

الباب التاسع

الفيتامينات

أ.د/ عاطف أنور قطب أبو عرب
أستاذ علوم وتكنولوجيا الأغذية
كلية الزراعة جامعة عين شمس

الباب التاسع 9. الفيتامينات *Vitamins*

1.9. مقدمة:

فى أوائل القرن العشرين لاحظ بعض العلماء أنه لتدعيم الحياة لابد من توافر بعض المواد الفعالة فى غذاء الإنسان والحيوان وذلك خلاف المواد الكربوهيدراتية والبروتينات والدهون والأملاح المعدنية . وقد وجد أن هذه المواد الفعالة توجد فى كثير من المواد الغذائية . وقد لوحظ أيضا أن نقص هذه المواد يؤدي لحدوث بعض الأمراض مثل البرى برى والعشى الليلي إلخ . كما أنها ضرورية بصورة مطلقة فى كثير من التفاعلات الحيوية فى الجسم وقد تمكن بعض الباحثين فى فصل بعض هذه المواد من قشور الأرز والتي أدت إلى شفاء مرضى البرى برى ، وخاصة فى البلاد التى تعتمد على إستهلاك الأرز المقشور .

وتمثل الفيتامينات من وجهة النظر الكيميائية مجموعة من المركبات العضوية المختلفة ولذلك يصعب تعريفها تعريفا عاما من وجهة نظر بناءها الكيميائى . وعليه فقد تم وضع الفيتامينات فى مجموعة مستقلة من المواد العضوية الطبيعية تبعا لإحتياج الكائن الحى إليها كجزء مكمل لغذائه . وقد عرفت الفيتامينات بأنها " مجموعة من المواد العضوية ذات بناء متنوع وصفات طبيعية كيميائية مختلفة ولكنها ضرورية للنشاط الحيوى الطبيعى لكل كائن حى ، حيث تقوم فيه بصورة مباشرة أو بالإشتراك مع مركبات أخرى أكثر تعقيدا بوظائف تحفيزية "

ونظرا لإحتواء بعض الفيتامينات على النيتروجين ظن الباحثين أن هذه المواد من نوع الأمين *amino* ، ولذلك أطلق عليها لفظ فيتامينات *Vitamines* أى أمينات الحياة ، حيث إتخذت هذه التسمية من *vita* وهى تعنى الحياة . إلا أن بعد إكتشاف بالى هذه المركبات (الفيتامينات) إتضح أن معظمها لايتحوى على نيتروجين ، ولذلك عدلت التسمية إلى *Vitamins* أى بحذف الحرف "e" منها.

وفى بداية دراسة تلك المواد (الفيتامينات) كان يطلق على كل منها إسم يشتق من ذلك المرض الذى يظهر نتيجة نقص هذا الفيتامين فى الغذاء وكانت تضاف عند ذلك إلى إسم المرض بادئة بمعنى مانع (*anti*) ، حيث أن إضافة الفيتامين إلى الغذاء يؤدي إلى سرعة

الشفاء من هذا المرض . وأصبحت الأمراض التي تنتج من نقص الفيتامينات في الغذاء تسمى بأمراض نقص الفيتامينات *Vitaminosis* .
ونظرا لأن التركيب الكيميائي للفيتامينات كان مجهولا في تلك الفترة فقد إتفق على تسميتها تبعا لترتيب فصلها بالحروف الهجائية مثل *A* ، *B* ، *C* ... إلخ . وأخيرا فبعد دراسة التركيب الكيميائي والصفات الطبيعية والكيميائية للعديد من الفيتامينات سميت بأسماء كيميائية مختلفة . ويوضح جدول (1.9) قائمة بأهم هذه الفيتامينات وطرق تسميتها.

جدول (1.9) : أهم الفيتامينات وطرق تسميتها

التسمية		
بالحروف الهجائية	الكيميائية (الدولية)	الفسلوجية (بالنسبة للإنسان)
الفيتامينات الذائبة في الدهون :		
أ A	الريتينول <i>Retinol</i>	مانع للعشى الليلي <i>Antinycctalopia</i>
د D	الكالسيفيرول <i>Calciferol</i>	مانع للكساح <i>Antirachitic</i>
هـ E	التوكوفيرول <i>Tocopherol</i>	مانع للعقم <i>Antisterility</i>
ك K	الفيلوكوينون <i>Phyloquinone</i>	مانع للنزيف <i>Antihemorrhagic</i>
الفيتامينات الذائبة في الماء :		
ب ₁ B ₁	الثيامين <i>Thiamin</i>	مانع لإلتهاب الأعصاب <i>Antiberiberi</i>
ب ₂ B ₂	الريبوفلافين <i>Riboflavin</i>	فيتامين النمو <i>Growth vitamin</i>
ب ₃ B ₃	حامض البنثوثينيك <i>Pantothenic acid</i>	مانع للإلتهاب الجدى <i>Antidermatitis</i>
ب ₅ B ₅	النياسين (حامض النيكوتينيك) <i>Niacin</i>	مانع لمرض البلاجرا <i>Antibellagra</i>
ب ₆ B ₆	البيريدوكسين <i>Pyridoxine</i>	مانع للإلتهاب الجلدى <i>Antidermatitis</i>
ب ₁₂ B ₁₂	الميثانوكوبالامين <i>Cyanocobalamin</i>	مانع للأنيميا <i>Antianemia</i>
ج C	حامض الأسكوربيك <i>Ascorbic acid</i>	مانع لمرض الإسقربوط <i>Antiscorbutic</i>
ح H	البيوتين <i>Biotin</i>	مانع لمرض التققق الدهنى <i>Antiseborrhea</i>

وقد قسمت الفيتامينات تبعاً لخاصية ذوبانها في مذيبات الدهون وفي الماء إلى مجموعتين :

المجموعة الأولى : الفيتامينات الذائبة في الدهون : معظم فيتامينات هذه المجموعة تساهم في بناء الأعضاء الداخلية والأنسجة في جسم الكائن الحي.

المجموعة الثانية : الفيتامينات الذائبة في الماء : ومعظم هذه المجموعة من الفيتامينات تدخل في التفاعلات الحيوية المرتبطة بانطلاق الطاقة ، أي ذات

وظيفة تتعلق بالطاقة *energy function*

وقد إتفق على تقسيم الفيتامينات تبعاً لتأثيرها الفسيولوجي على جسم الإنسان إلى مجاميع مختلفة كما هو موضح في جدول (2.9) .

جدول (2.9): الخواص المتشابهة لبعض الفيتامينات في تأثيرها الفسيولوجي.

أسماء الفيتامينات	الخواص الفسيولوجية	التأثير الطبى الوقتى
B_1, B_2, A, C	تقوم بتنظيم الحالة الوظيفية للجهاز العصبى المركزى ، والأبيض ، وتغذية الأنسجة	الفيتامينات التى ترفع من الفعالية العامة للجسم
K, C	تنظم عملية النفاذية الطبيعية للدم ، كما تزيد من تجلط الدم	فيتامينات مانعة للنزيف
C, B_{12}	تنظيم وتشيط النورة النموية	فيتامينات مانعة للأنيميا
A, C	ترفع من مقاومة الجسم للعنوى وتنشط إنتاج الأجسام المضادة ، وتقوى من الخواص الوقائية للطبقة الطلانية	فيتامينات مانعة للعنوى
C, B_2, A	تقوى حدة الإبصار ، وتوسع من مجال الإبصار	فيتامينات منظمة للإبصار

وسوف نتكلم عن بعض فيتامينات كل مجموعة وطرق تحليلها المختلفة .

2.9. تحليل الفيتامينات *Analysis of Vitamins* :

يلعب تقدير وتحليل الفيتامينات فى الأغذية والعينات البيولوجية الأخرى دورا مهما فى تحديد المتطلبات الغذائية للإنسان والحيوان وتحسين درجة جودة الغذاء من الناحية التغذوية . ويمكن تقسيم الطرق المختلفة لتحليل الفيتامينات إلى الأقسام التالية :

أ- طرق التحليل البيولوجية والتي تشمل الإنسان والحيوان ومعرفة الأعراض المرضية التي تنشأ نتيجة نقص فيتامين معين .

ب- طرق التحليل الميكروبيولوجية: والتي تعتمد على قياس معدل نمو الكائنات الحية الدقيقة ، حيث أن معدل النمو يعتمد على وجود بعض الفيتامينات الخاصة ، وعليه فإن طريقة تقدير الفيتامينات ميكروبيولوجيا يعتمد على درجة نمو الميكروبات فى بيئة محتوية على مستخلص الفيتامين مقارنة بنمو الميكروبات فى بيئة محتوية على كمية معلومة من الفيتامين المراد تقديره . وعادة تستخدم البكتريا والخمائر والبروتوزوا فى هذه الطريقة . ويقاس معدل نمو البكتريا (الكائنات الحية الدقيقة) بالعاكارة أو إنتاج الحامض فى معظم الحالات . وعموماً فإن طرق التقدير الميكروبيولوجية تستخدم عادة فى تقدير الفيتامينات الذائبة فى الدهون.

ج- طرق طبيعية-كيميائية *physicochemical* وتشمل الطرق الإسبكتروفوتومترية *spectrophotometric* ، الفلورومترية *fluorometric* ، الكروماتوجرافية *chromatographic* ، المناعة البيولوجية *immunological* ، والإشعاعية *radiometric* .

وتعتبر الطرق البيولوجية من الطرق المحدودة الاستخدام كطريقة روتينية وتعتمد طريقة التقدير على عدة عوامل : درجة النقا والدقة فى النتائج ، العوامل الاقتصادية ، وطريقة تداول العينات .

وهناك العديد من الطرق الرسمية *AOAC* لتقدير الفيتامينات ولكنها محدودة فى تطبيقاتها على معظم المواد الغذائية مثل تقدير الفيتامينات فى اللبن المركز والحبوب ولا يمكن تطبيقها على المواد الغذائية الأخرى إلا بعمل تعديل *modification* للطريقة نفسها .

ونظرا لدرجة حساسية بعض الفيتامينات للضوء والأكسجين ، الحموضة ، الحرارة فلا بد من أخذ الاحتياطات اللازمة أثناء الإستخلاص لمنع تدهور العينات قبل عملية التقدير وكذلك أثناء خطوات التحليل المختلفة .وسوف نتكلم بإيجاز عن طرق الإستخلاص المختلفة للفيتامينات فيمايلي :

3.9. طرق الإستخلاص : *Extraction methods* :

قبل تقدير الفيتامينات يتم إستخلاص الفيتامينات من مصادرها (الغذائية) المختلفة ، وبصفة عامة تشمل عملية الإستخلاص خطوة واحدة أو عدة خطوات والتي تشمل : المعاملة الحرارية أو المعاملة بالحامض أو القلوي ، بالمذيبات ، بالإنزيمات . وعليه فإن طريقة الإستخلاص تختلف باختلاف نوع الفيتامين المراد تقديره ودرجة ثباته أثناء التقدير وكذلك نوع المادة الغذائية المراد تقدير الفيتامين فيها . وفي بعض الحالات فإن هناك لبعض طرق الإستخلاص التي يمكن عن طريقها إستخلاص وتقدير أكثر من فيتامين واحد فعلى سبيل المثال لا الحصر الثيامين والريبوفلافين ، وبعض الفيتامينات الذائبة في الدهون . ويمكن توضيح بعض طرق الإستخلاص لبعض الفيتامينات كمايلي :

1.3.9. إستخلاص حامض الأسكوربيك : يستخلص حامض الأسكوربيك (فيتامين ج) على البارد باستخدام حامض الميتافوسفوريك/حامض الخليك / *metaphosphoric acid* . *acetic acid* .

2.3.9. إستخلاص فيتامين B_1 ، B_2 : يتم إستخلاص كل من فيتامين B_1 ، B_2 بالمعاملة الحرارية (غليان أو باستخدام الأوتوكلاف) في وسط حامضي ومعاملة إنزيمية .

3.3.9. إستخلاص فيتامين A ، E ، D : تستخلص هذه الفيتامينات من الجزء الغير قابل للتصبن بالمذيبات العضوية بعد إجراء عملية تصبن *saponification* (بواسطة محلول قلوي كحولي من البوتاسا الكاوية 0.5 ع والتسخين في حمام مائي في وجود مكثف عاكس حتى تمام التصبن ،أو تترك العينة مع البوتاسا الكاوية على درجة حرارة الغرفة طوال الليل) للعينة (عادة زيوت أو دهون) ، وقد يضاف مضادات أكسدة أثناء عملية الإستخلاص في حالة الفيتامينات غير الثابتة .

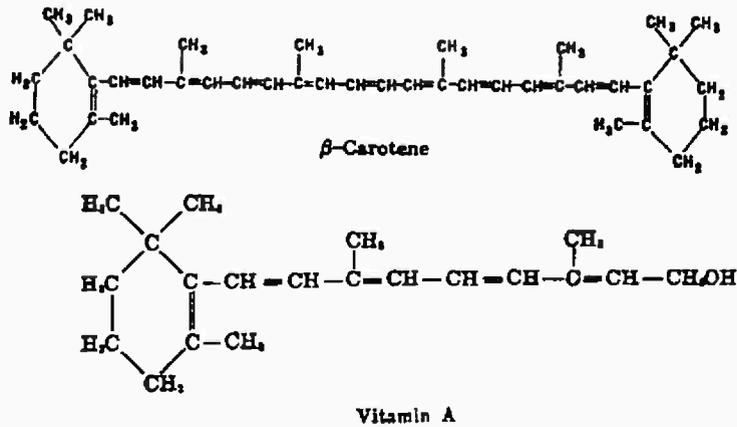
4.3.9. إستخلاص النياسين : يستخلص النياسين بالمعاملة الحرارية (في الأوتوكلاف) في وسط حامضي (في منتجات غير الحبوب) أو بالقلوي (في منتجات الحبوب) .

4.9 طرق تقدير وتحليل الفيتامينات : هناك العديد من الطرق المختلفة في تقدير الفيتامينات تختلف باختلاف نوع الفيتامين والمادة المراد تحليل الفيتامين فيها ، وسوف نتكلم عن بعض الطرق الرسمية المستخدمة في تحليل الفيتامينات كما يلي :

1.4.9 تقدير الفيتامينات الذائبة في الدهن *Fat – soluble vitamins* :

1.1.4.9 فيتامين أ (الريتينول) : *Vitamin A (Retenol)* :

تعتبر الكاروتينات *carotenoids* من أهم مولدات *provitamins* فيتامين أ (A) في الجسم ، حيث تحول هذه الكاروتينات في جدار الأمعاء إلى فيتامين أ (A) ، وذلك بأكسدة الرابطة الزوجية الوسطى من الكاروتين لتكوين الريتينين *retinene* ثم يتحول بسرعة إلى فيتامين أ (A) . ومن أهم الكاروتينات التي تعمل كمولدات لفيتامين أ (A) هي الألفا كاروتين ، بيتا كاروتين ، جاما كاروتين ، والكريبتوزانثين . ويعطى الجزيء الواحد من البيتا كاروتين 2 جزئ من فيتامين أ (A) ، حيث يحتوى جزيء البيتا كاروتين على حلقتين من β -ionone ، في حين أن باقي الكاروتينات تحتوى على حلقة واحدة منه كما هو موضح في المعادلة الآتية :



يوجد فيتامين أ (A) في الخضروات والفواكه ذات اللون الأصفر مثل الجزر والمشمش والخوخ والطماطم والسبانخ والفلفل الأخضر . كما يوجد في زيوت أكباد بعض الأسماك البحرية مثل سمك القرش ، والتونا . كذلك يوجد في الكبد والزبد والبيض واللبن ، كما تم فصله من المواد الغير قابلة للتصبن في الزيوت والدهون . ومن أهم وظائفه

المحافظة على الأغشية الطلائية *epithelial tissues* والمخاطية ، ومنع حدوث العشى الليلي *night blindness* والمحافظة على الجلد من الجفاف . ويحتاج الجسم الطبيعي للإنسان البالغ إلى 5000 وحدة دولية (I.U) منه في اليوم .

وهناك عدة طرق لتقدير فيتامين أ نذكر منها مايلي :

أ- تقدير فيتامين أ (A) باستخدام كروماتوجرافيا المسائل ذات الأداء العالي *HPLC*: تعتبر هذه الطريقة من أهم الطرق المقبولة في تقدير فيتامين أ (A) في الأغذية المختلفة ، وهي طريقة رسمية *AOAC* برقم 50.1.02 ، 992.04 . وتعتمد طريقة التقدير بهذه الطريقة على إستخلاص الدهن من العينة ثم إجراء عملية تصبين والذي يتبعه إستخلاص الفيتامين من الجزء الغير قابل للتصبين بالمنبيبات العضوية ، ثم يركز المستخلص ويحقن في الجهاز (*HPLC*) . وفيما يلي ملخص لتقدير فيتامين أ (A) في اللبن وأغذية الأطفال :

- إنقل 40 مل من العينة في فلاسكة الهضم سعة 100 مل ، ثم أضف إليها 10 مل محلول كحولي 0.2 % بيرجالول *pyrogallol* (مضاد للأكسدة) .
- أضف كمية مناسبة من البوتاسا الكاوية الكحولية (10 %) لإجراء عملية التصبين على درجة حرارة الغرفة لمدة 18 ساعة أو في حمام مائي على درجة حرارة 70°م لمدة 30 دقيقة في وجود مكثف عاكس .
- إنقل 3 مل من المحلول بعد عملية التصبين في أنبوبة إختبار وأضف عليها 2 مل ماء مقطر ، 7 مل هكسان + إيثير (15:85 ح/ح) ورج جيدا لإستخلاص الفيتامين أجرى هذه العملية مرتين .
- إنقل المستخلص في نوريق معيارى سعة 25 مل وأضف عليه 1 مل من هكسانديكان *hexadecane* (هكسانديكان + هكسان 1 + 100) ثم أكمل الحجم حتى العلامة .
- خذ 15 مل من المحلول المخفف في أنبوبة إختبار وبخر تحت نيتروجين ، ثم أذب المتبقى بعد التبخير في 0.5 مل هيبتان *heptane* .
- إحقن العينة بعد ذلك في جهاز الـ *HPLC* .

• حساب النتائج :

تحسب النتائج من الـ *peaks* كما يلي :

- حساب كمية الفيتامين في الصورة ترانس *trans* من المعادلة الآتية :

$$V.A.(mg/ml) = \frac{A_T/A_{ST} \times C_T \times D_F}{V_{sPI}}$$

حيث أن :

- . A_T = المساحة الكلية للفيتامين في الصورة ترانس في العينة .
- . A_{ST} = المساحة الكلية للفيتامين في الصورة ترانس في العينة القياسية.
- . C_T = تركيز العينة (مجم/مل) .
- . V = حجم العينة (مل) .
- . D_F = معامل التخفيف .

- حساب كمية الفيتامين في الصورة سيس *Cis* كما يلي :

$$13\text{-cis-retinol } (\mu g/ml) = \frac{A_c/A_{sc} \times C_s \times D_F}{V_{sPI}}$$

حيث أن :

- . A_c = المساحة الكلية للفيتامين في الصورة سيس في العينة .
- . A_{sc} = المساحة الكلية للفيتامين في الصورة سيس في العينة القياسية.
- . C_s = تركيز العينة (مجم/مل) .
- . V = حجم العينة (مل) .
- . D_F = معامل التخفيف .

ب- طريقة ثلاثي كلوريد الأنتيمون *Antimony trichlorid method* : وهي طريقة لونية تعتمد قياس اللون الأزرق عند طول موجي 620 نانوميتر الناتج من تفاعل فيتامين "أ" مع ثلاثي كلوريد الأنتيمون في الكلوروفورم ، وبالرغم من إنخفاض شدة اللون الأزرق المتكون إلا أنه يكون ثابت لمدة طويلة ، وبالتالي يمكن الإعتماد عليه . وقد لوحظ أن درجة كثافة اللون الأزرق ذات علاقة خطية مع كمية الفيتامين الموجودة في العينة . ويمكن إيجاز هذه الطريقة (*Griffiths et al, 1933*) فيمايلي :

- زن 1 جم من العينة بدقة فى دورق معيارى سعة 10 مل ، ثم أنبها فى كمية من الكلوروفورم وأكمل حتى العلامة (10 مل) .
- إنقل 0.2 مل من محلول الزيت وأضف عليه 2 مل من محلول ثلاثى كلوريد الأنتيمون (30 % فى الكلوروفورم) مع التقليب الجيد .
- إقرأ الإمتصاص الضوئى للون المتكون على طول موجى 620 نانوميتر .
- يحسب كمية الفيتامين عن طريق منحنيات قياسية لفيتامين أ (A) .

ج- طريقة الجليسيرول دايكلوروهيدرين *Glycerol dichlorohydrin method*

وهى طريقة لونية تعتمد على قياس شدة اللون البنفسجى الناتج من تفاعل فيتامين 'أ' مع الجليسيرول دايكلوروهيدرين ، ويكون اللون المتكون ثابتا لمدة تتراوح من 2 - 10 دقائق . ويمكن إيجاز هذه الطريقة فى النقاط التالية (*Sobel and Werbin, 1947*) :

- ضع 2 - 5 ميكروجرام من الفيتامين (أو وزنة معلومة من العينة المراد قياسها) المذاب فى الكلوروفورم فى أنبوبة إختبار ، وأضف عليها 0.4 مل محلول جليسيرول دايكلوروهيدرين (2 % فى الكلوروفورم) .
- إخلط المحتويات جيدا ، ثم ضع الأنبوبة فى حمام مائى على درجة حرارة 25°م لمدة 1 - 1.5 ق .
- إقرأ الإمتصاص الضوئى للون الناتج على طول موجى 550 نانوميتر .
- أحسب كمية الفيتامين من المنحنيات القياسية للفيتامين النقى .

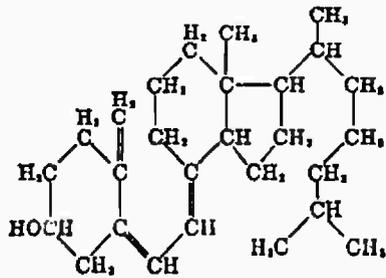
د- طريقة إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية *Ultraviolet absorption* :

لوحظ أن فيتامين أ (A) له القدرة على إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجى 328 نانوميتر ، أما الكاروتين فيقاس فى منطقة الضوء المرئى على طول موجى 450 نانوميتر . لذا إتخذت هذه الخاصية فى إستخدام الأشعة فوق البنفسجية فى تقدير فيتامين أ (A) . ويمكن تلخيص هذه الطريقة طبقا لطريقة *Zscheile and Henry* . 1942 .

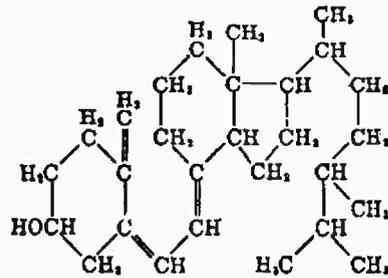
- زن 1 جم من العينة وضعها فى دورق معيارى سعة 100 مل .
- أذب العينة فى كحول أيزوبروبانيل ، وأكمل الحجم حتى العلامة بالكحول.
- خفف التركيز بحيث يتراوح تركيز الفيتامين فى المحلول بين 5 - 15 وحدة/مل .
- اقرأ إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية على طول موجى 328 نانوميتر بعد ضبط الجهاز بالبلانك .
- احسب تركيز الفيتامين من المنحنى القياسى للفيتامين النقى .

2.1.4.9. فيتامين " د " (المضاد للكساح) *Vitamin " D " (Antirachitic)* : تشتق مجموعة فيتامين " د " (د₂ ، د₃) من مولداتها الإستيرولية ، ومن أهم هذه الإستيرولات التى تعتبر من مولدات فيتامين " د " هى الإرجوستيرول *ergosterol* ، الكوليستيرول *cholesterol* فالإرجوستيرول من الإستيرولات النباتية وهو مولد لفيتامين " د₂ " والذى يطلق عليه " أرجوكالسيفرول *ergocalciferol* " وهو يوجد فى صورة متبلورة ودرجة ثباته منخفضة نظرا لتأثره بالضوء .

أما الكوليستيرول فهو من الإستيرولات الحيوانية وهو مولد لفيتامين (د₃) والذى يطلق عليه كوليالكالسيفرول *cholecalciferol* حيث يتحول الكوليستيرول إلى مركب نشط بفعل أشعة الشمس وهو 7-ديهيدروكوليستيرول ، وهو يوجد فى صورة صلبة متبلورة . ويوضح الشكل التالى الرمز البنائى لكل من فيتامين د₂ ، د₃ .



D3



D2

ويتولد فيتامين " د " فى الجسم من مولداته وهى الأرجوستيرول (مولد فيتامين د₃) ويوجد بكثرة فى النباتات وهو يكون حوالى 90 % من إستيرولات الخميرة ، والديهيدروكوليسيرول (مولد فيتامين د₃) ويوجد فى الحيوانات ويتكون فى العشاء المخاطى للأمعاء من الكوليستيروول ثم ينشط إلى فيتامين د₃ بفعل الأشعة فوق البنفسجية. ويكثر فيتامين " د " فى زيت كبد الأسماك مثل سمك التونة .

ومن أهم وظائفه أنه ينظم توازن الكالسيوم والفوسفور فى الجسم واللازم لتكوين العظام ، كما يعمل على زيادة إمتصاص الكالسيوم والفوسفور من الأمعاء . ويقال إمتصاص الكالسيوم والفوسفور من الأمعاء فى حالة نقص فيتامين " د " ، مما ينتج عنه مرض الكساح *rickets* عند الأطفال ومرض لين العظام *osteomalacia* عند الكبار .

ومن أهم الطرق المستخدمة فى تقدير فيتامين " د " (D) ما يلى :

أ- طريقة ثلاثى كلوريد الأنتيمون *Antimony trichloride method* : وهى طريقة لونية تعتمد على قياس اللون الأصفر الأرجوانى عند طول موجى 500 نانوميتر الناتج من تفاعل الفيتامين مع ثلاثى كلوريد الأنتيمون. ويمكن إيجاز هذه الطريقة كما أوضحها (Brockmann and Chen 1936) فيما يلى :

- خذ 0.2 مل من محلول العينة (بعد تصبئها) المراد قياسها فى أنبوبة إختبار، وأضف عليها 4 مل من محلول ثلاثى كلوريد الأنتيمون المشبع فى الكلوروفورم .

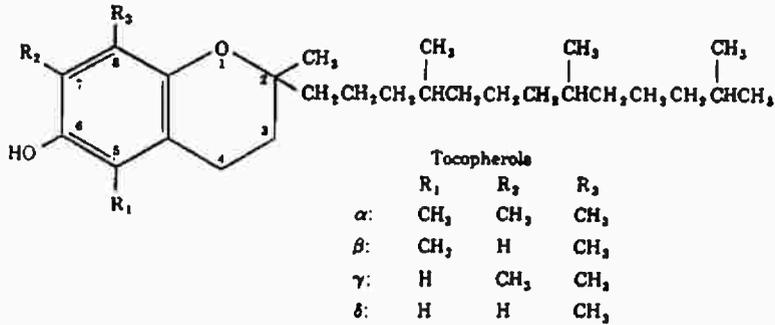
- إقرأ الإمتصاص الضوئى للون المتكون بعد 10-15 ق على طول موجى 500 نانوميتر ، ثم إحسب كمية الفيتامين عن طريق منحنيات قياسية لفيتامين " د " .

ب- طريقة الجليسيرول داىكلوروهيدرين *Glycerol dichlorohydrin method* وهى طريقة لونية تعتمد على قياس شدة اللون الناتج من تفاعل فيتامين " د " مع الجليسيرول داىكلوروهيدرين الذى يتحول إلى اللون الأخضر بعد 15 ق ، ويكون اللون المتكون ثابت لعدة ساعات ويقاس اللون عند طول موجى 625 نانوميتر (طريقة (Sobel et al, 1945) .

- بالإضافة للطرق السابقة فإن هناك طرق رسمية *AOAC* حديثة إستحدثت لتقدير فيتامين " د " (*D*) فى الأغذية المختلفة بأرقام 979.24 ، 975.42 ، 980.26 ، 981.17 ، 982.29 ، 985.27 . وسوف نتكلم عن إحدى هذه الطرق بإيجاز كما يلى :
- ج- الطريقة الرسمية *AOAC* رقم 975.42 لتقدير فيتامين " د " (*D*) :
- زن 1 جم من العينة وأضف عليه 10 مل (20 % أسكوريات الصوديوم) ، 25 مل كحول إيثايل + 20 مل بوتاسا كاوية 50 % .
- أجرى عملية تصبىن للمخلوط السابق لمدة 30 دقيقة فى وجود مكثف عاكس .
- برد محتويات الدورق وإفصل المواد الغير قابلة للتصبىن .
- جهز التخفيفات اللازمة وضع 2 مل من العينة بعد التخفيف فى أنبوبة القياس ، 5 مل من الجوهر الكشاف (ويتكون من محلولين (أ): إذابة 110جم من S_6Cl_2 فى 400 مل من CH_2ClCH_2Cl + 2 جم أومينا لا مائية ، إخلط واكمل الحجم إلى 500 مل بواسطة CH_2ClCH_2Cl (ب): إخلط 100 مل $AcCl$ مقطر + 400 مل من CH_2ClCH_2Cl وإحفظه فى مكان بارد . ويخلط 90 مل من المحلول (أ) مع 10 مل من المحلول (ب) فى زجاجة بنية اللون قبل الإستخدام ، ويكون هذا المخلوط صالح لمدة إسبوع) .
- سجل قراءة اللون الناتج بعد 45 ثانية على طول موجى 500 نانوميتر بعد ضبط الجهاز على البلائك (تولوين 20 % فى الأيزوأوكتان).
- إحسب تركيز الإنزيم فى العينة من المنحنى القياسى للفيتامين النقى .

3- فيتامين هـ (مضاد للعقم) *Vitamin E (Antisterility)* : هذا الفيتامين من الفيتامينات المضادة للعقم ، حيث لوحظ أنه بتغذية الحيوانات على أغذية كاملة تحتوى على دهون ، بروتينات ، وكربوهيدرات ، وفيتامين " أ " حدث إضطرابات فى الأجهزة التناسلية وكذلك عقم مستديم للذكور . وقد أمكن علاج ذلك بإعطاء الحيوانات زيت جنين الحبوب (خاصة جنين القمح) . وقد تم عزل أو فصل هذا الفيتامين من زيت جنين القمح وأطلق عليه التوكوفيرول *tochopherol* .

ويشتق هذا الفيتامين من مجموعة الكرومان ويوجد منه فى الطبيعة عدة أنواع وأهمها ألفا ، بيتا ، جاما ، دلتا توكوفيرول ، حيث يختلف بعضها عن البعض فقط فى عدد ومكان مجاميع الميثيل . ويوضح الشكل التالى الرمز البنائى لهذه التوكوفيرولات .



التوكوفيرولات

وتعتبر الزيوت النباتية من أغنى مصادره وخاصة زيت جنين القمح وزيت أجنة البنور الأخرى . وكذلك يوجد في الخس والفول السوداني ، ويحتوي زيت الأرز والقمح وفول الصويا على نسبة أقل مما يتواجد في زيت جنين القمح .

ويعتبر هذا الفيتامين من الفيتامينات المضادة للقمح ، بالإضافة إلى أنه مضاد للأكسدة (خاصة في الزيوت والدهون) ، كما يقوم بحماية كرات الدم الحمراء ، ويمنع حدوث الـ *hemolysis* بواسطة بعض المواد المؤكسدة . ويحتاج الإنسان البالغ حوالي 30 مجم من مخلوط التوكوفيرولات يوميا . ومن أهم طرق تقديره ما يلي :

أ- الطريقة الكيميائية *Chemical method* : تعتمد هذه الطريقة على إختزال أيونات الحديدية بواسطة التوكوفيرولات وتقدير أيونات الحديدوز الناتجة والتي تعطى لون أحمر مع *α-α dipyridyl* ويمكن إيجاز خطوات إجراء هذا الإختبار فى النقاط التالية (Kauntiz and Beaver ,1944):

- صبن 1 جم زيت كما سبق ، ثم إستخلص المواد غير المتصينة وجففها كما سبق.

- أضف على المواد غير المتصينة المتحصل عليها 5 مل من البنزين وضعها فى عمود كروماتوجرافى يحتوى على *Floridin XS* لإزالة الكاروتينات (حيث يلاحظ أن مادة الإنمصاص تعطى لون أزرق مخضر فى وجود الكاروتينات ، لون أزرق فى وجود فيتامين "أ" .

- ضع العينة بعد تنقيتها فى ورق معيارى سعة 25 مل ، أضف عليها 1 مل من 0.2 % كلوريد حديدك فى الإيثانول وإخلط جيدا ، ثم أضف 1 مل 0.5 % (*α-α dipyridyl* فى الإيثانول) وإخلط جيدا ثم أكمل الحجم إلى العلامة بواسطة كحول الإيثانول .

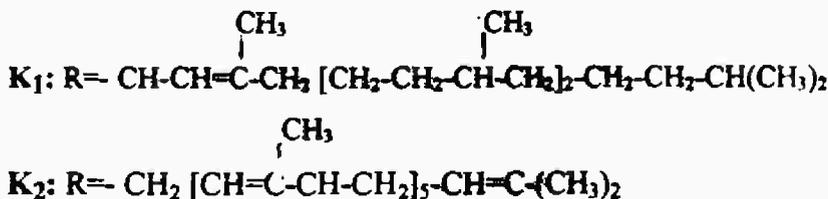
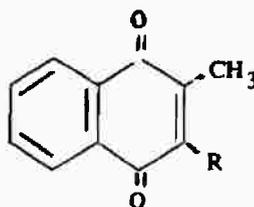
- أترك العينة لمدة 10 - 15 ق وقارن اللون الناتج على طول موجى 520 نامومتر . ثم قدر محتوى العينة من الفيتامين بواسطة المنحنيات القياسية للفيتامين النقى .

ب- تقدير فيتامين *H* (*E*) باستخدام كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى *HPLC* وتعتمد هذه الطريقة على تصبن العينة وفصل المواد الغير قابلة للتصبن وبعد تنقية المستخلص تحقق العينة المستخلصة فى جهاز الـ *HPLC* . ويمكن إيجاز تلك الطريقة كما أوضحها *Hashim* وآخرون سنة 1993م فيما يلى :

- خذ وزن مناسبة من العينة (10جم) وإجرى لها عملية تصبن كما سبق مع إضافة 10 مل من محلول 6 % بيروجالول كمضاد للأكسدة أثناء التصبن .

- إستخلص المواد الغير قابلة للتصين بالهكسان المحتوى على (0.1 % BHT) ، ثم أضف 0.5 جم كبريتات مغنيسيوم على المستخلص ورج جيدا ، ثم رشح المستخلص ، خفف الناتج إلى التخفيف المناسب بالهكسان .
- إحتن بعد ذلك 20 ملليمكرون فى جهاز الـ HPLC وإحسب تركيز الفيتامين عن طريق العينة القياسية من الفيتامين النقى .

4.1.4.9. فيتامين " ك " (مضاد للنزيف) (*Vitamin K (Antihemorrhagic)*) : وهو مضاد للنزيف وتم عزله من البرسيم الحجازى وبعض الأسماك المتحللة وله أهمية كبيرة فى عمليات التمثيل الغذائى . ويوجد منه نوعان ك₁ (K₁) ، ك₂ (K₂) . وفيتامين " ك " (K) يعتبر أحد مشتقات النافثوكوينون *naphthoquinone* ، كما لوحظ أن هناك بعض المركبات الأخرى لها خواص مشابهة لخواص فيتامين " ك " (K) أطلق عليها اسم ميناديون *Menadion* . ويوضح الشكل التالى التركيب البنائى لكل من فيتامين ك₁ (K₁) ، ك₂ (K₂) .



ومن أهم وظائفه تكوين أو تخليق البروثرومبين *prothrombin* اللازم لتجلط الدم من خلايا الكبد ، ولكن ميكانيكية عمل هذا الفيتامين غير معروفة بالضبط ويعتقد أنه ربما يستخدم كإنزيم مرافق *co-enzyme* للإنزيم اللازم لتكوين البروثرومبين من خلايا الكبد. كما يعتبر هذا الفيتامين أحد المكونات الهامة في عمليات الفسفرة البيولوجية أثناء عمليات التمثيل الضوئي في النباتات الخضراء . ولا توجد نسبة محددة منه في غذاء الإنسان في الظروف الفسيولوجية الطبيعية وذلك نتيجة تخليقه من بكتريا الأمعاء . ولكن في بعض الظروف المسببة لنقص الفيتامين يجب إضافته من مصادر خارجية حوالى 1 - 2 مجم من الميناديون إلى الغذاء يوميا .

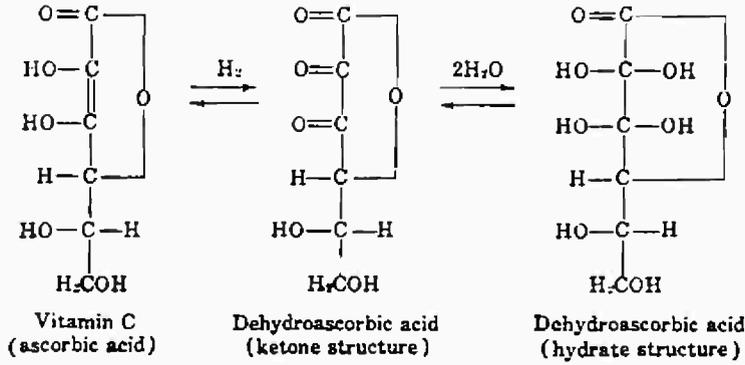
وتعتمد طريقة تقديره (Menotti 1942) على تفاعل مستخلص الفيتامين من العينة مع 4,2- ثنائي نيتروفينيل هيدرازين *2,4-dinitrophenyl hydrazine* فيتكون لون أزرق أو أزرق مخضر في وجود أمونيا كحولية ، واللون الناتج يمكن قياسه ومقارنته مع المنحنيات القياسية للفيتامين النقي .

2.4.9. الفيتامينات الذائبة في الماء *Water soluble vitamins* :

1.2.4.9. فيتامين ج (حامض الأسكوربيك) *Vitamin C (ascorbic acid)* :

يعتبر فيتامين ج (حامض الأسكوربيك) من الفيتامينات المضادة لمرض الأسقربوط لذا يطلق عليه *antiscorbutic vitamin* . ومن أعراض مرض الأسقربوط حدوث آلام في المفاصل وتأخر إلتام الجروح ، حدوث نزيف في الأغشية المخاطية للقم والقناة الهضمية ، وتناثر اللثة وتلتهب وتصبح حمراء متقرحة .

ويعتبر فيتامين ج (حامض الأسكوربيك) مشتقا من سكر الـ *L-glucose* لذا يطلق عليه اسم لاكتون ثنائي-كيتو-جلوكونيك كما هو موضح فيما يلي :



وترجع الخواص الحامضية لحامض الأسكوربيك (الذي لا يحتوى على مجموعة كربوكسيل حرة ، كما هو واضح من الرمز البنائى له) إلى تفكك هيدروجين المجموعة الهيدروكسيلية المتصلة بذرة الكربون الثالثة . وفيتامين ج عبارة عن بلورات عديمة اللون وذات طعم حامضى ، تذوب فى الماء والكحول ولكنها لا تذوب فى المنزيات العضوية. وتحتوى النباتات الطازجة على إنزيم *ascorbic acid oxidase* الذى يعمل على أكسدة حامض الأسكوربيك .

ومن أهم مصادر هذا الفيتامين الخضروات والفواكه الطازجة وخاصة الموالح مثل الليمون والبرتقال والفراولة والطماطم والجوافة والبقدونس والفلل الأخضر... إلخ . وتعتبر البذور الجافة خالية من هذا الفيتامين ولكن عند إنباتها يظهر الفيتامين حيث أن الإنبات يساعد على تكوين حامض الأسكوربيك . ويؤدى نقص هذا الفيتامين إلى حدوث الإصابة بمرض الإسقربوط كما سبق أن ذكرنا .

ومن أهم وظائفه أنه يلعب دورا مهما فى نقل الهيدروجين فى عمليات الأكسدة والإختزال ، كما يلعب دورا مهما فى ميتابوليزم الأحماض الأمينية ، وتكوين الهرمونات والمساعدة على إلتئام الجروح ، بالإضافة إلى أنه يلعب دورا هاما فى تكوين الكولاجين وضرورى لتكوين العظام . ويحتاج الجسم منه حوالى 50 - 70 مجم للإنسان البالغ ، 30 - 75 مجم للأطفال . وهناك عدة طرق لتقدير هذا الفيتامين نذكر منها ما يلى :

أ- طريقة المعايرة باليود *Iodine titration method* :

تستخدم هذه الطريقة (Bessy and King, 1933) في تقدير فيتامين ج لعصائر الفاكهة والطماطم ، حيث يتم إستخلاص العصير من المادة الخام ويجرى عليه عمليات التنقية المختلفة (التصفية والترشيح) ويمكن توضيح هذه الطريقة فيما يلي :

- إنقل 5 مل من العصير المجهز في دورق سعة 250 مل .
- أضف 20 مل ماء مقطر + 2 مل (1 % دليل نشا) .
- عاير محتويات الدورق بسرعة بواسطة محلول يود 0.01 ع (في 16جم يويد بوتاسيوم /لتر) .
- إحسب كمية الفيتامين بالمليجرام على أساس أن كل 1 مليلتر من محلول اليود المستخدم في التعادل يكافئ 0.88 مجم حامض أسكوربيك .

ويجب في هذه الطريقة أن تتم المعايرة بسرعة حتى لاتتدخل مركبات أخرى في التفاعل مثل الجلوتاتيون والسستين ، حيث أنها تتأكسد ببطء بواسطة محلول اليود ، لذا وجب هنا إجراء التقدير بسرعة حتى يمكن الحصول على نتائج صحيحة .

ب- طريقة الصبغة *Dye method* :وهي طريقة رسمية (AOAC برقم967.21.45) تعتمد هذه الطريقة على إستخلاص المادة المراد تقدير الفيتامين فيها بواسطة حمض الميتافوسفوريك أو حامض الأوكساليك ، ثم يتم إختزال صبغة 6,2 داى كلوروفينول إندوفينول(2,6-dichlorophynolindophynol) بواسطة الفيتامين الموجود في العينة المراد إختبارها ، حيث يتحول لون الصبغة من اللون الأزرق إلى عديم اللون ، ثم إلى اللون الوردي عند إنتهاء الفيتامين في الوسط الحامضي. وهذا يدل على إنتهاء التفاعل . ويمكن حساب كمية الفيتامين عن طريق كمية وقوة الصبغة المستخدمة في عملية التقدير. ويمكن إيجاز هذه الطريقة كما يلي :

- زن وزنة معينة من العينة المراد تقدير الفيتامين فيها ، ثم إستخلصها بكمية مساوية لها من حامض الميتافوسفوريك 3 % أو حامض أكساليك 2 % . إخلط العينة في خلاط وجنسها جيدا حتى نحصل على مخلوط متجانس .
- إنقل المخلوط إلى دورق معيارى معلوم الحجم ، وأكمل إلى العلامة بواسطة حامض الأكساليك 1 % .

- رشح العينة ، وخذ منها حجم معلوم وضعه فى بورق مخروطى سعة 250 مل .
- عابر العينة بواسطة الصبغة (2,6-داى كلوروفينول إندوفينول) معلومة القوة حتى الحصول على اللون الوردى .

- أحسب كمية الفيتامين بالمليجرام /100 جم عينة كما يلى :

كمية فيتامين ج (مليجرام/100 جم) = حجم الصبغة x قوتها

ويمكن حساب قوة الصبغة كما يلى :

* حضر محلول قياسي من حمض الأسكوربيك بحيث يحتوى الـ 5 مل منه على 1 مليجرام من الفيتامين .

* عابر محلول الفيتامين بواسطة الصبغة حتى ظهور اللون الوردى وثباته لمدة 15 ثانية . وفى هذه الحالة فإن حجم الصبغة المستهلكة فى معايرة الـ 5 مل من محلول الفيتامين تكافئ 1 مليجرام من الفيتامين .

* إذن قوة الصبغة يعبر عنها بكمية الفيتامين بالمليجرام الذى إستهلك 1 مل من الصبغة ، أى أن :

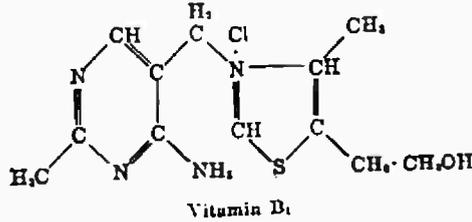
قوة الصبغة = كمية الفيتامين المعيارية (1 مليجرام) / حجم الصبغة المستهلكة

2.2.4.9. مجموعة فيتامين ب المعقدة *Vitamin B complex* : وتشمل هذه المجموعة

على العديد من الفيتامينات نذكر منها مايلى :

* فيتامين ب₁ (الثيامين) *Vitamin B₁ (Thiamine)* : يسمى هذا الفيتامين

بالفيتامين المضاد للبريبرى *anti-beriberi* يعتبر هذا الفيتامين أول الفيتامينات التى أمكن الحصول عليها معمليا فى صورة بلورات ، وله إمتصاص ضوئى فى مجال الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجى 235 - 267 نانومتر فى المحاليل المتعادلة والقلوية ، أما فى المحاليل الحامضية فيمتص الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجى 246 نانومتر . ويحتوى تركيبه الكيميائى على حلقة بيريميدين *pyrimidine* وحلقة ثيازول *thiazole* كما هو موضح فى الشكل البنائى التالى :



ونظرا لإحتواءه على ذرة كبريت لذا فإنه يسمى كيميائيا بالثيامين (حيث جاء من الكلمة اليونانية ثيو أى كبريت) . ويتحول هذا الفيتامين إلى الثيوكروم *thiochrome* وهو مركب ذو لون أزرق له خاصية إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية . ويعرف فى أوروبا بإسم أنيورين *Anurin* .

وينتشر هذا الفيتامين بكثرة فى المملكة النباتية ويوجد بأعلى تركيز فى البنور والأوراق والجنور والسيقان والثمار . كما يتواجد أيضا فى أجنة الحبوب ، البيض ، اللحوم والكبد ، والخميرة . وينشأ عن نقص هذا الفيتامين وقف النمو والتهاب الأعصاب الممتد *polynuritis* والمعروف بالبرى برى ، وكذلك ضمور العضلات وفقدان الشهية. ومن أهم طرق تقدير هذا الفيتامين مايلى :

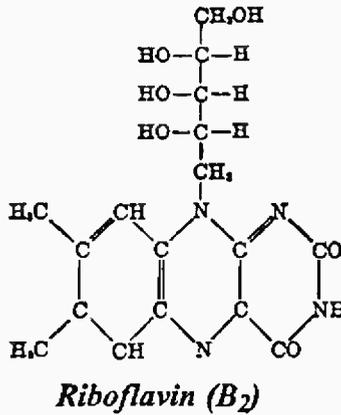
أ- طريقة الثيوكروم *Thiochrom reaction method* : تعتمد هذه الطريقة على قياس الوميض الناتج من الصورة المؤكسدة للثيامين ، وهى طريقة رسمية *AOAC* برقم 942.23.45.1.05 ويتم أكسدة الثيامين بواسطة حديدى سيانيد البوتاسيوم *potassium ferricyanide* منتجا الثيوكروم ذو اللون الأزرق الذى يمكن قياسه على طول موجى 365 نانوميتر ،ويمكن حساب تركيز الفيتامين عن طريق المحاليل القياسية للفيتامين النقى.

ب- طريقة الدايتزو *Diazo method* : تعتمد هذه الطريقة (*Prebluda and McCollum, 1936*) على تكوين مركب غير ذائب ناتج من تكثيف فيتامين *B1* ومركب الـ *diazotized* (الذى يتكون من تفاعل الـ *p-aminoacetanilide*

مع حامض النيتريك) ويعطى لون إرجواني محمر ثابت لا يذوب في الماء يمكن قياسه .

ج- طريقة التخمر *Fermentation method* : تعتمد هذه الطريقة على قياس كمية ثاني أكسيد الكربون CO_2 الناتجة من تخمر الدكستروز مع محلول الفيتامين المستخلص . وتستغرق فترة إجراء الإختبار حوالي 3 ساعات ، وقد وجد أن هناك علاقة طردية بين كمية الفيتامين وثاني أكسيد الكربون الناتجة (Schultz et al, 1937).

• **فيتامين ب₂ (الريبوفلافين) Vitamin B₂ (Riboflavin)** : وهو عبارة عن مادة بللورية ذات لون برتقالي مصفر وله وميض أصفر مخضر ، ومحاليله أكثر ثباتا في الأوساط الحامضية عنها في الأوساط القلوية ، كما يتحلل بسرعة إذا تعرض للضوء . ويشق أساسا من الأيزولوكسازين *isolocazine* الذى يحتوى على حلقة بنزول ، بيرازين ، وبيريميدين ، كما هو موضح فى الشكل البنائى التالى :



ويوجد هذا الفيتامين بكثرة فى جميع الخلايا النباتية والحيوانية ، كما يوجد بنسبة كبيرة فى الخميرة والكبد والبيض واللبن ، ويجد أيضا فى الحبوب الكاملة غير المنزوعة القشور . وينتج عن نقص هذا الفيتامين حدوث التهابات فى الفم واللثة وإحمرار اللسان ، كما يحدث أيضا التهابات فى الجلد وتشققه . ومن أهم وظائفه أنه يعمل كمراقب إنزيمى فى كثير من التفاعلات الحيوية وخاصة تفاعلات الأوكسدة والإختزال .

ومن أهم طرق تقدير فيتامين ب₂ (B₂) الطريقة الفلورومترية *fluorometric* وهي طريقة رسمية AOAC برقم 970.65.45.1.08 . كما أن هناك أيضا الطريقة الميكروبيولوجية *Microbiological method* وهي طريقة رسمية AOAC تحت رقم 940.33 وتعتمد على إستخدام بكتريا حمض اللاكتيك ، والتي لا تستطيع أن تخلق الريبوفلافين ، ولذلك فهي تحتاجه دائما في نموها وقد إتخذت هذه الخاصية أساسا لتقدير هذا الفيتامين ، حيث تتناسب كمية الريبوفلافين المضافة إلى الغذاء طرديا مع نمو البكتريا .

وعموما فإن الفيتامينات القابلة للذوبان في الماء يفقد منها كميات كبيرة أثناء عمليات التجهيز (في ماء الطبخ) لذا يجب الأخذ في الإعتبار الطرق الصحيحة في معاملة أو تجهيز الأغذية الطازجة حتى يمكن الحفاظ على أكبر قدر من الفيتامينات ممكن دون فقد.

5.9. التحليل الكروماتوجرافي للفيتامينات *Chromatographic Analysis of Vitamins*

يعتبر التحليل الكروماتوجرافي للفيتامينات من الطرق الحديثة والسريعة والتي عن طريقها الحصول على نتائج دقيقة لمحتوى الأعية من الفيتامينات المختلفة . وسوف نتكلم عن أهم الطرق الكروماتوجرافية المختلفة المستخدمة في فصل وتقدير الفيتامينات من الأغذية المختلفة .

1.5.9. تقدير الفيتامينات بالعمود الكروماتوجرافي :

Determination of vitamins by column chromatography:

يتم الفصل بهذه الطريقة بإستخدام الفصل بالعمود الكروماتوجرافي السائل (LC) *liquid column chromatography* . وتعتمد كفاءة عملية الفصل بهذه الطريقة على نوع مادة الإدمصاص *adsorptant* ، وحجم الجزيئات *particle size* ، درجة الحرارة ، زمن خروج المواد المفصولة (الفيتامينات) ، ومعدل الخروج *elution rate* . وتعتبر هذه الطريقة أولى الخطوات في التحليل الكروماتوجرافي للفيتامينات ، حيث يتم عن

طريقها الحصول على محلول الفيتامينات في صورة نقية قبل تقديره بالطرق الكروماتوجرافية الأخرى (*HPLC ، GLC ، TLC ، paper*) .

وقد إستخدمت هذه الطريقة في فصل الفيتامينات الذائبة في الدهون ومولداتها من الأغذية المختلفة ، حيث أن معظم هذه الفيتامينات يجرى عليها عملية تحلل *hydrolyzed* (تصبن *saponification*) قبل وضعها في العمود الكروماتوجرافي ، إلا إذا كانت على صورة إسترات . أما الفيتامينات الذائبة في الماء والمرتبطة بالأنسجة (نباتية أو حيوانية) فلا بد من إجراء عملية تحليل إنزيمي (*enzyme hydrolysis*) لها لفصلها عن باقي الأنسجة المختلفة . ومن أهم المواد المستخدمة كمواد إدمصاص هي : الألومينا *alumina* ، سليكات المغنيسيوم *magnesium silicate* ، سليكا جيل *slica gel* أو السيفاديكس *sephadex* .

وبعد فصل الفيتامينات بواسطة العمود الكروماتوجرافي ، يمكن التعرف عليها بالطرق اللونية أو الطرق الضوئية أو بالطرق الإسبكتروفوتومترية .

2.5.9. تقدير الفيتامينات باستخدام الورق الكروماتوجرافي :

Determination of vitamins by paper chromatography:

يستخدم في هذه الطريقة ورق كروماتوجرافي (عبارة عن ألياف زجاجية -*Glass-fiber* على صورة ورقة رقيقة أو على صورة شريط *sheet*) ، حيث تغطي *impregnated* بواسطة طبقة رقيقة من كربونات الزنك *zinc carbonate* أو الألومينا *alumina* أو زيت البارافين إلخ . ويتم عملية الفصل إما في إتجاه واحد -*single-dimensional* أو في إتجاهين *two-dimensional* .

ونظرا لأن عملية الفصل هنا تتم في جو مفتوح ، لذا يجب أخذ الإحتياطات اللازمة لعدم حدوث أكسدة للفيتامينات ويتم ذلك عن طريق إضافة مواد مضادة للأكسدة للمحاليل أو المذيبات المستخدمة في عملية الفصل .

وتستخدم هذه الطريقة كطريقة وصفية أكثر منها كمية ، ويتم التعرف على الفيتامينات المفصولة عن طريق رش الورقة بجوهر كشاف يعطى لون مع الفيتامينات المفصولة والتي يمكن قياسه بإحدى الطرق اللونية (قياس الكثافة الضوئية *densitometry* أو

spectrophotometry ، *colorimetry*) أو يمكن التعرف عليها أيضا عن طريق حساب الـ R_f ومقارنتها بالفيتامينات القياسية *standard vitamins* .

3.5.9. تقدير الفيتامينات بالطبقة الرقيقة :

Determination of vitamins by thin layer chromatography(TLC):

تعتبر هذه الطريقة أكثر شيوعا من طريقة الفصل باستخدام الورق الكروماتوجرافي ، وقد وجد أن نسبة الفيتامينات الذائبة في الدهون إلى نسبة الفيتامينات الذائبة في الماء والمقدرة بهذه الطريقة كانت كنسبة 7 : 1 . بالإضافة إلى أن أكثر من نصف الفيتامينات الذائبة في الدهن والتي تم فصلها بهذه الطريقة كانت عبارة عن توكوفيرولات (*vitamin E*) . وقد يتم الفصل باستخدام هذه الطريقة في إتجاه واحد أو في إتجاهين . وسوف نتكلم باختصار عن فصل بعض الفيتامينات بهذه الطريقة :

1.3.5.9. الفيتامينات القابلة للذوبان في الدهون *Fat-soluble vitamins* :

معظم هذه الفيتامينات والموجودة في المادة الغذائية يجب أن يجرى لها عملية تحلل (*saponification*) ، ثم فصل الجزء الغير قابل للتصين وتقدير الفيتامينات فيه بواسطة التحليل الكروماتوجرافي . أما فيتامينات *A* ، *D* ، *E* والموجودة في الأنسجة الحيوانية فيمكن تقديرها بطريقة نصف كمية *semiquantitavely* بدون إجراء عملية التحلل ، حيث أن عملية التحلل لا تجرى في جميع الأحوال وخاصة إذا كانت الفيتامينات المراد فصلها وتقديرها في صورة إسترات .

ويتم فصل فيتامين *E* (التوكوفيرولات *tocopherols*) ، فيتامين *D* بعد تنقيتها على العمود الكروماتوجرافي بواسطة الفصل على الطبقة الرقيقة (الواح سليكا جيل) ، وقد يتم الفصل في إتجاه واحد أو في إتجاهين .

وقد أمكن فصل الفيتامينات الذائبة في الدهن من المواد الغذائية المحتوية على أكثر من فيتامين واحد باستخدام الطبقة الرقيقة العالية الأداء (*high-performance thin layer chromatography*) ، وفيها يتم استخدام ألواح زجاجية مغطاه بمادة إدمصاص ناعمة جدا (دقيقة الجزيئات) لتعطي فصل جيد ودقيق في وقت قصير . وعموما فإنه بعد عملية الفصل بواسطة هذه الطريقة يتم رش الألواح بجوهر

كشاف يعطى لون مميز للفيتامينات المفصولة والتي يمكن بتقدير شدة لونها معرفة تركيزها من خلال منحنيات قياسية .

2.3.5.9. الفيتامينات القابلة للذوبان في الماء *Water-soluble vitamins* :

أمكن فصل وتقدير الفيتامينات الذائبة في الماء والموجودة في الأغذية المختلفة بواسطة الفصل على الطبقة الرقيقة *TLC* . حيث يتم الإستخلاص عادة بطحن أو خلط العينات الغذائية بالماء أو محلول حامضى ضعيف أو بواسطة محاليل منظمة ، كما يمكن إجراء تحلل إنزيمى كجزء من عملية الحصول على الفيتامينات فى صورة حرة يمكن تقديرها . فعلى سبيل المثال يقدر حامض الأسكوربيك فى الأغذية بعد أكسدته إلى الأوسازون *osazones* ثم يوضع على لوح الفصل . أما الثيامين *thiamin* ، الريبوفلافين يمكن فصلهما على الألواح الزجاجية المغطاه بالسليكا جيل وتقديرها بإستخدام الإسبكتروفوتومتر *spectrophotometrically* .

4.5.9. تقدير الفيتامينات بإستخدام كروماتوجرافيا الغاز السائل :

Determination of vitamins by gas liquid chromatography:

تعتبر هذه الطريقة من الطرق الحديثة والدقيقة التى يمكن إستخدامها فى تقدير الفيتامينات بعد فصلها وتفتيتها بإستخدام العمود الكروماتوجرافى ، *TLC* . وسوف نتكلم عن الصور المختلفة التى يتم عن طريقها تقدير الفيتامينات بإستخدام جهاز الـ *GLC* :

1.4.5.9. الفيتامينات الذائبة فى الدهن *Fat-soluble vitamins* :

لإجراء تحليل الفيتامينات الذائبة فى الدهن بإستخدام هذه الطريقة ، لابد من تحويلها إلى صورة أكثر ثباتا من الصورة الطبيعية للفيتامين نفسه . وعليه فيقدر فيتامين *A* ، فيتامين *D* فى صورة ترائى ميثيل سيليل *trimethylsilyl* ، بعد إجراء عمليات التنقية المختلفة بإستخدام العمود الكروماتوجرافى أو كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة الـ *TLC* . أما فيتامين *E* (التوكوفيرول) والذى يتواجد بكميات صغيرة جدا فى المواد الغذائية فإنه يمكن تقديره بإستخدام كروماتوجرافيا الغاز السائل بعد إستخلاصه من المادة الغذائية وتفتيته ، ثم تحويله إلى مشتقات *derivatives* أكثر ثباتا من الفيتامين الأصيلى ثم حقنه مباشرة فى الجهاز . وقد أوصت بعض الأبحاث الحديثة أنه ليس من الضرورى إجراء

عملية تحويل التوكوفيرولات إلى مشتقات أكثر ثباتاً ، بل يمكن حقنها مباشرة في الجهاز . أما في حالة تقدير التوكوفيرولات (خاصة الألفا توكوفيرول) والتي تتواجد بنسب صغيرة جدا في الأنسجة الحيوانية فيجب تجفيفها بواسطة التجفيد ثم إجراء عملية *silylation* لها ثم تحقن مباشرة في الجهاز . أما فيتامين *K* فيقدر بعد إستخلاصه من المادة الغذائية بواسطة كحول الميثانول وحقنه مباشرة في الجهاز .

2.4.5.9. الفيتامينات الذائبة في الماء *Water - soluble vitamins* :

عند تقدير فيتامين *C* بهذه الطريقة ، لايد من إستخلاص الفيتامين من العينة الغذائية بواسطة 5 % حامض الميتافوسفوريك *metaphosphoric acid* أو الميثانول حتى يتكون مشتق الـ *trimethylsilyl* ، وقد يتم إجراء عملية تنقية للمستخلص بواسط العمود الكروماتوجرافي أو يمكن حقنها مباشرة في الجهاز .

أما مجموعة فيتامين *B* فتقدر على أساس الثيامين المنفرد بعد عملية التحلل الإنزيمي والحصول على السيازول والذي يمكن فصله على عمود يحتوي على *chromosorb G* والمغطى بواسطة *Triton X-305* 3 % .

5.5.9. تقدير الفيتامينات بواسطة كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالي:

Determination of vitamins by High performance liquid chromatography (HPLC):

تتميز طريقة الـ *HPLC* بدقتها العالية ، وسرعة الإنجاز . وتعتبر من أحدث الطرق الكروماتوجرافية في التحليل الكيميائي . وسوف نتكلم بإختصار عن فصل الفيتامينات المختلفة بهذه الطريقة :

1.5.5.9. الفيتامينات الذائبة في الدهون *Fat-soluble vitamins* :

تختلف طريقة تقدير الفيتامينات الذائبة في الدهن بإختلاف المادة الغذائية المراد تحليلها ، وكذلك طريقة تجهيز العينة للحقن ، فمثلا عند تقدير فيتامين *A* ، *K* في أغذية الحيوانات (*feed*) ، يجرى إمرار المواد الغير قابلة للتصين على عمود كروماتوجرافي يحتوي على مادة إدمصاص $(NH_4)2CO_3$ تعرف بالـ *Spherisorb* ، ويتم الفصل هنا بواسطة الميثانول 3 % ، ثم تقدر مباشرة في الجهاز بدون أى عمليات تنقية أخرى . أما

في حالة تقدير فيتامين *A* في المارجرين ، فتم عملية الفصل (سواء كانت العينة متصبنة أو غير متصبنة) أولاً على *reversed phase column* .

ويتم تقدير فيتامين *D* في الأغذية فيتم على العينة سواء كانت متصبنة أو غير متصبنة ، ومعظم طرق التقدير تعتمد على العديد من الإحتياطات الواجب مراعاتها عند التقدير قبل حقنها في الجهاز . فبعض الطرق المستخدمة في تقدير فيتامين *D* تعتمد على إجراء عملية التصبن ، ثم تنقية المواد الغير قابلة للتصبن باستخدام العمود الكروماتوجرافي المحتوى على السليكا جيل قبل فصلها في الجهاز ، كما يجب إضافة مضادات الأكسدة أثناء عملية الإستخلاص ، وتستخدم هذه الطريقة في تقدير فيتامين *D* في اللبن ومنتجاته ، والمارجرين ... وغيرها .

ويقدر فيتامين *E* في الألبان المكثفة وبدلها بإجراء عملية التصبن وفصل المواد الغير قابلة للتصبن بواسطة محلول حامض الأسكوربيك والميثانول ، ثم يتم الإستخلاص بالإيثر ، ثم ترسب الإستيروولات على درجة حرارة - 20°م ثم يتم تقدير التوكوفيرولات بواسطة الـ *HPLC* .

2.5.5.9. الفيتامينات الذائبة في الماء *Water soluble vitamins* :

عند تقدير الفيتامينات الذائبة في الماء بواسط الـ *HPLC* يجب إجراء عمليات تنقية مختلفة على العينات قبل حقنها في الجهاز . فمثلاً عند تقدير فيتامين ج في العينة الغذائية يجب إجراء عملية إستخلاص للفيتامين بواسطة محلول حامض الميتافوسفوريك أو الماء ، ثم تجرى بعد ذلك عملية طرد مركزي للعينة أو ترشيح دقيق ، ثم يتم تقديرها بواسطة الـ *HPLC* .

ومن ناحية أخرى فقد تم تقدير الفيتامينات في الأغذية المدعمة بواسطة الثيامين والريبوفلافين ، حيث تم إستخلاص (الفيتامينات) من العينة بواسطة 0.1 ع *HCL* في الأوتوكلاف ، ثم أجرى للعينة بعد ذلك طرد مركزي وترشيح ، بعد ذلك تم حقنها في جهاز الـ *HPLC* المزود بعمود فصل من نوع الـ *Bodapak C18 reverse phase column* باستخدام 12.5 % أسيتونيتريل ، 85.5 % محلول الفوسفات المنظم *M 0.01* الذي يحتوى على كميات صغيرة من *sodium heptane sulfonic acid* .

6.9. أسئلة

- 1- تختلف طرق إستخلاص الفيتامينات باختلاف نوع الفيتامين المراد تقديره وكذلك نوع المادة الغذائية . وضح ذلك .
- 2- أذكر أهم مولدات الفيتامينات *provitamins* الآتية :
* فيتامين أ (A) * فيتامين د (D) * فيتامين هـ (E) * فيتامين ك (K)
- 3- لماذا سمي فيتامين ب1 (B1) بالثيامين ؟
- 4- أذكر الأساس العلمي في تقدير الفيتامينات بالطرق المختلفة الآتية :
- فيتامين أ (A) بطريقة ثلاثى كلوريد الأنتيمون .
- فيتامين ج (C) بطريقة الصبغة (2،6- داي كلوروفينول إندوفينول) .
- فيتامين هـ (E) بالطريقة الكيميائية .
- فيتامين أ (A) بواسطة الـ HPLC .
- 5- قارن بين كل من الـ HPLC ، HPTLC في فصل الفيتامينات المختلفة .
- 6- ماهى الإحتياطات الواجب مراعاتها عند فصل وتقدير الفيتامينات بالطرق الكروماتوجرافية ؟
- 7- لماذا يطلق على فيتامين ج (C) اسم لاکتون ثنائى-کيتو-جلوكونيك ؟
- 8- ما هى الأمراض التى تنشأ نتيجة نقص الفيتامينات فى غذاء الإنسان ؟

7.9 المراجع REFERENCES

- AOAC International . 1995. Official Methods of Analysis . 16th ed. AOAC International, Gaitherssburg, MD.*
- Chang, S.K.C. 1998. Protein Analysis chapter 18 in: Food Analysis 2nd ed. S.Suzanne Nielsen. An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.*
- Frutton, J. and Simmonds, S. 1953. General Biochemistry. Copyright by John Wiley & Sons, Inc. New York ,London Chapman & Hall, Limited*
- Hart, F.L. and Fisher, H. J. 1971. Modern Food Analysis . Springer-verlag. New York, Heidelberg Berlin.*
- Hashim, I.B., Koehler, P.E., Eitenmiller, R.R. and Kuien, C.K. 1993. Fatty acids composition and tocopherol content of drought stressed florunner peanuts. Peanut Science, 20: 21 – 24 .*
- Jacobs, M.B. 1962. The chemical analysis of food and food products. 3rd ed. D.Van Nastrand, Toronto, New York, London.*
- Sobel and Werlin .1947. Anal., Chem. 19 : 107.*