

Experiment 9

Qualitative Determination of Lipids

الدهون هي مجموعة واسعة من الجزيئات الطبيعية التي تشمل الدهون، والشموع (النباتية والحيوانية)، والستيرولات، والفيتامينات الذائبة في الدهون، واحادي الجليسيريد، وثنائي الجليسيريد، وثلاثي الجليسيريد، والفوسفوليبيدات، وغيرها. وهي تشمل الدهون والزيوت الصالحة للاكل (مثل الزبدة وزيت الزيتون وزيت الذرة)، والتي هي في الأساس ثلاثي الجليسيريد، والفوسفوليبيدات (مثل الليسيثين)، والتي تعد مهمة في بنية الخلية وعمليات الأيض. تشمل وظائف الدهون تخزين الطاقة، حيث تحتوي الدهون على أكثر من ضعف كمية الطاقة (السعرات الحرارية) لكل وحدة وزن مقارنة بالبروتينات والكربوهيدرات. تؤدي الدهون وظائف مهمة في الإشارات الخلوية، وتعمل كمكونات هيكلية لأغشية الخلايا. ولها تطبيقات في صناعات مستحضرات التجميل والأغذية، وفي تقنية النانو.

LIPIDS are a broad group of naturally-occurring molecules which includes **fats**, **waxes** (plant and animal), **sterols**, **fat-soluble vitamins**, **monoglycerides**, **diglycerides**, **triglyceride**, **phospholipids**, and others. They include the **fats and edible oils** (e.g., **butter, olive oil, corn oil**), which are **primarily triglycerides**; **phospholipids** (e.g., **lecithin**), which are **important in cell structure and metabolism**. The functions of lipids include **storing energy**, lipids contain more than twice as much energy (calories) per unit of weight as the other two (proteins and carbohydrates). **signaling**, and acting as **structural components of cell membranes**. Lipids have applications in the cosmetic and food industries, and in nanotechnology.

A **fat molecule** consists of two kinds of parts: **a glycerol backbone and three fatty acid tails**. Glycerol is a small organic molecule with three hydroxyl (OH) groups, while a **fatty acid** consists of a long hydrocarbon chain attached to a carboxyl group. A typical **fatty acid** contains **12–20 carbons**, though some may have as few as 4 or as many as 36.

يتكون جزيء الدهون من نوعين من الأجزاء: هيكل جليسرول وثلاثة ذيول من الأحماض الدهنية. الجليسرول هو جزيء عضوي صغير يحتوي على ثلاث مجموعات هيدروكسيل (OH)، بينما يتكون الحمض الدهني من سلسلة هيدروكربونية طويلة متصلة بمجموعة كربوكسيل. يحتوي الحمض الدهني النموذجي على 12-20 ذرة كربون، على الرغم من أن بعضها قد يحتوي على 4 ذرات كربون فقط أو 36 ذرة كربون.

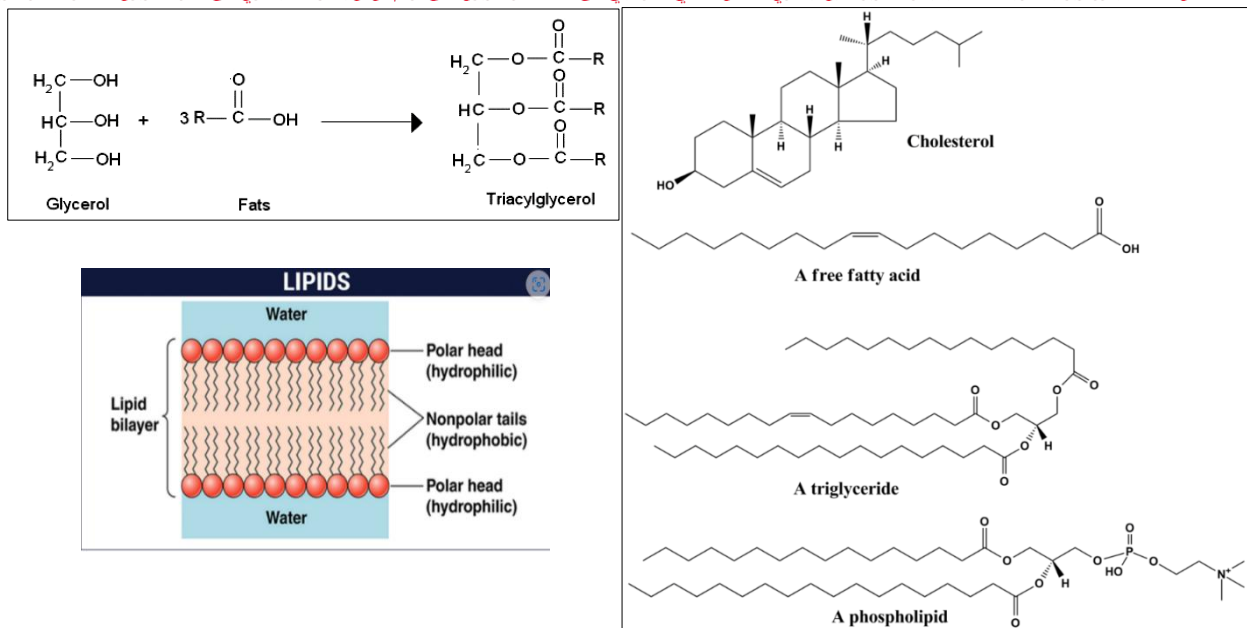


Figure: structures of some common lipids. Right image: at the top are cholesterol, and free fatty acid (oleic acid). The middle structure is a triglyceride. The bottom is a phospholipid.

الشكل: تراكيب بعض الدهون الشائعة. الصورة على اليمين: في الأعلى يوجد الكوليسترول، وحمض دهني حر (حمض الأوليك). التركيب الأوسط هو ثلاثي الجليسيريد. في الأسفل يوجد فوسفوليبيد.

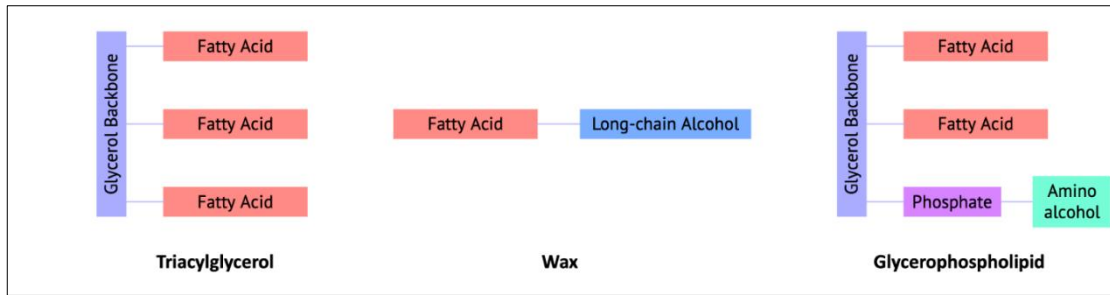
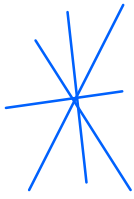


Figure: structures of some common lipids.

Classification of lipids:

1. الدهون البسيطة هي إسترات الأحماض الدهنية مع كحولات مختلفة، على سبيل المثال، الدهون (إسترات الأحماض الدهنية مع الجلسرين) والشموع (إسترات الأحماض الدهنية مع كحولات أحادية الهيدروكسيل ذات وزن جزيئي أعلى).

1. Simple lipids are esters of fatty acids with various alcohols, e.g., fats (esters of fatty acids with glycerol) and waxes (esters of fatty acids with higher molecular weight of monohydric alcohols).

2. الليبيدات المعقدة هي إسترات الأحماض الدهنية التي تحتوي على مجموعات بالإضافة إلى الكحول والحمض الدهني، مثل الفوسفوليبيدات أو الجليكوليبيدات.

2. Complex lipids are esters of fatty acids containing groups in addition to an alcohol and a fatty acid, e.g., phospholipids or glycolipids,

- **Phospholipids** yield in addition to alcohol and fatty acids, phosphate and a nitrogenous base like choline, ethanolamine, etc. Specialized lipids called phospholipids are major components of the plasma membrane. **Lecithin's** and **cephalous** are representatives of the phospholipids.

- تُنتج الفوسفوليبيدات، بالإضافة إلى الكحول والأحماض الدهنية، الفوسفات وقاعدة نيتروجينية مثل الكولين والإيمانولامين، إلخ. تُعد الدهون المتخصصة التي تُسمى الفوسفوليبيدات مكونات رئيسية للغشاء البلازمي. الليسين والسيفالوس مثالان على الفوسفوليبيدات.

- **Glycolipids** contain carbohydrates.

- تحتوي الجليكوليبيدات على الكربوهيدرات. - تحتوي السلفوليبيدات على الكبريتات.

- **Sulpholipids** contain sulphate.

- البروتينات الدهنية هي تركيبات من الدهون مع البروتينات. هناك أربع فئات رئيسية من البروتينات الدهنية المنتشرة، لكل منها تركيبها البروتيني والدهني المميز. هي الكيلوميكرونات، والبروتينات الدهنية منخفضة الكثافة جدًا (VLDL)، والبروتينات الدهنية منخفضة الكثافة (LDL)، والبروتينات الدهنية عالية الكثافة (HDL).

- **Lipoproteins** are combinations of lipids with proteins. There are four major classes of circulating lipoproteins, each with its own characteristic protein and lipid composition. They are chylomicrons, very low-density lipoproteins (VLDL), low-density lipoproteins (LDL), and high-density lipoproteins (HDL).

3. Derived lipids When both simple and compound lipids combine and undergo the process of hydrolysis, the produced chemical is known as the derived lipids. Derived lipids include cholesterol, carotenes, steroids and prostaglandins, fat soluble vitamin (A, K, E, D), and hormones.

3. الدهون المشتقة: عندما تتحد الدهون البسيطة والمركبة وتخضع لعملية التحلل المائي، يُعرف الناتج الكيميائي بالدهون المشتقة. تشمل الدهون المشتقة الكوليسترول، والكاروتينات، والستيرويدات، والبروستاجلاندينات، والفيتامينات الذائبة في الدهون (أ، ك، هـ، د)، والهرمونات.

They have the common property of being:

(1) Relatively insoluble in water. Lipids are hydrophobic (“water-fearing”).

(1) غير قابلة للذوبان نسبيًا في الماء. الدهون كارهة للماء (“تكره الماء”).

(2) Soluble in nonpolar solvents such as ether and chloroform.

(2) قابلة للذوبان في المذيبات غير القطبية مثل الإيثر والكلوروفورم.

1. مشبعة: إذا لم تحتوي السلسلة الأليفاتية على رابطة مزدوجة. تكون ذبول الأحماض الدهنية المشبعة مستقيمة، لذا يمكن لجزيئات الدهون ذات الذبول المشبعة تمامًا أن تتراص بإحكام مع بعضها البعض. ينتج عن هذا التراص المحكم دهون صلبة في درجة حرارة الغرفة. معظم الدهون في الزبدة هي دهون مشبعة. من أكثر الأحماض الدهنية شيوعًا حمض البالمتيك وحمض الستياريك. يحتوي حمض البالمتيك على 16 ذرة كربون، بينما يحتوي حمض الستياريك على 18 ذرة كربون. كلاهما من الأحماض الدهنية المشبعة.

الأحماض الدهنية هي أحماض كربوكسيلية ذات سلسلة أليفاتية (12-20 ذرة كربون)، وهي إما مشبعة أو غير مشبعة.

Fatty acids is a **carboxylic acid** with an **aliphatic chain** (12-20 carbon), which is either **saturated** or **unsaturated**.

1. **Saturated** If the **aliphatic chain** contains **no double bond**. Saturated fatty acids tails are **straight**, so fat molecules with fully saturated tails can **pack tightly** against one another. This tight packing results in fats that are **solid** at room temperature. most of the fat in butter is saturated fat. Some of the most common fatty acids are **palmitic acid** and **stearic acid**. Palmitic has 16 carbon atoms and stearic has 18 carbon atoms.

both are saturated fatty acids.

2. غير مشبع إذا كان يحتوي على رابطة مزدوجة واحدة أو أكثر. إذا كانت هناك رابطة مزدوجة واحدة فقط في حمض دهني، فهو أحادي عدم التشبع (MUFA)، بينما إذا كانت هناك روابط مزدوجة متعددة، فهو متعدد عدم التشبع (PUFA). تميل الدهون ذات السلاسل غير المشبعة إلى أن تكون سائلة في درجة حرارة الغرفة.

2. **Unsaturated** if it contains **one or more double bond**. If there is just one double bond in a fatty acid, it's **Monounsaturated (MUFA)** while if there are multiple double bonds, it's **Polyunsaturated (PUFA)**. fats with unsaturated tails tend to be **liquid** at room temperature.

Another class of fatty acids which is considered as PUFA that deserves mention includes the **omega-3** and **omega-6** fatty acids. while **omega-9** is MUFA. The names omega-3,-6 or -9 refer to the **locations of the first double bond** in the three different fatty acid molecules. classified as **essential fatty acids** and must be obtained from a **person's diet**. Some fish, such as salmon, and some seeds, such as chia and flax, are good sources of omega-3 fatty acids. Omega-6 found in Sun flower seed and Olive oil while avocado and almond is rich with omega-9.

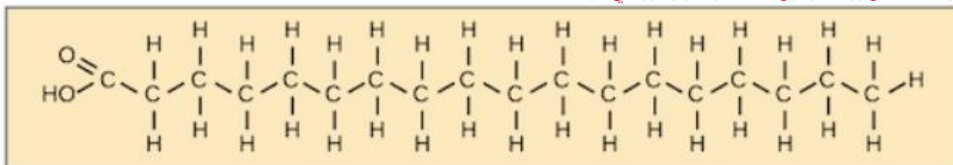
Fats have more saturated fatty acids whereas **oils** have more of unsaturated ones.

تحتوي الدهون على المزيد من الأحماض الدهنية المشبعة، بينما تحتوي الزيوت على المزيد من الأحماض الدهنية غير المشبعة.

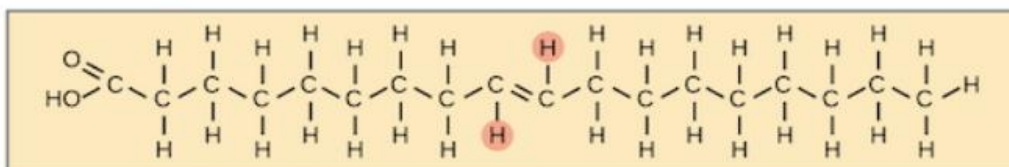
هناك فئة أخرى من الأحماض الدهنية والتي تعتبر PUFA والتي تستحق الذكر تشمل أحماض أوميغا 3 وأوميغا 6 الدهنية. بينما أوميغا 9 هو MUFA. تشير أسماء أوميغا 3 أو 6 أو 9 إلى مواقع الرابطة المزدوجة الأولى في جزيئات الأحماض الدهنية الثلاثة المختلفة. تصنف على أنها أحماض دهنية أساسية ويجب الحصول عليها من النظام الغذائي للشخص. تعتبر بعض الأسماك، وبعض البذور، مثل الشيا والكتان، مصادر جيدة لأحماض أوميغا 3 الدهنية. أوميغا 6 موجودة في بذور عباد الشمس وزيت الزيتون بينما الأفوكادو واللوز غني بأوميغا 9.

Saturated fatty acid

Stearic acid



Unsaturated oleic acid



هي عملية تحويل الإسترات إلى صابون وكحولات بفعل القلويات المائية (مثل محاليل هيدروكسيد الصوديوم المائية). الصابون هو أملاح الأحماض الدهنية. ستيرات الصوديوم هو صابون نموذجي.

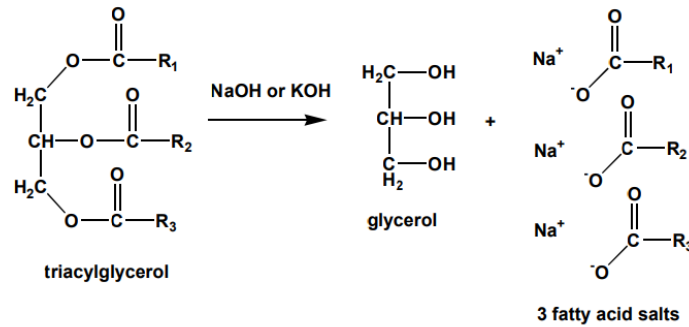
التصين

يمكن تحلل ثلاثي الغليسريد إلى مكوناته من الأحماض الدهنية والكحولات - أي يتم تكسيرها بإضافة جزيء ماء. في الجسم، تقوم إنزيمات تُعرف باسم الهيدرولازات بهذا التحلل المائي. يمكن أيضًا إجراء هذا التفاعل في المختبر من خلال عملية تسمى التصين - حيث يتم التحلل المائي في وجود قاعدة قوية (مثل NaOH أو KOH).

Saponification

It is a process of **converting esters into soaps and alcohols by the action of aqueous alkali** (for example, **aqueous sodium hydroxide solutions**). **Soaps are salts of fatty acids salts**. **Sodium stearate is a typical soap**.

Triacylglycerol can be hydrolyzed into their component fatty acids and alcohols – that is, **they are broken down by the addition of a water molecule**. In the body, enzymes known as **hydrolases carry out this hydrolysis**. This reaction can also be carried out in the laboratory by a process called saponification – where the hydrolysis is carried out in the presence of a strong base (such as NaOH or KOH).



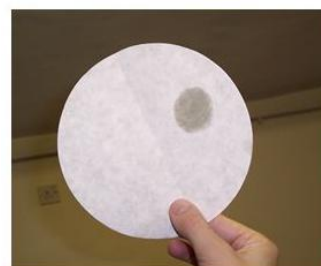
Qualitative test of lipids:

The qualitative analysis of lipid involves some preliminary tests and specific tests to detect lipids' presence or absence. Depending upon lipids' reactivity with the chemical reagents.

يتضمن التحليل النوعي للدهون بعض الاختبارات الأولية والاختبارات المحددة للكشف عن وجود الدهون أو عدمه. اعتمادًا على تفاعل الدهون مع الكواشف الكيميائية. يمكن أن يكون الزيت (زيت الزيتون، زيت الفول السوداني، زيت جوز الهند).

Oil could be (olive oil, arachis oil, coconut oil).

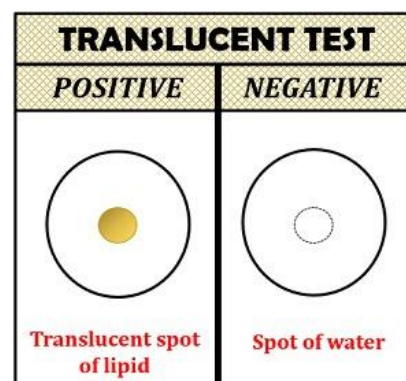
1. **Translucent Spot Test (Grease spot test):** The lipid will not wet the filter paper, unlike water. The lipids will form a greasy or translucent spot due to their greasy texture, and penetrate the filter paper. Unlike lipids, the spot of water will disappear from the paper.



1. اختبار البقعة الشفافة (اختبار بقعة الشحم): لن تبلل الدهون ورقة الترشيح، على عكس الماء. ستشكل الدهون بقعة دهنية أو شفافة بسبب قوامها الدهني، وتخترق ورقة الترشيح. على عكس الدهون، ستختفي بقعة الماء من الورقة.

Procedure:

1. Take a filter paper.
2. Add one drop of water at one end and a drop of oil or lipid at the other end.
3. Observe the appearance of a translucent spot on the filter paper. While disappearance of water spot.



Interpretation of result:

- **Positive result:** Translucent spot will appear on the filter paper. نتيجة إيجابية: ستظهر بقعة شفافة على ورقة الترشيح.
- **Negative result:** Translucent spot will not appear on the filter paper. نتيجة سلبية: لن تظهر بقعة شفافة على ورقة الترشيح.

2. **Solubility:** It is the preliminary test that detects the presence of all lipids. Solubility test detects lipid solubility in various solvents to check whether it is miscible or immiscible in polar or non-polar solvents. Thus, it is based on the property of lipid solubility in different solvents. Lipids are readily miscible in non-polar solvents like chloroform, partially soluble in a polar solvent like ethanol and immiscible in a polar solvent like water.

2. الذوبانية: هو الاختبار الأولي الذي يكشف عن وجود جميع الدهون. يكشف اختبار الذوبانية عن ذوبانية الدهون في مذيبات مختلفة للتحقق مما إذا كانت قابلة للامتزاج أو غير قابلة للامتزاج في المذيبات القطبية أو غير القطبية. وبالتالي، فهو يعتمد على خاصية ذوبانية الدهون في المذيبات المختلفة. تمتزج الدهون بسهولة في المذيبات غير القطبية مثل الكلوروفورم، وتذوب جزئيًا في المذيبات القطبية مثل الإيثانول، ولا تمتزج في المذيبات القطبية مثل الماء.

Procedure:

1. Take 1 ml oil sample in three different test tubes by labelling it as A, B and C.
2. Then, add 2 ml of different solvents like water, ethanol and chloroform in each test tubes A, B and C.
3. Shake the tubes and allow it to stand for 1 minute.
4. Check the solution for whether lipid (oil) is soluble or insoluble.

4. Salting out: (Testing the separation of soap from the solution by salting out)

Objective: to investigate the effect of NaCl on soap solubility.

Principle:

لفصل الصابون عن المحلول بالتمليح، عند إضافة كلوريد الصوديوم الصلب إلى المحلول حتى التشبع، ينفصل الصابون على شكل مادة غير قابلة للذوبان وتطفو فوق السطح.

To get the soap out of solution by salting out, when added solid sodium chloride to the solution until saturation; separated soap in the form of insoluble and floats above the surface.

The NaCl solution provides Na⁺ and Cl⁻ ions that bind to the polar water molecules, and help separate the water from the soap. This process is called **salting out the soap**.

يوفر محلول كلوريد الصوديوم أيونات الصوديوم (+Na) والكلوريد (-Cl) التي ترتبط بجزيئات الماء القطبية، مما يساعد على فصل الماء عن الصابون. تسمى هذه العملية بفصل الصابون بالتمليح.

Procedure:

1. Add 4 ml of water to 1 ml of soap solution obtained by saponification test.
2. Add sodium chloride solution to saturate (about 1 g). The soap will form a precipitate. Use filter paper and funnel to filter the solution and get soap. Note its characteristics.

5. Emulsification:

الدهون غير قابلة للذوبان في الماء لأنها غير قطبية. ومع ذلك، تنفقت الدهون إلى جزيئات دقيقة وتنتشر في الماء عند رجها لتكوين مستحلب. يكون الاستحلاب دائمًا وكاملاً في وجود عامل استحلاب. من عوامل الاستحلاب المهمة أملاح الصفراء والبروتينات والصابون وأحادي وثنائي الجليسيريد. الاستحلاب مهم في عمليات هضم الدهون في الأمعاء. تعمل عوامل الاستحلاب على خفض التوتر السطحي للسائل.

Lipids are insoluble in water as they are nonpolar. However lipids becomes finely divided and is dispersed in water when shaken with water to form emulsification. **Emulsification** is permanent and complete in the presence of emulsifying agent. The important emulsifying agents are bile salts, proteins, soaps, mono- and diglycerides. Emulsification is important in the processes of fat digestion in the intestine. Emulsifying agents lower surface tension of the liquid.

Procedure:

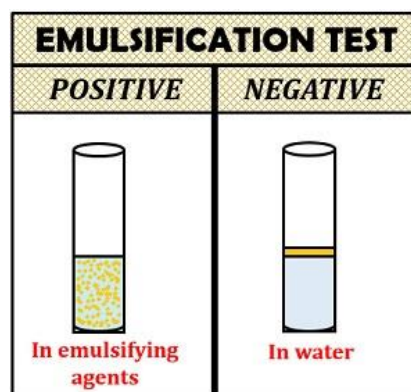
1. Take two test tubes and label it as test tube A and test tube B.
2. Add 1ml oil to each of the test tube.
3. Add 5 ml of water to each test tube.
4. Shake the test tube and allow it to stand for about two minutes.
5. Observe the test tube for the appearance of tiny droplets in the suspension of liquid.
6. Now add a few drops of soap (you prepare in the saponification test) to the mixture **test tube A** and shake again. Leave it to stand for 1 min. The oil is dispersed again in water but the layers do not separate on standing. the oil can be seen in minute droplets suspended in the liquid (**permanent emulsification**).
7. In **test tube B**, after shake, a coarse suspension of oil is obtained. On standing, the oil and the water layer will separate. oil is broken in small pieces and floats on the surface

نتيجة إيجابية: ينتج عنه مستحلب دائم أو مستقر من الدهون والماء.
نتيجة سلبية: سيتشكل مستحلب زيت في الماء في الأعلى، بسبب التوتر السطحي العالي للماء.

Interpretation of result:

Positive result: It gives a permanent or stable emulsion of lipid and water.

Negative result: Oil in water emulsion will form at the top, due to the high surface tension of water.



6. Insoluble soaps: Test formation insoluble fatty acids salt :

Objective: to investigate the effect of different cations on soap solubility.

Principle:

تؤدي الكاتيونات مثل أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم والرصاص والحديد إلى ترسب الصابون وجعله غير قابل للذوبان في الماء، لأن هذه الأيونات تحل محل أيونات الصوديوم أو البوتاسيوم الموجودة في الصابون.

Cations as calcium, magnesium, lead or iron ions lead to the deposition of soap and make it insoluble in water, because these ions replace the sodium or potassium ions present in soap.

Hard water contain significant quantities of Ca^{2+} , Mg^{2+} and some Fe^{3+} that react with the charged ends of the soaps to form insoluble salts of fatty acid. The insoluble salts of fatty acid that Ca^{2+} and Mg^{2+} form with soap anions cause white precipitate to form.

يحتوي الماء العسر على كميات كبيرة من Ca^{2+} و Mg^{2+} وبعض Fe^{3+} التي تتفاعل مع الأطراف المشحونة للصابون لتكوين أملاح غير قابلة للذوبان من الأحماض الدهنية. تسبب أملاح الأحماض الدهنية غير الذائبة، التي تكونها أيونات الكالسيوم (Ca^{2+}) والمغنيسيوم (Mg^{2+}) مع أنيونات الصابون، تكون راسب أبيض.

Sodium or potassium soaps precipitated by the addition of calcium and magnesium salts. Also free fatty acid will be liberated by addition of acid render the soap insoluble.

Procedure:

يترسب صابون الصوديوم أو البوتاسيوم بإضافة أملاح الكالسيوم والمغنيسيوم. كما تتحرر الأحماض الدهنية الحرة بإضافة الحمض، مما يجعل الصابون غير قابل للذوبان.

Effect of cation on soap

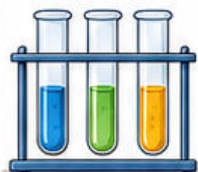
Take 2 ml of soap solution obtained by saponification test. Add 1 ml of calcium chloride(1M). Note the precipitation of soap.

خذ 2 مل من محلول الصابون الذي تم الحصول عليه عن طريق اختبار التصبن. أضف 1 مل من كلوريد الكالسيوم (1 مل). لاحظ ترسب الصابون.

Hydrolysis of fats by acids

In another test tube acidify 1 ml portion of the soap solution obtained by saponification test with 2 ml of diluted HCl. Allow to stand and write your observation? Note: Free fatty acids will form and will float on the top as an oily layer

في أنبوب اختبار آخر، قم بتحميض 1 مل من محلول الصابون الذي تم الحصول عليه عن طريق اختبار التصبن باستخدام 2 مل من حمض الهيدروكلوريك المخفف. اتركه جانباً واكتب ملاحظاته؟ ملاحظة: ستتكون الأحماض الدهنية الحرة وستطفو على السطح كطبقة زيتية



Summary of Qualitative Tests for Lipids



• Qualitative Tests for Lipids •

Test Name	Principle / Brief Idea	Reagent / Chemical Used	Positive Result (+)	Negative Result (-)
1 Translucent Spot Test (Grease Spot Test) 	Lipids form a greasy translucent spot on filter paper and do not disappear like water.	Filter paper + one drop of oil/fat + one drop of water for comparison 	A permanent translucent greasy spot appears on the filter paper. 	No translucent spot appears, or the mark disappears like water. 
2 Solubility Test 	Lipids are nonpolar, so they dissolve in nonpolar solvents, are partially soluble in ethanol, and are immiscible with water.	Water + Ethanol + Chloroform 	Soluble in chloroform and partially soluble in ethanol (solubility increases on heating). 	Insoluble in water. 
3 Saponification Test 	Lipids undergo alkaline hydrolysis to form soap and alcohol.	20% alcoholic KOH + water + red litmus paper 	Soap forms, oil droplets disappear after complete saponification, and the medium is alkaline. 	Oil droplets remain or soap does not form (incomplete saponification). 
4 Salting Out Test 	Adding sodium chloride decreases the solubility of soap, causing it to separate from the solution.	Soap solution obtained from the saponification test + sodium chloride (NaCl) 	An insoluble soap precipitate or mass forms and separates or floats above the solution. 	No precipitation or no separation of soap occurs. 
5 Emulsification Test 	Lipids do not dissolve in water, but in the presence of an emulsifying agent such as soap, a stable emulsion forms.	Oil + water + a few drops of soap solution (emulsifying agent) 	A permanent or stable emulsion of oil and water forms. 	The oil and water separate into two layers, with oil floating on top. 
6 Insoluble Soaps Test 	Cations such as Ca^{2+} or acids make soap insoluble, forming insoluble fatty acid salts or free fatty acids.	Calcium chloride (CaCl_2), 1 M + diluted HCl 	With CaCl_2 : a white precipitate or turbidity forms. With HCl: free fatty acids appear as a floating oily layer. 	No precipitate forms and no oily layer appears. 

Quick Notes

- Lipids are hydrophobic.
- They dissolve better in nonpolar solvents such as chloroform.
- Soap acts as an emulsifying agent and lowers surface tension.



ملخص اختبارات الكشف النوعي عن الدهون

• Qualitative Tests for Lipids •



اسم الاختبار	المبدأ / الفكرة المختصرة	الكاشف/المادة الكيميائية المستخدمة	النتيجة الإيجابية (+)	النتيجة السلبية (-)
1 اختبار البقعة الشفافة (Translucent Spot / Grease Spot Test)	الدهون تُكوّن بقعة دهنية شفافة على ورق الترشيح ولا تختفي مثل الماء.	ورق ترشيح + قطرة زيت/دهن + قطرة ماء للمقارنة	ظهور بقعة شفافة دهنية ثابتة على ورق الترشيح	عدم ظهور بقعة شفافة، أو اختفاء الأثر مثل الماء
2 اختبار الذوبانية (Solubility Test)	الدهون غير قطبية؛ لذلك تذوب في المذيبات غير القطبية، وتكون غير ممتزجة بالماء.	ماء + إيثانول + كلوروفورم	ذائبة في الكلوروفورم، وقابلة للذوبان جزئياً في الإيثانول (وتزداد بالحرارة)	غير ذائبة في الماء
3 اختبار التصبن (Saponification Test)	الدهون تتحلل قلويًا لتكوين صابون والكحول.	هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي 20% (Alcoholic KOH) + ماء + ورقة تباع الشمس الحمراء	تكوّن صابون، اختفاء قطرات الزيت بعد اكتمال التصبن، وسط قلوي	بقاء قطرات الزيت أو عدم تكون الصابون (لتصبن غير كامل)
4 التميح/الترسيب بالملح (Salting Out)	إضافة كلوريد الصوديوم المشبع تقلل ذوبانية الصابون فينفصل عن المحلول.	محلول الصابون الناتج من اختبار التصبن + كلوريد الصوديوم NaCl	تكوّن راسب/كتلة صابون غير ذائبة تطفو أو تنفصل عن المحلول	عدم حدوث ترسيب أو عدم انفصال الصابون
5 اختبار الاستحلاب (Emulsification Test)	الدهون لا تذوب في الماء، لكن بوجود عامل استحلاب مثل الصابون تتكوّن مستحلبات ثابتة.	زيت + ماء + بضع قطرات من محلول الصابون (عامل استحلاب)	تكوّن مستحلب دائم أو ثابت من الزيت والماء	انفصال طبقتي الزيت والماء وطفو الزيت في الأعلى
6 اختبار الصوابين غير الذائبة (Insoluble Soaps Test)	الأيونات مثل Ca^{2+} أو الأحماض تجعل الصابون غير ذائب؛ فتتكون أملاح دهنية غير ذائبة أو أحماض دهنية حرة.	كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ بتركيز 1M، أو حمض الهيدروكلوريك المخفف HCl	مع $CaCl_2$: يتكوّن راسب أبيض/تعكر. مع HCl : تتكوّن أحماض دهنية حرة كطبقة زيتية طافية	عدم تكوّن راسب وعدم ظهور طبقة زيتية

ملاحظات سريعة

- الدهون كارهة للماء (Hydrophobic).
- تذوب أفضل في المذيبات غير القطبية مثل الكلوروفورم.
- الصابون يعمل كعامل استحلاب ويقلل التوتر السطحي.

