤ ميكروجرام لعمل منحنى قياسي يستخلص منه أزوت ثاني ميثيل أمين العينات لحساب تركيزه بالمليجرام أزوت ثاني ميثيل أمين / ١٠٠ جم سمك =

كمية ثاني ميثيل أمين في الأنبوبة من المنحنى بالميكروجرام × حجم المستخلص الكلي (مل) × ١٠٠

حجم (مل) المستخلص المضاف للأنبوبة × وزن عينة السمك المستخلصة × ١٠٠٠ .

جـ ـ الفورمالدهيد :

ينتج الفورمالدهيد وثاني ميثيل أمين بكميات مولارية متساوية بحفظ الأسماك البحرية على حرارة أعلى من −٢٥م ، فيسبب الفورمالدهيد صلابة العضلات وانخفاض البروتين المستخلص بالمحلول الملحي وفقد عام للجودة الحسية للسمك البحري المخزن بالتجميد . ويزيد معدل تراكم الفورمالدهيد في السمك المفروم عنه في الشرائح المتماسكة ، وأعلى في العضلات الداكنة والأحشاء عن العضلات البيضاء .

والفورمالدهيد المقدر هو الصورة الحرة غير المرتبطة ؛ لذلك فالمكتشف لا يتعدى ٥٠٪ من الموجود ، إذ للفورمالدهيد القدرة على التداخل مع الأمينات والأحماض الأمينية والمجاميع النشطة في البروتين . وللتقدير تجرى الخطوات التالية :

١ ـ اخلط ١٠٠ جم عينة مجنسة مع ٢٠٠ مل بيركلوريك ٦٪ (أو حمض ثلاثي كلورو خليك) . رشح واجمع ٥٠ مل تحفظ بالتجميد (−٣٠م) لحين التحليل .

٢ ـ عادل المستخلص (٥٠ مل) بالتنقيط بالبوتاسا الكاوية ٣٠٪ إلى PH ٧ وسجل حجم البوتاس المستخدم .

٣ ـ اسحب ١ − ٥ مل مستخلصاً متعادلاً في أنبوبة وخففه إلى ٥ مل بالماء ،ثم أضف ٥ مل دليل ناش (٢ مل أسيتيل أسيتون مع ٧٥ − ٨٠ مل ماء ورج ، أذب ١٥٠ جم خلات أمونيوم في ٣٠٠ مل ماء ، أضف المحلولين معا وأكمل إلى ٥٠٠ مل ، ويحضر يومياً طازجاً ويحفظ في ثلاجة) اخلط ، وسخن ١٠ دقائق في حمام مائي على ٦٠م . برد ٥ دقائق بالماء ، اقرأ الامتصاص الضوئي على ٤١٥ نانومتر .

٤ ـ اعمل منحنىً قياسياً بمحاليل تحتوي على صفر ، ٠,٢ ، ٠,٤ ، ٠,٦ ، ٠,٨ ميكرو مول فورمالدهيد (محلول ١ مولر بإذابة ٨,١٢ جم وزن / وزن محلول فورمالدهيد ٣٧٪ في ماء وأكمل إلى ١٠٠ مل) بأخذ صفر ، ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ مل من المحلول

القياسي ويجرى عليه خطوة (٣) .

٥ ـ احسب تركيز الفورمالدهيد بالميكرومول / جم سمك =

$$\frac{\text{التركيز من المنحنى القياسي} \times ٢٠٠ \times (\text{حجم البوتاس} + ٥٠}{\text{حجم المستخلص في الأنبوبة} \times ١٠٠ \times ٥٠}$$

أو بالميكروجرام / جم سمك بضرب القيمة ميكرومول / جم × الوزن الجزيئي الجرامي للفورمالدهيد (٣٠) .

***

ولمزيد من الإيضاح يمكن الاستعانة بالمراجع الآتية :

– ديورانت د. ب. ج : كيمياء عضوية ـ جزء أول طبعة أولى ١٩٥٠ (ترجمة المجلس الأعلى للعلوم ١٩٦١) .

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

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

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

ـ محمد عبد المنعم كمال ، سعد إبراهيم الحناوى (١٩٦٩) : الكيمياء الحيوية العملية ـ المطبعة الفنية الحديثة ـ القاهرة .

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

- Close , W. & Menke, K. H. (1986) Selected topics in animal nutrilion . Deutschestiftung für Interenationale Entwicklung, Feldafing, Germany .

- Conway, E. J. & O'Malley , E. (1942) Biochem. J., 36:655 .

- De Baaij, J. A. et al. (1986) Sci. Tools. 33 : 17 .

- Doumas, B. T. & Biggs, H. G. (1972) Standard Methods of Clinical Chemistry, vol. 7 , Academic Press, N.Y.

- Doumas , B. T. et al (1981) Clin. Chem., 27 : 1642 .

- Egan, H. et al. (1981) pearson's Chemical Analysis of Foods . 8th Ed . Churchill, London .

- Elmer, H. M. (1978) Standard methods for the examinathion of dairy products. 14th Ed. American public Health Association, Washington Dc .

- Greweling, T. et al (1964) Agric . Food Chem. 12 : 139.

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

- Husdan , H. et al. (1968) Clin. Chem. 14 : 222 .

- Jakobson , P. E. et al. (1960) 322 bertning fraforgs labortoriet, udgivet of stants . Husdgr bugsud valg - kobenhavn .

- Knobloch, E. & Cerna - Heyrovska, J. (1979) Fodder Biofactors, their methods of determination . Academia , Praha .

- Kuhl , J. (1980) Landtechnik, 30 : 160 .

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

- Leitegeb, R. (1979) Futtermittelkunde, Vorlesungen, Univ. F. Boku., Wien.

- Lowry, O. H. et al . (1951) Biochem. J., 193 : 265 .

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

- Merck, E. (1976) Labordiagnostik in der Tiermedizin. Merck, Darmstadt .

- Merck , E. (1980) Arbeitsanleitungen für die klinische Chemie . Diagnostica Merck , Darmstadt .

- Meyer, H. et al (1980) Supplemente zu vorlersungen and Ubungen in der Tiernahrung . 5 . Auflage, Sprungmann Verlag, Hannover .

- Noel, R. J. (1976) J. AOAC, 59 : 141 .

- Noll, J. S . et al . (1974) Am. Assac. cereal cheists, 51 : 610. oser, P. L. (1979) . et al. Hawk's physiological chemistry . 14 th Ed . Tata Mc Graw - Hill , New Delhi .

- Ranganna, S. (1979) Manual of analysis of fruit and vegetable products . Tata Mc Graw - Hill, New Delhi .

- Rowland, S. T. (1938) J. Dairy Res., 9:42 .

- Schmidl, M. (1981) Laboruntersuchungen - Veterinmedizin. Boehringer, Mannheim .

- Simmonds , D. H. et al . (1976) Chem . Absts. Vol. 84, No. 1 84 : 3486 h.

- Soliman, M. K. & Abd El Moty , I . (1976) A Moderm Approach to Veterinary Clinical & Laboratory Diagnosis . The Scientific Book Centre, Cairo .

- The Feeding stuffs (sampling and Analysis) Regulations 1982 . Agriculture 1982 No . 1144 . Her Majesty's stationery Office, London .

- Thiemann , K. G. (1983) Arch. Tierernähr. 33 : 95 .

- Varley . H. (1978) Pratical Clinical Biochemistry . 4 th Ed. Arnold-Heinemann. India .

- Vertregt, N. (1977) Neth. J. Agric. Sci., 25 : 243 .

- 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, Londo