الباب السادس

تحليل الكربوهيدرات

أ.د/ إبراهيم محمد حسن
أستاذ علوم وتكنولوجيا الأغذية
كلية الزراعة جامعة عين شمس

الباب السادس
6. تحليل الكربوهيدرات
Carbohydrate Analysis

تعد الكربوهيدرات من المصادر الرئيسية للطاقة التى يحصل عليها الإنسان من غذائه ، ولها صفاتها الطبيعية ودورها الوظيفى الهام فى المنتجات الغذائية كما تلعب دورا حيويا فى العمليات الفسيولوجية فى جسم الإنسان . وتمثل الطاقة التى يحصل عليها الإنسان من الكربوهيدرات وحدها ، على مستوى العالم حوالى 70 % ، وينصح تغذويا أن يكون النشا هو المصدر الرئيسى للطاقة التى يحصل عليها الإنسان من الكربوهيدرات .

وتكسب الكربوهيدرات الأغذية صفات عديدة تشمل الحجم ، والشكل ، واللزوجة ، والثبات الإستحلابى ، وثبات الرغوة ، كما تزيد من قدرتها على الإرتباط بالماء ، وتعمل على إحتفاظ الأغذية بثباتها عند تسييحها بعد تجميدها . وللكربوهيدرات أيضا دورها الهام فى روائح ونكهات الأغذية ، بالإضافة لما تضيفه على الأغذية من صفات القوام ، فقد يكون قوام الغذاء هشا ، أو صلبا ، أو جافا أو ناعما أو حتى على صورة قوام جيلى . وتساهم الكربوهيدرات أيضا فى إحساس الإنسان بالشبع . وتستخدم مركبات كربوهيدراتية كالسكريات الأحادية والثنائية كمحليات طبيعية ، كما تعتبر المركبات الكربوهيدراتية المادة الخام الأساسية فى التخمرات الصناعية.

ويبين جدول (1.6) الأنواع الرئيسية للمركبات الكربوهيدراتية فى الأغذية المختلفة والتى معظمها نباتية المصدر عدا سكر اللاكتوز فى اللبن وتشمل الكربوهيدرات المجموعات التالية :

- **السكريات الأحادية *Monosaccharides*** : (هيدروكسيدات عديدة ألدهيدية أو كيتونية) وقد تكون من 5 ذرات كربون مثل الزيلول ، الأرابينوز ، أو تتكون من 6 ذرات كربون كالجلوكوز والفركتوز .
- **الأوليجوسكريدات *Oligosaccharides*** : وتتكون بتكثيف رابطة هيدروكسيلية من أحد السكريات الأحادية مع مجموعة مختزلة من سكر احادى آخر فيتكون سكر ثنائى ***disaccharides*** (كالسكروز ، المالتوز ، اللاكتوز ... إلخ) وعندما يرتبط عددا من

جدول (1.6) : بعض أنواع الكربوهيدرات الرئيسية فى الأغذية.

الكربوهيدرات	المصدر	المكونات
السكريات الأحادية :		
الجلوكوز *D-Glucose*	يوجد بصورة طبيعية فى عسل النحل ، والفواكه ، عصائرها – يضاف للأغذية على صورة شراب الذرة ، وينتج أثناء التصنيع بالتحليل المائى للسكروز .	
الفركتوز *D-fructose*	يوجد بصورة طبيعية فى عسل النحل ، والفواكه ، وعصائرها – يضاف للأغذية على صورة شراب الذرة عالى الفركتوز، وينتج أثناء التصنيع بالتحليل المائى للسكروز .	
سكريات كحولية :		
السوربيتول *D-Glucitol*	يضاف للمواد الغذائية ، يعمل كمادة مرطبة *Humectant* .	
السكريات الثنائية :		
السكروز *Sucrose*	واسع الإنتشار فى أنسجة الفواكه والخضروات والعصائر بنسب متفاوتة ، وبصفة خاصة القصب والبنجر .	D-جلوكوز ، D- فركتوز
اللاكتوز *Lactose*	فى اللبن والمنتجات المشتقة منه	D-جلاكتوز ، D- جلوكوز
المالتوز *Maltose*	يوجد فى المولت ، وبنسب متفاوتة فى شراب الذرة ، والمالتودكسترينات .	D-جلوكوز
الأوليجوسكريدات :		
مالتو أوليجوسكريد *Maltooligosaccharide*	توجد بنسب متفاوتة فى شراب الذرة ، والمالتودكسترينات	D-جلوكوز
الرافينوز *Raffinose*	يوجد بنسب ضئيلة فى الفول *beans*	D-جلوكوز ،D- فركتوز، D- جلاكتوز
الستاكيوز *Stachyose*	يوجد بنسب ضئيلة فى الفول	D-جلوكوز ،D- فركتوز ، D- جلاكتوز
السكريدات العديدة :		
النشا *Starch*	ينتشر بصورة كبيرة فى الحبوب والدرنات ، ويضاف للأغذية المصنعة .	D-جلوكوز

تابع جدول (1.6) :

الصموغ الغذائية ، المواد الغروية : ألجينات ***Algins*** كربوكسى ميثيل سليلوز ***CMC*** كاراجينان ***carageenans*** صمغ الجوار ***Guar gum*** صمغ عربى ***Arabic gum*** هيدروكسى بروبيل ميثيل سليلوز ***HPMC*** صمغ بذور الخروب ***Locust bean gum*** ميثيل سليلوز ***Methyl-celluloses*** مركبات بكتينية ***Pectins*** زانثان ***Xanthan***	تضاف لمكونات المنتجات الغذائية المختلفة لتؤدى أدوار وظيفية فى أغلب الأحيان .	
السكريدات العديدة لجدر الخلايا بكتين طبيعى سليلوز هيموسليلوز بيتاجلوكان	توجد بصورة طبيعية فى الخلايا النباتية	

وحدات السكريات الأحادية يبلغ من 3 إلى 8 وحدات بروابط جليكوزيدية فى سلاسل مستقيمة تنتج الأوليجوسكريدات .

✔ **السكريدات العديدة *Polysaccharides*** : تقسم السكريدات العديدة بصورة مبسطة إلى مجموعتين رئيسيتين :

المجموعة الأولى : السكريدات الهيكلية أو التركيبية حيث تشكل التركيب الصلب لهيكل النباتات ويمثل السليلوز ، والهيميسليلوز ، واللجنين .

المجموعة الثانية : فيطلق عليها السكريدات العديدة الغذائية كالنشا والجليكوجين وتعتبر مخزون للطاقة فى النباتات والحيوانات على التوالى .

ويعتبر سكر الجلوكوز هو أهم السكريات الأحادية ، ويوجد فى دم الحيوانات وفى عصارة النباتات ، وعصائر الفاكهة ويشكل الوحدة الأساسية فى بناء كثير من أنواع الأوليجوسكريدات والسكريات العديدة . أما سكر الفركتوز الأحادى فيوجد فى عصائر الفواكه وفى عسل النحل .

ويعتبر السكروز هو السكر الثنائى (يتكون من كميات متساوية بالمول من الجلوكوز والفركتوز) السائد. ومن السكريدات الثنائية الأخرى سكر اللبن ، اللاكتوز والذى يكون 5 % من اللبن البقرى ، حوالى 6 % من لبن الأم (ويتكون من جلوكوز وجلاكتوز) . أما سكر المالتوز والناتج من إرتباط وحدتين من الجلوكوز بالرابطة الجليكوزيدية ألفا 1-4 ويتكون بصفة رئيسية من تحطيم النشا إنزيميا بالأميليز وينتج السكر الثنائى سليلوز عن تحلل السليلوز ويشابه المالتوز إلا أن الرابطة بين وحدتى الجلوكوز تكون رابطة جليكوزيدية من النوع بيتا 1-4 .

ومن السكريات الثلاثية الشائعة سكر البنجر (الرافينوز) وينتج من إرتباط الجلاكتوز مع السكروز.

ولا يمتص فى جسم الإنسان من الأمعاء الدقيقة إلا السكريات البسيطة الأحادية كالجلوكوز والفركتوز . أما السكريدات العديدة (كالأوليجوسكريدات ، والسكريدات العديدة الأخرى) فإنها يجب أن تهضم أولا ، ليستفيد منها الإنسان ، أى تتحلل لسكريات أحادية ، ولا يستطيع الإنسان أن يهضم إلا السكروز ، واللاكتوز ، والمالتوأوليجوسكريدات ، وكذلك النشا .

وتوجد حوالى 90 % من الكربوهيدرات فى الطبيعة فى صورة سكريدات عديدة وكما سبق القول فإن النشا فقط من أنواع السكريدات العديدة التى يستطيع الإنسان أن يهضمها أولا إلى وحدات جلوكوز والتى يمثلها فى جسمه ليحصل منها على السعرات الحرارية اللازمة له . أما السكريدات العديدة غير القابلة للهضم فتقسم إلى قسمين الذائبة وغير الذائبة . وتمثل هذه المجموعة مع الليجنين الألياف الغذائية ***diatary fibers*** . وتنظم الألياف الغذائية سواء الذائبة أو غير الذائبة وظائف الإخراج العادية ، كما تخفض من معدل الإستجابة لزيادة السكر فى الدم ***hyperglycemic*** كما قد يكون لها دورا فى خفض كوليستيرول السيرم . وعلى أية حال ، فقد تضاف الألياف الغذائية إلى بعض

المنتجات المصنعة بسبب الصفات الوظيفية التى تضيفها عليها بالإضافة لآثارها الفسيولوجية المرغوبة .

ويوضح جدول (2.6) محتوى بعض المواد الغذائية من الكربوهيدرات الكلية .

جـــدول (2.6) : محتـــوى بعـــض الأغـــذية من الكربوهيدرات الكلية*

الغـــــــذاء	% للكربوهيدرات (وزن رطب)	الغـــــــذاء	% للكربوهيدرات (وزن رطب)
منتجات الحبوب – الخبز – المكرونة		لحوم ودواجن وأسماك :	
رقائق الذرة	86	شرائح سمك مكسوة بالخبز	19 – 17
المكرونة الجافة والمدعمة	75	سجق بولونى ولحوم لانشون	4
خبز أبيض	50	دواجن (للشى أو القلى)، صدور الدواجن	0
منتجات الألبان :		مواد غذائية أخرى :	
أيس كريم	27 – 22	عسل	82 – 75
يوجهورت (سادة)	6.9 – 4.7	شوكولاتة باللبن	59
لبن كامل	4.7	مشروبات خفيفة	12 – 11
الفواكه والخضروات :		شاى مثلج محلى محليا	11 -7.1
شراب تفاح معلب محلى	20		
عنب	17 – 16		
ثمار تفاح	15		
بطاطس (خام وبالقشرة)	12		
عصير برتقال	12 -10		
جزر	10		
قنبيط (خام)	5.2		
طماطم ، عصير طماطم	4.2		

* الكربوهيدرات الكلية : تحسب من المعادلة = 100 – %(الماء + البروتين + الدهن + الرماد) .

وسنتناول فى الجزء التالى من هذا الباب طرق تحليل الكربوهيدرات وسنشير فى سياقه إلى أكثر الطرق دقة وسهولة فى الإجراء وسنلقى الضوء أساسا على الطرق الرسمية المعتمدة .

وتشمل الطرق التحليلية للمركبات الكربوهيدراتية الطرق **الوصفية اللونية** ، ثم طرق التقدير الكمى سواء **الكيميائية** ، أو **اللونية** ، أو **الكرماتوجرافية** ومنها الوصفية أو الكمية لكروماتوجرافيا الورق ، وكروماتوجرافيا الغاز " *GC* " لمشتقات السكريات ، وكروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة " *TLC* " ، وأيضا الطرق الإنزيمية ، وطرق الإلكتروفوريسيس ، بالإضافة لطرق كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى " *HPLC* " ، وهناك طرق حديثة لتقدير الكربوهيدرات نشرت فى المجلات العلمية ولكنها لازالت غير واسعة الإنتشار ولم يعتمد معظمها كطرق تحليل رسمية كطرق التأرجح النووى المغناطيسى *nuclear magnetic resonace* ، وطرق مطياف الكتلة ، والإلكتروفوريسيس الأنابيب الشعرية ، وطرق الأشعة تحت الحمراء ، وطرق التحليل المناعى ، وكذلك الطرق التى تعتمد على تقدير الطيف الوميضى .

1.6. إعداد العينة *Sample preparation* :

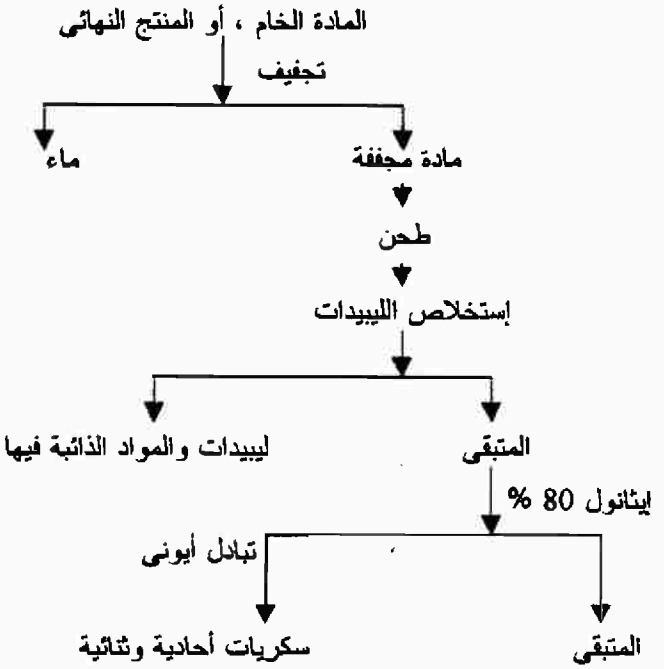
للكربوهيدرات صور عديدة تتباين فى درجات ذوبانها ، ويرتبط إعداد عينة المادة الغذائية لتحليل الكربوهيدرات فيها بعدة عوامل أهمها :

* نوع المنتج الغذائى الذى سيتم تحليله .
* نوع الكربوهيدرات التى يجرى تقديرها .
* درجة الدقة المطلوبة فى التحليل .

وعادة ما تكون الخطوة الأولى فى إعداد العينات فى أغلب المواد الغذائية للتحليل هى عملية التجفيف ، والتى يمكن الإستفادة منها أيضا فى تقدير المحتوى الرطوبى للمادة الغذائية . وتتم عملية التجفيف بوضع كمية مناسبة من المادة الغذائية فى فرن تجفيف تحت تفريغ على 55°م وضغط 1 مم زئبق.

وتلى عملية التجفيف طحن العينة لتصبح مسحوق ناعم . ثم تستخلص الليبيدات من العينة بإستخدام مخلوط الكلوروفورم والميثانول (95 : 5 ح/ح) فى جهاز سوكسلت . ويؤدى إستخلاص الليبيدات من عينة المادة الغذائية قبل تحليل الكربوهيدرات لسهولة

وإكتمال إستخلاص الكربوهيدرات . ويوضح شكل (1.6) رسم تخطيطى لإعداد العينة للتحليل وإستخلاص السكريات الأحادية والثنائية .



شكل (1.6): رسم تخطيطى لإعداد العينة للتحليل وإستخلاص السكريات الأحادية والثنائية

هذا وقد تستخدم طرق أخرى للإستخلاص مع منتجات غذائية معينة ففى طريقة *AOAC* رقم 14-982 لتحليل منتجات حبوب الإفطار الجاهزة للأكل يتم إستخلاص الدهون بواسطة الإثير البترولى ثم تستخلص السكريات بإستخدام الإيثانول 50 %.

2.6. السكريات الأحادية والأوليجوسكريدات *Mono-and Oligosaccharides*:

1.2.6. الإستخلاص *Extraction* :

عند تقدير السكريات الأحادية (كالجلوكوز ، الفركتوز ... إلخ) أو الثنائية (كالسكروز واللاكتوز ، المالتوز ...إلخ) أو ثلاثية (كالرافينوز) أو رباعية (كالستاكيوز) أو الأوليجوسكريدات (كالمالتودكسترينات) تستخلص عينة المادة الغذائية الجافة الخالية من الليبيدات بإستخدام كحول الإيثانول 80 % الساخن (تركيز نهائى بعد أن تؤخذ رطوبة المادة الغذائية فى الإعتبار) ، وفى وجود كربونات الكالسيوم لتعادل الحموضة حتى لايتحلل السكروز (طرق *AOAC* برقم 922.02 ، 925.05) وفيما يلى بعض أهم الإعتبارات الجديرة بالملاحظة :

1- يجب أن تجرى عملية الإستخلاص بكحول الإيثانول مرتين على الأقل لضمان إستخلاص كل المكونات المطلوبة . وتجدر الإشارة إلى أن الإستخلاص بكحول الإيثانول الساخن 80 % متخصص لحد كبير .

2- إذا كانت المادة الغذائية حامضية (كالفواكه) فيجب معادلة الحموضة قبل الإستخلاص لتجنب تحلل السكروز لذلك تضاف كربونات البوتاسيوم لهذا الغرض .

3- يحتوى مستخلص الإيثانول (80 %) على مركبات أخرى (ملوثات) خلاف الكربوهيدرات أهمها الرماد ، الصبغات ، الأحماض العضوية ، وربما أيضا الأحماض الأمينية الحرة والببتيدات منخفضة الوزن الجزيئى . ولأن السكريات الأحادية والثنائية متعادلة الشحنة ومعظم الملوثات تحمل شحنة كهربية لذلك تزال بإستخدام كروماتوجرافيا التبادل الأيونى . وتتم عملية التنقية بوضع 50 مل من المستخلص الإيثانولى فى دورق مخروطى سعة 250 مل ، ويضاف 2 جم من راتنج تبادل كاتيونى (فى صورة حامض) ، 3 جم راتنج تبادل أنيونى (فى صورة هيدروكسيد) ويترك المخلوط لمدة ساعتين مع التقليب كل فترة وبعد ذلك يتم الترشيح.

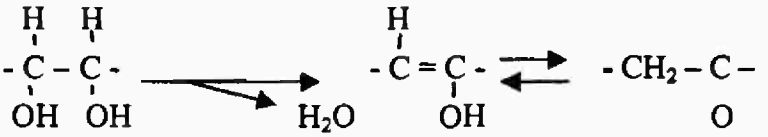
4- عند الرغبة فى تقدير تركيز السكروز فى المستخلص بالبولاريميتر يجب أن يكون المحلول رائقا ، ولذلك تضاف مادة ترويق كخلات الرصاص بدلا من إجراء معاملة التبادل الأيونى ، ثم يتم الترشيح أو الطرد المركزى لفصل الراسب (طرق *AOAC* أرقام 44.1.0713 ، 44.10 ، 44.6.01).

5- يزال الكحول من المستخلص الإيثانولى تحت ضغط منخفض بإستخدام جهاز التبخير الدوار تحت ضغط منخفض ***Rootary evaporator*** على درجة حرارة تتراوح بين 45 – 50°م . يذاب المتبقى الجاف (بعد تبخير الكحول) فى كمية معلومة من الماء.

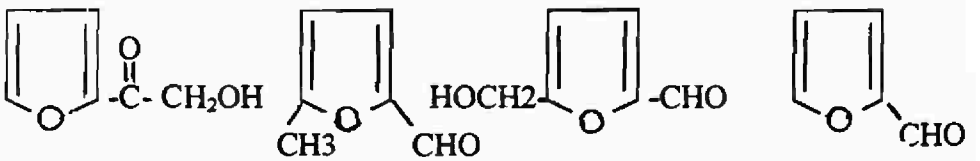
3.6. تقدير الكربوهيدرات الكلية بطريقة " الفينول – حامض الكبريتيك" :

Total Carbohydrate: Phenol-Sulfuric acid Method :

عند إضافة حامض قوى للكربوهيدرات على درجة حرارة عالية تتحطم الكربوهيدرات وتحدث سلسلة من التفاعلات الكيميائية المعقدة تبدأ بتفاعل تجفيف بسيط توضحه المعادلة (1) .



ويؤدى إستمرار التسخين فى وجود الحامض لإنتاج مركبات الفوران ومشتقاتها ***furan derivatives*** (شكل 2.6) . وقد تتكثف مشتقات الفوران مع بعضها البعض أو مع مركبات أخرى وتنتج مركبات معقدة بنية أو سوداء اللون .



فورمالدهيد — هيدروكسى ميثيل

(فورفورال) (1) — فورفورال (HMF) (2) — (3) — (4)

شكل (2.6) : مركبات الفوران والتى تنتج من 1- البنتوزانات والأحماض الهكسويورونية ، 2- الهكسوزات ، 3- 6 ، الكيتوهكسوز

هذا وقد تتكثف نواتج التحطيم الحامضى للكربوهيدرات مع المركبات الفينولية مثل الفينول ، الريزوسينول ، الأورسينول ، الألفانافثول أو مع مركبات نيتروجينية حلقية وينتج عن هذا التكثيف مركبات ملونة . وقد صدرت عن الـ ***AOAC*** طريقة رسمية برقم 441.30 تعتمد على تكثيف نواتج التحطيم الحامضى للكربوهيدرات مع الفينول فيتكون لون يقاس إمتصاصه للضوء على طول موجى 490 نانوميتر . وتتميز طريقة التقدير هذه بالبساطة ، والسرعة ، والحساسية والدقة ، كما أنها تعتبر متخصصة للكربوهيدرات ، ولا تتجاوز نسبة الخطأ فيها عن ± 2 % . ويمكن إيجاز طريقة التقدير فى الخطوات التالية :

1- يسحب بماصة محلول الكربوهيدرات ويوضع فى أنبوبة إختبار ، ويعد البلانك بوضع ماء بدلا من المحلول الكربوهيدراتى بنفس الحجم فى أنبوبة أخرى .
2- يضاف محلول الفينول وتخلط المكونات جيدا فى الأنبوبة .
3- يضاف حامض كبريتيك مركز بسرعة إلى الأنبوبة ويؤدى البخار الناتج عن الحرارة الناتجة من إضافة الحامض لخلط جيد لمحتويات الأنبوبة .
4- يقاس الإمتصاص الضوئى للون الناتج على طول موجى 490 نانوميتر .
5- تطرح قيمة الإمتصاص الضوئى للبلانك من نظيره للعينة .
6- تقدر كمية الكربوهيدرات الكلية عن طريق منحنى قياسى ويفضل أن يتكون من نفس كربوهيدرات العينة ، أو قد يستخدم محلول D- جلوكوز لإعداد المنحنى القياسى .

4.6. تقدير السكريات المختزلة الكلية *Total reducing sugar* :

1.4.6. طريقة سوموجى- نيلسون *Somogyi-Nelson* :

تعتمد طريقة سوموجى- نيلسون على إختزال النحاسيك Cu^{++} إلى نحاسوز C^{+} بواسطة السكريات المختزلة طبقا للمعادلة الآتية :

$$R\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}H + 2Cu(OH)_2 \longrightarrow R\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}O^{-}Na^{+} + Cu_2O + 3H_2O + NaOH$$

بعد ذلك تختزل أيونات النحاسوز معقد ***arsenomolybdate*** والذى يتم تحضيره بتفاعل موليبدات الأمونيوم $[(NH_4)Mo_7O_{24}]$ وزرنيخات الصوديوم $(Na_2HA_sO_7)$ فى حامض

الكبريتيك . ويؤدى إختزال معقد موليبدات الزرنيخ لتكوين لون أزرق كثيف يمكن قياسه لونيا ***spectrophotometrically*** . يعد منحنى قياسى لتقدير السكريات المختزلة بإستخدام الـ D- جلوكوز . وفيما يلى ملخص لخطوات هذه الطريقة :

1- يضاف محلول كبريتات النحاسيك ومحلول منظم قلوى بواسطة الماصة إلى محلول السكريات المختزلة ، ويضاف أيضا إلى محلول ماء كبلانك.

2- يتم تسخين المحلول السابق فى حمام مائى يغلى .

3- يضاف الجوهر الكشاف المعد بخلط محلولى موليبدات الأمونيوم الحامضية وزرنيخات الصوديوم .

4- بعد الخلط يخفف المحلول ، يعاد خلطه جيدا ثم يقاس الإمتصاص الضوئى للمحلول على طول موجى 520 نانوميتر .

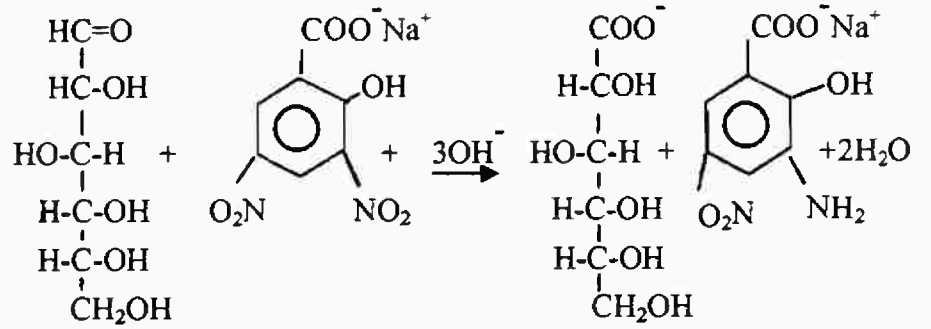
5- تطرح قيمة الإمتصاص الضوئى للبلانك (A_{520}) من قيمة الإمتصاص الضوئى للعينة . ثم يتم تحويل القيمة إلى ما يكافئها من جلوكوز بإستخدام المنحنى القياسى الذى سبق إعداده من محاليل جلوكوز معلومه التركيز وإمتصاصها الضوئى .

وتعتبر طريقة سوموجى- نيلسون من أكثر الطرق شيوعا للتقدير الكمى للسكريات المختزلة ، ويمكن كذلك إستخدامها بالإشتراك مع طرق إنزيمية لتقدير الأوليجوسكريدات والسكريدات العديدة بعد تحويلها إنزيميا إلى سكريات أحادية تقدر نسبتها بطريقة سوموجى- نيلسون السابق شرحها .

2.4.6. بعض الطرق الأخرى لتقدير السكريات المختزلة

1.2.4.6. طريقة ثنائى نيتروحامض الساليسيليك *dinitrosalicylic acid* :

قد تستخدم طريقة ثنائى نيتروحامض الساليسيليك لقياس كمية السكريات المختزلة سواء الموجودة بصورة طبيعية فى الأغذية أو التى قد تنتج بتأثير الإنزيمات . حيث تختزل السكريات المختزلة مركب 3،5 ثنائى نيتروالساليسيلات إلى مشتقات أحادية الأمونيوم حمراء اللون كم هو توضحها المعادلة الآتية :



D- جلوكوز

D- جلوكونات

صوديوم 3-أمينو-5- نيتروساليسيلات

2.2.4.6. طريقة *Walker-Munson* :

وهى طريقة رسمية (*AOAC* برقم 90.03) وتشبه لحد كبير طريقة سوموجى-نيلسون وتعتمد على إختزال أيونات النحاسيك فى الوسط القلوى إلى أيونات نحاسوز ، ويقدر بعد ذلك راسب أكسيد النحاسوز بعدة طرق .

1- الوزن النوعى (طريقة *AOAC* برقم 31.039 فى الطبعة الرابعة عشرة) .

2- أو بالمعايرة بإستخدام برمنجنات البوتاسيوم (طريقة *AOAC* برقم 31.042 فى الطبعة الرابعة عشرة) .

3- أو بالمعايرة وفى وجود دليل الميثيلين الأزرق (طريقة ***Lane Enon*** وهى طريقة رسمية *AOAC*برقمى 923.09 ، b920.183) .

4- أو إلكتروليتيا (طريقة *AOAC* برقم 31.044 فى الطبعة الرابعة عشرة) .

وعند تقدير السكريات المختزلة بالطرق السابقة يجب عمل منحنى قياسى لنوع السكر المختزل أو فى مخلوط السكريات المختزلة وذلك لتباين طريقة تفاعل كل نوع من أنواع السكريات المختزلة .

وتجدر الإشارة إلى صعوبة أكسدة مجموعة الكيتون فى السكريات الكيتوزية إلا أنه تحت الظروف القلوية المستخدمة فى هذه الإختبارات يتحول الكيتوزات إلى مشابهاتها من الألدوزات ولذلك تقاس كسكريات مختزلة ولكن يكون معدل الإستجابة للتفاعل أقل . ولهذا

فيجب عمل منحنى قياسى خاص بالسكريات الكيتوزية إذا كان الفركتوز هو السكر السائد فى المحلول السكرى .

5.6. طرق التحليل المتخصصة للسكريات الآحادية والأوليجوسكريدات :

Specific Analysis of Mono- and Oligosaccharides:

1.5.6. كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى :

تعد طريقة كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى ***HPLC*** من أفضل طرق تحليل السكريات الأحادية والأوليجوسكريدات ويمكن إستخدامها أيضا فى تقدير السكريدات العديدة بعد تعرضها للتحليل المائى . وبهذه الطريقة تحلل السكريات تحليلا وصفيا ويتم التعرف عليها ثم بحساب المساحة تحت المنحنى للـ ***peaks*** يصبح التحليل كميا . وتتميز طريقة كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى بسرعة الإجراء ، مع إمكان إجراءها على مدى واسع من تركيزات العينات موضع التحليل . هذا بالإضافة لدقتها ونتائجها المؤكدة لحد كبير .

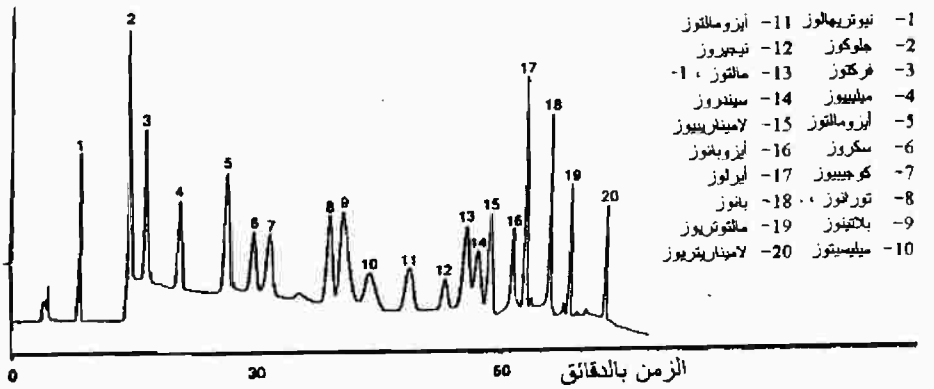
ولا تتطلب طريقة كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى إلى تحويل السكريات إلى مشتقات سهلة التطاير قبل التحليل كما هو الحال فى كروماتوجرافيا الغاز " ***GC*** " ولكنها تحتاج إلى ترشيح من نوع خاص بمرشح دقيق ***micron filter*** قبل حقن العينات فى الجهاز .

وسنناقش فيما يلى بعض التفاصيل الخاصة بطريقة التحليل بكروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى لإلقاء مزيد من الضوء على هذه الطريقة الحساسة والتى زاد إستخدامها فى معامل عديدة فى الآونة الأخيرة .

1.1.5.6. الأطوار (الأوساط) الثابتة ***Stationary phases*** :

• **كروماتوجرافيا التبادل الأيونى** : تعد الكربوهيدرات أحماضا ضعيفة لها قيمة pK_a فى حدود 12 – 14 . وفى المحاليل مرتفعة الـ pH تتأين بعض مجموعات الهيدروكسيل فى الكربوهيدرات وبذلك يمكن فصل السكريات عن بعضها البعض بإستخدام راتنج للتبادل الأيونى تملأ به أعمدة الفصل ، وعندئذ تخرج السكريات من العمود بالتتابع التالى : سكريات كحولية (أدينولات) – سكريات أحادية – سكريات ثنائية – أوليجوسكريدات . وتستخدم مع كروماتوجرافيا التبادل الأيونى وسيلة كشف

إلكتروكيميائية ***electro chemical*** . هذا وقد أمكن بهذه الوسيلة التعرف على مخاليط السكريات والأوليجوسكريدات فى منتجات عديدة كعسل النحل (شكل 3.6) ، ومشروبات البيرة ، سكر البنجر المتحلل ، وعصير البرتقال .



شكل (3.6):كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى للسكريات الأحادية والأوليجوسكريدات فى عسل النحل بإستخدام كروماتوجرافيا التبادل الأيونى ووسيلة كشف عن طريق قياس النبضات الكهربائية ***Pulsed amperometric***

2.1.5.6. كروماتوجرافيا الطور العادى ***Normal phase chromatography*** :

فى كروماتوجرافيا الطور العادى يكون الوسط الثابت قطبى ***polar*** ويتم عملية إزاحة مخلوط السكريات بإستخدام طور متحرك تزداد قطبيته بالتدريج ، وهذه الطريقة من الطرق الشائعة الإستخدام فى كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى. ويتم فى هذه الطريقة إدخال مجموعة أمين مع السليكا جيل بإستخدام أحد الجواهر الكشافة ويطلق على الوسط الثابت حينئذ الوسط المرتبط بالأمين ***amino-bonded stationary*** وتتم إزاحة السكريات بإستخدام وسط سائل متحرك من الأسيتونيتريل والماء بحيث يتراوح تركيز الأسيتونيتريل بين 50 –80 % . ويكون ترتيب خروج المركبات المزاحة من عمود السليكا جيل– المرتبط بالأمين كالتالى : سكريات أحادية –سكر كحولى – سكر ثنائى – ثم الأوليجوسكريدات . وقد إستخدمت هذه الطريقة بنجاح فى تعريف وتقدير الكربوهيدرات فى منتجات : عسل النحل ، والأيس كريم ، والمخبوزات ، ومنتجات

حبوب الإفطار ، وأغذية الأطفال ، والفواكه والخضروات ، ومنتجات الحبوب ، والمشروبات الخفيفة .

ويعاب على أعمدة السليكا جيل- المرتبطة بالأمين (عند فصل السكريات) أن السكريات المختزلة تتفاعل وترتبط مع مجموعة الأمين المرتبطة بالوسط الثابت مما يؤدى لتدهور أداء العمود وفقدان صلاحيته بمرور الوقت . ويمكن التغلب على تلك المشكلة بإضافة نسبة ضئيلة من مواد تعرف بالمواد المعدلة ***modifiers*** (عبارة مركبات أمينية ذائبة) للطور السائل . وتتكون المواد المعدلة من مجموعتى أمين على الأقل ، تدمص أحدهما على السليكا جيل والأخرى تكون حرة لترتبط مع الشق الكربوهيدراتى ، ولأن المواد المعدلة تكون فى محلول الإزاحة لذلك يعاد تجديد الطور الثابت بإستمرار دون أن يفقد مجاميع الأمين المرتبطة به .

3.1.5.6. كروماتوجرافيا التبادل الكاتيونى *Cation exchange chromatography*

تستخدم فى هذه الطريقة من طرق الفصل راتنجات كروية ذات جسيمات دقيقة ، كطور ثابت ، تحمل أحد أنواع الأيونات المعدنية مثل ايونات الكالسيوم C^{2+} أو الرصاص Pb^{2+} أو الفضة Ag^{+} . أما الطور المتحرك المستخدم فى تلك الأعمدة فهو الماء بالإضافة لكميات متباينة (حوالى 40 %) من المذيب العضوى كالأسيتون و/أو الميثانول. ويتم الفصل فى هذه الأعمدة على درجات حرارة مرتفعة (80°م) فيزيد معدل إنتقال الكتلة بين الوسطين الثابت والمتحرك ويتحسن معدل سريان الطور المتحرك وتنتج ***peak*** أضيق مما يدل على تحسين كفاءة الفصل . وتخرج الكربوهيدرات من على راتنج التبادل الكاتيونى بترتيب نقص أوزانها الجزيئية ، فتنفصل فى البداية الأوليجوسكريدات ذات عدد وحدات سكر أكبر من 3 – ثم السكريات الثلاثية – فالسكريات الثنائية – فالسكريات الأحادية – فالسكريات الكحولية .

2.5.6. كروماتوجرافيا الطور- العاكس *Reversed phase chromatography* :

فى هذا النظام من أنظمة الفصل يكون الوسط الثابت هيدروفوبى ، والوسط المتحرك غالبيته من الماء . ويعد الوسط الثابت بالتفاعل بين السليكا جيل مع مادة تضيف سلسلة ألكيل . فعندما تضاف سلسلة ألكيل من 18 ذرة كربون (يعرف العمود حينئذ بعمود C_{18}) وتستخدم كروماتوجرافيا الوسط العاكس لفصل السكريات الأحادية والثنائية والثلاثية إلى مجموعات ، فعلى سبيل المثال يمكن تقدير السكروز ، والرافينوز ، والستاكيوز فى فول

الصويا ومنتجاته ، كما يقدر السكر المحول ، والسكروز ، والمالتوز ، والمالتوتريوز فى العصائر والمشروبات الكحولية .

ويعد قصر زمن الإحتجاز ***retention time*** للسكريات الأحادية هو العيب الرئيسى فى طريقة الطور الثابت ، ويمكن علاج تلك المشكلة نسبيا بإضافة الأملاح ككلوريد الصوديوم فتؤدى لزيادة زمن الإحتجاز .

وتتميز أعمدة الطور العادى والعاكس بطول فترة صلاحيتها ، وثباتها الجيد كما يمكن أن تعمل مع عديد من الأوساط المتحركة فى مدى كبير من أرقام الـ ***pH*** (من 2 إلى 10) . ويعيب على الأطوار الثابتة التى تعتمد فى تركيبها على السليكا ، وإحتمال ذوبان السليكا لحد بسيط فى سوائل الإزاحة الغنية بالماء .

وتستخدم فى أجهزة كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى أجهزة الكشف التالية :

1- كشاف معامل الإنكسار *Refractive index detector* :

ويستخدم عادة فى تحليل الكربوهيدرات حيث يعطى إستجابة خطية فى مدى واسع من تركيز معظم أنواع الكربوهيدرات . ومن أهم عيوبه حساسية صفة معامل الإنكسار الطبيعية للتغير فى معدلات السريان ، والضغط ، ودرجة الحرارة ، ولتلافى تلك العيوب يستخدم فى أجهزة الـ ***HPLC*** كشاف مع جهاز للتحكم فى درجة الحرارة فتقل المشاكل التى تظهر من جراء التغيرات المشار إليها لحد كبير . وعندما يستخدم كشاف معامل الإنكسار لايمكن إستخدام وسط متحرك بنظام الإزاحة التدريجى ***gradient elution*** كذلك فإن مقياس معامل الإنكسار لايكون حساسا للتركيزات الضئيلة من الكربوهيدرات .

2- أجهزة الكشف الكهروكيميائية *Electrochemical detectors* :

يعرف جهاز الكشف الكهروكيميائى ثلاثى النبضات ***triple-pulsed electro-chemical*** بكشاف قياس الأمبير النابض ويعتمد على أكسدة مجاميع الهيدروكسيل والألدهيد فى الشق الكربوهيدراتى ، وتستخدم عادة مع كروماتوجرافيا التبادل الأيونى . وعند إستخدام هذا الجهاز فى الكشف يجب أن يكون الـ pH مرتفعا مما يتطلب إ ـافة هيدروكسيد الصوديوم للعمود بإستخدام مضخة إضافية ، وعادة يستخدم مذيب إزاحة فى أعمدة التبادل الأيونى مكون من (ماء وهيدروكسيد الصوديوم ومحلول خلات الصوديوم). وعادة ما تكون الحدود الدنيا للكشف حوالى 1.5 نانوجرام للسكريات الأحادية وحتى 5 نانوجرام للسكريات الثنائية .

3- تكوين مشتقات بعد الفصل بالعمود *Post-Column Derivatization* :

تتم عملية تكوين مشتقات بعد الفصل بالعمود بإستخدام مواد تكون مركبات ملونة مع النواتج المفصولة من العمود ، ثم يقاس تركيز لونها أو وميضها . ويتطلب تكوين مشتقات بعد الفصل بالعمود وحدات إضافية : مضخة أو مضختين ، عمود لخلط المواد المفصولة مع مواد أخرى لتكوين المركبات الملونة ، حمام مائى لضبط درجة حرارة التفاعل مزود بثرموستات . وتتميز هذه الطريقة بحساسيتها العالية التى تتفوق على كشافات معامل الإنكسار .

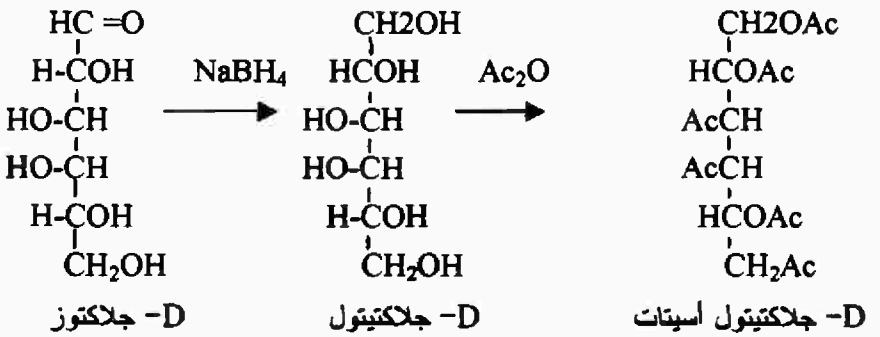
3.5.6. تحليل السكريات بكروماتوجرافيا الغاز *Gas chromatography* :

لإجراء فصل للسكريات بكروماتوجرافيا السائل والغاز " *GLC* " يتم تحويل السكريات إلى مشتقات متطايرة . ومن أكثر المشتقات المتطايرة شيوعا مشتق فوق خلات الألديتول ***alditol peracetate*** حيث يتم إنتاجه على خطوتين:

أ- إختزال المجموعة الألدهيدية إلى مجموعة كحول أولى .

ب- تحويل السكر المختزل إلى مركب فوق خلات الإستر ***peracetate ester*** متطاير أو مشتق ***pertrimethylsilyl*** .

وتوضح المعادلة الآتية (شكل 4.6) كيفية إعداد تلك المشتقات :



D- جلاكتوز D- جلاكتيتول D- جلاكتيتول أسيتات

شكل (4.6) تحويل سكر الـ D- جلاكتوز إلى مشتق متطاير للتحليل بكروماتوجرافيا الغاز

وفيما يلى موجزا لخطوات تحليل السكريات بجهاز كروماتوجرافيا السائل -غاز :

1- يتم إختزال السكريات المتعادلة المستخلصة من مستخلص الإيثانول 80 % أو من جراء تحليل السكريدات بواسطة كمية من بروموهيدريد الصوديوم $NaBH_4$ الذائب فى محلول هيدروكسيد الأمونيوم .

2- بعد تمام حدوث التفاعل على درجة حرارة الغرفة يضاف حامض الخليك الثلجى نقطة نقطة حتى يتوقف إنبعاث غاز الهيدروجين ، وتؤدى تلك المعاملة لتحطيم الزيادة من بروميد الصوديوم .

3- يتم تبخير المحلول المحمض حتى الجفاف ، وتزال أيونات البورات على صورة بورات الميثيل بإضافات متتالية من الميثانول وتبخيره أولا بأول .

4- يضاف أنهيدريد حامض الخليك ***Acetic anhydride*** ثم يقفل الدورق جيدا ويسخن إلى 121°م ويبرد بعد ذلك . ويضاف الماء لتحليل الزيادة من أنهيدريد حامض الخليك ثم تبخر محتويات الدورق حتى الجفاف .

5- تذاب المحتويات الجافة فى الدورق فى كلوروفورم نقى . ثم تحقن فى جهاز الـ ***GLC*** على أن تكون درجة الحرارة أثناء الفصل ثابتة ***isothermally*** .

6- يتم التعرف على المركبات من أزمنة خروجها من الجهاز منسوبة إلى مركب سداسى خلات الإينيسيتول ***inisitol hexacetate*** كمعيار داخلى أيضا للجهاز . وتفضل معايرة جهاز الـ ***GLC*** بإستخدام مخلوط ***Internal standard*** قياسى من المركبات المفصولة بنفس تركيزاتها ومقارنة النتائج .

6.6. تقدير السكريدات العديدة ***Polysaccharides*** :

1.6.6. النشا ***Starch*** :

يعد النشا من أكثر المركبات تواجدا فى الأغذية بعد الماء . وللنشا أنواعا عديدة أهمها نشا الذرة ، الذرة الشمعية ، الذرة عالية الأميلوز ، البطاطس ، القمح ، الأرز ، التابيوكا (الكاسافا) ،... إلخ . ويوجد النشا فى جميع أجزاء النبات (أوراق – سوق – درنات – بذور)

وتتلخص طريقة تقدير النشا فى الخطوات التالية :

1- توضع العينة المطحونة جيدا فى أنبوبة إختبار وترطب بالإيثانول 80 % ثم يضاف إليها ثنائى ميثيل سلفوكسيد ***DMSO*** ويتم خلط محتويات الأنبوبة .

2- تسخن الأنبوبة بمحتوياتها فى حمام مائى يغلى .

3- يضاف محلول إنزيم الألفا أميليز (الثابت للحرارة) مع إجراء خلط دوامى وتعاد الأنبوبة إلى الحمام المائى.

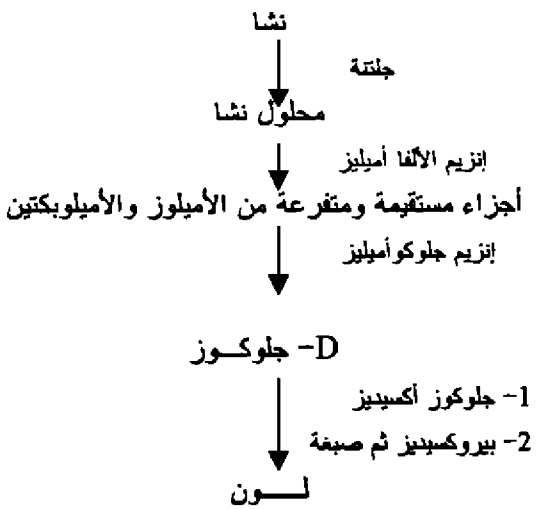
4- بعد خمسة دقائق ، تبرد الأنبوبة إلى 50°م ، ثم يضاف محلول منظم من خلات الصوديوم ، عند pH = 4.5 ومحلول إنزيم الجلوكوأميليز ثم تخلط المحتويات ، وتحضن الأنبوبة على 50°م .

5- يتم نقل محتويات الأنبوبة كميا إلى دورق معيارى بإستخدام ماء مقطر وتغسل الأنبوبة عدة مرات ويكمل الدورق المعيارى حتى العلامة .

6- بعد الخلط الجيد لمحتويات الدورق المعيارى ، تؤخذ كمية معينة من المحلول وتعامل بمخلوط إنزيم ***GOPOD*** (الجلوكوز أكسيديز + البيروكسيديز) وتحضن على 50°م.

7- يقاس الإمتصاص الضوئى للعينة المختبرة والبلانك .

ويوضح الشكل التالى (شكل 5.6) رسما تخطيطيا لخطوات تقدير النشا الكلى :



شكل (5.6): رسم تخطيطى لخطوات تقدير النشا الكلى

وفيما يلى بعض أهم الإعتبارات الواجب مراعاتها أثناء تقدير النشا :

1- عادة ما يوصى بإجراء معاملة ***Carrez*** على المنتجات الغذائية لتحطيم المستحلبات وترسيب البروتينات ، وإمتصاص بعض الألوان ، وذلك قبل تقدير النشا . وتتم معاملة ***Carrez*** بإضافة محلولى بوتاسيوم هكساسيانوحديديك $K_4Fe(CN)_6$ ، حديدوسيانيد البوتاسيوم ، ويعقب ذلك إضافة محلول من كبريتات الزنك $ZnSO_4$ ، ثم يضاف محلول هيدروكسيد الصوديوم . ويتم ترشيح المعلق ، ويستخدم الراشح الرائق مباشرة فى التقديرات الإنزيمية .

2- يجب تنقية إنزيمات الأميليز المستخدمة فى تحليل النشا لتجنب أى نشاط إنزيمى آخر يؤدى لإنتاج الجلوكوز (مثل إنزيمات السليلولاز ***cellulases***).

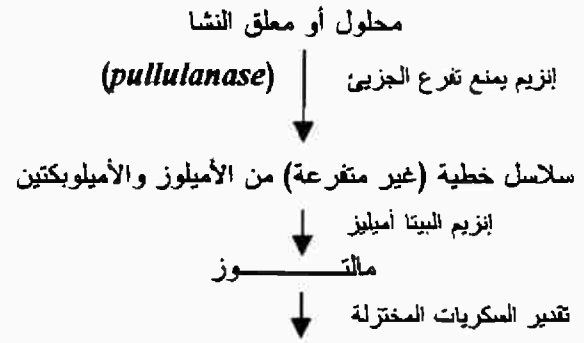
3- توجد أنواع من النشا تقاوم التحليل الإنزيمى أهمها :

* النشا المحتجزة داخل المادة الغذائية فلا تصل إليها إنزيمات الأميليز .
* أنواع من النشا تقاوم التحليل الإنزيمى بسبب طبيعة الحبيبة .
* النشا معاد التبلور (مثل نشا البطاطس بعد الطبخ والتبريد) .

1.1.6.6. قياس درجة جلتنة النشا *Degree of gelatinization of starch:*

عندما تسخن حبيبات النشا فى الماء إلى درجة حرارة معينة تنتفخ حبيبات النشا ، وتفقد تبلورها وتصبح أكثر قابلية للتحلل الإنزيمى ويزداد قوامها كثافة ، ويطلق على هذه الظاهرة عملية الجلتنة .

ولقياس الجلتنة يستفاد من الحقيقة العلمية ان هناك إنزيمات يمكن أن تعمل على النشا المطبوخة وليست لها القدرة على تحليل حبيبات النشا غير المطبوخة . ويتميز مخلوط إنزيمى البوللوناز ***pullulanzse*** والبيتا أميليز ***B-amylase*** أنها ليست لهما القدرة على تحليل حبيبات النشا غير المطبوخة . أما مع النشا المجلتنة فكلا الإنزيمين لهما القدرة على تحليل النشا ، فإنزيم البوللولاناز يحطم الرابط 1 – 6 وبذلك يمنع تفرع الأميلوبكتين أما البيتا أميليز فيعمل على السلاسل المستقيمة ويحولها إلى مالتوز وتقاس درجة الجلتنة بقياس كمية السكريات المختزلة المتكونة بعد المعاملة الإنزيمية . يوضح الشكل التخطيطى التالى (شكل 6.6) كيفية تقدير درجة جلتنة النشا .



شكل (6.6) : رسم تخطيطى لتقدير درجة جلتنة النشا

2.6.6. المركبات غير النشوية كالصموغ والمركبات الغروية

Non starch food gums / hydrocolloids:

تشكل السكريدات العديدة بالإضافة للجيلاتين (بروتينى الأصل) مجموعة مكونات تعرف بالصموغ الغذائية أو المركبات الغروية . ولتلك المركبات إستخدامات عديدة فى منتجات غذائية كثيرة كاللحوم واللحوم المصنعة ، ومنتجات الشوكولاتة ، الأيس كريم والمخبوزات ، ... إلخ .

ومن الأهمية بماكان التعرف على تلك المركبات والتيقن من طرق تحليلها لتقدير نقاوتها ، ولضمان سلامة بيانات البطاقة الغذائية ، وللكشف عنها فى المنتجات الغذائية التى لايصرح بإستخدامها .

ويجابه تحليل تلك المركبات مشاكل عديدة لأن لهذه السكريدات العديدة تركيبات كيميائية ، ودرجات ذوبان ، وأوزان جزيئية متعددة . كما أن تركيبها غير متجانس ، بالإضافة إلى تباين تركيب نفس المجموعة بتباين الظروف البيئية ومصدرها النباتى . وهناك من السكريدات العديدة أنواع متعادلة وأخرى أنيونية ، وبعضها يكون سلسلة مستقيمة والآخر يكون سلسلة متفرعة ، وتحتوى بعض السكريدات العديدة على مجموعات إثير ، أو إستر أو مجموعات أسيتال حلقية . وتوجد أنواع من السكريدات العديدة تذوب فى الماء البارد ، وبعضها يذوب فقط فى الماء الساخن ، ومنها ما يتطلب ذوبان محاليل

أحماض أو قلويات ، ... إلخ . أما السليلوز ، على سبيل المثال ، فلايذوب إلا بطرق إذابة خاصة به .

وتعتمد طرق التحليل على إستخلاص الصموغ ، ثم فصلها إلى مكوناتها وبعد ذلك تقدر تلك المكونات .

1.2.6.6. تقدير محتوى المواد الغذائية من الصموغ/ الغرويات :

Gum / Hydrocolloid –content determination:

من الصعوبة بماكان إستخدام طريقة عامة لتقدير محتوى المواد الغذائية من الصموغ و/أو الغرويات . وقد كانت هناك عديد من المحاولات لتطوير طرق التحليل ، إلا أن أكثر الطرق التى لاقت قبولا كانت الطريقة الموضحة بالرسم التخطيطى فى شكل (7.6) :

شكل (7.6): رسم تخطيطى يبين كيفية عزل وتحليل السكريدات العديدة

وفيما يلى مناقشة مختصرة لبعض الخطوات الموضحة بالحروف الأبجدية بين القوسين :

(أ) : تجفد المادة المراد تحليلها أو تجفف تحت تفريغ ثم تزال منها الدهون والبروتينات حيث تطحن العينة حتى يصبح قوامها ناعما تماما ثم توضع وزنة معلومة منها فى جهاز سوكسلت وتزال منها المواد الليبيدية الذائبة بمخلوط من الكلوروفورم والميثانول 95 :5 (ح/ح) ، ويمكن أيضا إستخدام الهكسان العادى ، إلا أنه عادة ما تفضل المذيبات الأعلى قطبية . يتم تبخير المذيبات من العينة بالتجفيف بالهواء فى خزانة غازات ثم توضع العينة فى مجفف تحت تفريغ .

(ب): يمكن إزالة السكريات الذائبة ، والمركبات منخفضة الوزن الجزيئ والرماد بإستخدام محلول إيثانول ساخن 80 %.

(ج): يزال البروتين من العينة بالتحليل المائى الإنزيمى ، ويستخدم عادة البابايين كمحلل للبروتين . ويتم ذلك بدنترة البروتين (لسهولة هضمه) بنشر العينة فى محلول منظم لخلات الصوديوم على pH = 6.5 يحتوى على كلوريد الصوديوم ثم يسخن المخلوط . يضاف البابايين ثم يحضن المخلوط حتى تحلل البروتين .

(د): ترسب أى سكريدات عديدة ذائبة فى بإضافة محلول كلوريد الصوديوم إلى المخلوط المبرد ، يضاف 4 أمثال الحجم من الكحول المطلق ، ثم يطرد المخلوط مركزيا.

(هـ): يتم تحويل الراسب إلى معلق بإستخدام محلول الخلات المنظم على pH = 4.5 ويضاف للمعلق محلول محضر حديثا من إنزيمى الجلوكوأميليز/أميلوجلوكوزسيداز لإزالة النشا . ويؤدى الطرد المركزى بعد إزالة النشا لإزالة وعزل الألياف غير الذائبة (السليلوز ، الهيميسليلوز ، الليجنين) .

(و): يتم ترسب باقى السكريدات العديدة الذائبة ثانية بإضافة محلول كلوريد الصوديوم إلى المعلق البارد ، ويعقب ذلك إضافة 4 أمثال الحجم من الإيثانول ، ثم يجرى طرد مركزى للمخلوط فيكون الجزء غير الذائب هو الألياف الغذائية غير الذائبة ***Insoluble dietary fiber*** (أساسا سليلوز ولجنين) .

(ز): يتم خلط الراسب مع ماء منزوع الأيونات ، وينقل إلى أنبوبة ديلسة وتتم إجراء عملية ديلسة بإستخدام محلول خارجى من أزيد الصوديوم (لمنع النمو الميكروبى) ، ثم فى

النهاية تجرى عملية الديلسة بإستخدام ماء منزوع الأيونات للتخلص من أزيد الصوديوم . وبعد ذلك يتم تجفيد محتويات أنبوبة الديلسة .

(ح): للتعرف على السكريدات العديدة يتم تحليلها إلى مكوناتها من السكريات الأحادية ثم تعريف وتصنيف تلك السكريات وتقديرها كميا . ولتحليل السكريدات العديدة تضاف مادة البولى سكريد إلى أنبوبة مبطنة بالتفلون ولها غطاء لقفلها بإحكام أثناء التحلل المائى. يضاف محلول حامض ثلاثى فلوروالخليك ***TFAA*** ثم تغلق الأنبوبة بإحكام وتسخن . بعد تمام عملية التحليل الحامضى للسكريدات تبرد الأنبوبة بمحتوياتها ثم تبخر حتى الجفاف بواسطة تيار من الهواء أو النيتروجين .

وتقدر السكريات ونواتج التحليل بواسطة كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى ***HPLC*** أو كروماتوجرافيا الغاز ***GC*** . ويتم التعرف على السكريدات العديدة من تحليل السكريات ، فعلى سبيل المثال ينتج عن تحلل السكريد العديد الجواران ***guaran*** (فى صمغ الجوار) السكريات الأحادية D- مانوز ، D- جلاكتوز بنسبة 1.00 : 0.56.

3.6.6. تقـديـــر البكتـــين ***Pectin determination*** :

البكتين مركب كربوهيدراتى يتم الحصول عليه تجاريا من لب التفاح والموالح بعد إستخلاص العصير ، ويعتبر البكتين من السكريدات العديدة ذات الأهمية البالغة ، وبرغم أهميته ، إلا أنه لم تصدر حتى الآن طريقة رسمية لتقديره .

ويعتمد تركيب البكتين على عوامل عديدة أهمها مصدره ، درجة نضج الثمار المستخلص منها ، وطريقة الإستخلاص ، والمعاملات التى تلى عملية الإستخلاص . وكيميائيا ، فالبكتينات عبارة عن سلاسل طويلة من حامض الجلاكتورونيك ***D-galacturonic*** المرتبطة مع بعضها بالرابطة 1 – 4 . ويتكون البكتين من حوالى 150 – 500 وحدة حامض جلاكتورونيك ويبلغ وزنه الجزيئ من 30000 إلى 100000 وعادة ما تحدث أسترة جزئية بمجاميع الميثيل . وتقسم المركبات البكتينية عادة للمجموعات التالية :

1- **المواد البكتينية *Pectic substances*** : وتشمل كل المواد التى تتكون من وحدات متصلة من حامض الجلاكتورونيك .

2- **البروتوبكتين *Protopectin***: لا يذوب فى الماء ، ويوجد فى صورة مرتبطة وبتحليله مائيا ينتج البكتين .

3- **البكتين *Pectin*** : ويتكون من سلاسل من وحدات حامض الجلاكتورونيك المؤسترة جزئيا ، وعادة ما تكون الإسترات ، أسترات ميثيل ، إلا أنه فى بعض المحاصيل (كالشلجم ، والبنجر) تكون الأسترة بحامض الخليك . ويقسم البكتين إلى نوعين:

- البكتين منخفض الميثيل ***low methoxy pectin*** : ويحتوى على أقل من 7 % من مجاميع الميثيل المرتبطة برابطة إستيرية مع حامض الجلاكتورونيك .
- البكتين عالى الميثيل ***High methoxy pectin*** : وتكون نسبة مجاميع الميثيل فيه أعلى من 7 % .

وتجدر الإشارة إلى أن بوليمر حامض الجلاكتورونيك يعتبر مؤستر بالكامل (100 %) عندما يحتوى على 16.3 % مجموعات ميثيل .

3- **حامض البكتيك *Pectic acid*** : ولا ترتبط فيه أية مجاميع كربوكسيل مع مجاميع ميثيل بل تكون جميعها فى صورة حرة ، ولا يذوب حامض البكتيك فى الماء عكس أملاحه .

وتحتوى المواد البكتينية المعزولة من المواد النباتية على مركبات أرابينان ***arabinan*** ، جلاكتان ***galactan*** ، أرابينوجلاكتان ***arabinogalactan*** ويكون مستخلص البكتين خليط غير متجانس من هذه المكونات .

1.3.6.6. ترسيب المواد البكتينية :

تزداد درجة ذوبان المواد البكتينية بزيادة درجة الأسترة وإنخفاض وزنها الجزيئ وكلما قل ذوبان المركبات البكتينية فى الماء كان ترسيبها أسهل بالإلكترودات .

ويمكن ترسيب المواد البكتينية بإحدى الطرق التالية :

1- عندما تكون درجة أسترة المواد البكتينية فى حدود 20 % يتم ترسيبها بمحلول كلوريد الصوديوم .

2- بزيادة درجة أسترة المواد البكتينية إلى 50 % يتم ترسيبها بمحلول كلوريد الكالسيوم .

3- أما المواد البكتينية التى تصل درجة أسترتها إلى 70 % فيتم ترسيبها بمحلول كلوريد الألومنيوم أو كلوريد النحاس .

هذا ويمكن أيضا ترسيب المواد البكتينية بالمذيبات العضوية كالأسيتون ، والميثانول والإيثانول والبروبانول ، وتزداد درجة تركيز الكحول المطلوبة لترسيب المواد البكتينية بزيادة درجة أسترتها .

2.3.6.6. تقدير البكتين :

توجد عدة طرق تقريبية لتقدير البكتين أهمها الطريقة التالية :

1- تؤخذ وزنة مناسبة من المادة الغذائية ثم تجرى لها عملية تصبن بمحلول هيدروكسيد الصوديوم .

2- تضاف كمية من الحامض بحيث تزيد عن الكمية اللازمة لمعادلة القلوى فيصبح الوسط حامضى .

3- تضاف أيونات الكالسيوم C^{2+} لترسيب البكتين على صورة بكتات كالسيوم .

4- تجمع بكتات الكالسيوم وتغسل وتجفف ويقدر وزنها ثم تحسب النسبة المئوية لها.

وهناك طرقا أخرى لإستخلاص وتقدير البكتين نذكر منها على سبيل المثال لا الحصر الطرق التالية :

- طريقة الترسيب بأملاح الأمونيوم الرباعية والتى تكون معقد مع البكتين حساس للتركيزات القليلة من الإلكتروليات ، عكس الحال فى معقدات أملاح الأمونيوم الرباعية مع السكريدات العديدة الأخرى .
- بسبب سيادة حامض الجلاكتورونيك فى تركيب جزئ البكتين يتم تقديره غالبا بإستخدام الكربازول ***carbazole*** أو ***m-hydroxydiphenyl*** .

7.6. درجـــة الأسترة ***Degree of esterification*** :

تطلق على النسبة المئوية لوحدات حامض الجلاكتورونيك المرتبط بمجاميع الميثيل برابطة إستيرية بدرجة الأسترة . وقد تستخدم الأمونيا لإزالة بعض مجاميع الميثيل عندما تزداد نسبتها فى البكتين عن حد معين . ولدرجة الأسترة أهميتها القصوى فى تحديد

القدرة الجيلية للبكتين وتأثيره فى إكساب المنتجات الغذائية سواء الطبيعية أو المضاف إليها القوام المناسب .

ويتم تقدير درجة الأسترة كما توضحها بإيجاز الخطوات التالية :

1- يغسل البكتين بعد فصله بكحول محمض لتحويل مجموعات الكربوكسيلات *carboxylate groups* إلى مجموعات كربوكسيل (*-COOH*) حرة .

2- يغسل البكتين للتخلص من الزيادة من الحامض .

3- يعادل حامض البكتينيك المعلق فى الماء بمحلول قياسى من قلوى مخفف مثل هيدروكسيد الصوديوم ، ويمكن بذلك تقدير % لمجاميع الكربوكسيل غير المؤستر مباشرة .

4- تضاف كمية من القلوى معلوم العيارية لإجراء تصبن لمجاميع إسترات الميثيل.

5- بعد التصبن يجرى تعادل رجعى ***back titration*** بحامض قياسى وبذلك يمكن تقدير كمية القلوى التى لم تستهلك فى التصبن .

6- من المعادلة : عدد ملليمكافئات القلوى الكلية – عدد ملليمكافئات الحامض القياسى

= عدد ملليمكافئات القلوى التى إستهلكت فى تصبن مجاميع إسترات الميثيل

7- يمكن بسهولة حساب % لمجاميع الكربوكسيل المؤسترة (درجة الأسترة)

كذلك يمكن تقدير الميثانول المتحرر بعد التصبن مباشرة بواسطة كروماتوجرافيا الغاز .

8.6. الألياف الغذائية *Dietary fibers* :

فى الآونة الأخيرة ظهر إهتماما كبيرا بتقدير الألياف الغذائية فى الوجبات الغذائية . والألياف الغذائية هى مجموع المكونات التى لاتهضمها إنزيمات الثدييات فى المواد والمنتجات الغذائية . ومعظم الألياف الغذائية عبارة عن جدر الخلايا النباتية (سليلوز ، هيميسليلوز ، لجنين) . وبعض الألياف الغذائية تكون غير ذائبة كالسليلوز ، وبللورات السليلوز الدقيقة التى تضاف للأغذية الخاصة ، والهيميسليلوز واللجنين . أما الألياف الذائبة فتشمل الصموغ الغذائية والغرويات .

وقد إزداد الإهتمام بإستهلاك الألياف الغذائية فى غذاء الإنسان منذ بدايات السبعينات بعدما تناولت تقارير طبية أهميتها وربطت بين إنخفاض معدلات إستهلاكها وزيادة

إحتمالات الإصابة بأمراض القلب والأمراض السرطانية . وقد تأكد طبيا أن إستهلاك الألياف الغذائية مع غذاء الإنسان يقلل من الإصابة بسرطان القولون ، كما يقلل من إمتصاص الجلوكوز ويخفض من إفراز الأنسولين ويستفيد من ذلك المصابين بمرض السكر ***diabetes*** وأيضا غير المصابين . كما تساعد الألياف الغذائية فى عملية الإخراج وقد قدرت الكمية المناسبة من الألياف الغذائية بخمسة وعشرين جراما مع كمية من المواد الغذائية تقدر قيمتها الحرارية بـــ 2000 كالورى .

ويعتبر السليلوز والهيميسليلوز والبكتين ، والغرويات ، واللجنين هى المكونات الرئيسية للألياف الغذائية .

وتقدر الألياف الغذائية إما بطرق الوزن النوعى أو بالطرق الكيميائية . وسنتناول بإيجاز الطريقة الأولى والتى تعتمد على إذابة الكربوهيدرات القابلة للهضم ، والبروتينات ولإستخلاص الليبيدات ثم تجمع المواد غير القابلة للهضم بعملية الترشيح وتقدر الألياف بالوزن .

1.8.6. إعداد العيـــنة ***Sample preparation*** :

عندما تكون العينة منخفضة فى نسبة الدهن (أقل من 5 – 10 %) وجافة ومطحونة جيدا تكون تقديرات الألياف فى تلك العينة أكثر دقة . وعندما تحتوى العينة على نسبة من الدهون أعلى من 10 % تستخلص الدهون بالإيثر البترولى أو الهكسان مرتين على الأقل ثم تجفف العينة تحت تفريغ على 70°م وتطحن لتمرر خلال غربال سعة ثقوبه 0.3 – 0.5 مم . ويسجل الفقد فى الوزن بعد إستخلاص الدهن وإزالة الرطوبة ومن هذه النتائج يمكن حساب % للدهن والرطوبة فى العينة .

ويوضح الرسم التخطيطى التالى (شكل 8.6) طريقة معتمدة من هيئة المحللين الكيميائيين الرسمية برقم 991.43 (فى الطبعة السادسة عشرة 1997م) لتقدير الألياف الغذائية فى الأغذية .

عينة المادة الغذائية (1 جم)

▼

يضاف 40 مل محلول منظم (pH = 8.2) ثم يضاف إنزيم الألفا أميليز الثابت للحرارة

▼

حضن الإنزيم على 95 – 100°م لمدة 15 دقيقة

▼

يتم التبريد إلى 60°م

▼

يضاف إنزيم البروتيز ***protease***

▼

حضن على 60°م لمدة 30 دقيقة

▼

يضبط الـ pH على 4.5 – 4.7 ثم يضاف إنزيم الأميلوجلوكوسيداز

▼

حضن على 60°م لمدة 30 دقيقة

▼

رشح بعد عمليات الهضم السابقة

▼

إغسل الراسب على ورقة الترشيح بـ 10 مل ماء (مرتين)

▼

يستخدم الراشح + ماء الغسيل لتقدير الألياف الذائبة

▼

يغسل الراسب مرة أخرى بـ 10 مل كحول إيثانول 95 % (مرتين) ، ثم يغسل مرة ثانية بـ 10 مل أسيتون (مرتين)

▼

جفف بالفرن

▼

زن البوتقة

▼

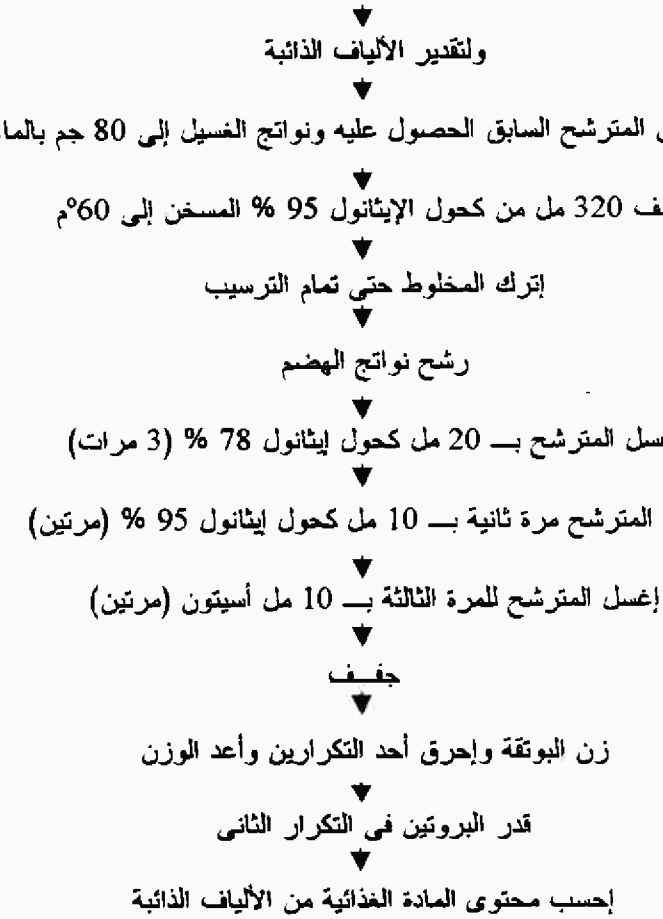
إحرق أحد التكرارين (على 525°م/5 ساعات)

▼

قدر البروتين في التكرار الثاني

▼

إحسب محتوى المادة الغذائية من الألياف غير الذائبة



شكل (8.6) : رسم تخطيطى يوضح طريقة تقدير الألياف الغذائية فى الأغذية

ويوضح جدول (3.6) محتوى بعض الأغذية من الألياف الكلية ، والذائبة وغير الذائبة مقدرة بالطرق السابق وصفها .

جدول (3.6): محتوى بعض الأغذية من الألياف الغذائية الكلية ، غيرالذائبة ، والذائبة (مقدرة كنسبة مئوية على اساس الوزن الرطب).

الغـــــذاء	الألياف الذائبة	الألياف غير الذائبة	الألياف الكلية
الشعير (المقشور)	5.02	7.05	12.25
الحبوب المرتفعة فى نسبة الليف	2.78	30.52	33.73
ردة الشيلم	7.71	9.73	16.92
ردة الصويا	6.90	60.53	67.14
المشمش	0.53	0.59	1.12
البرقوق	5.07	4.17	9.29
الزبيب	0.73	2.37	3.13
الجزر	1.10	2.81	3.93
الفاصوليا الخضراء	1.02	2.01	2.89

9.6. أســـــــــئلة

1- أذكر ثلاثة أسباب لأهمية تحليل الكربوهيدرات .

2- بين لماذا يفضل إستخلاص السكريات الأحادية والثنائية بمحلول 80 % إيثانول بدلا من الماء ؟

3- عرف مصطلح السكريات المختزلة . وضح أى أنواع المواد الكربوهيدراتية التالية مختزلا أو غير مختزل مع التعليل : D- جلوكوز ، D- فركتوز ، سكروز ، مالتوز ، رافينوز ، المالتوز ، سليلوز ، الأميلوبكتين .

4- صف طريقة واحدة يمكن إستخدامها لكل مما يأتى :

أ- لتجنب تحلل السكروز عند إستخلاص السكريات بالكحول الساخن .

ب- إزالة البروتين من محلول سيستخدم للتحليل الإنزيمى .

ج- لتقدير الكربوهيدرات الكلية .

د- لتقدير السكريات المختزلة الكلية .

هـ- لتقدير تركيز السكروز بإحدى الطرق الطبيعية .

5- إشرح الأساس العلمى لتقدير الكربوهيدرات بطريقة الفينول – حامض الكبريتيك .

6- إشرح الأساس العلمى لتقدير السكريات المختزلة بطريقة سوموجى- نيلسن .

7- إشرح الأساس العلمى لكروماتوجرافيا التبادل الأيونى للكربوهيدرات .

8- لماذا إزداد الإهتمام بتقدير السكريات بكروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى ؟

9- وضح كيفية تقدير البكتين مع إيضاح المبرر لخطوات التقدير المختلفة .

10- عرف مصطلح الألياف الغذائية ***dietary fibers*** ثم بين مكوناتها .

11- وضح أهمية كل خطوة من الخطوات التالية عند تقدير الألياف الغذائية بطريقة الـ *AOAC* :

* تسخين العينة ومعاملتها بإنزيم الأميلوجلوكوسيداز .
* تسخين العينة مع إنزيم البروتيز .
* إضافة كحول إيثانول 95 % للعينة بعد المعاملة بإنزيمات الأميلوجلوكوسيداز والبروتيز .
* بعد تجفيف ووزن ورقة المترشح يتم إجراء حرق لأحد المكررين على 525°م فى فرن إحتراق ، ويتم تقدير البروتين فى المكرر الثانى .

11- عند تقدير الرماد فى عينة مادة غذائية كانت النتائج المتحصل عليها كالتالى :

وزن العينة (مجم) = 1002.8 ، وزن المتبقى (مجم) = 151.9

وزن البروتين (مجم) = 13.1 ، وزن الرماد (مجم) = 21.1

البلانك (مجم) = 6.1 ، وزن النشا المقاوم (مجم) = 35.9

إحسب % للألياف الكلية .

10.6. المراجـــــــع

REFERENCES

AOAC International. 1995. Official Methods of Analysis 16th ed. AOAC International , Gaithersburg, M.D.

Asp, N.G. and Bjoerk, I. 1992. Residant starch . Trends in Food Science and Technology.3 : 11.

Baker, R.A. 1997. Reassessment of some fruit and vegetable pectin levels. J. Food Sci. 62: 225.

Chaplin , M.F. and Kennedy, J.F. (Ed.). 1994. Carbohydrate Analysis . A practical Approach , 2nd ed. IRL. Press, Oxford, UK.

Hicks, K.B. 1988. High-performance liquid chromatography of carbohydrates. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 46 : 17.

Kintner, P.K. and Van Buren, J.B. 1982. Carbohydrate interference and its connection in pectin analysis using the m.hydroxydiphenyl method. J. Food Sci. 47: 756.

Leeds, A.R. and Avenell, A. (Eds.). 1985. Dietary Fiber prespective: Review and Bibliography 1-John Libby and Company Ltd., London.

Pomeranz, Y. and Meloan, C.E. 1994. Food Analysis: The Theory and Practice, 3rd ed. Champan and Hall, New York.

Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, T.F., de Vries, J.W. and Furda, I. 1988. Determination of insoluble , soluble, and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory study. J. of the Association of Official Analytical Chemists 71: 1017 – 1023.

Suzanne Nielsen, S.(Ed.). 1998. Food Analysis 2nd ed. An Aspen Publication, Aspen Publisher, Inc., Gaithersburg, Maryland.

Theander, O. and Westerlund, E. 1986. Studies on dietary fiber. 3. Improved procedures for analysis of dietary fiber . J. of Agric. And Food Chem. 34 :33. –336.