

٩٢

١٠٦٨١٢

تحليل الفيتامينات

تحليل الفيتامينات

دكتور

عادل سيد عفيفي

أستاذ الكيمياء الحيوية - كلية الزراعة
جامعة القاهرة



الناشر

المكتبة الأكاديمية

٢٠٠٠

حقوق النشر

الطبعة الأولى : حقوق الطبع والنشر © ٢٠٠٠ جميع الحقوق محفوظة للناشر :

المكتبة الأكاديمية

١٢١ شارع التحرير - الدقي - القاهرة

تليفون : ٣٤٨٥٢٨٢ / ٣٤٩١٨٩٠

فاكس : ٣٤٩١٨٩٠ - ٢٠٢

لا يجوز استنساخ أى جزء من هذا الكتاب بأى طريقة كانت

إلا بعد الحصول على تصريح كتابى من الناشر .

المحتويات

الصفحة

٩	مقدمة
١٢	الفيتامينات
١٥	الغرض من التحليل الكمي والنوعي للفيتامينات
١٧	فحص وتحليل الحالة الغذائية للفيتامينات في الإنسان
١٨	تحديد سبب نقص الفيتامينات
٢٣	الاختبارات العملية لنقص الفيتامينات
٢٤	رعاية حيوانات التجارب والعناية بها لتجارب التغذية
٥١	طرق دراسة الفيتامينات
٦١	تحليل الفيتامينات
٦٣	Vitamin A - فيتامين أ
	تفاعلات فيتامين أ - الخواص - أعراض نقص فيتامين أ - التمثيل الغذائي لفيتامين أ - تحليل فيتامين أ
١١٣	Vitamin D - فيتامين د
	تفاعلاته - انتشاره ومصادره - أعراض النقص - فصل وتقدير فيتامين د
١٣٩	Vitamin E - فيتامين هـ
	تفاعلاته - الذوبان - انتشاره ومصادره - تحليل فيتامين هـ

فيتامين ك - Vitamin K

تفاعلاته - صورته - خواصه الطبيعية - انتشاره وتوزيعه - الدور
الطبي والغذائي - تحليل فيتامين ك

فيتامين ب_١ (الثيامين) - Vitamin B₁ (Thiamine)

تفاعلاته - الذوبان - صورته - خواصه - انتشاره ومصادره -
الدور الطبي والغذائي - تحليل الثيامين - تقدير تركيز الثيامين في
مستحضرات البول فيثامين .

فيتامين ب_٢ (الريبوفلافين) - Vitamin B₂ (Riboflavin)

تفاعلاته - الذوبان - خواصه - انتشاره ومصادره - الدور الطبي
والغذائي - تحليل فيتامين ب_٢

فيتامين ب_٦ (البيريدوكسين) - Vitamin B₆ (Pyridoxine)

تفاعلاته - صورته وخواصه - انتشاره ومصادره - الدور الطبي
والغذائي - تحليل فيتامين ب_٦ .

النياسين - Niacin

تفاعلاته - الذوبان - صورته وخواصه - انتشاره ومصادره -
الدور الطبي والغذائي - تحليل النياسين

البيوتين - Biotin

تفاعلاته - الذوبان - صورته وخواصه - انتشاره ومصادره -
المصادر الغذائية - الدور الطبي والعلاجي - تحليل البيوتين

حمض البانتوثينيك - Pantothenic acid

تفاعلاته - صورته وخواصه - انتشاره ومصادره - الدور الطبي
والعلاجي - تحليل حمض البانتوثينيك

حمض الفوليك - Folic acid

تفاعلاته - الذوبان - صورته وخواصه - انتشاره ومصادره -
الدور الطبى والغذائى - تحليل حمض الفوليك

فيتامينات ب_{١٢} - Vitamin B₁₂

تفاعلاته - الذوبان - صورته وخواصه - انتشاره ومصادره -
الدور الطبى والغذائى - تحليل فيتامين ب_{١٢}

حمض الاسكوربيك (فيتامين ج) - L-Ascorbic acid (Vit. C)

تفاعلاته - الذوبان - صورته وخواصه - انتشاره ومصادره -
الدور الغذائى والطبى - تحليل حمض الاسكوربيك

المحتوى الفيتامينى لبعض الأغذية الشائعة

المراجع

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مقدمة

إن علم المنظمات الحيوية إحدى علوم الكيمياء الحيوية الأساسية الذي يهتم بدراسة تنظيم العمليات الحيوية داخل جسم الكائن الحي بصفة عامة وداخل الخلايا بصفة خاصة . وقد تقدمت العلوم الحديثة وأهتمت بكل فرع من فروع المنظمات الحيوية كل على حده ، وأنشأت هيئات ومجلات علمية متخصصة تهتم بهذه الدراسات المتخصصة بغرض فهم وتوضيح ما يحدث داخل الوحدة الأساسية للحياة ألا وهي الخلية .

وعلم الفيتامينات Vitamins أحد أفرع هذه العلوم والذي يختص بدراسة الأوجه المختلفة للفيتامينات سواء من الناحية الكيميائية والتي تشمل تفاعلاتها الكيميائية وثباتها والعوامل المؤثرة عليها ... إلخ ، أو من الناحية الحيوية والتي تشمل الدور الذي تلعبه داخل خلايا الكائنات المختلفة (وظائفها الحيوية) وكيفية تخليقها وهدمها وتخزينها إلخ . وتحليل الفيتامينات كماً ونوعياً يحتل المكانة الرئيسية في دراسة هذه الأوجه ، وقد اهتم به علماء الكيمياء الحيوية اهتماماً كبيراً ، وبفضل التقدم التكنولوجي الكبير في أجهزة التحليل الدقيقة فقد تطورت أيضاً طرق تحليل الفيتامينات . وفي هذا العمل المتوضع سوف نستعرض بمشيئة الله سبحانه وتعالى بعض النقاط الهامة في مجال تحليل الفيتامينات والتي تضم الغرض من تحليل الفيتامينات ، وكيفية دراستها ، وما هي متطلبات الإنسان منها، ومصادرها الهامة، وأعراض نقصها، مع إضافة موجزة عن العناية بحيوانات التجارب والتي تستخدم كمرجع لتقدير كل فيتامين . ونسأل الله تبارك وتعالى أن ينفع بها ونسأله عز وجل التوفيق .

الفيتامينات

تبدأ قصة اكتشاف الفيتامينات منذ العصور القديمة ولكن لم يفتح الستار عن حقيقة هذه المركبات إلا منذ قرن تقريباً ، فقد عرف اليونانيون القدماء والرومان والعرب منذ القدم مرض العشى الليلي night blindness وكانوا يدأونه بتناول الكبد . كما كان للفيتامينات قصة أيضاً مع البحارة ، ففي القرن السادس عشر كان يظهر على البحارة امراض نقص الفيتامينات وذلك لندرة ما يتناولونه من خضروات طازجة ، فكانوا يمكنون في البحار شهور طويلة بدون خضروات طازجة فظهرت عليهم أعراض مرض الأسقربوط Scurvy ووصف لهم الليمون لعلاج هذه الحالة . كما عانى البحارة اليابانيون من مرض البرى برى beriberi (فى القرن التاسع عشر) لما كانوا يتناولونه من أرز وتم معالجة أعراضه باستبدال الأرز بالشعير أو بزيادة نسبة ما يتناولونه من لحوم وخضروات . وفى نفس الفترة تقريباً لوحظت بعض أعراض نقص الفيتامينات على الحيوانات ومشابهة لأعراض نقصها على الإنسان ، وبذلك إتجه نظر العلماء إلى إن الجسم يحتاج إلى مغذيات أخرى غير الكربوهيدات والبروتينات والدهون والأملاح والماء حتى يصح ولا تظهر عليه الأعراض المرضية .

ومن الطريف فى هذه القصة إن أحد الفيتامينات (النياسين) كان يوجد فى المعامل الكيميائية (وسبق تحضيره نقياً) ولم يكن يعرف إنه يلزم لصحة الجسم إلى أن تم فصله وتعرفه . وجدول (١) يلخص تاريخ الفيتامينات ، تاريخ اكتشافها وفصلها وتاريخ توضيح تركيبها وتاريخ تخليقها ، هذا بالإضافة إلى المصدر الغذائى الذى فصل منه أول مرة .

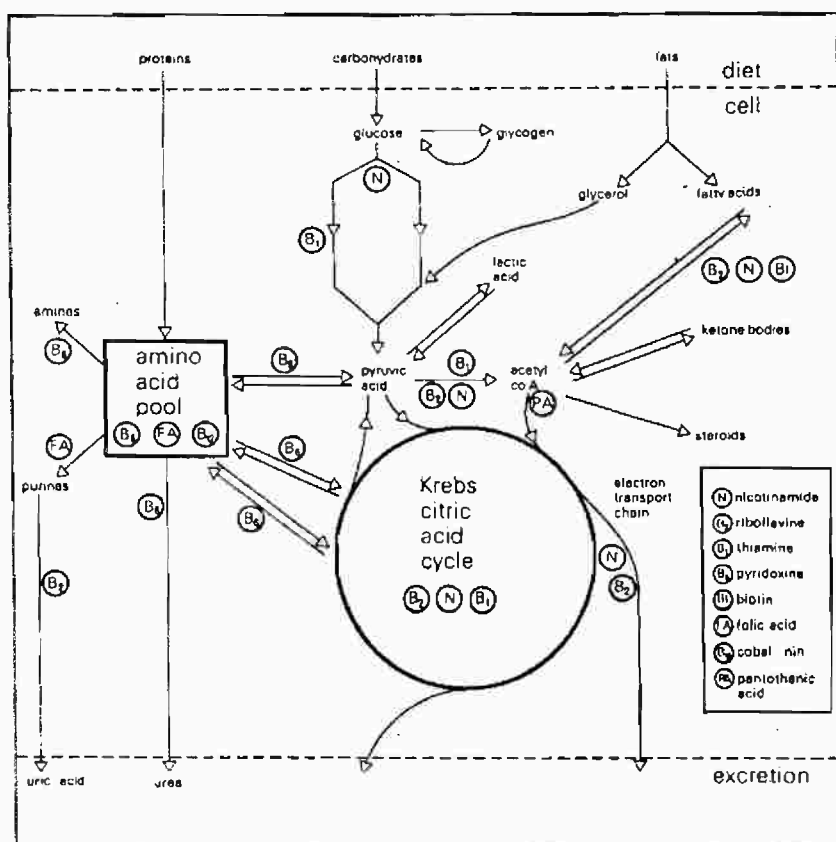
والآن يعتبر علم الفيتامينات أحد أفرع العلوم البيولوجية الهامة ، وأصبح علماً قائماً بذاته نتيجة لما اكتشفه ومازال يكتشفه العلم الحديث من أدوار ووظائف حيوية وفسيولوجية للفيتامينات فى الإنسان خاصة وفى جميع الكائنات الحية عامة . وبمعاونة الأجهزة الحديثة والمتطورة يوم بعد يوم ، تكتشف أهميات فسيولوجية أو حيوية أو طبية جديدة لبعض الفيتامينات ، ونظراً لأهمية هذا العلم واهتمام العلماء به فقد أصبح اليوم مجالات علمية خاصة تهتم فقط بنشر الأبحاث الخاصة بالفيتامينات . هذا ، ومن الصعب تعريف الفيتامينات تعريفاً محدداً ، لأنها تختلف فى التركيب والخواص والوظائف إلخ ، ولكن يمكن تعريفها بصفة عامة بأنها مجموعة مركبات عضوية لازمة لنمو الإنسان والحيوان وبعض الكائنات الحية الدقيقة بصورة طبيعية ويلزم تناولها من الخارج (أى لا تخلق داخله) ويحتاج إليها بكميات

Vitamin	First isolated	Discovery	Isolation	Structure elucidated	Synthesis
Vitamin A	Fish liver oil	1909	1931	1931	1947
Provitamin A	Carrot, palm oil		1831	1930	1950
Vitamin D	Fish liver oil, yeast	1918	1932	1936	1959
Vitamin E	Wheat germ oil	1922	1936	1938	1938
Vitamin K	Alfalfa	1929	1939	1939	1939
Vitamin B ₁	Rice bran	1897	1926	1936	1936
Vitamin B ₇	Egg albumin	1920	1933	1935	1935
Niacin	Liver	1936 (1894)	1935 (1911)	1937	1894
Vitamin B ₆	Rice bran	1934	1938	1938	1939
Vitamin B ₁₂	Liver, fermentation	1926	1948	1956	1972
Folic acid	Liver	1941	1941	1946	1946
Pantothenic acid	Liver	1931	1938	1940	1940
Biotin	Liver	1931	1935	1942	1943
Vitamin C	Adrenal cortex Lemon	1912	1928	1933	1933

جدول (١) تاريخ الفيتامينات

بسيطة ، ولا تدخل في بناء أنسجة الكائن الحي (ليست مركباً بنائياً) ، ولا تهدم لغرض إعطاء الطاقة (ليست مركباً مولداً للطاقة) ، ولكنها لازمة لكل هذه العمليات التمثيلية (هدم وبناء) والنمو والتكاثر والعمليات الفسيولوجية الأخرى .

وعادة ما تخلق الفيتامينات أو المركبات التي تتحول داخل الكائن الحي إلى فيتامينات precursors أو provitamins (بادئات) ، والتي تسمى أحياناً بأصل الفيتامين ، تخلق في النبات وأحياناً يخلق بعضها في بعض الكائنات الحية الدقيقة . وتختلف الخواص الكيميائية والطبيعية للفيتامينات . وكثيراً ما تقسم الفيتامينات إلى مجموعتين على حسب خاصية ذوبانها في الماء أو في مذيبيات الدهون وهما فيتامينات ذائبة في الدهون fat soluble vitamins وفيتامينات ذائبة في الماء water soluble vitamins . ومعظم أفراد مجموعة الفيتامينات الذائبة في الماء تشارك في كثير من التفاعلات الكيميائية الحيوية داخل الخلايا الحية من خلال وظيفتها كمعاونات أنزيمية coenzymes لأنزيمات كثيرة تشارك في حفز تفاعلات التمثيل الغذائي metabolism للكربوهيدرات والدهون والبروتينات التي تزود الجسم بالطاقة ، وشكل (١) يوضح أهمية الفيتامينات في التمثيل الغذائي داخل الخلية .



شكل (١) أهمية الفيتامينات في التمثيل الغذائي الخلوي cellular metabolism

وتختلف متطلبات الكائن الحي من الفيتامينات تبعاً لاختلاف نوعه وجنسه وعمره وحالته إلخ ، فمثلاً تحتاج النواجن إلى حوالي ٦٠ ملجم فيتامين ج لكل كيلو جرام من الغذاء ، أما الخنزير فيحتاج إلى حوالي ١٥٠ - ٢٠٠ ملجم حسب نوعه وحالته ، بينما لا تحتاجه القوارض (ماعدا خنزير غينيا) ، وجدول (٢) يلخص احتياجات بعض أجناس الحيوانات المختلفة للفيتامينات واللازمة لأفضل نمو optimum growth وأنتاج yield وخصوبة fertility تحت الظروف الطبيعية . وفي غياب هذه الفيتامينات في غذاء الإنسان أو الحيوان أو نقصها تظهر أعراض مرضية معينة ، ولكل فيتامين أعراض النقص الخاصة به ، كما تختلف أعراض نقص الفيتامين من حيوان لآخر ، ومن ذلك تتضح أهمية الفيتامينات وأهمية تقديرها وتحليلها .

Table 36 Vitamin requirements of various animal species. Expressed as quantities per kg of ration unless otherwise stated.

Vitamin Quantities per kg of ration (about 90% dry matter)	A	D ₃	E	K	B ₁	B ₂	Nico- nic acid	Panto- thenic acid	B ₆	B ₁₂	Folic acid	Biotin	Choline C
	I.U.	I.U.	I.U.	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
POULTRY													
Chicks and broilers (starting)	15,000	1,500	30	3	3	8	50	20	7	0.030	1.5	0.15	1,500
Chicks and broilers (growing)	10,000	1,000	25	2	3	6	40	12	5	0.020	0.7	0.10	1,300
Hens, Ducks (laying and breeding)	12,000	1,200	30	2	3	6	40	15	5	0.040	1.5	0.20	1,100
Turkey (starting)	15,000	1,500	35	3	3	8	80	20	7	0.020	1.5	0.35	2,000
Turkey (growing and fattening)	10,000	1,100	30	2	3	6	70	15	5	0.015	1.5	0.20	1,700
Turkey (breeding)	12,000	1,200	40	2	3	8	70	25	6	0.015	1.5	0.30	1,700
PIGS													
Piglets (starting)	15,000	1,500	30	3	3	6	25	20	6	0.04		0.20	1,200
Pigs (growing)	10,000	1,000	25	1	2.5	5	20	15	5	0.03		0.15	1,000
Pigs (fattening)	5,000	500	20	0.5	2	4	15	15	4	0.02		0.10	900
Sows (breeding)	12,000	1,200	25	1	2.5	6	15	12	5	0.02		0.21	900
RUMINANTS													
Calves (0-3 months)*	20,000	2,000	40		4	7	25	12	5	0.02		0.10	400
Cattle (rearing)**	25,000	3,000	150										500†
Cattle (fattening)**	40,000	5,000	250										
Dairy cows**	50,000	8,000	350										
Sheep and goats**	4,000	250	25										
HORSES													
Foals	10,000	1,500	50		6	10	30	12	3	0.03	3		150
Yearlings	20,000	3,000	100		12	20	60	25	6	0.06	6		300
Working and saddle horses	40,000	6,000	300		20	40	100	40	10	0.10	10		450
Race horses and breeding horses	40,000	6,000	1,000		30	50	120	50	15	0.15	15		600
OTHERS													
Dogs	10,000	1,000	40		3	5	25	10	3	0.03	0.3	0.25	1,000
Cats	18,000	1,800	50		8	8	60	12	6	0.02	0.4	0.25	1,500
Rabbits	9,000	900	40		2	6	50	20	2	0.01			1,300
Mink and foxes	10,000	1,000	80		4	6	30	15	2	0.03	0.6	0.25	1,000
Fish (trout)	8,000	1,000	125	15	10	25	200	50	15	0.02	4.0	1.00	1,500

* per day per 100 kg live weight.

** per day per animal.

† 500 daily for the first two weeks.

جدول (٢) احتياجات بعض اجناس الحيوانات المختلفة للفيتامينات ، والكميات عبر عنها بوحدات دولية (I.U.) أو ملجم لكل كيلو جرام من الغذاء فيما عدا بعض الحالات ومشار إليها .

الغرض من التحليل الكمي والنوعي للفيتامينات :-

هناك أغراض عديدة للتحليل الكمي أو النوعي للفيتامينات سواء على المستوى البحثي أو الغذائي أو الأكلينيكي إلخ ، وهذه الأغراض تضم مايلي :-

١ - تقدير محتوى الأغذية من الفيتامينات :-

من المهم بالطبع تقدير محتوى الأغذية الطبيعية من الفيتامينات المختلفة لغرض إظهار قيمتها الحيوية ، كما يقدر محتوى الأغذية المصنعة والمعلبة والمحفوظة إلخ من الفيتامينات لغرض دراسة تأثير المعاملات المختلفة عليها . ومن ناحية أخرى ، لابد من الأخذ في الاعتبار وجود المواد المصاحبة للفيتامينات في الأغذية المختلفة ، فقد تعطى الطرق الكيميائية نتائج عالية لما تحتويه من فيتامين ما ، ولكن طرق أخرى (مثل الطرق الحيوية) تعطى نتائج مخالفة لذلك ، ويرجع ذلك إلى عدم تيسر الفيتامين حيويًا ، لذلك فلا بد من تقييم مدى تيسره الحيوي bioavailability .

٢ - تقدير المحتوى الفيتاميني للمستحضرات الصيدلانية والطبية :

إن تقدير الفيتامينات في المستحضرات الصيدلانية pharmaceutical preparations أمر هام لتحديد الكمية الفعلية والحيوية من الفيتامينات في هذه المستحضرات ، ففي كثير من الأحيان توجد الفيتامينات في هذه المستحضرات في صورة غير نقية ولكن تستخلص من مصادره الطبيعية الغنية بها ، لذلك لابد من استخلاصها أولاً ثم تقديرها حتى نعرف محتواها بالضبط من الفيتامينات ، كما هو الحال في مجموعة فيتامين ب المركب Vit . B complex حيث توجد في الخميرة بكميات كبيرة جداً وتستخلص منها وتجهز في صورة مستحضرات صيدلانية .

٣ - تقدير المحتوى الكلي من الفيتامينات في الأغذية الخاصة المدعمة بالفيتامينات :

مع زيادة متطلبات الحياة العصرية وإنشغال الإنسان في العمل ، بات يصعب عليه تناول الأغذية الطازجة ويتناول الأطعمة المحفوظة والمعلبة والمجففة إلخ ، وحيث أن هذه الأغذية تفقد معظم محتواها من الفيتامينات أثناء التصنيع ، فأصبح حتمياً تعويض الإنسان عن ذلك النقص ، فتصنع أغذية مدعمة بالفيتامينات . وفي أحيان كثيرة ، قد تصاب الأطفال بنقص فيتامينات لذلك تجهز لهم أغذية خاصة مدعمة بالفيتامينات أيضاً ، لذلك أصبح من

الضرورى تقدير محتوى هذه الأغذية من الفيتامينات .

أما بالنسبة للحيوانات (مثل حيوانات المزرعة - بقر - جاموس - غنم .. إلخ) عادة ما تجهز لها علائق مناسبة ويضاف إليها مخلوط فيتامينات ، وعلى ذلك من الضرورى أيضاً تقدير محتوى هذه العلائق من الفيتامينات وتقييمها حيويًا .

٤ - تقدير مستوى الفيتامينات فى السوائل الحيوية والأنسجة :

إن تحليل الفيتامينات وتقدير مستواها فى السوائل الحيوية biological fluids (مثل الدم والسيرم والبلازما و اللبن والبول .. إلخ) أمر ضرورى جداً فى الدراسات الأكلينيكية ويعتمد عليها فى تحديد حالة المرضى بنقص الفيتامينات ، كما أن نتائج التحليل تستخدم فى تقييم الحالة الفيتامينية Vit . status فى الإنسان أو الحيوان .

٥ - تحديد متطلبات الكائن الحى من الفيتامينات :

تمت دراسات كثيرة لتحديد متطلبات الإنسان فى مراحل حياته المختلفة من الفيتامينات ، كما تمت مثل هذه الدراسات ومازالت تجرى على الحيوانات وبعض الكائنات الحية الدقيقة . هذا ، وتضم هذه الدراسات تحديد الصورة المثلى الواجب تقديمها له .

٦ - دراسة تأثيرات نقص وزيادة الفيتامينات على الكائن الحى :-

سبق وقد عرف الإنسان أعراض نقص الفيتامينات ، وكان لهذه الأعراض الفضل الأول فى اكتشافها ، وعلى ذلك كان ومازال من المهم دراسة تأثير نقصها فى الإنسان والحيوان على حد سواء لتلافى حدوثها والوقاية منها ، وتعرف هذه الحالات بالـ hypovitaminosis . ومن ناحية أخرى ، عند زيادة تناول الفيتامينات تحدث أعراض مشابهة لنقصها وتعرف بأسمـ hypervitaminosis . وعادة ما تظهر هذه الحالات فى مجموعة الفيتامينات الذائبة فى الدهون لأنها تخزن فى الجسم وتصبح حملاً على الجسم يجب التخلص منه ، ومن هنا تنشأ أعراض التسمم بالفيتامينات . لذا كان من المهم دراسة تأثيرات نقص وزيادة الفيتامينات فى جسم الإنسان والحيوان على حد سواء .

٧ - دراسة تأثيرات الفيتامينات الطبية والعلاجية :

مع تقدم العلوم الحيوية والتقنيات الحديثة وتوافر الأجهزة الدقيقة للتحليل ، أمكن كشف النقاب عن تأثيرات جديدة لم تكن تعرف من قبل للفيتامينات ، مثل تأثير فيتامين أ على

السرطان (Meyskens et al ., 1984) وأمكن وقف نموه بالفيتامينات ، لذا فهناك دراسات حديثة تجرى على إظهار الدور الطبى والعلاجى للفيتامينات .

٨ - دراسة مشابهات الفيتامينات ومشجعاتها ومضاداتها : -

إن الأجهزة الدقيقة الحديثة تمكنها الآن تحليل مشابهات الفيتامينات isomers كميًا ونوعيًا ، وهذا له دوره فى إبراز الدور الحيوى لهذه المشابهات . وتجرى دراسات عديدة على وظيفة مشابهات الفيتامينات ونشاطها الحيوى بالنسبة للفيتامين الأصيل ، وغيرها من الدراسات . كما تجرى الدراسات أيضاً على المركبات التى تشجع وتزيد من كفاءة الفيتامين فى جسم الإنسان والحيوان والتى تعرف بأسم synergists . والعكس بالعكس ، فهناك أيضاً مركبات تضاد فعل الفيتامين والتى تعرف بأسم antagonists (antivitamins) ، لذا فتجرى الدراسات عليها أيضاً .

٩ - دراسة التمثيل الغذائى (الأيض) والوظائف الحيوية للفيتامينات :

من المهم أيضاً دراسة تكسير أو هدم الفيتامين catabolism وتخليقه داخل الكائن الحى anabolism ، وهذا يتطلب اجراء التحليل الكمى والنوعى للفيتامينات ومركبات تكسيرها أو تخليقها الوسطية ، بالإضافة إلى ذلك دراسة وظائفها الحيوية داخل خلايا الكائن الحى .

١٠ - دراسات أخرى :-

هناك دراسات أخرى كثيرة تجرى على الفيتامينات يلزم لها التحليل الكمى والنوعى نذكر منها على سبيل المثال لا الحصر مايلى :-

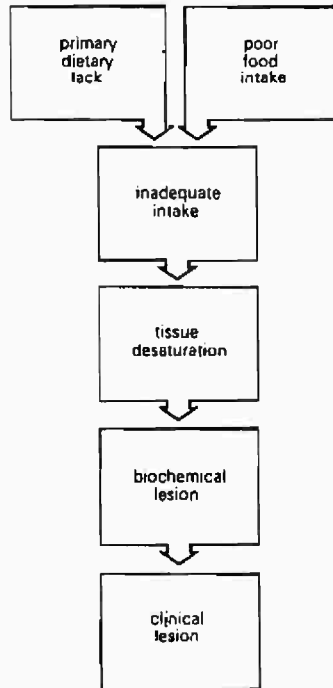
دراسة الخواص الطبيعية والكيميائية ، دراسة مسارها فى الجسم (امتصاص ، نقل ، تخزين ، إفراز إلخ) ، تفاعلاتها مع الجواهر الكشافة المختلفة إلخ .

فحص وتحليل الحالة الغذائية للفيتامينات فى الإنسان : -

إن تشخيص حالات نقص الفيتامينات لم يصبح الآن مشكلة للعاملين فى المجال الأكلينيكي عندما تكون هذه الحالات فى صورتها الكلاسيكية (التقليدية) أو فى صورتها الظاهرة للعيان ، فكثير من علامات نقص الفيتامين المرضية غالباً ما تكون متخصصة لكل فيتامين . أما فى حالة ما يكون هناك نقص بسيط فى الفيتامينات ولم تظهر أعراضه للعيان فيكون من الصعب تشخيصها إلا بعد اجراء التحليلات اللازمة . ويتم تحديد حالة نقص

الفيتامين أو تحديد مرحلتها بقياس مستوى الفيتامين في سوائل الجسم .

وأعراض نقص الفيتامين تمر بعدة مراحل ، كما يلخصها شكل (٢) . فتبدأ الخطوات بالمرحلة الأولى وفيها يكون المأخوذ من الفيتامين intake غير كافى لحاجة الجسم (أقل من متطلبات الجسم للفيتامين) . وتلك إما أن تنشأ من النقص الغذائي نفسه بما يحتويه الغذاء من فيتامين ، أو تنشأ من نقص الفيتامين في الغذاء أو من ضعف poor امتصاصه ، أو من عجز نقله داخل الجسم ، أو من زيادة احتياجات الجسم إليه (كما في حالة الحمل مثلاً) . وفي حالة ما يكون المأخوذ من الفيتامين غير كافى وقليل ، تحدث حالة من عدم تشبع الأنسجة منه . والمعدل الذى عنده تحدث هذه الحالة يختلف من فيتامين لآخر ، ويعتمد على كمية المخزن منه في الجسم أو في النسيج ، وبمجرد عدم تشبع الأنسجة وبلوغ المستوى الحرج critical level تُفقد الوظائف التمثيلية metabolic functions للفيتامين وتحدث تغيرات في الأنشطة الأنزيمية المرتبطة بهذا الأنزيم . وعندما تبلغ تلك التغيرات بدورها المستوى الحرج أيضاً ، تظهر الأعراض الاكلينيكية لنقص الفيتامين . وشكل (٢) يلخص مراحل ظهور أعراض نقص الفيتامين في جسم الإنسان أو الحيوان .



شكل (٢) مراحل أعراض نقص الفيتامين

تحديد سبب نقص الفيتامينات : -

يمكن تحديد سبب نقص الفيتامين بأى من التكنيكات التالية : -

١ - تقدير محتوى الغذاء من الفيتامين : -

وفيها يتم تحليل المحتوى الفيتامينى فى الغذاء كمياً ونوعياً والمفقود منه بالمعاملات المختلفة و المفقود منه بالتخزين إلخ . وهذا أمره سهل ولكن المشكلة تكمن فى محتوى الفيتامين القابل للامتصاص الحقيقى true absorbable Vit. ومدى تيسره حيوياً . فلابد من معرفة الصورة الموجود عليها الفيتامين والقابلة للامتصاص خلال الجهاز الهضمى .

٢ - تقدير عدم تشبع الأنسجة من الفيتامين : -

هناك ثلاث أنواع من الاختبارات تستخدم لتقدير عدم تشبع الأنسجة من الفيتامين ، اثنين من هذه التكنيكات عادة ما يكونا سهلين عند إجرائهما ولكنهما لا يغطيا المشكلة بالكامل، أما التكنيك الثالث فعادة ما يكون صعب ومعقد وهو فقط مناسب للتجارب البحثية . وفيما يلى موجز عن هذه التكنيكات : -

أ - قياس مستوى الفيتامين فى الدم فى وجود أو عدم وجود جرعة اختبارية test dose : -

هناك طرق كثيرة تستخدم لتقدير الفيتامينات فى الدم أو البلازما أو السيرم ، ولكن الفيتامين فى البلازما لا يكون له وظيفة تمثيلية ولكنه يكون فقط كعابر transit من نسيج لنسيج آخر . وقلته فى البلازما ربما تكون دليلاً على حالة مستوى الفيتامين بين الخلايا وبعضها ، وربما لا يكون هذا صحيحاً .

فعند تغذية شخص بالغ سليم ومعافى صحياً على غذاء خالى من حمض الأسكوربيك ، فبعد حوالى ٦ أسابيع من بداية هذه الظروف ينخفض مستوى حمض الأسكوربيك فى السيرم وربما يبلغ الصفر ، ويحتاج هذا الشخص إلى عدة أسابيع أزيد من ذلك قبل أن تظهر عليه أول أعراض مرض الأسقربوط . وبالرغم أن هذا يكون حقيقة إلا إن كل المرضى بالأسقربوط يكون مستوى حمض الأسكوربيك فى السيرم لديهم منخفضاً جداً ، والعكس لا يكون صحيحاً . وقد توجد مستويات منخفضة من حمض الأسكوربيك فى البلازما مع غياب أى دليل أكلينكى على نقص حمض الأسكوربيك ولحل هذه المشكلة لابد من إجراء اختبار

ال loading dose للفيتامين ويقدر مستوى الفيتامين فى البلازما بعد اعطاء جرعة فيتامين محددة ، وهذا الاختبار عادة ما يعكس كمية الفيتامين الفعلية التى أخذت بواسطة الأنسجة ، ومن الصعب اجراء التكنيك كميأ بالكامل ، فلو اعطيت جرعة عالية من الفيتامين فإن مستواه فى البلازما قد يزيد إلى الحد الذى يجعل الكلية تخرجه (ثلاث أصغاف) ، فيفقد فى البول .

ب - قياس معدل الافراز الكلوى فى وجود أو عدم وجود جرعة اختباريه : -

بالرغم من أن كمية الفيتامين المفرزة فى البول لكل يوم عادة ما تكون مرتبطة بكمية المأخوذ منه يومياً ، إلا أنها لا تمثل الانعكاس الحقيقى لحاله النسيج . وهذا أمر حقيقى لحد معين أو لقدر معين من حمض الاسكوريك ولكنه يكون أكثر وضوحاً لفيتامين أ ، حيث تأخذ منه الأنسجة كمية كبيرة ويخزن فى البعض الآخر ، وعلى ذلك تظهر نفس المشكلة عند تقدير الفيتامين فى البلازما فى وجود أو عدم وجود جرعة اختبارية . أكثر من ذلك ، فهناك مشاكل عديدة هامة لعينات البول المأخوذة خلال ٢٤ ساعة لتقدير حالة الفيتامين ، فالتقدير عادة ما يتم على عينات صغيرة والمستويات تكون اذاً مرتبطة بأفراز الكرياتينين Creatinine excretion ، ويستخدم الكرياتينين كدليل index لأنه عندما يكون مستواه فى البلازما طبيعياً ، فمعنى ذلك إن كفاءة الكلية على أحسن حال ، وتكون كفاءة الترشيح المباشر خلال الـ glomeruli جيدة ، والتقدير العشوائى random فى عينات البول المرتبط بالكرياتينين (كفاءة وظيفة الكلى) ، بالرغم من أنه الأسهل والأيسر لأنه يُنجز لأغراض كثيرة إلا أنه يعطى المعلومات الأقل فاعلية والأقل أهمية .

ج - قياس المستويات فى الأنسجة : -

هذا هو التكنيك الوحيد فى التكنيكات الثلاث الذى يعطى التمثيل الحقيقى لعدم التشبع بالفيتامين ، وهو بطبيعة الحال صعب اجراءه ويرجع ذلك إلى صعوبة أخذ عينات من النسيج tissue sampling وإلى صعوبة التكنيكات التحليلية .

فى حالة حمض الاسكوريك ، أستخدمت طريقتين لتقدير مستوياته فى الأنسجة . ففى الطريقة الأولى يتم تقديره فى كرات الدم الحمراء RBCs والبيضاء leucocytes ، وفى الصفائح الدموية Platelets . وتلك الطريقة أظهرت ارتباطاً وثيقاً بالعلامات الأولى للسكربوط ، ويوصى بهذه الطريقة لتقدير حالة تشبع أو عدم تشبع الأنسجة من حمض الاسكوريك .

فالتقدير الحقيقي والفعلي هذا بالطبع عادة ما يكون شاقاً ومضنياً ، محاولة أخرى أجريت لتقدير درجة تشبع النسيج من حمض الأسكوربيك وكانت عن طريق اختبار بين طبقات البشرة intradermal test باستعمال صبغة dichlorophenolindo phenol ، وتعتمد هذه الطريقة على وجود المواد المختزلة في الجلد ، وهي على ذلك غير متخصصة non-specific ، وكلا التكنيكين يطلبان لتقدير مستوى التشبع بالفيتامين في الجسم ، ولا يراعى فيهما المتطلبات التمثيلية .

٣ - قياس الانخفاض في النشاط الأنزيمي الخاص لكل فيتامين :

يمكن تقدير مستوى الفيتامين في الجسم عن طريق إجراء اختبارات للفاعلية البيوكيميائية التمثيلية biochemical metabolic efficiency والتي ترتبط ارتباطاً مباشراً بمتطلبات النسيج من الفيتامين حتى يحافظ على حيويته ونشاطه ، وهي تعطي دلالات يعتمد عليها ويوثق بها أكثر لحالة الفيتامين بالنسبة لما يحتاج إليه النسيج من فيتامين ، ولسوء الحظ فهذه الاختبارات متاحة فقط لعدد محدود من الفيتامينات .

لو أمكن تطبيق هذا النوع من الاختبارات ، فإنه من المهم استخدام تكتيكاً متخصصاً للفيتامين ، ولا يكون هناك مسارات أخرى للتمثيل الغذائي أو لا يكون هناك أيضاً معاون أنزيمي آخر يحل محله . ففي معظم مسارات التمثيل الغذائي غالباً ما يكون هناك خطوة واحدة أو خطوتين محددين لمعدل المسار rate-limiting steps ، فإن لم يكن الفيتامين جزءاً من إحدى هاتين الخطوتين ، فإنه قد يكون بطريقة غير مباشرة يشارك في مسار آخر ، وعلى ذلك فنقص الفيتامين قد ينعكس بصورة أو بأخرى على مسار التمثيل الغذائي .

وهناك أمثلة عديدة لهذا النوع من الاختبارات ، منها على سبيل المثال لا الحصر ، ارتباط تمثيل البيروفات مع مستوى الثيامين بيروفوسفات T. P. P ، وتقدير الـ Creatinuria في حالة نقص التوكوفيرول ، ودراسة التمثيل الغذائي للتربتوفان وعلاقته بنقص البيروكسين وتقدير البروثرومبين Prothrombin في حالات نقص فيتامين ك K .

٤ - الفحص الكلينيكي :

كما هو معروف إن لكل فيتامين أعراض symptoms وعلامات signs نقص معينة خاصة به . وبمجرد ظهور هذه الأعراض في صورتها التقليدية ، فإنه يمكن بسهولة وفي الحال

تمييز حاله النقص . وهناك طرق أكلينيكية خاصة تطبق لتحديد هذا النقص مثل اختبار التكيف مع الظلام dark adaptation لنقص فيتامين أ. وعند اجراء أى فحص أكلينيكي لابد من معرفة التاريخ المرضى للشخص ، كما يجرى فحص طبي شامل قبل أن تشخص الحالة بالضبط . وهناك فحوص أكلينيكية معينة تجرى لأعضاء معينة فى الجسم ، ومن خلالها يمكن تشخيص حالة نقص الفيتامين ، وهذه الأعضاء تشمل الجلد skin والفم mouth والعين eye والجهاز العصبى إلخ .

أ - فحص الجلد :

غالباً ما يرتبط نقص الفيتامينات بتغيرات معينة تحدث فى جلد وشعر حيوانات التجارب ، كما يحدث ذلك أيضاً فى الإنسان . فعلى سبيل المثال فى حالة نقص فيتامين أ يحدث تقرن للجلد (toad skin) skin keratinization ، وفى حالة نقص فيتامين ك يحدث تبقع جلدى cutaneous purpura وهذه الحالة هى انعكاس مباشر لنقص البروثرومبين ، وفى حالة نقص حمض النيكوتينيك تحدث حالة البلاجرا pellagra على الجلد (يشبه فى أعراضه أعراض الحروق الشمسية) . وهناك أعراض أخرى كثيرة تحدث عند نقص فيتامينات أخرى مثل حمض الأسكوربيك والريبوفلافين والبيريدوكسين والبيوتين وحمض البانتوثينيك ، والتى يمكن تحديدها بفحص الجلد أكلينيكياً .

ب - فحص الفم :

نقص مجموعة فيتامينات ب المركبة عادة ما تؤثر على الفم ، ولذلك عن طريقة فحص الفم يمكن التمييز بين بعضها البعض . وفى بعض الأحيان يكون هذا الأمر صعباً ويرجع ذلك إلى إن كثيراً من حالات النقص يكون سببها نقص أكثر من فيتامين ، فعلى سبيل المثال نقص حمض النيكوتينيك يؤدى إلى التهاب اللثة gingivitis والتهاب الفم stomatitis وغيرها من الأعراض على الفم . ونقص فيتامين ج أيضاً يؤدى إلى التهاب اللثة وفقد الأسنان وقد يحدث نزيف فى الفم . هذا ، وهناك أعراض متخصصة تظهر على الفم نتيجة لنقص الريبوفلافين والبيريدوكسين وفيتامين ب₁₂ والبيوتين .

ج - فحص العين :

كما هو معروف إن نقص فيتامين أ يؤدى إلى أضرار معينة فى الشبكية retina ومرض

العشى الليلي ، ونقص الريبوفلافين يسبب vasculature of cornea (ظهور أوعيه دموية كثيرة فى قرنية العين) ، ونقص الثيامين وحمض النيكوتينيك وحمض الأسكوربيك وفيتامين ك يضافاً تظهر أعراض معينة فى العين .

د - فحوص أخرى : -

هذا ، وهناك فحوص أكلينيكية أخرى تجرى على الجهاز الهضمى (مثل نقص الثيامين وحمض النيكوتينيك يسبب أسهال diarrhoea) ، وأخرى تجرى على الجهاز العصبى المركزى (نقص الفيتامينات يؤثر عليه) ، وثالثة تجرى على العظام bones (مثل نقص فيتامين د يسبب الكساح rickets) ، ورابعة تجرى على القلب والأوعية الدموية (مثل نقص الثيامين يسبب فشل فى الدورة الدموية circulatory failure والذي يرجع إلى ارتباك فى عضلة القلب) ، وغيرها من الفحوص .

الاختبارات المعملية لنقص الفيتامينات : -

تجرى اختبارات معملية كثيرة لتحديد مستوى نقص الفيتامين فى الجسم ، وهذه الاختبارات تضم ما يلى : -

- ١ - تقدير مستوى الفيتامين فى الدم أو فى السيرم .
- ٢ - تقدير مستوى الفيتامين فى بعض خلايا الدم (كما هو الحال فى تقدير فيتامين ج الذى يقدر فى خلايا الدم البيضاء) .
- ٣ - تقدير نشاط أحد الأنزيمات التى يشارك فيها الفيتامين .
- ٤ - تقدير كمية الفيتامين المفزة فى البول ، أو نواتج تكسيره أو تقدير أحد المركبات التى يشارك الفيتامين فى تمثيلها .
- ٥ - الفحص بأشعة أكس X-ray examination (كما هو الحال فى فيتامين د) .

هذا ، وهناك أختبارات معملية أخرى خلاف تلك الاختبارات تجرى وقت الضرورة .
ومما هو جدير بالذكر إنه يجرى أحياناً أكثر من أختبار معملى لتحديد حالة النقص بالضبط حتى يتسنى علاجها .

رعاية حيوانات التجارب والعناية بها لتجارب التغذية

معظم الأبحاث الحيوية تستخدم حيوانات التجارب experimental animals لاجراء الدراسات المختلفة عليها وتعتبر فى هذه الحالة كنموذج model تجريبى لما يحدث داخل الكائن الحى الحيوانى . فعادة ما تتم التقديرات الحيوية bioassay سواء الكمى منها أو الوصفى على هذه الحيوانات بدلاً من الإنسان أو الحيوانات الكبيرة (مثل البقر أو الجاموس) ، وعلى ذلك فهذه الحيوانات ساهمت فى خدمة الإنسان والحيوان على حد سواء . وهذه الحيوانات أصبحت وسوف تظل من أهم الوسائل الهامة التى يعتمد عليها فى اجراء البحوث الحيوية ، والنتائج المتحصل عليها من هذه التجارب هى اللبنة الأولى والمرجع الاساسى لطرق القياس والتقديرات الأخرى (الطرق الطبيعية أو الكيميائية وغيرها) . وعادة ما تستخدم قوارض rodents (مثل الفأر الأبيض الكبير albino rat والفأر الصغير mouse والأرنب rabbit والهامستر وخنزير غينيا ... وغيرها) ، أو حيوانات أخرى مثل الكلاب والقطط والكتاكت معروفة السلالة والنسب لضمان سلامة الدراسة . كما تساهم الأبحاث على هذه الحيوانات فى نواحى كثيرة مثل اظهار النور الحيوية لمركبات كثيرة خلاف الفيتامينات مثل السموم والمبيدات والأدوية إلخ ، بالإضافة إلى اختبارها وتقييمها حيويًا ، واختبارات تقييم الأغذية والمضافات الغذائية المختلفة (اختبارات التغذية) ، واختبارات العدوى بالطفيليات و الميكروبات والفيروسات ، واختبارات الحمل إلخ ، هذا بالإضافة إلى امكان استخدام هذه الحيوانات فى التجارب الجراحية وغيرها قبل تطبيقها على الإنسان .

على ذلك فإن العناية بحيوانات التجارب وتربيتها فى بعض الأحيان اذا اقتضت الضرورة امرأ هاماً جداً فى هذا الشأن ، ولذلك وقبل أن نخوض فى الفيتامينات وتحليلها ، لابد أن نلقى بعض الضوء على حيوانات التجارب ورعايتها والعناية بها .

بيت الحيوان Animal house

المقصود ببيت الحيوان هو ذلك المكان الذى تعيش فيه حيوانات التجارب ، فعادة ما تربي هذه الحيوانات فى أقفاص خاصة مناسبة لحجم ومساحة ووزن الحيوان ، وتوضع هذه الأقفاص فى مبنى الحيوانات . ويفضل عادة تربية كل نوع من حيوانات التجارب فى حجرة خاصة به ، ويلحق بهذه الحجرات معمل لتشريح الحيوانات مجهز بثلاجة كهربائية لحفظ

الحيوانات النافقة لحين التخلص منها بالحرق ، ويشترط فى المبنى الخاص برعاية وتربية حيوانات التجارب أن يكون مبنى صحى جيد التهوية ونظيف ومكيف وبعيداً عن الضوضاء ، وكل حجرة من حجراته تحتوى على أجهزة صرف صحى ومصدر للمياه وغيرها من اللوازم الأخرى . ومن الجدير بالذكر ، إن بيت الحيوان الحديث أصبح متطوراً كثيراً وأصبح من النظافة والتكيف والعناية إلخ إلى ما يشابه المستشفيات ، لدرجة إنه فى بعض الحالات (مثل معامل إنتاج المصل واللقاح) لا يدخله إلا المتخصصين والعاملين فقط والحاصلين على شهادات خاصة .

أ - الظروف المناخية

يجب أن تعيش الحيوانات العملية فى غرف جيدة التهوية وليس بها تيارات هوائية مباشرة لتلافى البرد cold أو للحفاظ على غذائها من التلوث بالأتربة والملوثات الأخرى عن طريق تلك التيارات أو لعدم تطايرها مع الهواء . ويجب أن تكون الأماكن التى تربي فيها الحيوانات مضيئة أيضاً أثناء النهار ومظلمة فى الليل ويجب تنظيم فترات الضوء والظلام فى غرف معيشة الحيوانات العملية على حسب التجربة المجرى . فلا تعرض الفئران rats (أو الكتاكيت Chicks) لضوء الشمس المباشر حتى ولو نفذ من خلال زجاج النوافذ حيث يجب تلافيه خصوصاً عند تقدير فيتامين «د» . والفئران حيوانات ليلية وتحدث ضجة زائدة عن اللازم وهى نشطة أثناء اليوم ، لذا يجب عدم التدخل فى عاداتها الطبيعية . ويوصى بغرف مكيفة الهواء للعناية بالحيوانات ، لكنها غير ضرورية فيما عدا عندما تكون درجات الحرارة شديدة . ودرجة الحرارة المثلى Optimum temperature للحيوانات الصغيرة small animals هى $24 \pm 2^{\circ} \text{C}$.

ومما هو جدير بالذكر ، أنه عند تعرض القوارض لدرجة حرارة عالية نسبياً (أكثر من 38°C فهرنهايتية - حوالى 100°F) فإن نشاطها التكاثرى يقل ، ويقل مقدار ما تتناوله من طعام food intake وتصبح الحيوانات فى حالة نعسان وخاملة lethargic وقليلة النشاط . وجنول (٢) يلخص مدى درجات الحرارة المناسبة والنسبة المئوية للرطوبة المناسبة لبعض حيوانات التجارب .

Species	°F	% Relative humidity
Rat	65 - 73	45 - 55
Mouse	68 - 75	50 - 60
Guinea pig	65 - 75	45 - 55
Rabbit	60 - 75	40 - 45
Hamster	68 - 75	40 - 45
Dog	65 - 75	45 - 55
Cat	70 - 75	40 - 45
Monkey	62 - 85	40 - 75

جدول (٢) درجات الحرارة والنسبة المئوية للرطوبة المناسبة لحيوانات التجارب المختلفة .

ومن الاحتياطات الهامة واللازمة أيضاً هو عمل ستائر للنوافذ ، كذلك النظافة المتكررة بالماء الجارى للجدران والأرضيات وحماية هذه الحجرات من الحشرات الطفيلية الضارة ومن القوارض البرية wild rodents .

ب - مقاومة الحشرات :

عندما يلاحظ ظهور الحشرات insects مثل الصراصير roaches والذباب flies والبق bedbugs يجب أبادتها بعناية كافية . وتستعمل المبيدات الحشرية الحديثة modern insecticides سواء المسحوقية منها أو التى تستعمل بالرش . ويتم استعمال (وضع) هذه المبيدات بتركيزات عالية فى الشقوق والفتحات وأماكن احتمال تكاثر وانتشار هذه الحشرات . وتغلق الغرفة لعدة ساعات أو طوال الليل over night ثم تهوى جيداً قبل إعادة الحيوانات إليها ، ويجب التأكد من التخلص من آثار هذه المبيدات .

وإذا لم يمكن تحريك الأقفاس أو خروج الحيوانات من الغرفة ، فتستعمل المبيدات الحشرية بواسطة فرشاة ناعمة على الجدران والأرضيات (خصوصاً فى الأركان والشقوق

والثنايا) . ويمكن استعمالها أيضاً على أرفف أقفاص الحيوانات cage racks وعلى التجهيزات أو المعدات الأخرى فيما عدا الأقفاص نفسها . وإذا لم يكن لهذه المعاملة تأثيراً جيداً ، فلا بد من أعادتها بعد ٦ أسابيع للقضاء على الجيل الثانى من الحشرات .

ح - النفايات (الفضلات) Excreta (بول ، براز ، فضلات غذائية إلخ) : -

يجب إزالتها كل يومين على الأقل ، ويمكن استعمال بكر ورق paper rolls أو طبقات سيمكة من ورق الجرائد تحت أرفف النفايات الموجودة فى الأقفاص وأسفل قاعدة القفص ، وهذا يسهل هذه العملية . وتفضل أقفاص سلك مجلفن بالزنك والرصاص حتى لا تصدأ ، ويجب تنظيفها مرة كل اسبوع أو مرتين على حسب عدد الحيوانات المقيمة فى كل قفص . ولتنظيف الأقفاص عند أعدادها لإى تجربة أو للنظافة الدورية لابد من خلوها من الحيوانات وتنظيفها بمحلول صابون ساخن hot soap solution عن طريق الحك بفرشاه مثلاً أو نقعها فى محلول Na_3PO_4 ساخن ، وأخيراً تشطف بماء ساخن ثم بماء بارد .

حيوانات التجارب Experimental animals

أولاً : الفئران البيضاء الكبيرة Rats

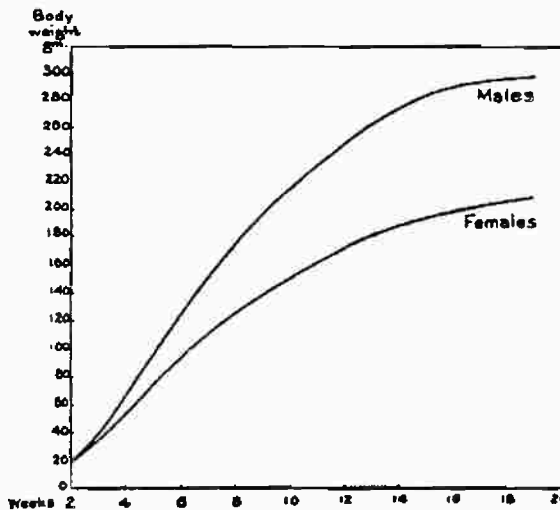
تختار لتجارب التغذية سلالات مختارة من الفئران الألبينو أو المنقطة (رقطاء أبيض فى أسود) albino or piebald rats فهى حيوانات ممتازة لهذا الغرض ، أما الفئران السوداء black rats فهى مناسبة أكثر لدراسة الترخينة الغير ملونة achromotrichina (بودة تصيب أمعاء الإنسان وبعض الحيوانات) . وظروف نمو الفئران البيضاء white rats بسيطة وهذا عند مقارنتها بالفئران ذات الفرو الأسود .

فترة النمو Growth Period : -

فترة نمو الفئران ممتدة لأكثر من حوالى ٣٠٠ يوم (شكل ٢) ، وامتداد أو اتساع حياتها يبلغ حوالى ٢ أعوام ، وعلى ذلك فدورتها cycle خلال حياتها يفوق الأجناس البشرية بحوالى ٣٠ مرة (عدد الولادات وخلافه) . وعند مقارنتها بأجناس أخرى فإن معدل النمو قبل البلوغ فى الإنسان the rate of prepuberied growth of man يكون أبطء . وتتكاثر الفئران بسرعة ، وهى ذات بطن واسعة large litters (أى عدد الحيوانات التى تلدها أنثى

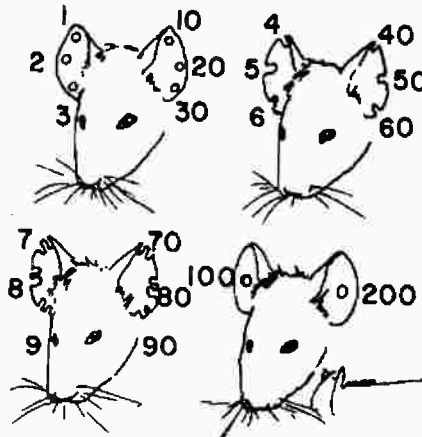
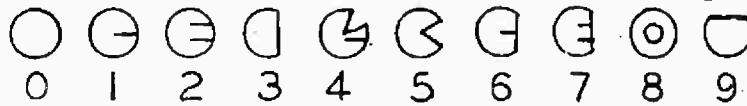
الفئران في المرة الواحدة كبير جداً ويبلغ حوالي ٦ في المتوسط) وذلك يسمح بدرجة عالية للتحكم التجريبي experimental control . وهي تتطلب غذاءً قليلاً little food ، وعلى ذلك فهي اقتصادية economic لدراسة أعراض النقص الغذائية المتعددة . والفأر الأبيض ذات مناعة ضد الاستقربوط ، وعلى ذلك فإنه يجب استخدام أنواع أخرى غيرها لدراسة هذه الحالة . هذا ، وكان للاختلافات في متطلبات أنواع الحيوانات المختلفة (الفئران غير الكتاكيت) الفضل الكبير في اكتشاف الصور المتعددة لفيتامين « د » وفيتامين ب المركب .

يتحقق النضوج الجنسي sexual maturity في الفئران بعد حوالي ٧٥ يوم ، ولكن يجب ألا يتم التزاوج لغرض التكاثر حتى عمر حوالي ١٠٠ يوم . ويمكن حبس ذكر male واحد مع ٢ أنثى females في قفص واحد . ويجب تنظيم عزل isolate الأنثى الحوامل pregnant قبل الولادة ، وأن لم يكن هذا ممكناً فتوضع أنثى واحدة في القفص مع الذكر . فترة الحمل gestation period حوالي ٢٢ يوم وتقطم wean الصغار عندما تبلغ ٣ - ٤ أسابيع من الولادة ، وإذا كان عدد الحيوانات المولودة في البطن الواحدة كبير (أزيد من ٨ حيوانات) فيجب ان يختصر أو يقلل لثمانية حيوانات للمحافظة على الأم ووقايتها وفي نفس الوقت لانتاج فئران قوية .

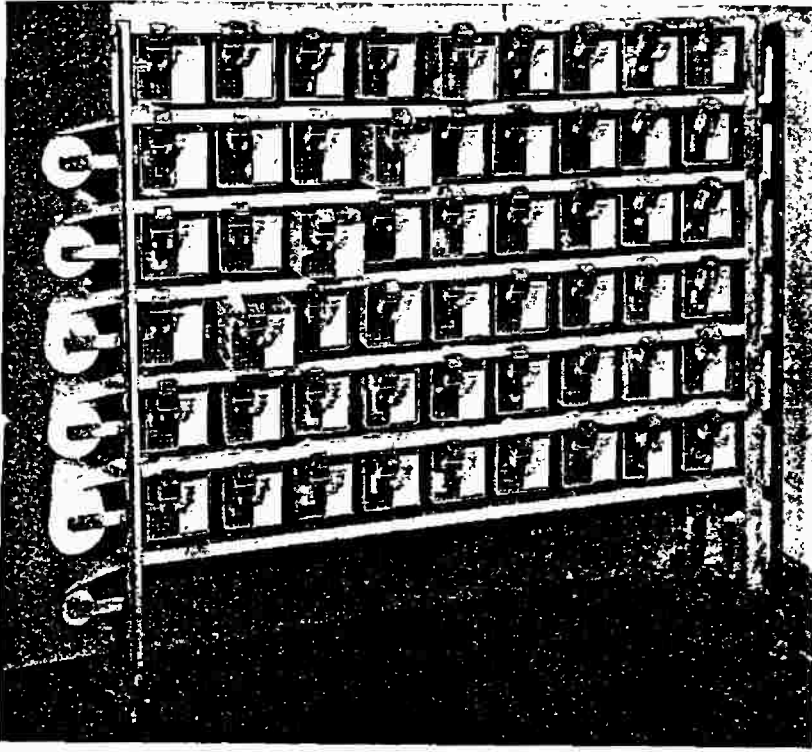


شكل (٣) منحنيات النمو الطبيعية لذكور وأنثى الفئران الأبيض

وإذا قسمت الحيوانات المولودة في أقفاص مصنوعة من سلك شبك wire mesh cages فيجب أن تقل فتحة الشبك mesh عن ١/٢ بوصة ، وتجهز الأقفاص بورق ممزق أو سليفان أو نشارة خشب لكي تنام عليها الحيوانات أو تبني منها أعشاش تأوى إليها . ولتعليم marking الفئران يمكن صبغ stain فرائها fur بصبغات dyes مثل حمض البكريك picric acid أو أزرق الميثيلين methylene blue ، أو بتعليم الأذن بأنواع من الأكلاشيهات cuts في كل أذن . وعن طريق تلك العلامات التي تعلق في الأذن هناك مدى واسع من الترقيم من الصفر وحتى رقم ٩٩ . ويستخدم الآن الترقيم الكودى عن طريق ثقب وحز الأذن - ear notch punch code لتمييز القوارض عن بعضها البعض . ويمكن بهذه الوسيلة الترقيمىية ترقيم الحيوانات إلى مدى واسع جداً من الأرقام ، وشكل (٤) يوضح طريقتى الأكلاشيهات وثقب وحز الأذن لترقيم القوارض . وعند تربية breeding الفئران للأغراض الكبيرة (نطاق تجارى) يمكن استخدام نظام المستعمرات الصغيرة small colonies وهي مجموعة من الأقفاص فوق بعضها مزودة بأدراج وزجاجات ماء خارجية للشرب outside water bottles وتربى فيها الفئران سواء كل فأر بمفرده individual أو فى مجموعة (فى حالة الأم وأولادها) . وعادة ما تكون هذه الأقفاص مزودة ببيكر لجمع وإزالة نفايات الفئران (شكل ٥) ، مع إن الصوانى الصلب الغير قابلة للصداء stainless stell trays والطبقات السميكة من ورق الجرائد هي الأفضل فى بعض الحالات .

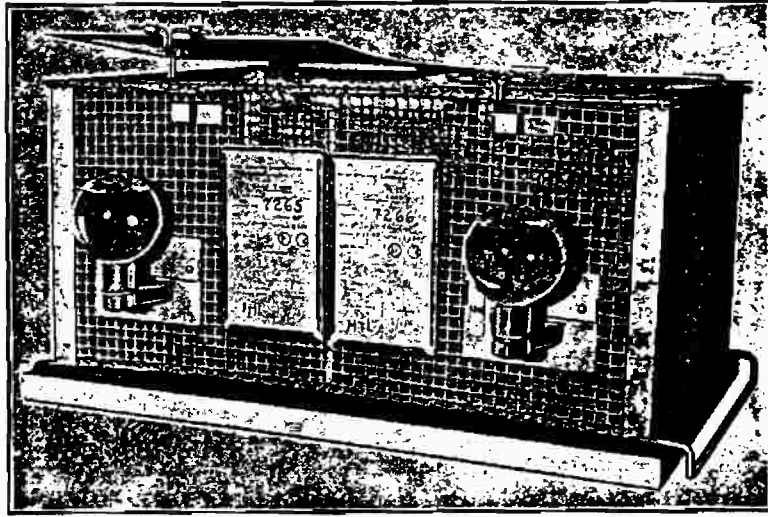


شكل (٤) ترقيم القوارض بطريقة الأكلاشيهات وبطريقة كود ثقب وحز الأذن



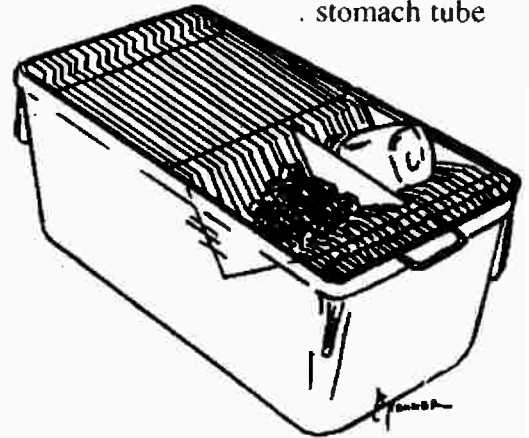
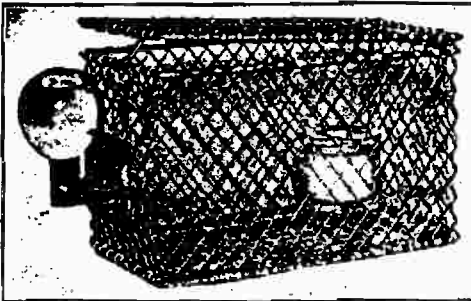
شكل (هـ) بطارية أقفاص فئران ذات النوع المعلق

أما في حالة تربية الفئران على نطاق ضيق ، فيمكن العناية بها في أقفاص تربية صغيرة مزودة بخزانات الماء وبأجهزة متحركة يمكن أزالته ليكون هناك قفص أكبر للتزاوج وعند وضعه يكون هناك قفصين منفصلين ، ومزود أيضاً بحوض منزلق . وشكل (٦) يوضح هذا النوع من الأقفاص . وعندما تبدأ التجربة العملية على الفئران فإنه بالطبع تنقل الحيوانات إلى أقفاص فردية (تسع لفأر واحد) (شكل ٧) وهذه الأقفاص قد تكون مصنوعة كلها من السلك وذات قاعده متحركة false bottom لتقلل النفقات إلى أدنى حد . وهذه الأقفاص سهلة التعقيم عند أطعام fed الفئران علائق مجهزة خصيصاً specially prepared diets ، ويجب وضع الطعام في كوب طعام خاص food cup بشرط ألا يبعثر الطعام حتى نحصل على معلومات data أكثر دقة عن استهلاك الطعام . والمناسب لهذا الغرض برطمان jar مرهم ذات غطاء بلاستيك قلاووظ قوى ذات فتحة مناسبة ولايسمح بفقد الغذاء . وهذا الأثناء jar سعة ٣ - ٤ أوقية (أنظر كوب الطعام food cup داخل القفص



شكل (٦) أقفاص تربية الفئران الفردية

(شكل ١٧) . هذا ، ويستخدم الآن طراز حديث من الأقفاص يسمى الصندوق النولاي أو المبيطر shoe - box لأيواء القوارض العملية (شكل ٧ ب) . وفي حالة التجارب الحيوية والتي يصعب فيها إعطاء الحيوان مادة معينة وبكمية معينة مع الغذاء أو الشراب (الإضافات السائلة أو الزيوت) ، فإنها تعطى عن طريق الفم بواسطة حقن خاصة ذات مواصفات خاصة ومثبت فيها أبرة needle ملساء وغير حادة حتى لا تجرح الحيوان وتسمى بالأنبوب المعدى stomach tube .



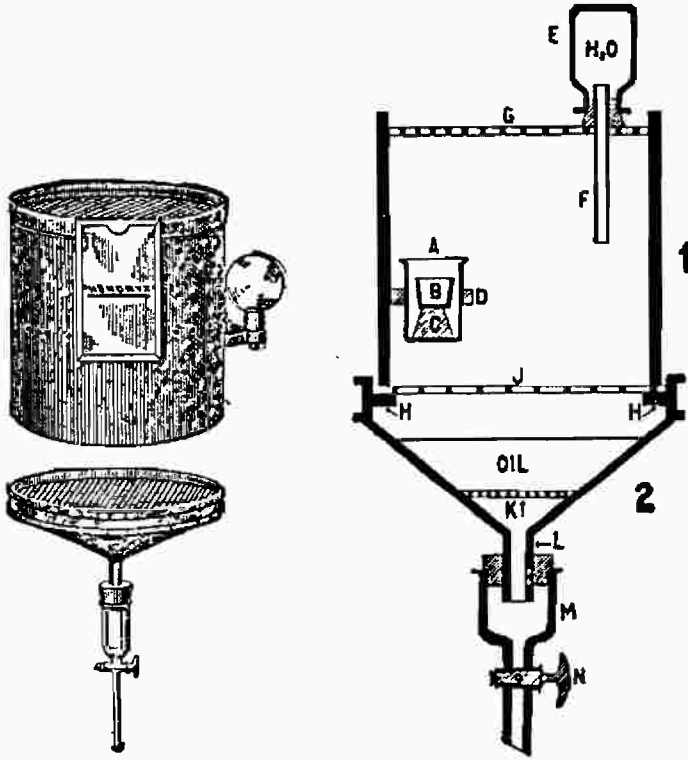
شكل (٧) نموذجين لأقفاص الفئران التي تسع حيوان واحد

ب - قفص من الطراز shoe - box

أ - قفص مصنع من السلك

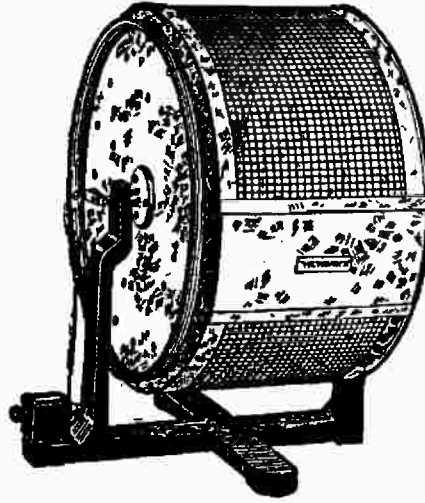
تجارب الميزان الغذائي : Nutritional balance experiments

فى هذا النوع من التجارب يكون من الضرورى تتبع كل ما يتناوله الحيوان in put وما يفرزه أو يخرج out put ، لذلك تستخدم أقفاص خاصة تسمى أقفاص التمثيل الغذائى حيث يمكن بهذه الأقفاص فصل البول عن البراز وتجميع البول urine بمفرده والبراز feces فى جزء آخر ، وشكل (٨) يوضح هذا النوع من الأقفاص .



شكل (٨) قفص التمثيل الغذائى للحيوانات الصغيرة (شمال)
ومقطع طولى فيه (يمين)

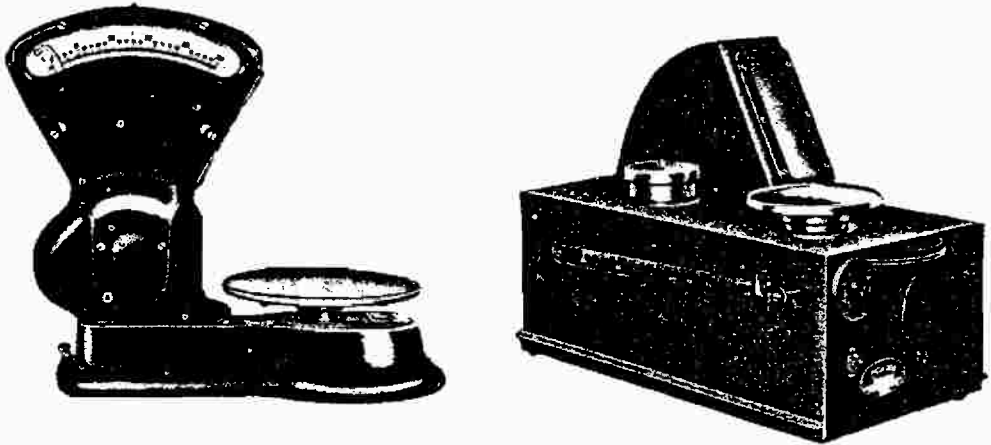
أما فى حالة تجارب تتبع نشاط الحيوان فتستعمل أقفاص النشاط activity cages لدراسة النشاط الإختياري للحيوان ، وهذه الأقفاص تكون معلقة على بكر لى تصبح حرة الحركة وتتيح للحيوان الجريان داخلها ، وشكل (٩) يوضح قفص النشاط .



شكل (٩) قفص النشاط الاختياري للفئران

وزن الحيوانات :-

يمكن وزن الفئران على ميزان زنبركى ، ولكن لنتائج أكثر دقة تستعمل موازين حساسة ذات ساعات مختلفة ٢٥٠ - ٥٠٠ - ١٠٠٠ جم (شكل ١٠) وهذه الموازين مناسبة لوزن أواني الطعام أيضاً .



شكل (١٠) نموذجين للموازين المستخدمة في وزن الحيوانات الصغيرة

التسجيل :

تسجل الأوزان أسبوعياً weakly أو نصف أسبوعياً semiweekly في صورة sheets كما في شكل (١١ ، ١٢) ، ويمكن استعمال كارت النمو growth chart المعدل كما في شكل (١٣) حيث يتم تنسيق تقسيم الزمن إلى أيام أو أسابيع .

FOOD RESEARCH LABORATORIES, INC.

NEW YORK CITY
FOOD CONSUMPTION

VITAMIN D

ASSAY NO.

[illegible]

شكل (١١) نموذج لكارت استهلاك الغذاء

FOOD RESEARCH LABORATORIES, INC.

NEW YORK CITY
VITAMIN D ADEK

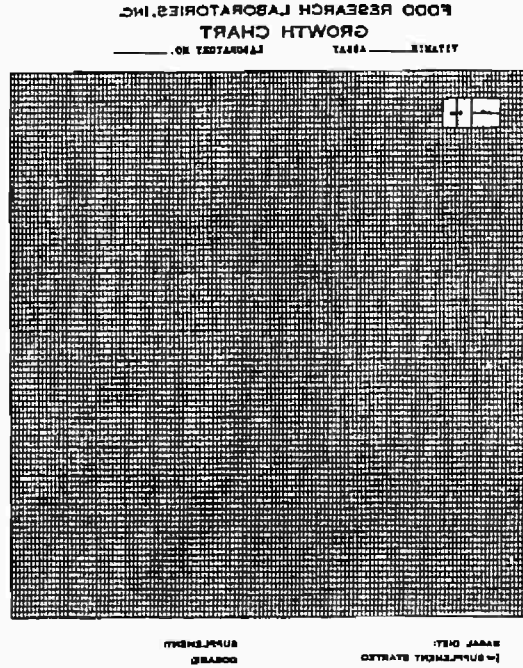
1000

Figure 1

[illegible]

NOTE: K, normal; +, ++, +++, +++++, degree of healing; — no healing (curets); C, curet; D, dead; T, tympanized; AD, accidental death; P, paralysis; E, middle ear disease; R, respiratory disorder; I, diarrhea; HM, hemorrhage; B, banding; Cr, curvature; S, fracture.

شکل (۱۲) نمودار تصحیح نتایج تقدیر فیتامین د



شكل (١٣) نموذج لكارث منحني نمو حيوانات التجارب

التربية والعلائق Breeding and stock diets :

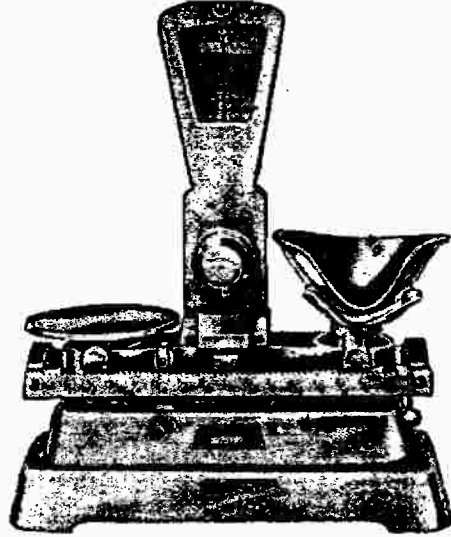
عند تربية الفئران لأغراض لا تتطلب تحكم دقيق في تغذيتها ، فإنه يمكن تغذيتها على عليقة مختلطة mixed diet تتكون من فضلات المائدة النظيفة clean table scraps و خبز ولبن أو dog biscuit (في أمريكا) مضافاً إلى اللبن أو خضروات طازجة مثل الجزر أو الخس مرة أو مرتين أسبوعياً .

وهناك علائق جاهزة تباع تجارياً مجهزة لذلك ، ويمكن استعمال أيضاً مخلوط أطعمة الدواجن أو وجبة العجل calf meal .

العليقة المصنعة المتزنة Balanced synthetic diet :

في الأبحاث الغذائية الدقيقة فإنه من الضروري استعمال عليقة مجهزة كاملة متماثلة

تماماً وذات فاعلية عالية لعدة أجيال generations من الفئران . ويمكن استعمال ميزان كما هو موضح فى شكل (١٤) لتحضير هذه العلائق .



شكل (١٤) نموذج لميزان حساس لوزن العلائق التجريبية

تعريفها : - هى عبارة عن عليقة حيوانية لازمة للنمو الكامل لهذه الحيوانات واستمرار هذا النمو بصورة طبيعية بدون ظهور أى عرض من أعراض نقص التغذية . وتكون محتويات العليقة معروفة كمياً حسب المكونات الداخلة فيها ، وبعد تجهيزها يتم تقدير كل مكون فيها (كربوهيدرات ، بروتينات ، دهون إلخ) .

ويتوقف تركيب مكونات العليقة وكميتها على عمر الحيوان ونوع الحيوان والغرض من الدراسة . ويحتوى مخلوط العليقة المصنعة فى أبحاث التغذية للفئران على مخلوط من الأملاح salt mixtures الغير عضوية inorganic ذات تركيب مشابه أو مقارب لتحليلها فى اللبن أو البول ، كما تحتوى أيضاً على مخلوط من الفيتامينات اللازمة لتمام النمو واستمراره ، هذا بالإضافة إلى وجود العناصر الغذائية الأخرى بكميات محسوبة ومدروسة (بروتين - كربوهيدرات - دهون) .

أهميه استخدام العليقة المصنعة فى تجارب التغذية :-

- ١ - دراسة أعراض النقص (فيتامينات - أملاح - بروتين الخ) على الحيوانات .
- ٢ - دراسة تأثير استبدال أحد مكونات العليقة بأضافات أخرى مثل استبدال الكازين ببول الصويا .

- ٣ - دراسة تأثير السعرات الكلية فى العليقة على معدل النمو .

- ٤ - دراسة تأثير الاضافات الغذائية المختلفة (مثل الألوان الغذائية) ، أو بعض المواد الكيميائية (مثل الانويه أو المبيدات) ، أو زيادة بعض العناصر الغذائية (مثل حالات زيادة الفيتامينات hypervitaminosis) . ويوضح جدول (٤) تركيب العليقة المصنعة للفئران البالغة طبقاً لـ (Hegsted et al ., 1941 and Campbell , 1961)

وتخلط هذه المكونات جيداً بطريقة خاصة ، ثم تحلل حتى يمكن معرفة كمية ونوع كل مكون فيها بالضبط. وتعطى العلائق للحيوانات بعدة طرق وهى :-

- ١ - Ad libitum diet :- وفيها يوضع الغذاء أمام الحيوانات وتتناوله كيفما تشاء وفى أى وقت تشاء .

- ٢ - Meal diet :- وفيها يوضع الطعام أمام الحيوانات فى صورة وجبات (٣ أو ٤ وجبات يومياً) ، أما باقى اليوم فلا يوجد أمام الحيوانات طعام .

- ٣ - Orally :- وفيها يتم حقن الحيوان بمحلول متجانس من العليقة عن طريق الفم من خلال أنبوبة التغذية stomach tube ، وهذه تعبر عن الغذاء الفعلى الذى وصل لمعدة الحيوان . ولا تتم هنا عملية مضغ ، أما الطريقتين الأولىتين فيتم فيهما مضغ للطعام .

وعادة ما يقدم الماء للحيوان ad libitum فى زجاجات خاصة .

ومن هذه الظروف المحكمة يمكن :-

- ١ - معرفة كمية الغذاء المأكل يومياً food intake .
- ٢ - معرفة استجابة جسم الحيوان للمعاملة تحت الدراسة بقياس الزيادة فى وزن الجسم مثلاً Body weight gain .

٣ - يمكن معرفة دور كل عضو من أعضاء الجسم وأستجابته لهذه المعاملة ، كما يمكن إيجاد العلاقة الفسيولوجية لبعض الأعضاء (وزن الأعضاء مثلاً) .
هذا ، وتتعدد أنواع الدراسات على حيوانات التجارب .

Diet composition for adult rat

1 - Carbohydrates	as Sucrose	80%
2 - Protein	as Casein	10%
3 - Fats	as Com oil	5%
4 - Salt mix.		4%
5 - Vit. mix.		1%

<u>Salt mix .</u>		<u>Vit . mix</u>	
NaCl	139 g	Vit . A	2000 IU
KI	0.79 g	Vit . D	200 IU
KH ₂ PO ₄	309 g	Vit . E	10 IU
MgSO ₄	57.3 g	Vit . K	0.5g
CaCO ₃	381.4 g	PABA*	10g
FeSO ₄	27 g	Inositol	10g
MnSO ₄	4 g	Nicotinamide	4g
CoCl ₂	0.032 g	Ca. Pantothenate	4g
ZnSO ₄	0.548 g	Riboflavin	0.8 g
CuSO ₄	0.477 g	Thiamine	0.5 g
		Pyridoxine HCl	0.5 g
		Folic acid	0.2 g
		Biotin	0.04 g
		Vit . B ₁₂	0.003 g

* PABA : Para Amino Benzoic Acid

جدول (٤) تركيب العليقة المتزنة للفران البالغة

تركيب العليقة الأساسية لتجارب التقييم الحيوى للبروتينات : -

فى أحيان كثيرة يكون تركيب الأحماض الأمينية للبروتينات تقريباً شبه متكامل ومناسب لتغذية الإنسان أو الحيوان عليه ، ولكن عند التغذية عليه يعطى نتائج غير متوقعة (سلبية) . لذلك من المهم اجراء تجارب عليه لتقييمه حيويًا ، ويسمى هذا النوع من التجارب Biological evaluation of protein quality . وتستخدم فى هذه التجارب فنران (ذكور) مفلومة عمرها ٢١ يوم وتغذى على عليقة متزنة balanced diet لمدة أسبوع آخر وعندما يبلغ عمرها ٣٠ يوم تغذى على عليقة أساسية basal تحتوى على كل العناصر الغذائية اللازمة للفنران فيما عدا البروتين ، ويضاف إليها البروتين تحت الدراسة ويكون تركيزه فى العليقة النهائية بنسبة ١٠٪ وتجهز بنفس الطريقة كما فى العليقة المتزنة . وتقدر نسبة البروتين ٪ فى العليقة بعد تجهيزها وفى نصف فترة التجربة ، أما الفنران الكونترول فتغذى على عليقة متزنة كاملة تحتوى على الكازين كمصدر للبروتين . وأثناء مراحل التغذية تسجل التقديرات الخاصة بالتقييم الحيوى للبروتين مثل الزيادة فى وزن الجسم ، وكمية المأخوذ من الغذاء food intake وميزان النتيروجين الخ . وتستمر التجربة إما لفترة قصيرة (شهر أو شهرين) أو لمدة أطول ، وقد تستغرق خمسة شهور أو أكثر . ومما هو جدير بالذكر ، يلزم لهذه التجارب أيضاً تقديرات حيوية أخرى مثل وظائف الكلى ووظائف الكبد وغيرها من الاختبارات وجدول (٥) يحدد تركيب العليقة الأساسية لتجارب التقييم الحيوى للبروتين طبقاً لـ (Fetuga et al ., 1973) .

Ingredients	%
Corn starch	65.0
Glucose	5.0
Sucrose	10.0
Non-nutritive cellulose	5.0
Groundnut oil*	10.0
Mineral supplement	4.0
Vitamin mixture	1.0

* The groundnut oil used in these trials were of commercial grade produced by P. S. Mandrides & Co. Ltd, Kano in Northern Nigeria.

Composition of the mineral and vitamin mixes are as follows:

Mineral mix (Miller)*		Vitamin mix (Miller) ¹⁹	
	Weight (g)		
Calcium phosphate	60	Thiamine (HCl)	0.06 mg
Sodium chloride	25	Calcium Panthothenate	1.2 g
Potassium chloride	15	Nicotinic acid	4.0 g
To this was added 2 g of minor mineral salts containing per		Inositol	4 g
Hydrated iron citrate	30	Para-amino benzoic acid	12.0 g
Magnesium carbonate levis	30	Biotin	0.04 g
Copper carbonate basic	7	Folic acid	0.04 g
Zinc carbonate	3	Cyanocobalamin	0.001 g
Sodium iodate	0.1	Choline chloride	12.0 g
Sodium fluoride	0.1	Corn starch	to 1 kg

جدول (٥) تركيب العليقة الأساسية لتجارب التقييم الحيوى للبروتينات

ثانياً : خنازير غينيا (Guinea Pigs (Cavies)

سلالة خنزير غينيا المناسبة لأبحاث التغذية هي English short smooth haired variety. ويجب أن تعيش خنازير غينيا بعيداً عن التيارات الهوائية وفي أقفاص جافة ، وتفضل أقفاص ذات قاعدة مثبتة ومتحركة (كاذبة) وتزود بنشارة أو رقائق من الورق . ويجب تجفيف الأقفاص من وقت لآخر وإضافة قش جاف لها . وهذه الحيوانات عشبية ويمكن تغذيتها على تب ن أو قش نظيف وحبوب grains (دقيق شوفان oat meal ، ونخالة bran وقمح الخ) مدعمة بخضروات طازجة (جزر ، بنجر ، ألفا ألفا ، خس ، كرفس ... الخ) . ويجب فحص الخضروات الطازجة وصحتها قبل إضافتها الى الخنازير لأن هذه الحيوانات تنبذ الطعام الفاسد ولا تأكله . ولابد من احتواء العليقة على دهون (مثل زيت كبد الحوت codliver oil) ويجب عدم تغذيتها عليه عندما يتزنخ . وكثيراً ما ينصح بإضافة

الخميرة الجافة dried yeast إلى مخلوط الحبوب . وتباع مخاليط علائق خنازير غينيا جاهزة فى الأسواق .

معظم الباحثون يشترون خنازير غينيا من الأسواق ، وذلك ليس مقبولا علمياً حيث يكون تاريخها الغذائى ليس منظماً ، ولكن يجب عليهم شرائها من مربين موثوق فيهم ، ويجب الحذر جدا عند شراء ونقل وحمل هذه الحيوانات حتى لا تصاب بإى عدوى عند تغيير ظروفها .

تلد خنازير غينيا حوالى مرة كل ٣ - ٤ شهور، وتبدأ فترة الحمل ابتداء من عمر ٦٥ - ٧١ يوم ، ويجب ألا يبدأ تزواجها قبل عمر ٣ شهور . وفترة الرضاعة تستمر حوالى ٢ - ٣ أسابيع .

ثالثاً : الفئران البيضاء الصغيرة White Mice

الفأر الأبيض الصغير white mouse يستعمل بنجاح فى دراسات التغذية ، ومميزات أو محاسن هذه الفئران تتضمن قلة أو صغر المتطلبات الغذائية ، ونمو أكثر سرعة more rapid growth ، وكثرة التوالد أو التكاثر . المتطلبات الغذائية للفأر الأبيض الصغير تتماثل مع تلك اللازمة للفأر الأبيض الكبير ، لكن ينصح بمحتوى بروتين عالى . ولكن يفضل الـ rat عن الـ mouse فى دراسات التغذية لأنه أكثر تحملاً بالمقارنة بالـ mouse ، وأقل عرضه للعدوى بالأمراض الثانوية ، ولا يتأثر سريعاً بتغيير درجات الحرارة . أما الـ mouse فيلزمه فيتامين ج للنمو الطبيعى .

رابعاً : الهامستر Hamster

تستخدم هذه الحيوانات فى تجارب الطفيليات المختلفة مثل البلهارسيا والأمراض الفيروسية . وهذه الحيوانات ثبت إنها أكثر حساسية عن الفئران الصغيرة ، وفاعلية التجارب عليها فى معامل الأبحاث غير ثابتة إذا قورنت بالحيوانات الأخرى ، لذلك نجد إنه قليل الاستعمال . أما من الجهة التشريحية فنجد أنه قريب الشبة من الفأر الأبيض الكبير . ومن عادة هذه الحيوانات أنها تحب النوم نوماً عميقاً وخصوصاً إذا كان هناك أنثى معها صفارها، ومن عاداتها أيضاً أنها تأكل برازها وهذه عادة طبيعية حتى ولو أستعملت أرضية من السلك الشبكى فى أقفاصها، لذلك ينهى عن أستعمالها فى تجارب التغذية والميزان الغذائى .

خامساً : الأرانب Rabbits

تعتبر الأرانب حيوانات تجارب نموذجية فى كثير من الأبحاث خصوصاً المتعلقة منها باللقاحات وأمراض تصلب الشرايين ، فهي مناسبة لهذا النوع من الأبحاث لسهولة أحداث أمراض تصلب الشرايين atherosclerosis فيها وارتفاع الكوليستيرول والليبيدات فى الدم . كما تستخدم أيضاً فى مجالات الأبحاث البكتريولوجية والفسيولوجية والتغذية والأبحاث المتعلقة بالهرمونات وإنتاج الأمصال واللقاحات . والأرانب حيوانات آكلة للعشب ذو معدة واحدة ، إلا إن الأعور بها ذو حجم كبير وذلك لقيام البكتريا الموجودة بها بتحليل وهضم المواد السليولوزية . وهناك أنواع كثيرة من الأرانب ، تستخدم كلها تقريباً فى الأبحاث . ولكن هناك أنواع وسلالات شائعة الاستعمال فى أبحاث معينة نذكر منها على سبيل المثال السلالات الكبيرة large breeds و يبلغ وزنها من ٦,٤ إلى ٧,٢ كيلو جرام أو ما يعادل ١٤ إلى ١٦ رطل ومنها الشينشिला الكبيرة giant chinchilla . السلالات متوسطة الحجم medium - sized و يبلغ وزنها من ١,٨ إلى ٦,٤ كيلو جرام أو ما يعادل ٤ إلى ١٤ رطل ومنها الأرانب النيوزلاندى newzealand rabbits . السلالات الصغيرة small و يبلغ وزنها من ٠,٩ الى ١,٨ كيلو جرام أو ما يعادل ٢ إلى ٤ رطل ومنها سلالات dutch و polish . والسلالة النيوزلاندى الأبيض مناسبة لإنتاج اللحم والأبحاث . وتربى الأرانب إما فى حظائر معينة أو فى أقفاص مصنوعة من الحديد أو الخشب والسلك .

سادساً : الجربيل أو العُضْل Gerbil

وهو حيوان من فصيلة الفأر ، يشبه فى شكله الفأر و يبلغ وزن الذكر البالغ منه حوالى ١٠٠ جم والأنثى حوالى ٨٥ جم . ويتميز الجربيل المنغولى mangolian gerbil بأنه فضولى curious ، تقريباً عديم الرائحة odorless ، ودود friendly ، وسلوكه التزاوجى أحادى monogamous (يتزوج الذكر بأنثى واحدة) .

حيوانات الجربيل نشطة ، تعيش فى جحور burrowing ، وهى حيوانات اجتماعية social لها دورات من النشاط والراحة أثناء اليوم والليل وتستهلك كميات متساوية من الطعام فى أثناء النهار والليل . وهذه الحيوانات مناسبة للأبحاث المتعلقة بزيادة الليبيدات فى الدم أو فى الكبد hepatic lipidosis والحصى المرارية gallstones والتي يمكن إحداثها بتغذية هذه الحيوانات على علائق عالية الدهون high - fat diets ، ولكنها غير مناسبة لأبحاث تصلب الشرايين .

سابعاً : الكلاب Dogs

استخدمت الكلاب فى تجارب التغذية على مخلوط غذاء مصنع نقى وكتب لهذه التجارب النجاح . وأساس ذلك إن العليقة تتركب من مخلوط من المواد الغذائية المنفردة والتي تمد الجسم بكل العوامل الضرورية لغرض التغذية عدا عامل غذائى واحد single dietary factor وهو المتغير فى مخلوط العلائق المختلفة (كما هو متبع فى تجارب التغذية) وأمكن تطبيق ذلك على فيتامين ب المركب كعامل متغير ، وتركب العليقة من : -

- ١ - بروتين protein مناسب فى النوع والكمية .
- ٢ - كربوهيدرات ودهون لتمد الجسم بالطاقة الكافية .
- ٣ - أملاح معدنية mineral salts ، كما فى الجدول (٦) ، فهى مناسبة فى النوع والكمية .
- ٤ - كمية كافية من فيتامين أ .
- ٥ - طعام خشن Roughage
- ٦ - ماء .

SALT MIXTURE (KARR, 1920)		SALT MIXTURE (COWGILL)	
NaCl.....	10 g.	NaCl.....	38.0
Ca lactate.....	4 g.	Mg citrate.....	32.5
Mg citrate.....	4 g.	KH ₂ PO ₄	12.2
Fe citrate.....	1 g.	CaHPO ₄ ·2H ₂ O.....	7.8
Iodine in KI (Lugol's solution) a few drops		KCl.....	7.0
		Fe citrate.....	1.8
		KI.....	0.5

Karr's salt mixture, when fed along with bone ash on the basis of 0.2 g. and 0.4 g., respectively, per kilo unit of food, the latter serving as a source of phosphate, has given successful results with the dog during periods lasting over five months.

Where 0.4 g. of agar-agar per kilo unit is used as a source of roughage, Cowgill's salt

جدول (٦) الاملاح المعدنية المناسبة لتغذية الكلاب

إن متطلبات الطاقة اللازمة للكلاب عادة ما تكون عالية (جدول ٧) ، وتقتصر الطاقة إلى ٦٠ - ٧٠ كالورى / كجم من وزن الجسم ، فمثلاً فى تجارب دراسة نقص أحد فيتامينات ب المركب (العامل المتغير) يتم التغذية عليه منفرداً separately (فى صورة خميرة جافة مثلاً) ويمكن اضافة إى مخلوط فيتامينى مخلق أو صور متنوعة من فيتامين ب منفردة . كما يجب ملاحظة إن اضافة كميات سكر زيادة عن اللازم فى العليقة يسبب اسهالاً للحيوانات .

KILO UNIT OF CASEIN FOOD *

	Amount	Calories	Percentage
	g.		
Casein (81.9 per cent pure, 12.7 per cent N).....	8.3	20.8	37.6
Sucrose.....	5.84	23.4	34.9
Lard.....	2.83	25.5	17.0
Butterfat.....	1.17	10.5	7.0
Bone ash.....	0.40	..	2.3
Salt mixture†.....	0.20	..	1.2
Totals	16.74	80.2	100.0

* This kilo unit contains 80 calories, 45 per cent of which are furnished by fat, and 0.8 mg. of nitrogen.
† See footnote 29, p. 1275.

جدول (٧) متطلبات الطاقة اللازمة للكلاب

لذا فإضافة الحبوب cereals (وليس نشا نقى) هو أحسن مصدر للكربوهيدرات .
وليس من الضروري مد الكلاب باللحم ، حيث إنها غير ضرورية لو كانت العليقة كافية فيما
يتعلق بالبروتين والمغذيات nutrients الأخرى . كما إن استخدام عليقة معينة باستمرار يسبب
ضعف شهية الكلاب وقلة الرغبة فى الأكل .

ثامنا : حيوانات أخرى Other animals

تستخدم حيوانات أخرى خلاف السابق ذكرها مثل القطط cats و الكناكيت والدجاج
..... إلخ ، وذلك على حسب متطلبات التجربة والفرض من أجراء البحث العلمى .

هذا ويتم اختيار نوع الحيوان ، ووزن جسمه ، وعمره ، و جنسه ... إلخ ، وذلك على
حسب نوع التجربة والفرض من إجراء البحث العلمى ، فمثلاً فى تجربة التغذية وقياس القيمة
البيولوجية لبعض المواد الغذائية ، تختار ذكور حيوانات صغيرة (فئران بيضاء كبيرة أو
صغيرة) ، وفى تجارب قياس بعض الفيتامينات التى لها علاقة بالخصوبة مثل فيتامين هـ
تختار اناث فئران بالغة .

ومما هو جدير بالذكر، إن القيم الفسيولوجية physiological values لهذه الحيوانات
أمراً هاماً جداً للباحثين والعاملين فى هذا المجال ، فهى بمثابة المرجع والدليل على صحة
وسلامة الحيوانات . والجدول (٨ - ١٣) تعرض هذه القيم ، مع مراعاة إن هذه القيم قيم
تقريبية ومن المحتمل فى بعض الحالات إنها تمثل المدى الطبيعى ، وهذا يرجع إلى اختلاف
الأنواع والظروف المعيشية وغيرها من العوامل (Harkness and Wagner , 1989)

Adult body weight: male	450–520 g
Adult body weight: female	250–300 g
Birth weight	5–6 g
Body surface area (cm ²)	10.5 (wt. in grams) ^{2/3}
Body temperature	35.9–37.5° C
Diploid number	42
Life span	2.5–3.5 yr
Food consumption	10 g/100 g/day
Water consumption	10–12 ml/100 g/day
GI transit time	12–24 hr
Breeding onset: male	65–110 days
Breeding onset: female	65–110 days
Cycle length	4–5 days
Gestation period	21–23 days
Postpartum estrus	fertile
Litter size	6–12
Weaning age	21 days
Breeding duration, commercial	350–440 days
Young production	7–10 litters
Milk composition	4–5 mo
Respiratory rate	13.0% fat, 9.7% protein, 3.2% lactose
Tidal volume	70–115/min
Oxygen use	0.6–2.0 ml
Heart rate	0.68–1.10 ml/g/hr
Blood volume	250–450/min
Blood pressure	54–70 ml/kg
Erythrocytes	84–134/60 mm Hg
Hematocrit	7–10 × 10 ⁶ /mm ³
Hemoglobin	36–48%
Leukocytes	11–18 g/dl
Neutrophils	6–17 × 10 ³ /mm ³
Lymphocytes	9–34%
Eosinophils	65–85%
Monocytes	0–6%
Basophils	0–5%
Platelets	0–1.5%
Serum protein	500–1300 × 10 ³ /mm ³
Albumin	5.6–7.6 g/dl
Globulin	3.8–4.8 g/dl
Serum glucose	1.8–3.0 g/dl
Blood urea nitrogen	50–135 mg/dl
Creatinine	15–21 mg/dl
Total bilirubin	0.2–0.8 mg/dl
Serum lipids	0.20–0.55 mg/dl
Phospholipids	70–415 mg/dl
Triglycerides	36–130 mg/dl
Cholesterol	26–145 mg/dl
Serum calcium	40–130 mg/dl
Serum phosphate	5.3–13.0 mg/dl
	5.3–8.3 mg/dl

جدول (٨) القيم الفسيولوجية للفأر الكبير

Adult body weight: male	900-1200 g
Adult body weight: female	700-900 g
Birth weight	70-100 g
Body surface area (cm ²)	9.5 (wt. in grams) ^{2/3}
Body temperature	37.2-39.5° C
Diploid number	64
Life span	4-5 yr
Food consumption	6 g/100 g/day
Water consumption	10 ml/100 g/day
GI transit time	13-30 hr
Breeding onset: male	600-700 g (3-4 mo)
Breeding onset: female	350-450 g (2-3 mo)
Cycle length	15-17 days
Gestation period	59-72 days
Postpartum estrus	fertile, 60-80% pregnancy
Litter size	2-5
Weaning age (lactation duration)	150-200 g 14-21 days
Breeding duration, commercial	18 mo to 4 years
Young production (index per female)	4-5 litters
Milk composition	0.7-1.4/mo
Respiratory rate	3.9% fat, 8.1% protein, 3.0% lactose
Tidal volume	42-104/min
Heart rate	2.3-5.3 ml/kg
Blood volume	230-380/min
Blood pressure	69-75 ml/kg
Erythrocytes	80-94/55-58 mm Hg
Hematocrit	4.5-7.0 × 10 ⁶ /mm ³
Hemoglobin	37-48%
Leukocytes	11-15 g/dl
Neutrophils	7-18 × 10 ³ /mm ³
Lymphocytes	28-44%
Eosinophils	39-72%
Monocytes	1-5%
Basophils	3-12%
Platelets	0-3%
Serum protein	250-850 × 10 ³ /mm ³
Albumin	4.6-6.2 g/dl
Globulin	2.1-3.9 g/dl
Serum glucose	1.7-2.6 g/dl
Blood urea nitrogen	60-125 g/dl
Creatinine	9.0-31.5 mg/dl
Total bilirubin	0.6-2.2 mg/dl
Serum lipids	0.3-0.9 mg/dl
Phospholipids	95-240 mg/dl
Triglycerides	25-75 mg/dl
Cholesterol	0-145 mg/dl
Serum calcium	20-43 mg/dl
Serum phosphate	5.3-12 mg/dl
	3.0-7.6 mg/dl

Adult body weight: male	20-40 g
Adult body weight: female	25-40 g
Birth weight	0.75-2.0 g
Body surface area (cm ²)	10.5 (wt. in grams) ^{2/3}
Rectal temperature	36.5-38.0° C
Diploid number	40
Life span	1.5-3 yr
Food consumption	15 g/100 g/day
Water consumption	15 ml/100 g/day
GI transit time	8-14 hr
Breeding onset: male	50 days
Breeding onset: female	50-60 days
Cycle length	4-5 days
Gestation period	19-21 days
Postpartum estrus	fertile
Litter size	10-12
Weaning age	21-28 days
Breeding duration,	7-9 mo
commercial	6-10 litters
Young production	8/mo
Milk composition	12.1% fat, 9.0% protein, 3.2% lactose
Respiratory rate	60-220/min
Tidal volume	0.09-0.23 ml
Oxygen use	1.63-2.17 ml/g/hr
Heart rate	325-780/min
Blood volume	76-80 mg/kg
Blood pressure	113-147/81-106 mm Hg
Erythrocytes	7.0-12.5 × 10 ⁶ /mm ³
Hematocrit	39-49%
Hemoglobin	10.2-16.6 mg/dl
Leukocytes	6-15 × 10 ³ /mm ³
Neutrophils	10-40%
Lymphocytes	55-95%
Eosinophils	0-4%
Monocytes	0.1-3.5%
Basophils	0-0.3%
Platelets	160-410 × 10 ³ /mm ³
Serum protein	3.5-7.2 g/dl
Albumin	2.5-4.8 g/dl
Globulin	0.6 g/dl
Serum glucose	62-175 mg/dl
Blood urea nitrogen	12-28 mg/dl
Creatinine	0.3-1.0 mg/dl
Total bilirubin	0.1-0.9 mg/dl
Cholesterol	26-82 mg/dl
Serum calcium	3.2-8.5 mg/dl
Serum phosphate	2.3-9.2 mg/dl

Adult body weight: male	85–130 g
Adult body weight: female	95–150 g
Birth weight	2 g
Body surface area (cm ²)	10.5 (wt. in grams) ^{2/3}
Body temperature	37–38° C
Diploid number	44
Life span	18–24 mo
Food consumption	> 15 g/100 g/day
Water consumption	> 20 ml/100 g/day
Breeding onset: male	10–14 wk
Breeding onset: female	6–10 wk
Cycle length	4 days
Gestation period	15–16 days
Postpartum estrus	infertile
Litter size	5–9
Weaning age	20–25 days
Breeding duration,	10–12 mo
commercial	5–7 litters
Young production	3 mo
Milk composition	12.0% fat, 9.0% protein, 3.4% lactose
Respiratory rate	35–135/min
Tidal volume	0.6–1.4 ml
Oxygen use	0.6–1.4 ml/g/hr
Heart rate	250–500/min
Blood volume	78 ml/kg
Blood pressure	150/100 mm Hg
Erythrocytes	6–10 × 10 ⁶ /mm ³
Hematocrit	36–55%
Hemoglobin	10–16 g/dl
Leukocytes	3–11 × 10 ³ /mm ³
Neutrophils	10–42%
Lymphocytes	50–95%
Eosinophils	0–4.5%
Monocytes	0–3%
Basophils	0–1%
Platelets	200–500 × 10 ³ /mm ³
Serum protein	4.5–7.5 g/dl
Albumin	2.6–4.1 g/dl
Globulin	2.7–4.2 g/dl
Serum glucose	60–150 mg/dl
Blood urea nitrogen	12–25 mg/dl
Creatinine	0.91–0.99 mg/dl
Total bilirubin	0.25–0.60 mg/dl
Cholesterol	25–135 mg/dl
Serum calcium	5–12 mg/dl
Serum phosphate	3.4–8.2 mg/dl

Adult body weight: male (buck)	2-5 kg
Adult body weight: female (doe)	2-6 kg
Birth weight	30-80 g
Body surface area (cm ²)	9.5 (wt. in grams) ^{2/3}
(See Paget 1965 ref., Chapter 3 bibliography)	
Rectal temperature	38.5-40.0° C
Diploid number	44
Life span	5-6 yr or more
Food consumption	5 g/100 g/day
Water consumption	5-10 ml/100 g/day or more
GI transit time	4-5 hr
Breeding onset: male	6-10 mo
Breeding onset: female	4-9 mo
Cycle length	induced ovulator
Gestation period	29-35 days
Postpartum estrus	none
Litter size	4-10
Weaning age	4-6 wk
Breeding duration, commercial	1-3 yr
Young production	7-11 litters
Milk composition	2-4/mo
Respiratory rate	12.2% fat, 10.4% protein, 1.8% lactose
Tidal volume	30-60/min
Oxygen use	4-6 ml/kg
Heart rate	0.47-0.85 ml/g/hr
Blood volume	130-325/min
Blood pressure	57-65 ml/kg
Erythrocytes	90-130/60-90 mm Hg
Hematocrit	4-7 × 10 ⁶ /mm ³
Hemoglobin	36-48%
Leukocytes	10.0-15.5 mg/dl
Neutrophils	9-11 × 10 ³ /mm ³
Lymphocytes	20-75%
Eosinophils	30-85%
Monocytes	0-4%
Basophils	1-4%
Platelets	2-7%
Serum protein	250-270 × 10 ³ /mm ³
Albumin	5.4-7.5 g/dl
Globulin	2.7-4.6 g/dl
Serum glucose	1.5-2.8 g/dl
Blood urea nitrogen	75-150 mg/dl
Creatinine	17.0-23.5 mg/dl
Total bilirubin	0.8-1.8 mg/dl
Serum lipids	0.25-0.74 mg/dl
Phospholipids	280-350 mg/dl
Triglycerides	75-113 mg/dl
Cholesterol	124-156 mg/dl
Serum calcium	35-53 mg/dl
Serum phosphate	5.6-12.5 mg/dl
	4.0-6.2 mg/dl

جدول (١٢) القيم الفسيولوجية للارانب

Adult body weight: male	65-100 g
Adult body weight: female	55-85 g
Birth weight (depends on litter size)	2.5-3.0
Body surface area (cm ²)	10.5 (wt. in grams) ^{2/3}
Body temperature	37.0-38.5° C
Diploid number-Karyotype	44
Life span	3-4 yr
Food consumption	5-8 g/100 g/day
Water consumption	4-7 ml/100 g/day
Vaginal opening	41 days or 28 g
Breeding onset: male	70-85 days
Breeding onset: female	65-85 days
Estrous cycle length	4-6 days
Gestation period (nonlactating)	24-26 days
Gestation period (concurrent lactation)	27-48 days
Postpartum estrus	Yes-fertile
Litter size	3-7; 5 avg.
Weaning age	20-26 days
Breeding duration,	12-17 mo
commercial	4-10 litters
Litters per year	7 avg.
Average production index	> 1/wk per breeding pair
Respiratory rate	90/min
Oxygen use	1.4 ml/g/hr
Heart rate	360/min
Blood volume	66-78 ml/kg
Erythrocytes	8-9 × 10 ⁶ /mm ³
Reticulocytes	21-54/1000 rbc
Stippled rbc	2-16/1000 rbc
Polychromatophilic rbc	5-30/1000 rbc
Hematocrit	43-49%
Hemoglobin	12.6-16.2 mg/dl
Leukocytes	7-15 × 10 ³ /mm ³
Neutrophils	5-34%
Lymphocytes	60-95%
Eosinophils	0-4%
Monocytes	0-3%
Basophils	0-1%
Platelets	400-600 × 10 ³ /mm ³
Serum protein	4.3-12.5 mg/dl
Albumin	1.8-5.5 mg/dl
Globulin	1.2-6.0 mg/dl
Serum glucose	50-135 mg/dl
Blood urea nitrogen	17-27 mg/dl
Creatinine	0.6-1.4 mg/dl
Total bilirubin	0.2-0.6 mg/dl
Cholesterol	90-150 mg/dl
Serum calcium	3.7-6.2 mg/dl
Serum phosphate	3.7-7.0 mg/dl

طرق دراسة الفيتامينات Methods of vitamin studies

تتم دراسة الفيتامينات حتى يمكن الوصول إلى ما يلي :-

- ١ - فائدة هذه المركبات و دورها في العمليات الفسيولوجية المختلفة (تمثيل غذائي - تكاثر - الوقاية من الأمراض إلخ) .
- ٢ - معرفة تركيبها الكيميائي ومشابهاتها المختلفة وصورها الفعالة النشطة .
- ٣ - كيفية تحليلها كيمياً ووصفياً حتى يمكن الاستفادة بها من مصادرها الطبيعية .
- ٤ - أعراض نقصها .
- ٥ - تمثيلها الغذائي (بنائها وهدمها) .

وتتطلب دراسة الفيتامينات الخطوات التالية :-

- ١ - تعتبر الخطوة الأولى في دراسة الفيتامينات هي محاولة الوصول إلى أعراض نقصها deficiency symptoms في حيوانات التجارب العملية .
- ٢ - الخطوة الثانية هي الحصول على المادة ذات النشاط الحيوي في صورة نقية ، ويتم ذلك عن طريق :-
- أ - طرق التحليل الكروماتوجرافي المختلفة chromatographic methods .
- ب - التقطير الجزئي تحت تفريغ عالي high vacuum molecular distillation .
- ٣ - دراسة التركيب البنائي لهذه المركبات المفصولة والنشطة حيويًا study of chemical formula .
- ٤ - اثبات هذا التركيب البنائي عن طريق تخليق الفيتامين وتكسيده synthesis and degradation .
- ٥ - تخليق مركبات مشابهة ثم دراسة درجة نشاطها الحيوية على الكائن الحي ، ومن ذلك يمكن التعرف على المجاميع الفعالة واللازمة للنشاط الحيوي حتى يتم اثبات العلاقة بين التركيب الكيميائي لها والخواص الفسيولوجية .

طرق تقدير الفيتامينات Methods of vitamin determination

تعتبر طرق تقدير الفيتامينات من الأشياء الهامة في دراسة الفيتامينات ، حيث يتم تقديرها في مصادرها الطبيعية سواء النباتية منها أو الحيوانية ، كما إن لها أهمية خاصة في الدراسات البيوكيميائية (تقديرها في الكائن الحي) ، وللوصول إلى ذلك لابد من وجود فيتامينات قياسية standard vitamins (كمرجع قياسي) .

كان يتم تقدير الفيتامينات (نشاطها الحيوى) أساساً بواحدات حيوية biological units مثل الوحدات التالية : - rat unit , chick unit , mouse unit
ولكن بعد الحصول على أغلب الفيتامينات في صورة نقيه pure عبر عنها بوححدات وزنية (وحدات قياسية) مثل : -

الوحدة الدولية (I. U) International Unit

United State Pharmacopia unit (U.S.P)

B.P. Unit .

M. R. C. unit

وبالنسبة لطرق تقدير الفيتامينات في مصادرها المختلفة فإنه توجد أربعة أنواع من الطرق تختلف عن بعضها البعض في أساس التقدير ، وهي كما يلي : -

أولاً : الطرق الحيوية Biological Methods(Bioassay)

الأساس الذى تبني عليه هذه الطرق هو أن لكل فيتامين تأثيرات حيوية خاصة به (متخصصة) specific biological effects على الكائنات الحية ، بقياس هذه الاستجابة الحيوية (تأثير الفيتامين) يمكن تقدير النشاط الحيوى الفعلى للفيتامين كميأ . وتستخدم في هذه الطرق حيوانات التجارب العملية السابق الإشارة إليها . هذا ، ولابد من وجود عامل استجابة على حيوان التجارب حتى يمكن أن يقاس به الفيتامين .

عامل الاستجابة Critiria of response : -

هو رد الفعل الطبيعى الناتج من استجابة الحيوان للفيتامين . وقد يأخذ هذا العامل اشكال متعددة مثل النمو العادى للجسم (كما فى فيتامين أ) ، أو النمو الرأسى والأفقى

للعظام (كما فى فيتامين د) ، أو نمو بعض أجهزة الجسم (كما فى فيتامين هـ) ، أو إنتاج بعض المواد من الكائن الحى كإنفراد الأحماض أو الغازات أو العناصر المعدنية .

وتستخدم الطرق الحيوية كمرجع أساسى ينسب إليه جميع الطرق الأخرى لأنها تقدر النشاط الفيتامينى الفعلى والتي تعجز الطرق الأخرى (كيميائية أو طبيعية) عن تقديرها .

الخطوات الرئيسية العامة لهذه الطرق :

هناك مجموعة من الخطوات الرئيسية عند تقدير الفيتامينات بهذه الطرق هى :

١ - تختار الحيوانات من سلالة معروفة النسب ولها نفس العمر والوزن ومرباة على حسب الشروط السابق ذكرها .

٢ - تقسم الحيوانات إلى عدة مجموعات وكل مجموعة تحتوى على العدد الكافى

لاجراء التجربة (للتحليل الاحصائى على الأقل ١٠ حيوانات فى كل مجموعة) .

وعادة ما يكون هناك هذه المجموعات :

أ - المجموعة الأولى Positive control group :

وهذه المجموعة تغذى بصورة طبيعية وعلى عليقة كاملة متزنة .

ب - المجموعة الثانية Negative control group :

وهذه المجموعة لا تعطى اطلاقاً الفيتامين المراد دراسته وتقديره حيويّاً فى غذائها .

ج - المجموعة الثالثة (القياسية) Standard group :

وفى هذه المجموعة يتم استنفاد الفيتامين من جسمها كما فى المجموعة الثانية ، ثم تعطى بعد

ذلك كميات معلومة بالضبط من الفيتامين النقى تحت الدراسة ويسجل فيها عامل الاستجابة

(لعمل المنحنى القياسى) .

د - المجموعة الرابعة Unknown group :

وفىها يتم استنفاد الفيتامين كما فى المجموعة الثانية ثم تعطى كميات معلومة من العينة

المراد تقدير الفيتامين فيها ، ويسجل بعد ذلك عامل الاستجابة المقابل لهذه المعاملة .

٣ - يتم فى كل المجاميع عمل استنفاد deplating للفيتامين تحت الدراسة عدا

المجموعة الأولى . ويتم هذا الاستنفاد بتقديم عليقة متزنة ولاحتوى على

الفيتامين، ثم تعطى المجاميع الفيتامين أو العينة تحت الدراسة كما سبق ذكره .

٤ - يتم رسم العلاقة البيانية بين عامل الاستجابة وكمية الفيتامين من دراسة المجموعة القياسية. وعادة ما يكون الرسم الناتج في صورة منحنى قياسى standard curve .

٥ - ومن نتائج المجموعة الأخيرة unknown group يسجل عامل الاستجابة المقابل للعينة المعطاة للحيوانات ، ويقارن بالمنحنى القياس ومنه تحسب كمية الفيتامين الفعلية في العينة المعطاة لها .

هذا، ويتم استنفاد الفيتامين عادة من حيوانات التجارب النامية الصغيرة young animals أو بعد فطامها weaning animals . ويجب الحرص الشديد ومراعاة النظافة التامة في هذه التجارب حتى لا تتلف التجربة بتناول الحيوانات إى شىء خلاف الغذاء المعد لذلك .

ويجب ملاحظة الآتى فى الطرق الحيوية : -

(١) وجود عامل استجابة يمكن قياسه .

(٢) أن يكون هذا العامل متخصصاً specific لهذا الفيتامين .

(٣) أن يكون هناك مرجع ثابت reference standard للرجوع اليه للمقارنة .

(٤) فى حالة وجود الفيتامين فى أكثر من صورة ، يجب معرفة هذه الصور فى المصدر المراد تقدير النشاط فيه .

(٥) يجب معرفة ومراعاة عدم حدوث أعراض جماعية multiple deficiency symptoms فى حيوان التجارب .

مميزاتها : -

فى حالة وجود مركبات مشابهة كيميائياً للفيتامين ولكن ليس لها نشاط فيتامينى حيوى ، يمكن التعرف عليها بسهولة (إى تبين كيف يستفيد الحيوان من المادة) . وتستخدم هذه الطرق عادة فى تقدير فيتامينات أ ، د ، هـ .

عيوبها : -

(١) مكلفة وتتطلب أموالاً كثيرة سواء لاجراء التجربة (حيوانات كثيرة) أو لانجاز التحاليل المختلفة .

(٢) مجهدة و بطيئة وتحتاج إلى متسع من الوقت .

(٣) يجب مقارنتها بالطرق الأخرى .

(٤) تحتاج الى حذر شديد جداً حتى لا تتلف التجربة .

هذا ، ويمكن استخدام الحشرات بدلاً من حيوانات التجارب السابق الإشارة إليها ، كما يمكن استعمال تصميم التجارب الحيوية في دراسة وتقدير مواد أخرى غير الفيتامينات ، مثل تقدير ودراسة المبيدات سواء على الحشرات أو على حيوانات التجارب المعملية .

ثانياً : الطرق الميكروبية Microbiological Methods

يختلف أساس تقدير الفيتامينات بهذا النوع من الطرق على حسب عامل الاستجابة وكيفية قياسه . وطرق التقدير بهذه الطرق تنقسم إلى مجموعتين أساسيتين وهما : -

١ - طرق تعتمد على قياس نمو الكائن الحى الدقيق مباشرة growth of microorganism . ومن أمثلة هذه الطرق قياس العكارة measurement of turbidity كمؤشر للنمو ، أو قياس وزن الخلايا النامية الجافة dry cells ، أو قياس كمية النيتروجين الخلوى amount of cellular N₂ ، أو تقدير عدد الخلايا مباشرة direct cell counts ، إلخ .

٢ - طرق تعتمد على قياس بعض نواتج التمثيل الغذائى some metabolic products للكائن الحى . وهى مبنية على أساس تقدير أحد نواتج التمثيل الغذائى لهذا الميكروب ، مثل تقدير الأحماض acids أو CO₂ إلخ .

وجداول (١٤) يلخص التقديرات الميكروبيولوجية للفيتامينات .

TYPICAL MICROBIOLOGICAL DETERMINATIONS OF THE VITAMINS

Vitamin	Extraction and Hydrolytic Procedure	Test Microorganisms	Vitamin Concentration		Response Measured
			at Half Maximum Growth	at Maximum Growth	
Thiamine.....	Heat 30 min. 100° C. 0.1 N H ₂ SO ₄ and digest with pepsin and "Taka-Diastase"	<i>Lactobacillus fermentum</i> 36 (ATCC 9833)	µg. per 10 ml. tube 0.02	0.04	Turbidity
Riboflavin.....	Autoclave 30 min., 15 lb., 0.1 N HCl	<i>Lactobacillus casei</i> (ATCC 7469)	0.00	0.20	Acidity
Niacin.....	Autoclave 30 min., 15 lb., 1.0 N H ₂ SO ₄	<i>Lactobacillus arabinosus</i> 17-5 (ATCC 8014)	0.1	0.4	Acidity
Pantothenic acid.	Digest with intestinal phosphatase and liver enzymes	<i>Lactobacillus arabinosus</i> 17-5 (ATCC 8014)	0.03	0.20	Acidity
Vitamin B ₁₂	Autoclave 60 min., 20 lb., 0.065 N or 2N H ₂ SO ₄	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	0.01	0.04	Turbidity
Vitamin B ₁₂	(1) Aqueous (USP) (2) 15 min., 15 lb., pH 4.5 with fresh NaHSO ₄	<i>Lactobacillus trichomonii</i> 313 (ATCC 7830)	0.00005	0.0002	Acidity
Biotin.....	Autoclave 60 min., 15 lb., 6 N H ₂ SO ₄	<i>Lactobacillus arabinosus</i>	0.0004	0.0015	Acidity
Folic acids.....	Digest by specific enzymes from chicken pancreas	<i>Lactobacillus casei</i> (ATCC 7460)	0.0005	0.005	Acidity
p-Aminobenzoic acid	Autoclave 1 hr., 15 lb., 6 N H ₂ SO ₄	<i>Neurospora crassa</i> 1633 (ATCC 2776)	0.015	0.04	Weight
Choline.....	Autoclave 120 min., 15 lb., 1 N H ₂ SO ₄	Cholineless mutant of <i>Neurospora crassa</i> No. 34486 (ATCC 9277)	6*	30*	Weight
Inositol.....	Reflux 6 hrs., 120° C., 2.7 N HCl	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> (ATCC 9080)	3.0	8.0	Turbidity

* Per 25 ml.

جدول (١٤) التقديرات الميكروبيولوجية النموذجية للفيتامينات

والمشكلة الرئيسية في هذه الطرق هي استخلاص الفيتامين (أو المركب المراد تقديره) أساساً من المادة المراد تقديره فيها بدون تلف أو فساد وفي ظروف معقمة حتى لا يحدث تلوث في التقدير .

وفيما يلي اختصار لأحدى طرق قياس العكارة : -

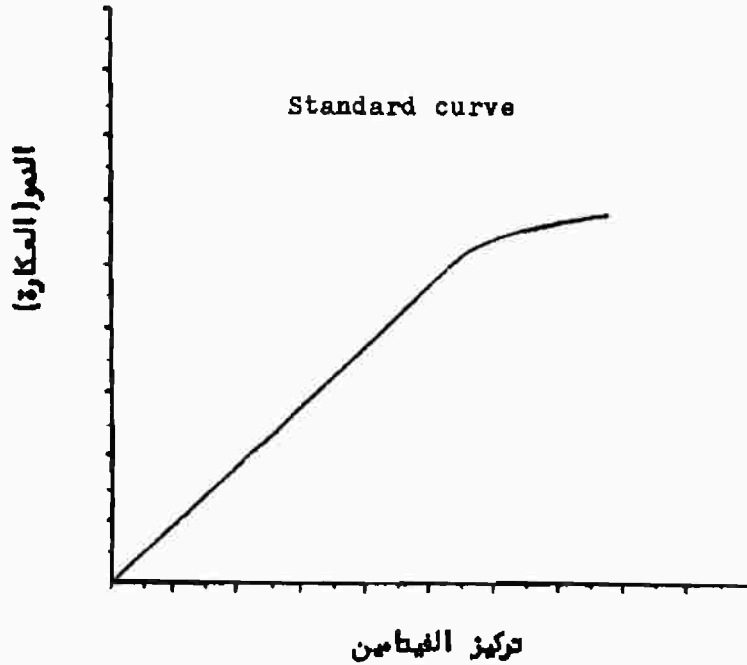
١ - يتم اختيار سلالة الكائن الحي الدقيق المناسبة (بكتريا) والتي لا يمكنها النمو

إلا في وجود هذا الفيتامين ، ويتم تنقيته وغسله عدة مرات .

٢ - يتم تحضير تركيزات مختلفة من الفيتامين معلومة بالضبط .

٤ - يحضر حجم معلوم بالضبط من التركيزات المختلفة من الفيتامين في بيئة النمو المعقمة مع الكائن الحى الدقيق ، وتقاس العكارة في جهاز ال spectrophotometer (على طول موجه ٥٨٠ nm) ثم يحضن لفترة زمنية مناسبة وعلى درجة حرارة مناسبة (عادة ٣٧° م) .

٥ - بعد التحضين تقاس العكارة أيضاً، ثم يرسم المنحنى القياسى لذلك ، وهنا يكون عامل الاستجابة هو النمو والمعبّر عنه بالعكارة (حيث بزيادة عدد خلايا البكتريا تزداد عكارة البيئة) (شكل ١٥) .



شكل (١٥) المنحنى القياسى لعلاقة تركيز الفيتامين بنمو الكائنات الحية الدقيقة .

٦ - ومن ناحية أخرى يتم أستخلاص الفيتامين من العينة المراد تقديره فيها ويحضن في نفس الظروف في بيئة خالية منه تماماً وتقاس العكارة أيضاً .

٧ - تقارن عكارة العينة المجهولة مع المنحنى القياس ، ومنها يمكن أيجاد تركيز الفيتامين في هذه العينة .

مميزاتها : -

(١) قصر الوقت بالمقارنة بالطرق الحيوية .

(٢) كمية الفيتامين التي تستعمل فى التقدير تكون صغيرة جداً بالمقارنة بالطرق الحيوية .

عيوبها : -

أستخلاص المادة (الفيتامين) المراد تقديرها من مصادرها ، وذلك قبل إضافتها إلى بيئة الكائن الحى ، وهذا قد يضر بها ويتلفها .

ومن أمثلة هذه الطرق : -

(١) طرق تستعمل بكتريا حمض اللاكتيك Lactic acid bacteria .

(٢) طرق تستعمل الخميرة Yeasts .

(٢) طرق أخرى تستعمل Neurospora , Miscellaneous Microorganisms .

ثالثاً : الطرق الكيميائية Chemical Methods

الاساس النظرى لهذه الطرق يعتمد أساساً على إجراء تفاعل كيميائى معين مع الفيتامين بأضافة جوهر كشاف مناسب ، حيث ينتج من هذا التفاعل لون يقاس فى أجهزة قياس الألوان colorimeters . ومن شروط هذه الطرق إنه لابد من عدم حدوث تداخل بين تقدير الفيتامين وإى ماده اخرى وأعطاء نفس اللون ، وأن يكون اللون الناتج من تفاعل الجوهر الكشاف مع الفيتامين علاقة كمية . مع كمية الفيتامين (تركيز الفيتامين يتناسب طردياً مع α اللون) (إى علاقة خطية) .

مميزاتها : -

تمتاز بسرعة اجرائها وسهولتها بالمقارنة بالطرق السابقة ، وأيضاً عدم تكلفتها بالمقارنة بها .

عيوبها : -

(١) لا تقدر هذه الطرق المشابهات المختلفة للفيتامين ولكنها لا تفرق بينها ، وعلى ذلك فهي لا تقدر النشاط الفعلى للفيتامين بعكس الطرق السابقة .

٢) قد يحدث تداخل بين طبيعة التفاعل بين جواهر الكشف المستخدم وبين مواد أخرى، وهذا يؤدي إلى حدوث أخطاء كبيرة .

و يدخل تحت هذه الطرق بعض الطرق الأخرى منها : -

أ - الطرق الكيميائية الحيوية Biochemical methods : -

وهي مبنية على أساس تقدير بعض الوظائف الكيميائية الحيوية للفيتامينات والتي تعلق دوراً هاماً في جسم الكائن الحي ، مثل تقدير فيتامين ب_١ عن طريق تقدير نشاط أنزيم Carboxylase والذي يدخل فيه الفيتامين كمعاون أنزيمي .

ب - الطرق الكيميائية الدقيقة Microchemical methods : -

وهي طرق حديثة تطبق لتقدير بعض الفيتامينات على نطاق واسع ، حيث يستخدم فيها كميات صغيرة من العينة المراد تقدير فيها الفيتامين وكميات صغيرة من الجواهر الكشفية أيضاً .

رابعاً : الطرق الطبيعية Physical Methods

تعتمد هذه الطرق أساساً على وجود مجاميع معينة في جزيء الفيتامين ، وخواص هذه المجموعات الطبيعية وسلوكها من حيث الفلورة والامتصاصات الضوئية ، أو بمعنى آخر تعتمد على قياس أحد الخواص الطبيعية للفيتامين some physical properties of Vit. مباشرة أو بعد إجراء تفاعل كيميائي معين ، مثل قياس لونه إذا كان ملوناً مثلاً كما في تقدير Provitamin A (الكاروتين) ، أو قياس الامتصاص الطيفي له بعد الحصول عليه في صورة نقية .

مميزاتها : -

هذه الطرق من أحدث وأسرع وأدق الطرق المتبعة في تقدير الفيتامينات وأرخصها أيضاً .

عيوبها : -

حدوث تداخلات أيضاً مع بعض المركبات الأخرى ، وهي لا تقدر الكمية الفعلية النشطة للفيتامين (تقدر المشابهات مع بعضها) ، كما أنها تحتاج إلى أجهزة امتصاص دقيقة والتي يحتمل عدم توافرها .

ومن أمثلة هذه الطرق : -

- ١ - طرق تتضمن قياس الامتصاص في منطقة الأشعة فوق بنفسجية UV ، مثل تقدير فيتامين أ وبادئات فيتامين أ provit . A وخلافه .
- ٢ - طرق تتضمن قياس الفلورة Fluorimetry كما في تقدير الثيامين والريبوفلافين .
- ٣ - طرق القياس اللونى Colorimetriy ، كما في تقدير الكاروتينات .

تحليل الفيتامينات Vitamins Analysis

مقدمة :-

الفيتامينات هي مجموعة مختلفة ومتنوعة من المواد توجد في الطعام بكميات تتراوح من ميكروجرامات قليلة few micrograms إلى عدة سنتيجرامات Centigrams لكل ١٠٠ جم من الغذاء . بعض هذه الفيتامينات لها صورة نو بناء كيميائي واحد ولها عدة مشابهاة مختلفة ، وعليه فإن لها درجات مختلفة في النشاط الحيوي . فعلى سبيل المثال يتكون فيتامين هـ من ثمان مركبات كل منها ذات نشاط حيوي مختلف عن الآخر ، وفيتامين ب المركب هي مجموعة من المركبات (ثيامين ونياسين وريبوفلافين و B_6 و B_{12} و حمض البانتوثينيك و حمض الفوليك والبيوتين) ولكل واحد منهم له وظائف بيولوجية مختلفة عن الآخر . بالإضافة إلى ذلك ، هناك مركبات عديدة مثل حمض الأروتيك Orotic acid وحمض البانجاميك Pangamic acid ($Vit. B_{15}$) والتي يدعى أنها ذات خواص مشابهة للفيتامين Vitamin like properties - ولكن لم يثبت أنها فيتامينات .

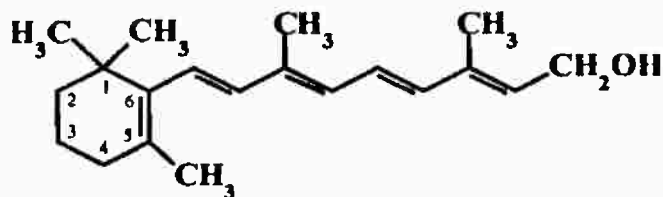
وبالنسبة لتحليل وتقدير الفيتامينات لابد أن يؤخذ في الاعتبار الصورة التي تعرض بها النتائج ، فكل نتائج تحليل الأغذية تُعرض عادة كنسبة مئوية ، ولكن بالنسبة لبعض الفيتامينات فإن هذا الوضع يختلف قليلاً .

وتسجل الآن نتائج الفيتامينات معتمدة أساساً على الوزن weight basis ، عادة ميكرو جرام μg أو ميللي جرام mg لكل ١٠٠ جم من طعام ، وتلك هي الصورة المقررة والمفضلة . وفي قليل من الأمثلة الأخرى المختلفة ربما من المفيد أكثر تسجيل محتوى الفيتامين بطرق أخرى . فعلى سبيل المثال ، فيتامين هـ في بعض الأحيان يعبر عنه في صورة ميللي جرام لكل جرام حمض لينوليك mg/g Linoleic acid . حيث أنه مترتب بالتمثيل الغذائي للدهون . وحيث أن نشاط الفيتامين يستمد derive من عدة مواد مختلفة في النشاط الحيوي ، ويلزم للكائن الحي مجموع هذا النشاط الحيوي ، وعليه فإنه يستخدم مفهوم concept هذه المكافئات . فنشاط فيتامين أ يمكن أن يستمد من الريتينول Retinol ومن الكاروتينيدات المختلفة ذات النشاط الحيوي Carotenoids خصوصاً البيتاكاروتين . فمثلاً مكافئ ميكروجرام واحد من الريتينول μg retinol equivalent يعادل ميكروجرام واحد من الريتينول أو ٦ ميكروجرام بيتاكاروتين (في الإنسان) أو ١٢ ميكروجرام من الكاروتينيدات

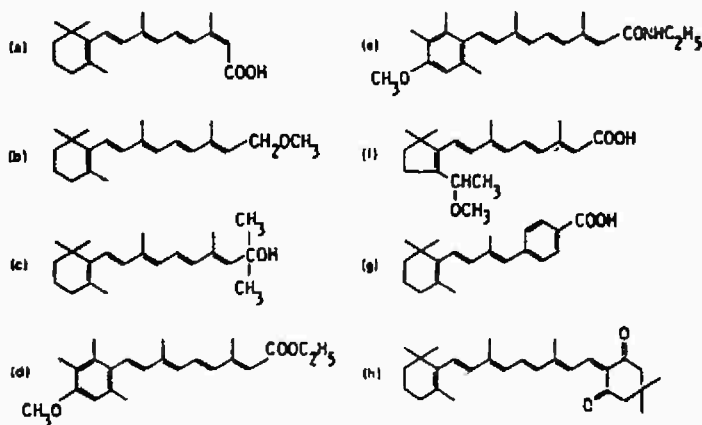
الأخرى ذات النشاط الحيوى ، لذلك فإن النشاط الكلى لفيتامين أ يمكن التعبير عنه كمكافئات ريتينول as retinol equivalents .

أخذ العينة sampling من الأغذية المختلفة هي مشكلة صعبة جداً ، وهذا ليس فقط لاختلاف محتوى الفيتامين بدرجة كبيرة فى المنتجات من مكان لآخر ، ولكن بالإضافة إلى ذلك، كثير من الفيتامينات حساسة للضوء أو للأكسجين أو للحرارة أو لفعل الأنزيمات وعلى ذلك فلا بد من أن يؤخذ هذا فى الاعتبار عند الحصول على عينة ممثلة لتحليلها . ولا بد من التأكد أنها ممثلة تماماً للعينة ككل ، ولا بد من وجود ضمان كافى للمحافظة عليها من التلف بوضعها مثلاً فى أوعية أو صناديق containers خاصة ومناسبة ، ويستخدم وسط ثابت (بارد) لنقل العينات الى المعمل بأسرع ما يمكن . والتجفيد freeze-drying هو تكنيك معملى ذات قيمة كبيرة لمعظم الفيتامينات الثابتة والتي لا تتأثر بالعوامل الأخرى . ولكن بالنسبة لفيتامين أ و فيتامين ح فمن الأحسن لتقديرهما بدقة أن يتم ذلك بسرعة وفى الحال immediately بمجرد وصولها إلى المعمل بقدر الأمكان . وتعتمد الطرق المستخدمة فى تقدير الفيتامينات فى الأطعمة الطازجة الغير مجهزة (النيئة) raw أو المطبوخة cooked أو المعاملة processed تعتمد على طبيعة الفيتامين ، وعلى تركيزه فى الطعام ، وعلى وجود أو غياب المواد المتداخلة سواء كانت طبيعية أو مضافة added . وأول خطوه فى التحليل هي تحرير release الفيتامين من أى صورة مرتبطة combined ، ويمكن إجراء ذلك بالمعاملة بالأحماض أو بالقلويات أو بالأنزيمات ، ثم أستخلاصه بعد ذلك بمذيب . وبعد إزالة كل المواد المتداخلة بتكنيكات عديدة مثل كروماتوجرافى الأعمده أو الطبقة الرقيقة (TLC) ، يمكن تقدير الفيتامين كميأً بتكنيك نهائى مناسب مثل طرق المعايرة titrimetry ، أو طرق القياس اللونى colorimetry ، أو القياس الطيفى فى منطقة الأشعة فوق بنفسجية (UV spectrometry) ، أو التقدير الميكروبيولوجى microbiological assay ، أو قياس الفلورة fluorimetry أو الكروماتوجرافى الغاز - السائل GLC ، أو الكروماتوجرافى السائل تحت ضغط عالى HPLC .

Vitamin A - فيتامين أ



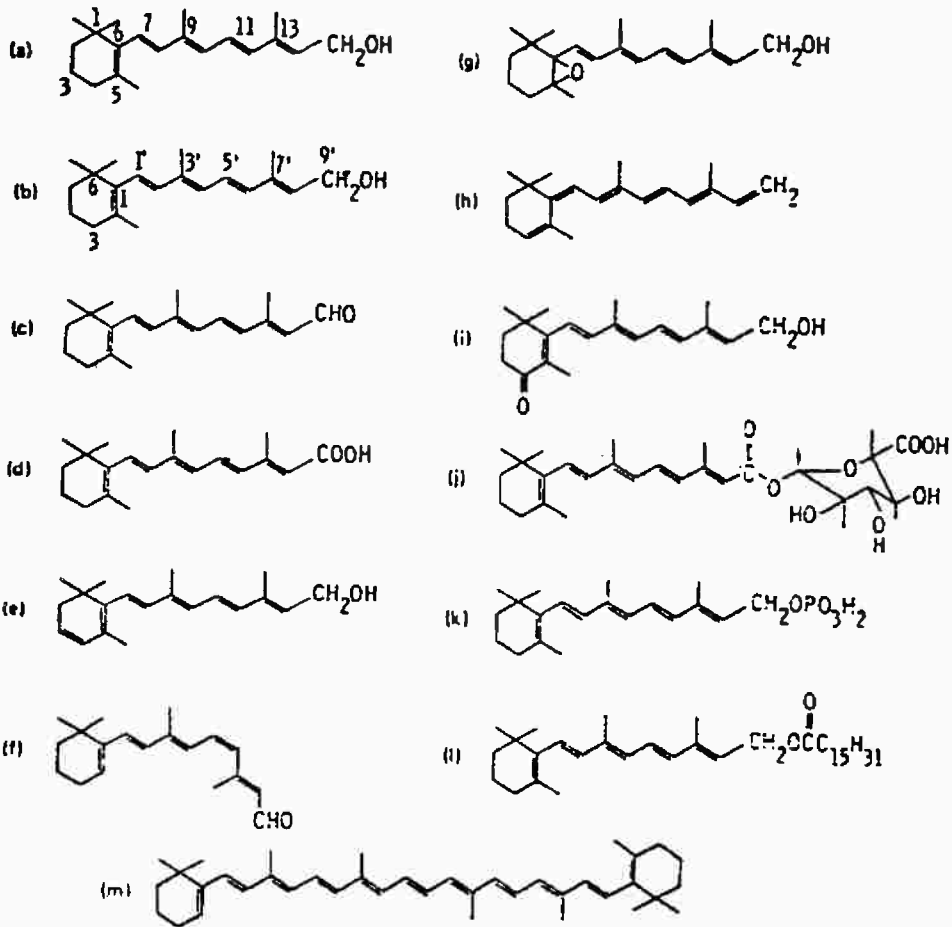
يطلق لفظ فيتامين أ عادة على الريتينول (Vit. A alcohol) وعلى مشابهاته isomers ونظائره analogs ومشتقاته. وهناك نظائر كثيرة لفيتامين أ تضم حمض الريتينويك وأثير المشاييل و ١٥ - ميثايل الريتينول، وغيرها من النظائر إلخ. وشكل (١٦) يعرض الصيغة البنائية لنظائر فيتامين أ.



Formulas of vitamin A analogs: (a) 13-cis-retinoic acid, (b) retinyl methyl ether; (c) 15-dimethylretinol, (d) the trimethylmethoxyphenol analog of ethylretinoate, also termed Ro 10-9359, (e) the ethylamide analog of (d), also termed Ro 11-1430, (f) the dimethylmethoxyethyl-cyclopentenyl analog of retinoic acid, (g) an aryl triene analog of retinoic acid, (h) 2-retinylidene-3,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione (retinylidene dimedone).

شكل (١٦) الصيغة البنائية لنظائر الريتينول

أما مشتقات الريتينول فهي أكثر وتضم حمض الريتينويك Vit. A acid وفيتامين أ، وألدهيد فيتامين أ وغيرها من المشتقات، وشكل (١٧) يعرض الصيغة البنائية لمشتقات الريتينول وأسم كل منها أشير إليه في جدول (١٥).



Formulas for retinol and its derivatives. The names of depicted compounds are referred to in Table 17.

شكل (١٧) الصيغة البنائية للريتينول ومشتقاته وأسم كل منها أشرير إليه في جدول (١٥)

Recommended term ^a	Synonyms
Retinol (a,b)	Vitamin A ₁ alcohol, axerophthol
Retinal, retinaldehyde (c)	Vitamin A ₁ aldehyde, retinene
Retinoic acid (d)	Vitamin A ₁ acid
3-Dehydroretinol (e)	Vitamin A ₂
11- <i>Cis</i> -retinaldehyde (f)	11- <i>Cis</i> or neo b Vitamin A aldehyde
5,6-Epoxyretinol (g)	5,6-Epoxy vitamin A alcohol
Anhydroretinol (h)	Anhydro vitamin A
4-Ketoretinol (i)	4-Keto vitamin A alcohol
Retinoyl β-glucuronide (j)	Vitamin A acid β-glucuronide
Retinyl phosphate (k)	Vitamin A phosphate
Retinyl palmitate (l)	Vitamin A palmitate
Retinyl acetate	Vitamin A acetate

^aThe formulas of most compounds (a, b, c, . . .) refer to Fig.

جدول (١٥) الريتينول وأسماء مشتقاته والصيغة

البنائية لكل منها تم توضيحها في شكل (١٧)

تفاعلات فيتامين أ :

فيتامين أ سريع التلف labile بالحرارة وبالحامض والضوء خصوصاً الأشعة فوق البنفسجية ، فيحدث له inactivation و isomerization . وهو غير ثابت أيضاً للعوامل المؤكسدة وتكسيره بفعل أكسجين الهواء الجوى يكون أسرع خصوصاً فى وجود المعادن والبيروكسيدات ، ولكنه ثابت فى الوسط القلوى .

الخواص :

الوزن الجزيئى MW = ٢٨٦,٤ - درجة الإنصهار MP = ٦٢ - ٦٤ °م .

الذوبان :- ينوب فى الكلوروفورم والأيثانول وغير ذائب فى الماء .

الامتصاص :- أقصى امتصاص له على طول موجة ٣٢٥ - ٣٢٨ nm .

هيبنته :- زيت أصفر Yellow oil .

صورته البلورية :- منشورية Prisms .

صورة :- فى صورة أسترات خلات acetate وبالميتات palmitate .

وجول (١٦) يلخص الخواص الطبيعية للريتينول all trans وإستراته .

Physical Properties of All-Trans-Retinol and its Esters

Property	Retinol	Retinyl acetate	Retinyl palmitate
Formula	$C_{20}H_{30}O$	$C_{22}H_{32}O_2$	$C_{36}H_{60}O_2$
Formula weight	286.46	328.50	524.88
Melting point (°C)	63-64	57-59	28-29
UV Absorption ^a			
λ_{max}	325	326	328
$E_{1\%}^{1cm}$	1820	1530	960
ϵ	52,140	50,260	50,390
Fluorescence			
Excitation λ_{max}	325	325	325
Emission λ_{max}	470	470	470

^aIn isopropanol. Values are similar in ethanol but differ in chloroform and other solvents. Absorbency values for retinol in hexane, for example, are essentially the same as in isopropanol, but for retinyl esters in hexane are about 3% higher.

جدول (١٦) الخواص الطبيعية للريتينول all trans وإستراته .

أمراض نقص فيتامين أ : Deficiency diseases -

١ - جفاف ملتحمة العين Xerophthalmia .

٢ - تضخم القرنية Hyperkeratosis .

٣ - لين القرنية Keratomalacia .

٤ - Nyctalopia .

٥ - Hemeralopia .

٦ - العشى الليلي Night blindness .

ومرض جفاف ملتحمة العين قد يتطور إلى Keratomalacia وتعنى تكوين الكيراتين وخشونة الأغشية الطلائية الدقيقة .

أعراض النقص Deficiency symptoms :

١ - العشى الليلي : - وهو عدم القدرة على الإبصار في الليل خصوصاً عند الانتقال من وسط مضيء إلى وسط مظلم . والمصاب بهذا العرض أو المرض يكون ثوبه عادي في النهار ولكنه يكون ذو بصر ضعيف ليلاً بسبب اختلال عملية الإبصار نفسها لنقص فيتامين أ ، اللهم في عملية الرؤية في الضوء الخافت .

٢ - جفاف الجلد والأغشية المخاطية .

٣ - ظهور خطوط مستعرضة في الأظافر .

٤ - التأخر في نمو الأطفال وفي الولادة (بالنسبة للحوامل) .

أما أعراض نقصه في حيوانات المعمل فهي :

١ - ضعف وردانة نمو العظام bones والأسنان .

٢ - إعادة امتصاص fetus الجنين وضمور الخلايا الطلائية النامية .

٣ - حصوات بولية Urolithiosis - Urinary calculi .

توزيعه ومصادره Distributon and Sources

١ - وجوده Occurance :

أ - في المصادر النباتية Plants : - يوجد في صورة بادئات فيتامين أ

provitamins أى على صورة كاروتينيدات corotenoids . ومن أهم مصادره في الفواكه المشمش والشمام yellow melons والخوخ والبرقوق . أما في الخضروات فيوجد في نفس الصورة أيضاً في الجزر carrots والخس والكرفس والتفاح والبقونس والقرع والسبانخ والبطاطا الصفراء . ويوجد في النمل nuts خصوصاً في البندق وفي بعض النمل الأخرى بكميات بسيطة .

ب - في المصادر الحيوانية Animals : يوجد فيتامين أ في كل الفقاريات

vertebrates ، والكاروتينيدات توجد في بعض اللافقاريات (القشريات مثل

الجمبرى) خصوصاً فيتامين أ_٢ . كما توجد في Fresh - water fish .

مكان وجوده فى الحيوان Location : - فى الكبد liver ، والقلب heart ، والرئة lungs ، والدهون fats ، و adrenals . الشبكية retina ، والكلى kidney ، واللبن milk ، وبلازما الدم blood plasma ، وفى البيض eggs .

ويوجد الفيتامين فى المصادر الحيوانية على شكله الأصيل فى صورة إستيرية كما فى زيت كبد الحوت cod liver oil .

وتوجد الكاروتينيدات فى عديد من الحيوانات على حسب نوع غذائها (كما فى لبن ودهن البقر) . وبالنسبة لكاروتينيدات بيض الدجاج hen's egg فهى أساساً Xanthophyll . وهو مشابه غير نشط حيويًا .

د - فى الكائنات الحية الدقيقة M.O. : - توجد الكاروتينات فى الطحالب algae ، وفى الفطريات fungi ، وفى البكتريا bacteria ، وهى تقوم بتخليقها . أما البكتريا المعوية فلا يمكنها تخليق فيتامين أ .

٢ - المصادر الغذائية Dietary Sources :-

أ - المصادر العالية High : من ١٠٠٠٠ إلى ٦٧٠٠٠ وحدة دولية IU لكل ١٠٠ جم وهى تشمل ما يلى :-

١- كبد (بقر beef ، خنزير pig ، خراف sheep ، عجل calf ، دجاج chicken) .

٢- زيت كبد liver oil (حوت cod ، سالمون salmon ، قرش shark وفى sperm whale) .

٣ - جزر ونعناع وبقدونس وسبانخ وزيت النخيل palm oil .

ب - المصادر المتوسطة Medium : من ١٠٠٠٠ إلى ١٠٠٠ وحدة دولية IU لكل ١٠٠ جم وهى تشمل ما يلى :-

١- زبد butter ، جبن cheese ، صفار بيض egg yolk ، مارجرين margarine ، لبن جاف dried milk ، كريمة cream ، white fish ، ell ، (نوع من السمك) .

٢ - الكلاوى kidneys (بقر ، خنزير ، غنم) وإحم الخنزير pork .

٣ - فواكة : - مانجو . بطيخ أصفر . خوخ ، مشمش .

٤ - خضروات : - مانجو ، شمام ، بطاطا ، طماطم ، كرنب kale ، خس أفرنجى ، الكرات leek ، شكوريا chicory .

د - المصادر القليلة (المنخفضة) Low :- من ١٠٠ إلى ١٠٠٠ وحدة دولية

IU لكل ١٠٠ جم وهى تشمل مايلى :-

١- لبن milk

٢ - اسماك : - رنجة harring ، سالمون salmon ، السبوط carp سردين sardines ، المحار oyster .

٣ - فواكه : - أعناب grapes ، موز bananas ، التوت berry بأنواعه (أسود - أزرق إلخ) ، برتقال ، تفاح ، راوند rhubarb (عشب) ، زيتون ، اليوسفى tangerine ، عنب أحمر red currants .

٤ - خضر : - قرع صيفى summer squash ، اسبارجس asparagus ، بقوليات beans (ماعدا الفاصوليا) ، كرنب ملفوف cabbage ، حمص peas ، ذرة corn ، بامية ، فول سودانى peanuts ، pea pecans جوز أسود black walnuts ، بندق hazelnuts .

الدور الغذائى والطبى Medical and Nutritional Role

١) وحدات فيتامين أ Units :-

كان ومايزال حتى اليوم يعبر عن نشاط فيتامين أ بالوحدات الدولية ، ولكن منذ سنة ١٩٦٧ عبر عن القيمة البيولوجية لنشاط مستحضرات فيتامين أ النشطة خصوصاً فى الأغذية عبر عنها بمكافئات الريتينول retinol equivalents (µg) ، فواحد ميكروجرام بيتاكاروتين فى الغذاء يكافىء ١٦٧ ، ٠ ميكروجرام ريتينول ، وواحد ميكروجرام من البروفيتامين أ الأخرى تكافىء ٠,٠٨٤ ميكروجرام ريتينول ، وعلى ذلك فمكافئات الريتينول الكليه تحسب من المعادلة التالية :

Retinol equivalents (μg) =

$$(\text{Retinol} \times 1.000) + (\beta\text{-Carotene} \times 0.167) + (\text{Other Provitamin A} \times 0.084) .$$

ويمكن تطبيق التحويلات التالية :-

1 Retinol equivalent = 1 μg Retinol

= 6 μg β -Carotene

= 12 μg other provit . A carotenoids

= 3.33 IU Retinol

1 IU Vit . A = 0.344 μg Retinyl acetate

= 0.3 μg Retinol

= 0.535 μg Retinyl palmitate

مع مراعاة أن الريتينول في هذه الحالات كلها all - trans . والتقييم السابق للكاروتينات يعتمد على الخبرة experience في إن هذه البروفيتامينات في الأغذية المختلفة تمتص بدرجات فاعلية مختلفة ولا تتحول بالكامل إلى فيتامين أ .

ومما هو جدير بالذكر إن المعادلة الأولى أستنتجت من حقيقة النشاط الحيوى للبيتاكاروتين ، فهو له ١/٦ النشاط الحيوى للريتينول . أما الالفكاروتين والكريتوزانثين فلهما ١/١٢ من النشاط الحيوى للريتينول . وجنول (١٧) يوضح الوحدات الدولية ومكافئات الريتينول للإنسان .

International Units (IU) and Retinol Equivalents for Humans

Compound	$\mu\text{g}/\text{IU}$	IU/g	Retinol equivalents/ μg
All-trans retinol	0.300	3.33×10^6	1.000
All-trans retinyl acetate	0.344	2.91×10^6	-
All-trans retinyl palmitate	0.549	1.82×10^6	-
All-trans β -carotene	1.6^a	0.56×10^6	0.167
Mixed carotenoids	3.6	0.28×10^6	0.083

جنول (١٧) الوحدات الدولية (IU) ومكافئات الريتينول

٢ (مستويات الدم الطبيعي Normal Blood Levels : -

من ١٠٠ - ٣٠٠ وحدة دولية / ١٠٠ مل سيرم .

٣ (الكميات الموصى بها فى الغذاء Recommended Allowance :-

للأطفال Children : - ٢٠٠٠ - ٣٥٠٠ وحدة دولية / يوم .

للبالغين Adults : - ٥٠٠٠ وحدة دولية / يوم .

الحالات الخاصة :-

الحامل Pregnancy : - ٦٠٠٠ وحدة دولية / يوم .

الرضاعة Lactation : - ٨٠٠٠ وحدة دولية / يوم .

٤ (كيفية تناوله او الأعطاء Administration : -

الطريقة المفضلة لاعطاء فيتامين أ هى عن طريق الفم Oral . ولم يجرب الطريق

الموضعى topical ، ولا يعطى عن طريق الحقن injection .

٥ (تأثيرات الجرعة العالية Effect of overdose : -

عند تناول جرعات عالية من الفيتامين يحدث بعض أو كل الأعراض التالية :

١ - ١٠٠٠٠٠ وحدة دولية / يوم عادة ما تكون سامه toxic للإنسان .

٢ - حساسية مفرطة irritability وأضرار عصبية Nerve lesions .

٣ - Exophthalmia .

٤ - تكوين خلايا ميكوزية mucosa cells ذات جدر متكرتنة keratinized .

٥ - تعب fatigue ، وأرق insomnia وآلم فى العظام والمفاصل painful bones and joints .

٦ - نمو عظام غير طبيعى abnormal bone growth .

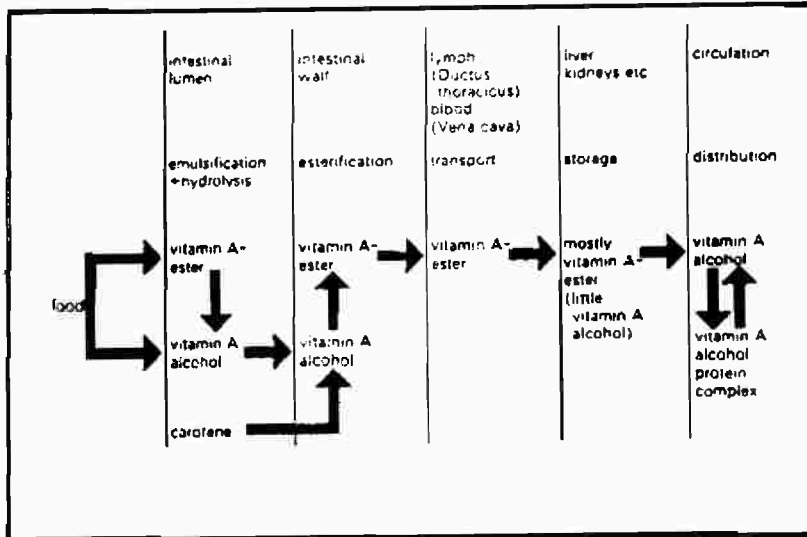
٧ - فقد الشعر loss of hair ، و يرقان jaundice ، وحك فى الجلد itchy skin .

٨ - قصر الوقت اللازم للتجلط decreased clotting time .

٩ - ارتفاع نشاط أنزيم الفوسفاتير elevated serum alkaline phosphatase

التمثيل الغذائي لفيتامين أ :-

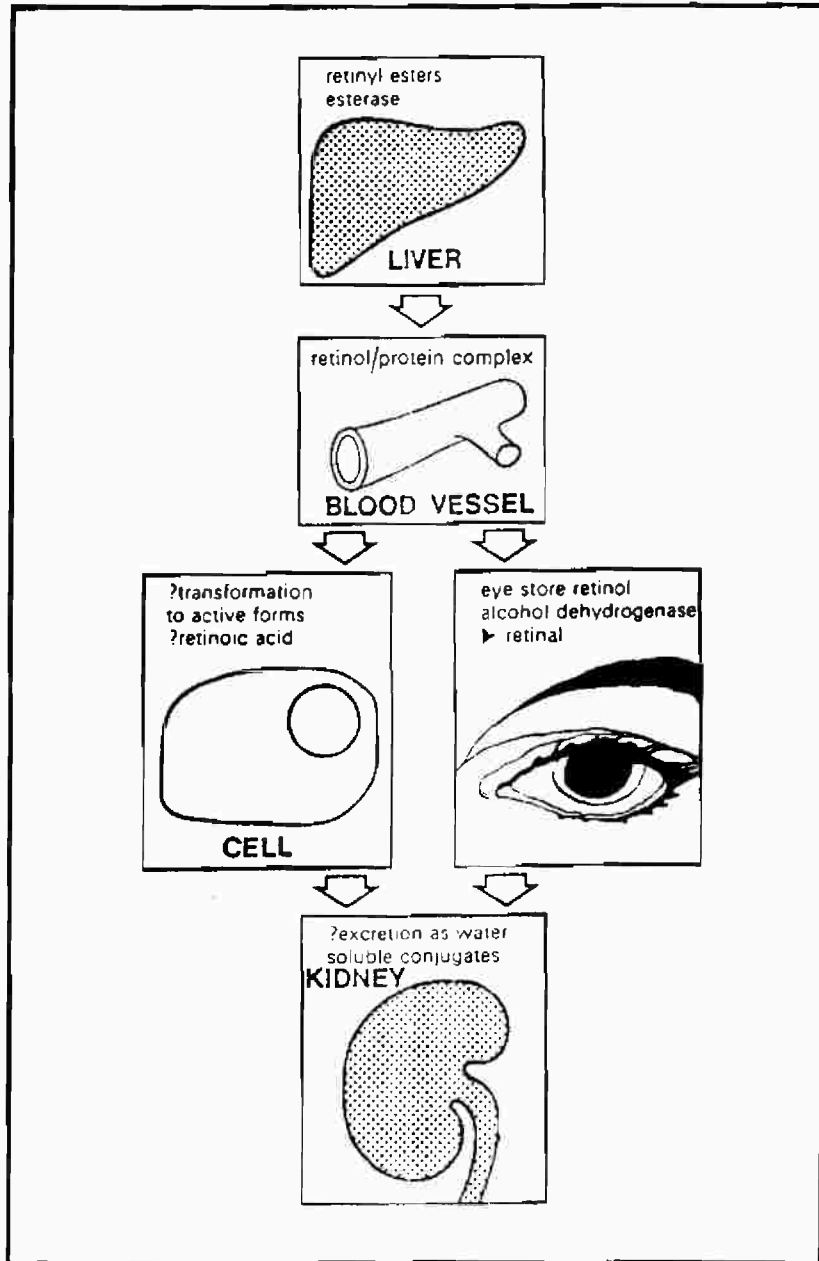
يبدأ التمثيل الغذائي لفيتامين أ في الجهاز العصبي ، فعندما يتناول الإنسان فيتامين أ أو استراته أو بادئاته مع الغذاء ، يتم أولاً تحويلها إلى مستحلبات دهنية في داخل تجويف القناة المعوية حتى يسهل تحليلها مائياً وأمتصاصها . أسترات فيتامين أ تتحلل مائياً إلى فيتامين أ حر يمتص بواسطة خلايا ميكوزا الأمعاء الدقيقة ، كما على جدرانها أيضاً يحدث تحول الكاوتينات إلى فيتامين أ . وبعد ذلك يؤسّر فيتامين أ لينتقل إلى الكبد عن طريق الجهاز الليمفاوي والأوعية الدموية . ويخزن فيتامين أ في الكبد والكلى وغيرها من الأنسجة في صورة أستر وقليل منه في صورة كحولية ، ومن الكبد يتم توزيعه إلى أعضاء الجسم المختلفة . وشكل (١٨) يوضح امتصاص وتخزين ونقل فيتامين أ في الجسم . والجانب الآخر من التمثيل الغذائي ، هو الاستفادة منه في الخلايا وتكسيده وهدمه ، ففي الكبد تبدأ هذه الرحلة حيث تتحلل استرات الريتينيل بفعل أنزيمات الأستيريز esterases إلى ريتينول حر والذي يرتبط مع بروتين خاص وينتقل إلى الخلايا الهدف (الخلايا التي تحتاج إليه) ومنها خلايا العين ، حيث يتحول بفعل أنزيمات الـ dehydrogenase إلى ريتينال retinal ، أما في الخلايا الأخرى فيتحول إلى حمض ريتينويك retinoic acid . وبعد أن يقوم بدوره ، يتحول إلى صورة



Schematic representation of absorption, storage and transport of vitamin A.

شكل (١٨) صورة تمثيلية لامتناس وتخزين ونقل فيتامين أ

مرتبطة conjugates ذائبة فى الماء ويفرز مع البول عن طريق الكلية . وشكل (١٩) يلخص التمثيل الغذائى لفيتامين أ بعد إنطلاقه من الكبد .

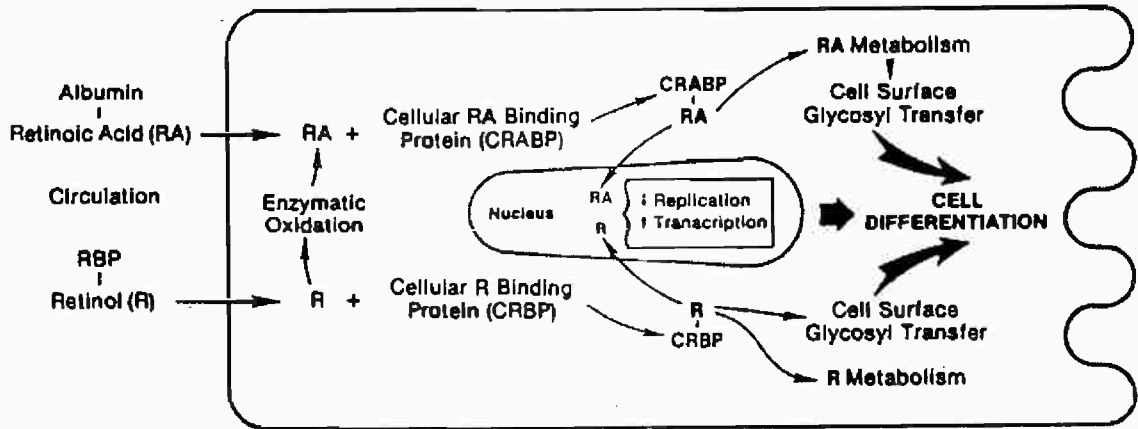


Metabolism of vitamin A after release from the liver.

شكل (١٩) ملخص للتمثيل الغذائى لفيتامين أ بعد انطلاقه من الكبد

أما في الخلايا الطلائية فإنه يلعب دوراً رئيسياً في تمييزها differentiation ، فبعد أن ينتقل حمض الريتينويك (RA) المحمول مع الألبومين إلى سطح الخلايا الطلائية فإنه يدخل فيها ويرتبط مع بروتين خاص يسمى Cellular Retinoic Acid Binding Protein (CRABP) ، أما الريتينول (R) فينتقل أيضاً إلى الخلايا الطلائية خلال بروتين خاص يسمى Retinol Binding Protein (RBP) وداخل الخلية يرتبط مع بروتين آخر ولكنه خلوي Cellular Retinol Binding Protein أو يتحول إلى RA . وكل من R و RA يدخلان النواة ويؤثرا على عمليتي النسخ replication والترجمة transcription وتلك بدورها تقوم بعملية تمييز الخلية . وشكل (٢٠) يلخص الميكانيكية المحتملة لفعل فيتامين أ في الخلايا الطلائية .

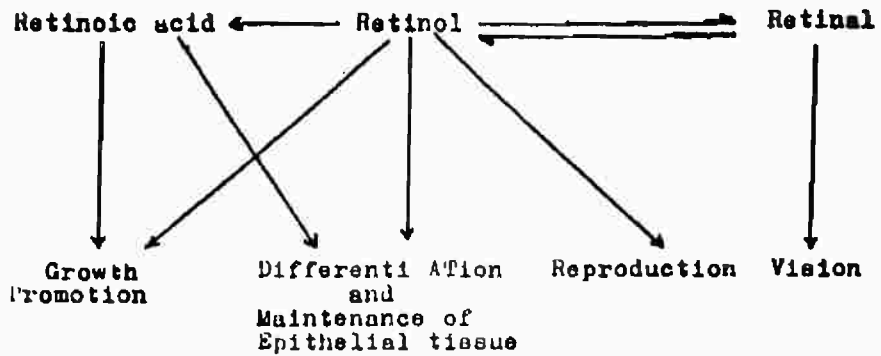
Proposed mechanism of action of Vitamin A on an epithelial cell



شكل (٢٠) الميكانيكية المقترحة لفعل فيتامين أ في الخلايا الطلائية .

ومما هو جدير بالذكر أن الصور المختلفة للريتينول على صلة ببعضها ، ومن خلال هذه الصور يكون الفعل البيولوجي لفيتامين أ . فيتحول الريتينول إلى RA (غير عكسي) وهذا يلعب دوراً هاماً في نمو الإنسان والحيوان growth promotion ، وفي تمييز الأنسجة الطلائية والعناية بها . والريتينول نفسه يشارك بدوره في هذه العمليات ويضاف إليها أنه لازم لعملية التكاثر reproduction . والريتينول يتحول أيضاً إلى ريتينال (في العين) وهذا بدوره يلزم للرؤية vision . وشكل (٢١) يلخص الفعل البيولوجي لفيتامين أ .

The biological action of vitamin A



شكل (٢١) الفعل البيولوجي لفيتامين أ

تحليل فيتامين أ

أثناء استخلاص فيتامين أ ، لابد أن تأخذ عديد من الاحتياطات precaution حتى لا يفقد بعض منه ، فلا بد من تلافي avoid ضوء الشمس sunlight المباشر والظروف الحامضية . وأثناء التحليل المائى القلوى لابد من وجود مواد مانعة للأكسدة antioxidants . ولابد أيضاً من استعمال المحاليل القياسية للريتينول أو أسترته بسرعة قدر الامكان بعد تحضيرها . وعند تخزين الريتينول المتبلور crystalline أو مشتقاته لابد من تخزينها تحت غاز النيتروجين أو تحت تفريغ vacuum.

أ - الأستخلاص Extraction :

الطريقة المتبعة أساساً لاستخلاص فيتامين أ من الأطعمة هي التصبن saponification المتبوع بأستخلاص المواد الغير متصبنة unsaponifiable matter (unsap.) بمذيب مناسب . وعادة ما تسخن العينة الغذائية فى وجود مكثف عاكس مع أيروكسيد بوتاسيوم كحولى ethanolic KOH لمدة ٢٠ - ٣٠ ق فى وجود مادة مانعة للأكسدة مثل حمض الأسكوربيك أو تحت نيتروجين . ويمكن استخلاص المواد الغير متصبنة بعديد من المذيبات العضوية مثل diethyl ether, hexane, cyclohexane . وحتى يكون الاستخلاص فعال efficient ، يجب أن يحتوى طور الايثانول المائى aqueous ethanolic phase على أقل من ٤٠٪ ماء ، وهذا يرجع لأن الريتينول يذوب نسبياً فى مخاليط الايثانول ٨٠٪ - ٢٠٪ الماء . وقد دلت التقارير الحديثة على أنه لو استعمل dimethylsulphoxide

كمذيب للتصين فإنه يمكن تقليل درجة حرارة وزمن التصين وهذا بدوره يقلل احتمالية فقد فيتامين أ بالأكسدة oxidation . وفى هذه الطريقة يتم عمل reflex (تسخين فى وجود مكثف عاكس) للعينة بمخلوط من dimethylsulphoxide و ٢٠ ٪ أيدروكسيد صوديوم مائى تحت غاز النتروجين لمدة ١٥ ق ، ثم يضاف بعد ذلك الماء وتستخلص المواد الغير متصبة كما هو متبع سابقاً . أثناء عملية التصين تتحول أسترات الريتينيل retinyl ester إلى ريتينول .

ولو كان محتوى الاسترات فى الطعام كبير ويلزم له استخلاص أكثر فلا بد من استعمال المذيب مباشرة على العينة الغذائية . وفى طريقة استخلاص فيتامين أ من الكبد يستعمل مخلوط من الأسيتون acetone و light petroleum (إيثيريترولى) بنسبة ١ : ١ يحتوى على ألفا - توكوفيرول كمادة مانعة للأكسدة . ويتم تجهيز الكبد بالطحن grinding مع سيليكاجيل Silica gel و التى تساعد على كل من الطحن ونزع الماء dehydrating agent . وقد بينت تجارب الاسترجاع recovery experiments أن السيليكاجيل لم تحتفظ بأى نشاط لفيتامين أ بالادمصاص adsorption . فطحن العينات مع السيليكاجيل قد أستخدم لاستخلاص الفيتامين من المواد النباتية ، وأنه من الممكن استخدام هذا التكنيك للأطعمة الجافة dry والنصف رطبه semi- moist الأخرى .

ب - الفصل والقياس Separation and Measurment :

ويضم هذا الجزء خمس طرق (تكنيكات) طبيعية كيميائية Physico - chemical لقياس فيتامين أ ، وفيها لابد من اجراء فصل كروماتوجرافى أولى حتى يتسنى قياس الريتينول ومشتقاته قدر الامكان .

١ - القياس اللونى Colorimetry :

يتكون لون أزرق كثيف intense blue ($\lambda_{max} 610 \text{ nm}$) عندما يتفاعل الريتينول مع حمض لويس Lewis acid ، ومازالت تستخدم كطريقة شائعة ومألوفة لتقدير الريتينول ، فمئذ اكتشف التفاعل اللونى لفيتامين أ مع ثالث كلوريد الأنتيمون فى الكلوروفورم $\text{antimony trichloride (SbCl}_3\text{)}$ فى سنة ١٩٢٦ مازال يستخدم بكثرة كحامض لويس . وفى مقارنة حديثة لثلاث جواهر لحمض لويس وهم SbCl_3 ، وثلاثى فلورو حمض الخليك trifluoroacetic acid (TFA) ، وثلاثى كلورو حمض الخليك trichloroacetic acid (TCA) فى مذيبات كلورونية متنوعة chlorinated solvents ، دلت هذه المقارنة على أن

TFA فى dichloromethane هو الأفضل والذي يوصى باستعماله عن الجواهر المختبرة الأخرى . وهناك عائق أو عيب للتفاعل اللوني السابق وهو طبيعة اللون الأزرق المتكون والذي يزول بسرعة ، لذلك فلا بد وأن يجرى قياس اللون خلال ١٠ - ٢٠ ثانية من إضافة حمض لويس . وهذا يؤدي بدوره الى الافتقار للدقة ، هذا بالإضافة إلى الطبيعة السامة toxic والكاوية والحارقة corrosive لهذه الجواهر .

وترتبط الصعوبات فى هذه الطرق بقياس اللون الأزرق سريع الزوال ، ويمكن التغلب عليها باستعمال activated 1,3-dichloro 2- propanol (dichlorohydrin) كجواهر تلوين color reagent . وهذا الجوهر يعطى لون وردى خفيف pink color يقاس على λ_{max} 555 nm والذي يكون ثابت لمدة ٢ - ١٠ ق . ولكن التفاعل غير شائع استعماله لأن الصعوبات ترتبط بتنشيط جوهر dichlorohydrin . وبالرغم من اللون الأزرق المتكون مع $SbCl_3$ ومع غيره يزول بسرعة إلا أنه ذو ميزة حسنة لأنه أكثر كثافة more intense عن اللون الوردى الناتج بواسطة 1,3- dichloro 2- propanol وأيضاً أكثر حساسية more sensitive بحوالى مرتين ونصف عن القياس الطيفى فى الـ UV فى التقدير الكمي للريتينول . وتستخدم أحماض لويس لتقدير الريتينول كمياً وهى أيضاً تكون نواتج ملونة مع الكاروتينيدات والأستيرويدات sterols والمركبات التى على صلة بها (المشابهة لها) related compounds مثل فيتامين د . وعلى ذلك فلا بد من التخلص من هذه المركبات قبل تقدير الريتينول لمنع التداخل عند التقدير .

ما زال يستعمل كروماتوجرافى الأدمصاص adsorption chromatography بكثرة لتنقية purification المستخلصات قبل القياس اللوني . وعادة ما تستعمل الألومينا المتعادلة neutral alumina الغير منشطة بالماء H_2O deactivated with (٢ - ١٠ ٪ ماء) . والطريقة الرسمية (AOAC) لتقديره فى الأغذية توصى باستخدام ألومينا متعادلة غير نشطة بماء ٥ ٪ ، ويتم الأحلال elution بـ ١٥ ٪ أسيتون فى هكسان . والطريقة الخاصة بالمارجرين margarine تستعمل عمود سنوتش sandwich column لألومينا متعادلة وقلوية غير نشطة بماء ٢ ٪ . ويمكن تتبع تحرك الريتينول ومشتقاته على الأعمدة الكروماتوجرافية بملاحظة فلورنتها fluorescence باستعمال لمبة UV ذات قوة ضعيفة low power UV lamp . فلو طلب تقدير تركيز أسترآت الريتينيل والمشتقات الأخرى منفردة ، فانه يجب فصلها قبل القياس

اللونى حيث أن الريتينول ومشتقاته كلها تتفاعل بنفس الطريقة مع أحماض لويس . ويمكن استعمال ورق مشرب ب كربونات زنك Zinc carbonate - impregnated paper مع أسيتون : أثير بترولى بنسبة ١ : ٩٩ يحتوى على ألفا - توكوفيرول كمادة مانعة للأكسدة لفصل أسترات الريتينيل عن الريتينول فى مستخلصات الكبد . ويمكن استعمال أعمدة حمض السيليسيك Silicic acid لفصل الريتينول عن مشتقاته ، وأيضاً لفصل عديد من المشابهات الهندسية geometric isomers للريتينول . والعائق الرئيسى عند استعمال كروماتوجرافى الإدمصاص لفصل الريتينول ومشتقاته هو انخفاض كمية الفيتامين المتحصل عليها حيث يسترد بكميات ضئيلة ، لكن يكون الفقد أقل ما يمكن لو أستعملت مضادات أكسدة فى المذيبات المحلة eluting solvents ، وأيضاً إذا كان الوقت المستخدم لفصل الريتينول فى الأعمدة أقل ما يمكن قدر الإمكان .

ويسمى تفاعل كلوريد الانتيمون فى الكلورفورم (فى ظروف خالية من الرطوبة نهائياً) بتفاعل كار- بريس Carr-price reation . وقد لوحظ أن هذا الجوهر من أحسن الأملاح فى ذلك وهذا لمميزات معينة .

مميزات التفاعل اللونى مع أحماض لويس هى :-

١ - اللون الأزرق الناتج من التفاعل ليس حاداً (لون فاتح) وهذا يسهل التقدير ، حيث أن كثافة اللون تتناسب طردياً مع التركيز .

٢ - يمكن التخلص من أى رطوبة فى الوسط بإضافة أندريد حمض خليك .

ولكن من أهم عيوب التفاعل اللونى مع أحماض لويس هى :-

١ - لابد أن يكون حمض لويس المستخدم نقياً تماماً pure وجافاً تماماً dry ، حيث أنه إذا وجدت أى آثار للرطوبة لم يتم التخلص منها تعطى راسب أبيض من تفاعل $SbCl_3$ مع الماء (لذلك يضاف أندريد خليك) . كما يجب استعمال كل الأدوات والمذيبات خالية من الرطوبة وجافة تماماً .

٢ - اللون الناتج من التفاعل سرعان ما يزول ويلزم له وقت قصير لقياسه بمجرد خلط المحاليل مع بعضها .

٣ - صعوبة غسيل الأدوات بعد التقدير لتكون راسب بيضاء فى الأدوات المستعملة من

تفاعل $SbCl_3$ مع الماء ، ويمكن التغلب عليها بالغسيل بحمض HCl مركز .

٤ - بعض المركبات عديدة الروابط الزوجية polyenes مثل الكاروتينيدات تتفاعل أيضاً ، مع أن معدل ظهور وطبيعة الناتج الملون مختلفين .

٥ - بعض المركبات الموجود في البلازما والتي تتكون أثناء تخزينها في حالة مثلجة (مجمدة بالبرودة) frozen تعطي نتيجة موجبة مع أحماض لويس ، لذلك فإن عينات البلازما المخزنة بهذه الطريقة غالباً ماتعطي قراءات أكبر من الواقع .

٢ - القياس الطيفي في منطقة الأشعة فوق البنفسجية :

وهذه طريقة بسيطة simple لقياس فيتامين أ ، ولكن لها مشكلة (عائق) واحدة رئيسية وهي إن الريتينول ومشتقاته تمتص absorb على موجات ضوئية قريبة من ٣٢٥ nm وهي منطقة من الطيف كثير من المركبات الأخرى تمتص عندها أيضاً . وفي السنوات الأخيرة حدثت تطورات هامة في الفصل الكروماتوجرافي للريتينول عن المواد المتداخلة جعلت استعمال القياس الطيفي في الـ UV لتقدير الريتينول ومشتقاته طريقة سهلة وميسرة ورخيصة ودقيقة وكثيرة الاستعمال .

النظام النافع جداً في تنقية المستخلصات قبل التقدير الكمي للريتينول بالقياس الطيفي في الـ UV هو الاستفادة من التوزيع partition بين الطور الثابت (الساكن) stationary phase (٩٠٪ إيثانول : ١٠٪ ماء) وبين 2,2,4- trimethylpentane كطور متحرك mobile phase ، حيث يُحمل support الطور الثابت على نوع معين من السيفادكس وهو Sephadex LH-20 .

وقد طبق التوزيع بنجاح على أعمدة سيفادكس LH-20 (٢٥ سم × ٢) سم لتقدير الريتينول كميّاً في مدى واسع من الأغذية المختلفة ، ولو أنه وجد إن مستخلصات فضلات الذبيحة offal والسّمك الدهني fatty fish تتطلب فصل اضافي قبل تقدير الريتينول بالامتصاص في الـ UV لهذين النوعين من الأغذية . الأجزاء المحتوية على الريتينول في أعمدة التوزيع يتم تنقيتها مرة أخرى اضافية على عمود (١٥ سم) من Calcium hydrogen phosphate ويتم احلال elute الريتينول بإيثير ١٠٪ في هكسان . وتستخدم أعمدة Calcium hydrogen phosphate أصلاً لتقدير فيتامين هـ .

استخدم أيضاً كروماتوجرافى الجيل gel chromatography على - Sephadex LH 20 فى فصل الريتينول من المارجرين وكبد الخنزير . وقد أستعملت الأبعاد ٦٠سم × ٢,٥ سم لهذه الأعمدة مع الكلوروفورم كعامل مُحل eluting agent . ويمكن لهذا النظام فصل الريتينول عن بالميتات الريتينيل retinyl palmitate أوخلات الريتينيل ، ولكن لا يمكن لهذا النظام فصل بالميتات الريتينيل عن خلات الريتينيل . ولو بدل مذيب الإحلال بمخلوط مكون من كلوروفورم : إيثير بترولى : ميثانول = ٦٥ : ٢٥ : ١ يمكن فصل الريتينول عن الريتينال retinal وحمض الريتينويك retinoic acid . وأعمدة (٥٥سم × ١,١ سم) من - Hydroxy alkoxy propyl sephadex (متاح تحت أسم Lipidex) مع نظام مذيب إيثير بترولى : أسيتون = ٩٢ : ٨ يمكنها فصل بالميتات الريتينيل عن خلات الريتينيل .

٣ - القياس الطيفى بالفلورة Fluorescence Spectrophotometry :

فلورة الريتينول تكون قوية جداً على طول موجة ٤٨٠ nm مع حث excitation على طول موجة ٢٢٠ - ٣٦٠ nm . وقياسات الفلورة هذه تعتبر طريقة نافعة جداً لتقدير الريتينول كميأ ، لكن أخيراً بينت نتائج بعض الدراسات أن الـ Phytofluene كان المصدر الرئيسى للتداخل بين المشتقات . وميزة القياس بالفلورة fluorimetry هى أن تقدير الريتينول لا يتأثر بأى مركب مثل الاستيرولات sterols ، وفيتامين د ، ومستويات منخفضة من الكاروتينيدات ، حيث أن هذه المواد تتداخل بدرجة كبيرة مع التقديرات بالقياس اللونى وكذلك بالـ UV . وفلورة الريتينول تعطى علاقة خطية linear function مع التركيز حتى أن الامتصاص ذاته يصبح معنوياً عند تركيزات تبلغ ٠,٢٥ µg لكل مل . وهناك طرق سريعة لتقدير الريتينول فى اللبن ومنتجاته dairy products ، وهذه الطرق تتضمن تصبن واستخلاص ولا تتضمن كروماتوجرافى . كما بينت الدراسات أن الفلورة بالـ UV ترجع كلية إلى الريتينول ولكن قد يحدث تداخل غير معنوى من Phytofluene لذا يلزم لهذه الطريقة بعض التعديل نتييجة لتداخل هذا المركب .

وبالنسبة للأغذية التى تحتوى على كميات كبيرة من الكاروتينيدات لابد من تنقيتها كروماتوجرافياً قبل استعمالها فى القياس بالفلورة .

ولابد أن تكون المذيبات المستعملة ذات نقاوة عالية high purity ، كما يجب تجنب تعرض الريتينول القياسى للأشعة فوق البنفسجية UV لأن تشعيعه سوف يؤدى إلى تكوين

مشتقات A. Vit - fluorescent retro والتي قد تتداخل مع التقدير . ويتوافر حالياً كواشف فلورية fluorescence detectors لأنظمة الـ HPLC حتى يتسنى تقدير الريتينول في الغذاء بطريقة سريعة وحساسة .

٤ - الكروماتوجرافى الغازى (GC) Gas Chromatography :

يتكسر الريتينول وأستراته على درجات الحرارة اللازمة لتطايرة فى الكروماتوجرافى الغازى ، ولكن أثيرات الريتينول ثابتة ، وعلى ذلك يمكن تقدير الريتينول كمياً بالكروماتوجرافى الغازى لو تحول الريتينول الى اثيرات ثلاثى ميثايل السيليل trimethyl silyl ethers . ويمكن استعمال N, O- Bis - (trimethylsilyl) - acetamide لتكوين هذه الاثيرات حيث يتم التفاعل خلال دقائق قليلة وعلى درجة حرارة الغرفة . كما تستخدم أعمدة الكروماتوجرافى المحتوية على طور ثابت مناسب ، وعادة ما يتم الفصل على ١٧٠ - ١٧٥ °م وهذه الأعمدة يمكنها فصل مشابهاة الريتينول عن بعضها البعض . أما صعوبة التقدير الكروماتوجرافى الغازى ، حتى تعطى نتائج موثوق فيها ، هى سبق تهيئته preconditioning تعبئة العمود . والطريق البديل لذلك هو إجراء هدرجة الريتينول hydrogenate retinol وأستراته إلى كحول مشبع وأسترات ، وتلك ثابتة حرارياً thermally stable وعليه يمكن فصلها بالكروماتوجرافى الغازى . هذا وقد أستخدم تكنيك الـ GC بنجاح فى تحليل الريتينول فى المستحضرات الصيدلانية Pharmaceutical preparations .

٥ - الكروماتوجرافى السائل تحت ضغط عالى HPLC :

استخدام هذا التكنيك أيضاً فى تقدير فيتامين أ فى الأغذية على نطاق واسع وأكثر من أى فيتامين آخر . وهذا التكنيك أستخدم فى الفصل والتقدير السريعين للريتينول ومشابهاة وأستراته ومشتقاته الأخرى .

أمكن فصل الريتينول عن خلاصة الريتينول عن فيتامين « هـ » و فيتامين « د » بهذا التكنيك بأعمده خاصة بمساهمته مذيب مناسب (ميثانول - ماء متدرج) ، حيث طبق هذا التكنيك على أنواع مختلفة من الأغذية (مارجرين، أغذية أطفال.... الخ)، والخطوة الأولى هى إجراء عملية التصبين للعينة ثم أستخلاص من المواد الغير متصبه بالهكسان ويحقن المستخلص مباشرة فى جهاز الـ HPLC ، ويتم الكشف عن الريتينول بقياس الامتصاص على طول موجه ٢٥٤ nm ، حيث يزود الجهاز بكواشف خاصة فى منطقة الـ UV ذات مرشحات filters

٢٥٤ nm وتلك قادرة على كشف detect أقل من ١٠ ng ريتينول .

ولو تضمن جهاز الـ HPLC عمود gel permeation (ترشيح خلال الجيل) فإنه يمكن فصل الريتينول من زيت كبد الحوت مباشرة بدون تصين أو استخلاص . فهذا العمود يمكنه إزالة الجلسريدات الثلاثية من العينة ويخرج منه الريتينول (elute) بمذيب عالي القطبية (٩٢٪ ميثانول و ٨٪ ماء) حيث يضاف للعمود الـ HPLC الأصلي .

وقد أمكن استخدام أعمدة ألومينا غير منشطة بماء (٥٪) لتقدير الريتينول في الأغذية ، فقد حقن في الجهاز متسخلص الهكسان للمواد الغير متصينة وتمت عملية الإحلال بميثانول ٣٪ في بنزين ، وكشف عنه بقياس فلورته . وزودت هذه الأجهزة بجهاز قياس الفلورة fluorimetry ، كما أمكن فصل المشابهات الهندسية geometric لخلات الريتينول باستعمال أعمدة silica (5µm) microparticulate أو أعمدة silica (30 µm) Pellicular . ويجب على الباحث المحلل للريتينول الحذر من حدوث تكسير decomposition أو تغييره إلى مشابه آخر isomerisation أثناء التحليل .

ح - الطرق الحيوية Bioassay Procedures :-

للاختبارات الحيوية أهمية نفع كبيرة ولا يمكن استبدالها بالطرق الكيميائية أو الطبيعية المتخصصة . ويمكن تقييم الاستجابة الفسيولوجية بإعطاء الـ provitamins أو مخلوط منها أو فيتامين أ نفسه فقط بالطرق الحيوية . ومن أهم معيزات الطرق الحيوية ، هو اعتمادها على كل التغيرات الحيوية المختلفة للفيتامين من حيث الامتصاص absorption والتمثيل الغذائي metabolism والتخزين storage وما تأخذه الأنسجة uptake والنقل transport ، وعليه فهي تعطي صورة كاملة وواضحة للفيتامين أو مشتقاته بعلاقة كل هذه العوامل مجتمعة مع بعضها .

معظم الطرق الحيوية الشائعة المستخدمة في فيتامين أ كلاسيكية وتتضمن اختبارات استجابة النمو growth - response في فئران تعاني من نقص فيتامين أ (Vit . A-deficient rats) ، وتقدير مدى تخزينه في الكبد liver storage assay في الفئران والدجاج ، وتكنيك vaginal smear .

وفي التقدير الوزني للفئران الكلاسيكي ، تتبع الخطوات السابق اشارة إليها في الطرق الحيوية ، وتسجل فيها الاستجابة في الوزن بالجرامات كل أسبوع (الزيادة في الوزن) ،

وترسم العلاقة البيانية مع لوغاريتم الجرعة المعطاه log of the dose لفيتامين أ all-trans retinyl acetate (المنحنى القياسى) . وبمقارنة نتائج مجموعة ال unknown بالمنحنى القياسى يمكن إيجاد تركيز الفيتامين فيها .

وحيث أن عامل الاستجابة المستخدم فى هذه التجارب (النمو) غير متخصص ، لذا أستخدمت حديثاً أنظمة زراعة الأعضاء والخلايا organ and cell culture فى قياس النشاط الحيوى لفيتامين أ . وفى هذه الطرق يتم تنمية الخلايا الطلائية للقصبه الهوائية tracheal epithelium المأخوذة من حيوانات تعاني من نقص فيتامين أ أو التى تميل الى التكرتن keratinization . كما تؤخذ خلايا طلائية من جلد فأر حديث الولادة newborn mouse skine يعانى من نفس الحالة ، وتنمى هذه الخلايا فى بيئة زراعة أنسجة مناسبة خالية من فيتامين أ Vit . A - free tissue culture media . وعند اضافة مشتقات فيتامين أ المتنوعة إلى البيئة بجرعات متدرجة يمكن تقييم سعتها بعكس عملية التكرتن reverse keratinization (فى حالة زراعة العضو القصبى) أو بزيادة تخليق ال RNA (فى حالة زراعة خلايا بشرة الجلد epidermal cells) ، ويتم ايجاد العلاقة النهائية بين النشاط الحيوى النسبى لمشتقات الفيتامين وكميته . وفى هذه الاختبارات يجب أن تقارن النتائج المتحصل عليها بالطرق الكلاسيكية .

والطرق الحيوية ذات ميزة هامة حيث أنها تعتمد على كل التغيرات الحيوية المختلفة للفيتامين من حيث امتصاصه وتخزينه وتمثيله الغذائى ، ولذلك فإنها تعطى صورة واضحة للفيتامين وعلاقته بهذه العوامل مجتمعة .

كما يمكن استخدام عامل استجابة آخر بتقدير السمية toxicity فى بيئة العضو القصبى باستعمال تركيزات مختلفة لمشتقات فيتامين أ . واستخدم هذا التكنيك فى استعراض تأثير الريتينويدات retinoids ومسابهاها المخلقة على نشاطها الحيوى وسميتها .

وأمكن استخدام عامل استجابة آخر فى التقدير وهو تقدير كبرينات الكوندريتين chondritin sulphate ، حيث وجد أن الفيتامين يقوم بدور معاون أنزيمى coenzyme فى تخليقه . فكلما زاد تركيز الفيتامين زاد معه مقدار تخليقها . وفى هذه الطريقة يستنفذ الفيتامين من الحيوانات ثم تعطى كميات معينة من الفيتامين وعلى مراحل متتابعة ، ثم تؤخذ عينات من المفاصل النامية فى صورة شرائح وتصبغ بصبغات متخصصة للكوندريتين ويلاحظ

مقدار الزيادة فيها بالمقارنة بكمية الفيتامين المضافة (histochemistry) ، وتقارن العينة المراد تقديرها مع المجموعة القياسية . ويعاب على هذه الطريقة صعوبتها مقارنة بالطرق السابقة .

اختبار قياس كفاءة الجسم على استعمال فيتامين أ

The Vit.A tolerance test

تنخفض مستويات فيتامين أ في سيرم الاطفال المصابة بتليف تكيسي في البنكرياس cystic fibrosis of pancreas وفي البالغين adults المصابين بالعجز أو النقص في افراز البنكرياس (النقص البنكرياسي) pancreatic insufficiency حيث تنخفض عن المدى العادي normal بـ ١٥ - ٦٠ µg لكل ١٠٠ مل . وأعطى كميات كبيرة من فيتامين أ في زيت عن طريق الفم oral administration يسبب فقط زيادات بسيطة جداً (تافهة) في محتوى السيرم من فيتامين أ في هذه المرضى نظراً لنقص كفاءة امتصاص الدهون وبالتالي فيتامين أ المصاحب لها . أما الأشخاص السليمة ذات الامتصاص الطبيعي لفيتامين أ من الأمعاء فتتراوح زيادة فيتامين أ في السيرم من ٢٠٠ إلى ٦٠٠ ميكروجرام لكل ١٠٠ مل سيرم عند إعطاء الفيتامين بنفس الطريقة .

الطريقة Technique : -

يتم تصوير الشخص تحت الدراسة وتؤخذ منه عينة دم يفصل منها السيرم ويقدر فيها محتوى فيتامين أ ، ثم يعطى ٥٠٠٠ وحدة / كجم من وزن الجسم من الفيتامين (في زيت) عن طريق الفم . ثم تؤخذ عينات الدم بعد ٢ و ٧ و ٢٤ ساعة ثم يقدر فيها مستوى فيتامين أ . ويمكن إعطاء المرضى ماء للشرب أو يتناولوا وجبة خفيفة أثناء الـ ٦ ساعات الأولى ، أما أثناء الـ ٦ ساعات التالية فيمكن تناول وجبة كاملة full meal ، ثم بعد ذلك يجب أن يصوم حتى آخر زمن التجربة (٢٤ ساعة) ، ثم يوقع ذلك على صورة منحنى قياسى ومنه يمكن معرفة مدى الاستجابة لامتصاص الفيتامين .

تقدير فيتامين أ : -

عند تقدير فيتامين أ كميأ ، يجب أن يؤخذ في الاعتبار نوع المصادر الطبيعية المواد تقدير الفيتامين فيها ونفرق بين محتوى الفيتامين Vit . content وفاعليته potency وعلى الأخص الكميات المتاحة حيويأ وفسيلوجيأ والكاروتينيدات ، حيث أن هناك تباين بينهم في

الفاعلية . علاوة على ذلك فقد يتأثر النشاط الحيوى بكل من : -

١ - محتوى العليقة من الدهن .

٢ - طبيعة هذه الدهون .

٣ - الحالة الطبيعية لحامل الفيتامين Vit. carrier . فمثلا لو كان وسط أنتشار فيتامين أ مائياً aqueous media ، يكون الفيتامين أكثر أمتصاصاً عنه فى الوسط الزيتى oil media .

وبذلك هناك أختلاف بين المحتوى الفيتامينى والنشاط الحيوى الحقيقى للفيتامين .

تفاعل ثالث كلوريد الأنثيمون (كار - بريس) : -

يتم إجراء الاختبار فى أنبويه نظيفة جافة تماماً تحتوى على ٢مل (ml) من محلول ٢٠٪ زيت كبد الحوت فى الكلوروفوم ثم يضاف نقطة من أندريد الخليك ، ثم يضاف بسرعة ٢ مل من محلول مشبع من ثالث كلوريد الأنثيمون فى كلوروفورم . يلاحظ ظهور لون أزرق يمكن قياسه (لاحظ التغير فى اللون ، فسرعان ما يختفى) .

الاختبار اللونى لفيتامين أ (Stroeve and Makarava, 1989) : -

يعتمد الاختبار على التفاعل اللونى للريتينول مع حمض الكبريتيك المركز . فحقيقة هذا الاختبار هى إن حمض الكبريتيك المركز ينزع (يأخذ) ماء من الريتينول ويعطى نواتج ملونة بلون أزرق تتحول بالتدرج إلى لون بنى - أحمر .

الجواهر الكشافة Reagents : -

١- زيت سمك fish oil (غنى بالريتينول)

٢ - كلوروفورم

٣ - حمض كبريتيك مركز .

التكنيك Technique : -

١ - فى أنبوية اختبار نظيفة يوضع نقطتين من زيت سمك وه نقط كلوروفورم ، ثم يضاف نقطة أو اثنتين من حمض الكبريتيك المركز .

٢ - يظهر لون أزرق يتحول بالتدريج الى لون بني محمر .

فصل المشابهات الهندسية لفيتامين أ (Groenendijk et al., 1980)

يمكن فصل الريتينويدات retinoids باستخدام تقنية كروماتوجرافى الامصاص على السيليكا جيل وأكسيد الألومنيوم ، ومع تقنية الـ TLC أمكن فصل المشابهات الهندسية geometric isomers (all - trans , 9- cis , 11 - cis and 13 - cis) لكل من الريتينول واسترات الريتينول والريتينال ألدهيد ، ويجرى الفصل غالباً على السيكاجيل . ويمكن رؤية الـ spots بعد الفصل بتعريض الكروماتوجرام للأشعة فوق البنفسجية حيث تظهر وميض UV- excited fluorescence ، أو برش الكروماتوجرام بجواهر كشافة تعطى لون مع هذه المشابهات . ومن هذه الجواهر ثالث كلوريد الأنثيمون $SbCl_3$ وثلاثى فلورو حمض الخليك TFA وثلاثى كلورو حمض الخليك TCA . وجسول (١٨) يبين الألوان المختلفة للريتينويدات على كروماتوجرام TLC . عند رشها بهذه الجواهر أو بالأشعة فوق البنفسجية .

Colorimetric determination of retinoids on thin-layer chromatograms

Method	Color			
	Retinol	Retinaldehyde	Retinal oxime	Retinyl ester
Antimony trichloride	Blue	Bluegreen	Orange-brown	Blue
Trifluoroacetic acid	Greenish blue	Yellow	Orange	Greenish blue
Trichloroacetic acid	Bluegreen	Brownish	Reddish	Bluegreen
UV fluorescence	Yellow	-	Orange	Yellow

جدول (١٨) الألوان المختلفة للريتينويدات عند رشها بالجواهر المختلفة أو تعريضها للـ UV على

كروماتوجرامات الـ TLC

تقدير فيتامين أ فى زيت كبد الحوت

الجواهر الكشفية :

١ - محلول KOH ١٠٪ :- ٥ جم فى ٥٠ مل ماء .

٢ - أيثير ثنائى الأيثيل

٣ - إيثانول .

٤ - كبريتات صوديوم لامائية .

٥ - جوهـر $SbCl_3$: - ويحضر بإذابة ٢٥٠ جم $SbCl_3$ فى ١٠٠ مل كلوروفورم (هذا المحلول ثابت لمدة شهر) .

٦ - دليل فينول فيثالين .

الطريقة :

أ- التصبن Saponification :

١ - فى دورق جاف معروف وزنه بالضبط تفتح ١٠ كبسولات capsules زيت كبد الحوت وتغسل بإيثير بترولى ، وبعد تطاير المذيب يوزن الدورق مرة أخرى . ومن الفرق يمكن ايجاد وزن زيت كبد الحوت .

٢ - يضاف ٢٠ مل إيثانول و٢ مل محلول KOH ١٠٪ .

٣ - يسخن الدورق تحت مكثف عاكس reflux لمدة ٣٠ ق لتمام التصبن . وللتأكد من تمام التصبن ، تضاف كمية قليلة من الماء ثم الرج . فإذا ظهر لون بنى أو كتل غير متصينة ، تكون العملية غير تامة ، ويرجع ذلك إلى زيادة كمية المواد الغير متصينة .

٤ - بعد التأكد من تمام التصبن يترك الدورق ليبرد إلى درجة حرارة الغرفة .

٥ - ينقل المحلول المتصبن كمياً فى قمع فصل نظيف ويتم ذلك بغسل الدورق بـ ٣٠ مل ماء مقطر على مراحل وينقل ناتج الغسيل إلى قمع الفصل .

ب - الاستخلاص Extraction :-

(١) يغسل الدورق بواسطة ٥٠ مل إيثير ويضاف ناتج الغسيل إلى قمع الفصل .

(٢) يرج قمع الفصل بأحتراس مع فتح الصنبور (لزيادة الضغط pressure) .

(٣) تأخذ الطبقة المائية فى قمع فصل آخر ، وتغسل بواسطة ٢٥ - ٥٠ مل إيثير .

(٤) تجمع الطبقة الإيثيرية فى قمع فصل وتغسل بواسطة ٥٠ مل ماء وتهمل الطبقة

المائية أيضاً .

٥) بعد ذلك تترك الطبقة الايثيرية لمدة ١٠ ق ، وفى حالة وجود أى آثار من الماء يتم التخلص منها أيضاً .

ج - التخلص من المذيب Solvent removal :

١ - يتم ترشيح المستخلص الايثيرى خلال كبريتات صوديوم لامائية (على قمع ترشيح) .

٢- تكمل الطبقة الإيثيرية الجافة بالإيثير إلى حجم معلوم فى دورق معيارى جاف .

د - التقدير Assay :

١ - يؤخذ ١٠ مل من المستخلص الإيثيرى وتوضع فى أنبوبة اختبار نظيفة ويتم تطاير المذيب بغاز نيتروجين حتى لا يتأكسد الفيتامين ، ثم يضاف إليها ٢ مل من جوهر $SbCl_3$ ويقاس اللون مباشرة على طول موجه ٦٦٠ nm . ومن خلال المنحنى القياسى (بين محاليل قياسية من الفيتامين واللون الناتج) يمكن ايجاد تركيز الفيتامين والبروفيتامين معاً .

٢ - يؤخذ ١٠ مل أخرى فى أنبوبة نظيفة أخرى ، وبعد تطاير المذيب بنفس الطريقة يضاف إليها ١٠ مل إيثير بترولى ويقاس اللون على طول موجه ٤٤٠ nm . ومن خلال المنحنى القياسى يمكن معرفة كمية البروفيتامين .

تقدير فيتامين أ فى المستحضرات الطبية طبقاً لطريقة (USP , 1985)

تُتبع هذه الطريقة لتقييم المستحضرات الطبية فى محتواها من فيتامين أ ، وهى الطريقة المعتمدة من الجمعية العالمية للكيمياء البحتة والتطبيقية (IUPAC) International Union of Pure and Applied Chemistry . وتتضمن الطريقة أستخلاص الفيتامين فى ظروف خاصة للمحافظة على تركيبه من الأكسدة ، ثم قياس الامتصاصات على أطوال موجية مختلفة فى منطقة UV (٢١٠ و ٢٢٥ و ٢٣٤ nm)

ويتم استخلاص الفيتامين بالكامل من المواد الغيرمتصبة للعينة بالإيثير (الخالى من البيروكسيدات) مع المحافظة على الفيتامين سليم قدر الامكان وذلك عن طريق عدم تعرض الفيتامين للضوء العادى و الأكسيجين الجوى والعوامل المؤكسدة الأخرى قدر الإمكان أو

أقل ما يمكن ، ويتم ذلك باستعمال أدوات زجاجية غير منفذه للضوء و ظروف غاز خامل inert gus .

الجواهر الكشفية Reagents :

١ - أثير Diethyl ether : يستعمل أثير حديث التحضير ويستخدم خلال ٢٤ ساعة الأولى من تقطيره .

٢ - كحول أيزوبروبيل (AR) Isopropyl alcohol .

٣ كحول أيثايل مطلق (AR) .

٤ - محلول هيدروكسيد بوتاسيوم (AR) : ٩ أجزاء في ١٠ أجزاء .

التكنيك Technique :

١ - يوزن بالضبط جزء من العينة المختبرة أو يؤخذ عدد معين منها (في حالة وجودها في صورة أقراص مثلاً) أو يؤخذ حجم معين منها (لو كان المراد نسبتها إلى الحجم) ، ثم تنقل كميّاً إلى بورق زجاج بوروسيليكاكات مناسب borosilicate gloss . وكمية العينة (وزنها أو حجمها أو عددها) يكون على أساس المتوقع أن يكون فيها من الفيتامين . وتوصى هذه الطريقة بأن تكون كمية العينة تحتوى على مكافئات ريتينول لا تقل عن ١٥ ، ٠ ملجم ولا يزيد الدهن فيها عن ١ جم .

٢ - لو كانت العينة في صورة كبسولات capsules أو أقراص tablets أو أى صورة صلبة أخرى فلا بد من تجهيزها حتى تتم عملية التصبن بكفاءة وعلى أكمل وجه . ولأجراء ذلك تتبع الإجراءات التالية : - تتم عملية refluxing للجزء المأخوذ للتقدير مع ١٠ مل ماء في حمام بخار steam bath لمدة حوالى ١٠ ق ، وتسحق cruch الاجزاء الصلبة الباقية بساق زجاجي غير حاد ثم تدفئ لمدة ٥ ق أخرى ، ثم تنقل جميع المحتويات كميّاً إلى بورق زجاج (بوروسيليكاكات) مناسب .

٣ - يضاف إلى المحتويات ٢٠ مل كحول و ٣ مل محلول هيدروكسيد بوتاسيوم ، ثم تتم عملية الـ refluxing في وحده كلها من زجاج البوروسيليكاكات لمدة ٣٠ ق . وبعد أن يبرد المحلول يضاف ٢٠ مل ماء ، وتنقل إلى قمع فصل ويضاف إليها ٤ جم مسحوق كبريتات صوديوم (بها ٨ جزيئات ماء) ناعمة جداً .

٤ - تستخلص المواد الغير متصبينه أولاً بواسطة ١٥٠ مل أيثير لمدة دقيقة ثم تستخلص بالايثير ثلاث مرات أخرى ، كل منها ٢٥ مل ، وتجمع المستخلصات وتغسل بـ ٥٠ مل ماء مع التقليب النوامى swirling برفق . يعاد الغسيل بالماء ٣ مرات وفي كل مرة يستخدم ٥٠ مل ماء مع زيادة التقليب .

٥ - ينقل المستخلص الأيثيرى المغسول الى بورق معيارى ٢٥٠ مل يكمل إلى العلامة بالايثير ثم يخلط جيداً .

٦ - يؤخذ ٢٥ مل من مستخلص الأيثيرى ويبخر إلى حوالى ٥ مل (بدون أستعمال حرارة ويمكن أجراء ذلك بالتبخير تحت تفريغ vacuum أو بتمرير غاز خامل فيها) ، يستمر التبخير حتى حوالى ٣ مل ثم تذاب فى كمية من كحول الأيزوبروبيل بحيث تعطى تركيز متوقع مايعادل من الفيتامين ٣ - ٥ µg لكل مل أو تعطى أمتصاص فى المدى ٠,٥ - ٠,٨ على طول موجة ٣٢٥ nm .

٧ - يقاس الأمتصاص فى المحلول الناتج على أطوال موجية ٣١٠ و ٣٢٥ و ٣٣٤ nm فى وجود كحول الأيزوبروبيل كبلانك ، وخلية قياس كوارتز بأستعمال جهاز سبكتروفوتومتر مناسب .

الحساب : Calculation -

يحسب محتوى فيتامين أ من المعادلة التالية :-

$$\text{Content (in mg)} = 0.549 A_{325} / LC$$

حيث أن : - A_{325} هى مقدار الامتصاص الملاحظ على طول موجة ٣٢٥ nm .

L هى مسار الضوء فى خلية القياس بالسـم .

C هى كمية العينة المختبرة المعبر عنها بالجم (g) أو كبسولات أو

أقراص فى كل ١٠٠ مل من محلول الأيزوبروبيل النهائى .

وهذه المعادلة تطبق بشرط أن :-

A_{325} لها قيمة لا تقل عن 1.030 / A_{325} ولا تزيد عن 0.970 / A_{325} حيث أن A_{325}

هى corrected absorbance على طول موجة ٣٢٥ nm والذى يحسب من المعادلة التالية :-

$$[A_{325}] = 6.815 A_{325} - 2.555 A_{310} - 4.260 A_{334}$$

حيث A تدل على الامتصاص على طول الموجة المستدل عليها بالرقم الملحق بها .

لو كانت قيمة $[A_{325}]$ كان لها قيمة أقل من $A_{325} / 1.030$ فإنه تطبق المعادلة التالية :-

$$\text{Content(in mg)} = 0.549 [A_{325}] / \text{LC}$$

كل واحد ملجم فيتامين أ (الصورة الكحوليه) تمثل ٢٢٢٢ وحدة USP من فيتامين أ .
ومما هو جدير بالذكر أنه في حالة وجود التوكوفيرول مصاحب لفيتامين أ ، فإنه يتداخل في التقدير لأن التوكوفيرولات لها امتصاصات على الأطوال الموجية الخاصة بفيتامين أ ، لذلك فيجرى على هذه الطريقة تعديلات جوهرية لأزالة هذا التداخل ، والطريقة المعدلة منشورة في نفس المرجع 1985 , USP .

تقدير الريتينول في السيرم بالطريقة الأسبكتروفوتومترية (Varley et al., 1976)

الأساس المبني عليه هذه الطريقة هو أستخلاص الريتينول أولاً ثم قياس امتصاصه على طول موجة ٢٢٧ nm (أقصى امتصاص) وبعد تشعيعه irradiating في منطقة الأشعة فوق بنفسجية يتلف ، ويقاس الامتصاص مرة أخرى على نفس طول الموجة ، والفرق في القياسين يعبر عن كمية الريتينول .

الجواهر الكشفية :

١ - كحول مطلق .

٢ - هبتان عادي n - heptane (خالي من الهيدروكربونات العطرية) .

٣ - محلول قياسي من الريتينول (١,٠ ملجم / مل هبتان) .

التكنيك :

١ - يخلط ٤,٠ مل من السيرم أو البلازما المعاملة بالهيبارين مع ٨,٠ مل كحول مطلق و ٨,٠ مل هبتان عادي .

٢ - يرج المخلوط جيداً لمدة ١٥ ق بواسطة جهاز رج ميكانيكى ، ثم يترك حتى تنفصل

طبقاته .

٢ - تؤخذ طبقة الهبتان وتقسم قسمين متساويين تقريباً ، وتشعع أحدهما فى أنبوبة زجاج صودا sada glass بغطاء لمدة ٢ ساعات بواسطة ضوء UV ، وهذا الزمن كافى لتلف كل الريتينول .

٤ - يقاس امتصاص المحلول الغير مشعع على طول موجة ٢٢٧ nm ضد الجزء المشعع كبلانك ، ثم يحسب التركيز من منحني قياسى تم تحضيره بنفس الطريقة .

٥ - يمكن تحضير محاليل المنحني القياسى من خلط المكونات التالية كما هو موضح فى الجدول التالى : -

٥,٠	٤,٠	٣,٠	٢,٠	١,٠	صفر	المحلول القياسى (مل)
٥,٠	٦,٠	٧,٠	٨,٠	٩	١٠	الهبتان (مل)

هذا ويمكن استعمال حجم أقل من السيرم ، كما يمكن حفظ مستخلص الهبتان سواء المشعع أو الغير مشعع فى الثلاجة على ٤° م حتى فترة تبلغ ٤٨ ساعة بدون أى تغيير يحدث .

التفسير : -

كثير من الباحثين وجد أن المدى الطبيعى المقدر بهذه الطريقة يتراوح بين ٠,٣٠ و ٠,٩٠ ملجم / لتر .

اختبار امتصاص فيتامين أ (Wooton and King, 1959)

يعد اختبار الميزان الدهنى fat balance أحد التطبيقات العملية لدراسات توازن التمثيل الغذائى فى الجسم . وتبلغ نسبة امتصاص الدهن fat absorption فى الأشخاص الطبيعية ٩٥٪ أو أكثر عندما يتناولون ١٠٠ جم دهن ، ولكن فى حالة قلة نسبة امتصاص الدهن عن ٩٠٪ فيكون هناك حالة تسمى الاسهال الشحمى steatorrhoea ، ولكن هذا الاختبار لا يحدد سبب النقص فى امتصاص الدهن . ومن ناحية أخرى، يمكن اجراء اختبار امتصاص فيتامين أ (أسهل بكثير من اجراء اختبار الميزان الدهنى) كاختبار يحل محل اختبار الميزان الدهنى ، كما يعد هذا الاختبار أيضاً اختباراً وظيفياً functionaltest لكفاءة امتصاص فيتامين أ .

فى هذا الاختبار يتم تقدير مستوى فيتامين أ فى البلازما أولاً ، ثم تعطى جرعة من فيتامين أ معروفة التركيز بالضبط عن طريقة الفم ، وبعد ٤ ساعات تؤخذ عينة دم أخرى ويقدر مستوى فيتامين أ فى البلازما . فإذا ارتفع مستواه عن المستوى الأول ارتفاعاً كافياً يزيد بمقدار ٥٠٠ IU فى كل ١٠٠ مل بلازما ، كان ذلك دالة على عدم وجود نقص فى امتصاص الدهن وفيتامين أ .

طريقة إجراء الاختبار : -

١ - لا يصوم الشخص تحت الاختبار أثناء إجراء الاختبار لأن الصيام يتعارض مع امتصاص فيتامين أ ، ويعطى الشخص جرعة قدرها ٢٥٠٠٠٠ IU من فيتامين أ على صورة محلول فى زيت .

٢ - تؤخذ عينة دم عند بداية التجربة وبعد إعطاء جرعة الفيتامين بزمان قدره ٤ ساعات .

٣ - تفصل البلازما من عينه الدم باستعمال الهيارين كمادة مانعة للتجلط .

٤ - يقدر تركيز الفيتامين فى البلازما بإى طريقة مناسبة ويحسب تركيزها بالنسبة لكل ١٠٠ مل بلازما .

الكاروتينويدات Carotenoids

هناك أكثر من ٨٠ نوع من الكاروتينويدات توجد طبيعياً ، ولكن فقط حوالى ١٠ منها له نشاط فيتامين . وأكبرها نشاطاً هو البيتاكاروتين وهو يستخدم كعامل غذائى للتلوين food coloring agent ويمكن تقسيم الكاروتينويدات الى نوعين على حسب وجود أو عدم وجود الأكسجين فيها الى : -

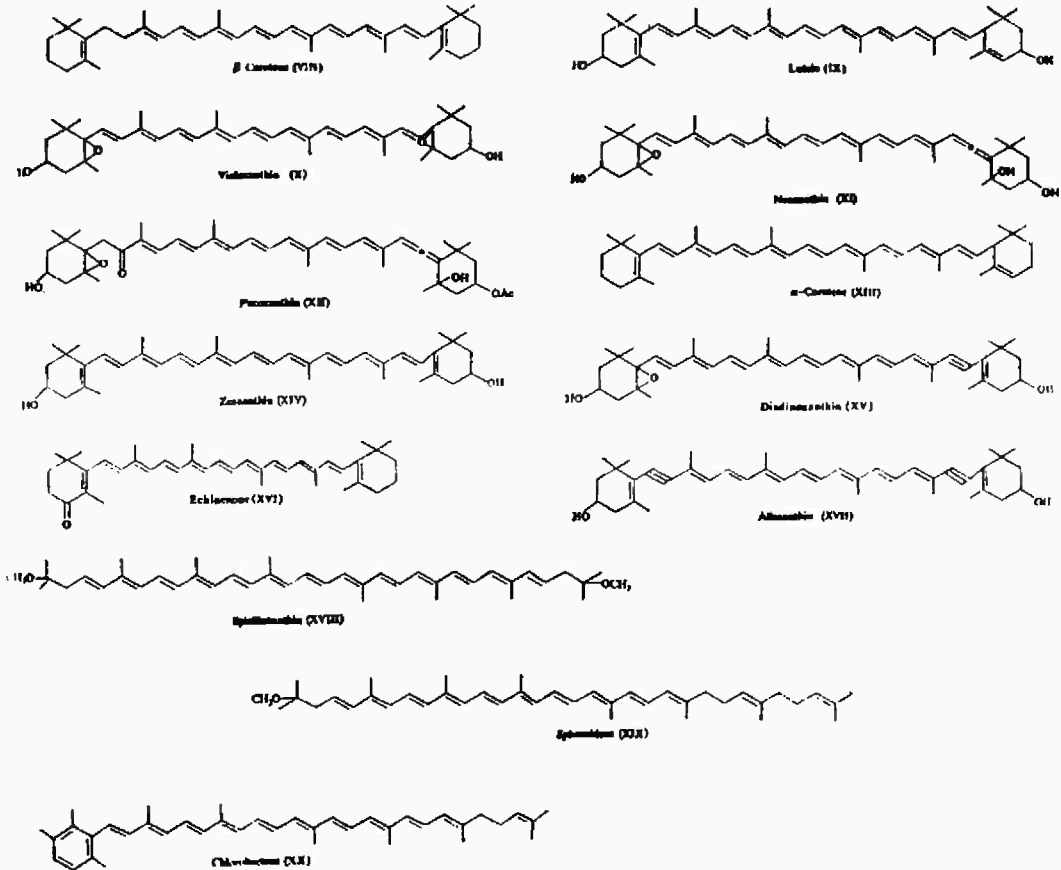
١ - كاروتينات هيدروكربونية Hydrocarbonated carotenes .

٢ - كاروتينات هيدروكسيلية Hydroxylated carotenes .

وشكل (٢٢) يوضح التركيب البنائى لأهم الكاروتينويدات المنتشرة فى الطبيعة .

وفى طرق تحليل الكاروتينويدات استفيد من هذا الفرق فى فصلهما عن بعضها لبعض ،

وتتعدد طرق فصل وتقدير الكاروتينويدات لكثرة مشابهاتها ، فمثلا يحتوى البرتقال على حوالي ٢٢ نوع منها .



شكل (٢٢) الصيغة البنائية لأهم الكاروتينويدات المنتشرة في الطبيعة

١ - الاستخلاص :

الكاروتينويدات حساسة للحرارة والضوء والأكسجين ، لذلك يجب المحافظة عليها من ضوء الشمس المباشر عند أستخلاصها قدر الامكان، ولابد من حماية المحاليل من الاكسدة بأحاطتها بمناخ من النيتروجين أو إضافة مواد مضاد(مانعة) للأكسدة إليها .

ويجب تلافي تأثير الحرارة الزائدة عند إجراء التصبن ، ويستحسن أن تتم هذه العملية على درجة حرارة الغرفة . وعملية التصبن غير ضرورية لتحليل كاروتينات المواد النباتية ولكن لو قدرت الزانثوفيلات xanthophylls فلا بد من إجراء تصبن لأن الزانثوفيلات النباتية غالباً ما توجد كأسترات (عادة laurates) . وفصل استرات الزانثوفيل عن الكاروتينات أكثر صعوبة عن فصل الكحول الحر والكاروتينات لأن قطبية polarity الإسترات مساوية لقطبية الكاروتينات.

يمكن إجراء تقدير محتوى الكاروتين في المواد النباتية مباشرة في مستخلصات المذيب العضوى ، والطريقة الرسمية AOAC توصى بالاستخلاص بواسطة أسيتون - هكسان (٤٠ : ٦٠) يحتوى على كمية صغيرة من كربونات الماغنسيوم لمعادلة الحموضة ثم يجرى التقدير . وقد وجد أن الخلايا النباتية المتقطعة ruptured تفرز أنزيم يثلف الكاروتينويدات ، لذلك يوصى بإجراء التحليل بسرعة قدر الإمكان بعد تجنيس المادة الطازجة . وإذا لم يتيسر التحليل السريع كما هو موصى به ، فلا بد من غمر immerse المادة في ماء يغلى لمدة ١٠ - ١٥ ق حتى يوقف نشاط الأنزيم to deactivate the enzyme ، ويمكن بعد ذلك حفظ العينة في صورة مجمدة frozen .

ويوصى عند إجراء التصبن على الساخن بأيدروكسيد بوتاسيوم كحولى بأنه لابد من وجود مادة مضادة للأكسدة عند تحليل محتوى الكاروتين للأغذية الدهنية مثل المارجرين . وعادة ما يتم التصبن على درجة حرارة الغرفة بترك العينة تتصل مباشرة بالبوتاسا الكاوية الكحولية لمدة ١٢ ساعة (طوال الليل overnight) تحت غاز النيتروجين كلما أمكن لتمام التصبن ، والتقدير محتوى الكاروتينويدات في عصائر الفاكهة fruit juices ، يتم تقليب المستخلص النباتى (العصير) مع محلول أيدروكسيد البوتاسيوم لمدة ١ - ٢ ساعة فقط تحت غاز النيتروجين ، فهذه المعاملة كافية لتمام التحليل المائى لإسترات الزانثوفيل .

ومن المواد المستخدمة كمانعة للأكسدة أثناء عملية التصبن هي حمض الأسكوربيك أو BHT . وبعد إجراء التصبن يضاف أيثير ثنائى الأيثيل مع إضافة كمية كافية من محلول كلوريد صوديوم مشبع حتى يتكون سطح فاصل واضح (تتكون طبقتين) ، ثم تفصل بعد ذلك طبقة المذيب والتي تحتوى على الكاروتينويدات بواسطة عمال قمع فصل . ويمكن إزالة الكاروتينويدات بالادمصاص على ماغنيسيا magnesia حيث يمرر عصير الفاكهة خلال طبقة

ماغيسيا ثم بعد ذلك تستخلص بمذيب dichloroethane وميثانول (١ : ١) لإزالة الكاروتينويدات المدمصة .

٢ - الفصل والقياس :-

كل تقديرات الكاروتينويدات في الأغذية تتم بالقياس الطيفي في منطقة الأشعة فوق البنفسجية - الضوء المرئي (UV - visible spectrophotometry) حيث أن الكاروتينويدات ذات امتصاص قوى جداً في منطقة الضوء المرئي من الطيف . فالبيتاكاروتين ذات امتصاص عالى ($E_1^1 = 2592$) على طول موجة ٤٥٣ nm وأيضاً ($E_1^1 = 2800$) على طول موجة ٤٤٤ nm ، والكربتوزانثين ($E_1^1 = 2370$) على طول موجة ٤٥٢ nm . وتتفاعل الكاروتينويدات مع أحماض لويس أيضاً وتعطى نواتج ملونة ، وتستخدم هذه الخاصية في تقديرها .

ولا يستخدم الـ GC في تحليلها لعدم ثباتها للحرارة ، وغالباً عند دراسة محتوى الكاروتينويدات في الأغذية لابد من فصل الكاروتين عن الزانثوفيل ، ويمكن إجراء ذلك الفصل على أعمده بها مخاليط من magnesia - celite . وتبدأ عملية الأحلال بمحلول عديم القطبية non- polar لفصل هيدروكربونات الكاروتين ثم يزداد تدرج القطبية لفصل الزانثوفيلات الأكثر قطبية .

وكثيراً ما تستعمل مخاليط الاسيتون في إثير بترولى أو هكسان لهذا الفصل . الكاروتينات مثل ألفا والبيتاكاروتين يمكن أحلالها بـ ٢ - ٥ ٪ أسيتون في إثير بترولى ، ثم بزيادة الأسيتون من ٥ - ١٠ ٪ تحل أكسيدات الكاروتين carotene oxide (مثل الـ epoxide) . عند استخدام تركيز أسيتون أكثر من ١٠ ٪ تبدأ الزانثوفيلات أحادية الهيدروكسيل polyhydroxy يمكن استعمال محلول أيثانول وإثير بترولى (١ : ١) .

ويمكن استعمال كروماتوجرافى التوزيع أيضاً في فصل الكاروتينات عن الزانثوفيلات ، وقد أستعملت أعمده سيلكاجيل مشبعة بميثانول لفصلها ولكن الأنظمة الأكثر كفاءة أستعملت سيفادكس LH - 20 حيث أستخدم هذا النظام سابقاً في تحليل الريتينول .

وإذا كان المطلوب فصل الكاروتينويدات كل على حدى (كل منها بمفردها) فإنه يمكن تطبيق تكنيك الـ TLC بعد الفصل بالأعمده الكروماتوجرافية . ويمكن استخدام شرائح الطبقة الرقيقة TLC - Plats لمخلوط من أيدروكسيد كالسيوم وسيليكاجيل (٦ : ١) ونظام مذيب

اثيريترولى و بنزين (٩٨ : ٢) لفصل الكاروتينات . الاجزاء التى تحتوى على أكاسيد الكاروتين والزانثوفيلات أحادية الهيدروكسيل يمكن فصلها إلى مركباتها على شرائح الطبقة الرقيقة لأكسيد الألومنيوم مع المذيب ٢٪ أسيتون فى اثيريترولى لأكاسيد الكاروتين ، و ٥٪ أسيتون للزانثوفيلات . وتستخدم شرائح السيليكاجيل لفصل الزانثوفيلات عديدة الهيدروكسيل بعديد من المذيبات ، واختيار المذيب يعتمد على قطبية الزانثوفيلات . ويتركب المخلوط المستخدم فى فصل زانثوفيلات عصير البرتقال من ٢٠ - ٤٠ ٪ أسيتون فى مخلوط اثيريترولى : خلات الايثايل : ايزوبروبيل (٩٥ : ١٠ : ٥) .

٣ - HPLC :

استخدام هذا التكنيك بصورة أدق فى تفريد (تحليل كمى ووصفى) أنواع الكاروتينويدات المختلفة بكثرة فى الوقت الحاضر ، واستخدم فيه أنواع مختلفة من الطور الثابت (مثل الماغنيسيا) ويمرر عليها مذيب متدرج فى القطبية (مثل أسيتون - هكسان) . ومن ميزة هذا التكنيك سرعة إجراء (٢٠ ق) ، ودقته مع المحافظة على المشتقات الناتجة . وعند استخدام أعمده الماغنيسيا فلا بد من مراعاة إعادة تجديد الرطوبة فيها وذلك بغسيلها بأستيون يحتوى على ٥,٢ ٪ ماء وذلك يستغرق ١٠ ق ، ويتم ذلك قبل حقن كل عينة ويحتوى المذيب عادة على مواد مانعة للأكسدة مثل BHT . ولا يستعمل هذا العمود فى تحليل الزانثوفيلات لأنها تتطلب أعمده أكثر قطبية مثل السيليكاجيل مع مذيب tetrahydrofuran وهكسان (١ : ٥) يحتوى على ٠,٠١ ٪ BHT . ويتم تقدير الكاروتينويدات بهذه الأجهزة بالكشف عنها بكواشف خاصة ، والقياس يكون فى منطقة الضوء المرئى ، وعادة ما يكون الامتصاص على طول موجة ٤٤٠ nm .

تستخلص الكاروتينويدات من العينات بعد التصبن بمذيب يلى عملية التصبن مباشرة ، ثم تحقن المواد الغير متصينة مباشرة فى عمود الـ HPLC .

٤ - التعرف على الكاروتينويدات :

حيث إن هناك أنواع كثيرة جداً من الكاروتينويدات ، فلا بد من معرفتها بعد الفصل الكروماتوجرافى بكميات كبيرة كافية ، ويتم ذلك بقياس الطيف المرئى visible spectrum للكاروتينيد المفصول فى مذيبات متنوعة مثل الإيثانول وكوروفورم و carbondisulfide حيث أن مناطق أقصى امتصاص للكاروتينويدات حساسة للمذيب . وعن طريق ذلك يمكن معرفة نوع الكاروتينويد مثل : -

β - Carotene λ max (ethanol) = 425 , 450 , 478 nm

λ max (chloroform) = 465 , 493 nm

λ max (carbendisulfide) = 450 , 475 , 505 nm

وهناك جداول خاصة لذلك ، وبمقارنة النتائج المتحصل عليها بهذه الجداول يمكن معرفة أنواع الكاروتينويدات المفصولة . كما يمكن قياس طيفها في مناطق أخرى مثل IR spectroscopy . MS . NMR إلخ ، وتلك أيضاً لها جداول خاصة .

تقدير الكاروتينات بالطريقة الأسبكتروفوتومترية

(Beadle and Zscheile , 1942)

الببتاكاروتين من الكاروتينات الأساسية في أغلب المصادر النباتية مثل الجزر carrots والأكفالفا alfa alfa ، وذلك بالنسبة للكاروتينات الأخرى مثل الكربتوزانثين cryptoxanthin والليكوبين lycopene . وربما في هذه الحالة تحتاج طرق فصل وتقدير الكاروتينات إلى مذيبات متخصصة للاستخلاص مثل : -

١- مخلوط من الهكسان والأسيتون .

٢ - Diacetone alcohol .

وهذا النوع الأخير يستخدم بكثرة وذلك لوجود الكاروتينات مع بعض الصبغات الغير نشطة inactive pigments مثل الزانثوفيل والكلوروفيل .

ويمكن توضيح بعض الاحتياطات المتبعة للاستخلاص تبعاً لنوع العينة كما يلي : -

الاستخلاص :

نجد أن عملية الاستخلاص تختلف حسب نوع المصدر (حيواني - نباتي) ويمكن توضيح ذلك كما يلي : -

أ - الاستخلاص من مخلوط المواد الغذائية الجافة والعينات النباتية الجافة :

حيث يتم الاستخلاص بعد تسخين العينة في ورق جاف باستخدام مخلوط من

الأسيتون والهكسان بنسبة ٣ : ٧ بالترتيب تحت مكثف عاكس under reflux لمدة ساعة ، حيث يتم استخدام ٣٠ مل من مخلوط المذيب لكل ٢ جم من العينة . يتم التبريد إلى درجة حرارة الغرفة ثم الترشيح filtration خلال كبريتات صوديوم لأمائية واستقبال الراشح filtrate في بورت معيارى سعة ١٠٠ مل .

ب - الاستخلاص من المنتجات اللبنية والحيوانية التى تحتوى على دهون :-

نجد هنا أن عملية الاستخلاص والتصبين تكون ضرورية necessary ، وذلك بفرض الحصول على الجزء الغير متصبين .

خطوات التقدير :-

١ - الجواهر الكشفية :-

١ - بوتاسا كاوية كحولية (N.O.) .

٢ - بوتاسا كاوية مائية (N.O.) .

٣ - إيثير ثنائى الإيثايل (خالى من البيروكسيدات) .

٤ - إيثير بترولى (٤٠ - ٦٠ °م) .

٥ - دليل الفينول فيثالين .

٢ - التصبين :-

يتم إضافة ١٥ مل بوتاسا كاوية كحولية لكل ١ جم من العينة وذلك في بورت مخروطى سعة ١٠٠ مل ، والتسخين في حمام مائى Water bath لمدة ٣٠ ق تحت مكثف عاكس أو يترك على حرارة الغرفة طول الليل overnight .

٣ - الاستخلاص :-

١ - يتم الاستخلاص وذلك باستخدام إيثير ثنائى الإيثايل (١٠٠ مل) ، وعلى دفعات لاستخلاص أكبر كمية ممكنة من الكاروتينات وذلك بعد نقل العينة إلى قمع فصل سعة ٢٥٠ مل (كما سبق فى حالة فيتامين أ) .

٢ - يغسل الدورق بحجم مساوى من الماء المقطر (Distilled Water (DW وينقل ناتج الغسيل أيضاً إلى قمع الفصل .

٣ - يتم الاستخلاص بالايثير ثم تهمل الطبقة المائية .

٤ - تغسل طبقة الايثير بواسطة ٥٠ مل من البوتاسا الكاوية المائية و ٥٠ مل ماء مقطر وذلك بالترتيب حتى لا تعطى لون أحمر مع دليل الفينول فيثالين .

٥ - تنقل طبقة الايثير إلى دورق معيارى ويكمل إلى العلامة باستخدام الايثير .

٦ - يأخذ منها حجم معلوم ويبخر الايثير فى حمام مائى تحت ضغط منخفض ، ثم يضاف ١٠ مل من الايثير البترولى .

٧ - يتم القياس على طول موجة ٤٤٠ nm فى وجود بلانك (ايثير بترولى) .

٨ - يتم عمل منحنى قياسى من البيتاكاروتين وذلك لحساب كمية الكاروتين فى العينة .

٤ - عمل المنحنى القياس من البيتاكاروتين

Standard curve of β -carotene :-

يتم اذابة وزنة معلومة بالضبط من البيتاكاروتين فى حجم معلوم بالضبط من الايثير البترولى (٠.٠٠١ جم لكل ١٠٠ مل ايثيربترولى) وذلك لعمل المحلول القياسى standard solution . يتم تحضير تحت تخفيفات مختلفة subdilutions من هذا المحلول بإضافة المذيب للحصول على محاليل ذات تركيزات مختلفة من الكاروتين كما فى الجدول التالى :-

٣,٠٠	٢,٠٠	١,٠٠	٠,٥٠	٠,٢٥	صفر	المحلول القياسى من البيتاكاروتين (مل)
٧,٠٠	٨,٠٠	٩,٠٠	٩,٥٠	٩,٧٥	١٠	ايثيربترولى (٤٠ - ٦٠ م°) (مل)
٤,٠	٣,٠	٢,٠	١,٠	٠,٥٠	صفر	نسبة الكاروتين (ملجم / مل)

٥ - القياس Reading :-

يتم القياس مباشرة على طول موجة ٤٤٠ nm فى وجود بلانك (ايثيربترولى) ،

ويحسب تركيز الكاروتين في العينة بتطبيق امتصاص العينة على المنحنى القياسي .

تقدير فيتامين أ والكاروتين في السرم بتفاعل كار - بريس

(Varley et al., 1976)

يتم تقدير فيتامين أ والكاروتين لونياً عن طريق التفاعل مع ثالث كلوريد الأنثيمون Carr - price reaction باستخدام طريقه Kimble and Stekol ، وفيها يتم ترسيب البروتين باستخدام كحول الأيثانول ثم أستخلاص فيتامين أ والكاروتين باستخدام الأثير البترولي . وبعد قراءة امتصاص اللون الأصفر على طول موجة 440 nm والخاص بتقدير الكاروتين ، يتم تبخير الأثير البترولي ثم إذابة المتبقى residue في كلوروفورم و إضافة جوهـر كشاف ثالث كلوريد الأنثيمون ثم قراءة اللون الأزرق المتكون على طول موجة 620 nm .

ملحوظة : - تعطى الكاروتينات لوناً أزرقاً أيضاً مع ثالث كلوريد الانثيمون $SbCl_3$

في الكلوروفورم .

١ - الجواهر الكشافة :

- ١ - كحول أيثانول مطلق .
- ٢ - اثيربترولي (٤٠ - ٦٠ م) .
- ٣ - كلوروفورم .
- ٤ - أندريد حامض الخليك .
- ٥ - جوهـر كار - بريس : - يحضر بإذابة ٢٥٠ جم ثالث كلوريد الأنثيمون في لتر من الكلوروفورم (عملية الترشيح ضرورية قبل الاستخدام) .
- ٦ - محلول قياسي من البيتاكاروتين : - ويحضر بإذابة ٥٠٠ ملجرام بيتاكاروتين في لتر اثير بترولي ، ثم يخفف بنسبة ١ : ٥ باستخدام نفس المذيب .

٢ - الخطوات :

- ١ - يؤخذ ٣ مل من مصل الدم (السيرم) في أنبوبة طرد مركزي ثم يضاف إليها ٣ مل كحول ايثانول تدريجياً نقطة نقطة مع الرج ، وذلك لترسيب البروتين .

٢ - يتم إضافة ٦ مل من الإيثير البترولى والرج بشده لمدة ١٠ دقائق ثم إجراء طرد مركزي لمدة دقيقة واحدة .

٣ - تؤخذ طبقة الإيثير البترولى دون نقل أى كمية من الطبقة المائية .

أولاً - تقدير الكاروتين : -

تؤخذ طبقة الإيثير البترولى فى خلية القياسى colorimetric cuvette ، ثم يقرأ الأمتصاص على طول موجة ٤٤٠ nm فى وجود بلانك (إيثيربترولى) ، وبحسب تركيز الكاروتين فى السيرم من المنحنى القياسى باستعمال المحلول القياسى كما فى الجدول السابق (تحت التخفيفات المختلفة subdivisions) .

ثانياً - تقدير فيتامين أ : -

١ - يؤخذ ٤ مل من مستخلص الإيثير البترولى فى أنبوبة القياس ، ثم ييخر المذيب فى حمام مائى على (٤٠ - ٥٠ ° م) مع أمرار تيار من CO₂ أعلى سطح المذيب .

٢ - يتم إذابة الطبقة المتبقية residue فى ٠.٥ مل كلوروفورم ، ثم تضاف نقطة من أندريد حمض الخليك وذلك للقضاء على آثار من الماء التى تسبب تغبش cloudiness المحلول عند إضافة جوهر كار- بريس .

٣ - يتم بسرعة إضافة ٢ مل من جوهر كار - بريس بحيث يكون طرف الماصة بعيداً عن سطح المخلوط ، فيظهر اللون الذى يقاس على طول موجة ٦٢٠ nm . ويظهر اللون بسرعة ويبلغ أقصاه فى خلال ٥ - ١٥ ثانية ثم يقل بسرعة . وثبات اللون يكون أكثر عند تبريد جوهر كار- بريس على درجة حراره ٥ الى صفر ° م قبل الاستخدام .

ملحوظة : -

عند وجود أى آثار من الرطوبة فى الكلوروفورم أو جوهر كار- بريس يكون من المستحيل قراءة اللون . وإذا ظهر تغبش يعاد التقدير . هذا ويجرى تصحيح اللون الناتج حيث أن الكاروتينات الموجوده مع الريتينول تتفاعل مع جوهر كار - بريس وتعطى نفس اللون .

٤ - يحضر منحنيان قياسيان على نفس الجهاز ، الأول لتفاعل الريتينول مع جوهر كار - بريس ، والآخر للكاروتينات مع الجوهر أيضاً وتعامل بنفس الطريقة . ثم من

نتائج تقدير مستوى الكاروتينات في السيرم ، تقراء كثافة اللون التي ترجع لنفس كمية الكاروتين من المنحنى القياسى الخاص بالكاروتين ، وبعد ذلك تطرح هذه القيمة من القراءة الفعلية الخاصة بتقدير الريتينول في العينة . وبتطبيق هذه القراءة على المنحنى القياسى الخاص بالريتينول يمكن حساب كمية الريتينول في السيرم بدون تداخلات للكاروتينات في التقدير . ومما هو جدير بالذكر ، يجب تصحيح الحجم أيضاً ، ففي تقدير فيتامين أ يستخدم ٤ مل من مستخلص الاثير البترولى للتقدير ، فلو استخدم حجم أقل فإنه يضرب في ٤ ويقسم على الحجم المأخوذ للتقدير .

٥ - أ - منحنى الريتينول القياسى : - يحضر محلول يحتوى على ٤,٠ ملجم ريتينول / لتر في كلوروفورم وتجهز سلسلة أنابيب كما في الجدول التالى : -

٠,٠٥	٠,١٠	٠,٢٠	٠,٣٠	٠,٤٠	٠,٥٠	صفر	المحلول القياسى من فيتامين أ (مل)
٠,٠٥	٠,٤٥	٠,٤٠	٠,٣٠	٠,٢٠	٠,١٠	صفر	كلوروفورم (مل)
صفر	٠,١٠	٠,٢٠	٠,٣٠	٠,٤٠	٠,٥٠	١,٠٠	كمية فيتامين أ في مصل الدم (ملجم / لتر)

ثم يضاف ٣ مل جوهر كار - بريس والقياس كما سبق ذكره .

٥ - ب - منحنى تصحيح الكاروتينات : - تحضر محاليل مختلفة من البيتاكاروتين وذلك بتخفيف مل واحد من المحلول القياسى السابق من البيتا كاروتين إلى ٢٥ مل بواسطة الكلوروفورم (نحصل على محلول يحتوى على ٢٠ ملجم / لتر) . وتحضر سلسلة من الأنابيب كما في الجدول التالى : -

٠,٠٥	٠,١٠	٠,٢٠	٠,٣٠	٠,٤٠	٠,٥٠	صفر	محلول قياسى من الكاروتين (مل)
٠,٠٥	٠,٤٠	٠,٣٠	٠,٢٠	٠,١٠	صفر	كلوروفورم (مل)	
صفر	٠,١٠	٠,٢٠	٠,٣٠	٠,٤٠	٠,٥٠	٠,٥٠	كمية الكاروتين في مصل الدم (ملجم / لتر)

ثم يضاف ٣ مل من جوهر كار - بريس والقياس كما سبق ذكره .

تقدير الريتينول والكاروتينات فى السيرم بواسطة ثلاثى كلورو حمض الخليك .

إن طريقة تقدير الريتينول والكاروتينات التى تعتمد على تفاعل كار - بريس والتى يستعمل فيها ثالث كلوريد الأنثيمون فى الكلوروفورم مازالت تستخدم حتى الآن ولكن لها عيب ألا وهو تكون أكسى كلوريد الأنثيمون الغير ذائب insoluble antimony oxy chloride (SbOCl) فى وجود أى رطوبة وهذا يسبب صعوبة التقدير. ولكن هناك تفاعل آخر يعطى لوناً أزرقاً مع فيتامين أ والكاروتينات وليس فيه هذا العيب ويستخدم فيه ثلاثى فلورو حمض الخليك TFA بدلاً من $SbCl_3$.

يتفاعل ثلاثى كلورو حمض الخليك مع الألكترونات باى π electrons فى الروابط الزوجية المتبادلة لفيتامين أ ويتكون مركب كيميائى له لون أزرق ، ويسمى هذا التفاعل باسم تفاعل Neeld - Pearson . ويتميز هذا التفاعل أيضاً بزيادة حساسيته وتخصصه حيث تتفاعل الكاروتينات أيضاً مع الـ TFA ، ولكن لتقديرها يتم تطبيق تصحيح للامتصاص المصاحب للكاروتينات .

وفى هاتين الطريقتين يتم ترسيب بروتينات السيرم بالكحول ثم يستخلص بعد ذلك الريتينول والكاروتينات بواسطة الإيثير البترولى . وبعد قياس كثافة اللون الأصفر فى هذا المستخلص على طول موجة ٤٥٠ nm والذي يرجع إلى الكاروتينات ، ييخر المذيب نهائياً ثم يعاد نوبان المادة الباقية residue فى كلوروفورم ، ويتم تفاعلها مع جوهـر الـ TFA حيث يتكون لون أزرق يقاس على طول موجة ٦٢٠ nm .

الطريقة الأولى (Bradley and Hambrek , 1973) : -

الجواهر الكشفية : -

- ١ - كحول إيثايل ٩٥٪ (AR) .
- ٢ - إيثير بترولى BP ٤٠ - ٦٠ °م (AR) .
- ٣ - كلوروفورم لامائى (AR) .
- ٤ - جوهـر TFA : - يخلط حجم من TFA (AR) مع حجمين من الكلوروفورم قبل

الاستعمال مباشرة ، وهذا الجوهر ثابت لمدة ٤ ساعات على ٢٥° م .

٥ - Retinol stock standard (١٦٠ ملجم / لتر) : - ينقل ١٨,٣٥ ملجم خلاص ريتينيل retinyl acetate (all trans) إلى ورق معيارى سعة ١٠٠ مل ويذاب فى الكلوروفورم ويكمل إلى العلامة .

٦ - Retinol working standards : - يخفف ١٠,٠ مل من محلول الريتينول المركز (جوهر ٥) إلى ١٠٠ مل بالكلوروفورم ، ثم يخفف ٢,٥ و ٥,٠ و ٧,٥ و ١٠,٠ مل من هذا المحلول إلى ١٠٠ مل بالكلوروفورم ، فنحصل على محاليل قياسية مختلفة من الريتينول بتركيزات ٠,٤ و ٠,٨ و ١,٢٠ و ١,٦٠ ملجم / لتر ، على التوالى . وهذه المحاليل القياسية ثابتة لمدة أسبوع واحد على درجة حرارة ٤-٨° م فى الظلام .

٧ - β - carotene stock standard (٢٠٠ ملجم / لتر) : - يذاب ٢٠,٠ ملجم بيتا كاروتين مخلوق بللورى synthetic crystalline فى حوالى ٤ مل كلوروفورم ويكمل إلى ١٠٠ مل بالايثير البترولى .

٨ - β - Caretene working standards : - يخفف ١٠,٠ مل من محلول البيتا كاروتين المركز (جوهر ٧) إلى ١٠٠ مل بالايثير البترولى ، ثم يخفف ٢,٥ و ٥,٠ و ١٠,٠ و ١٥,٠ و ٢٠,٠ مل من هذا المحلول إلى ١٠٠ مل بالايثير البترولى ، فنحصل على محاليل قياسية مختلفة من البيتاكاروتين بتركيزات ٠,٥ و ١,٠ و ٢,٠ و ٣,٠ و ٤,٠ ملجم / لتر ، على التوالى . وهذه المحاليل القياسية ثابتة فقط لساعات قليلة على درجة حراره ٢٥° م . ولا بد من تحضيرها طازجة freshly عند كل تحليل .

التكنيك : -

لا بد من تحضير كل المحاليل القياسية حين التقدير ، وتجرى كل العمليات التحليلية فى أنوار زجاجية (أنابيب) قليلة النفاذية للأشعاع (معتمة) low actinic glassware أو فى ضوء خافت subdued light ، كما ينجز كل تحليل أو قياس بصورة مزدوجة in duplicate .

١ - **تجميع العينات** : - تجمع عينات الدم من الحيوانات الصائمة (أو من الإنسان الصائم) ، ويجب أن تكون خالية من تحلل كرات الدم الحمراء haemolysis ، والمحافظة عليها من الضوء ووقايتها منه . ويمكن تخزين عينات السيرم المفصولة من الدم حديثة التحضير (الطازجة) على - ٢٠ ° م على الأقل لمدة أسبوعين في الظلام .

٢ - **التحليل** :- يؤخذ ١,٠ مل من السيرم في أنبوبة طرد مركزي زجاجية ذات غطاء زجاجي محكم سعة ١٥ مل ، ويضاف إليها ٢,٠ مل أيثانول ثم تغلق الأنبوبة بغطائها الزجاجي وتخلط محتوياتها جيداً بواسطة vortex mixer . بعد الخلط الجيد ، يضاف ٢,٠ مل أيثير بترولي ثم تغلق وتوضع في هزاز shaker ميكانيكي لمدة ١٠ ق لتمام أستخلاص الريتينول والكاروتينات في طبقة الأثير البترولي . توضع الأنبوب في جهاز الطرد المركزي ثم تطرد مركزياً لمدة ١٠ ق على ٢٥٠٠ g . بحذر ينقل بالضبط ٢,٠ مل من طبقة الأثير البترولي العليا أو ٢,٠ مل من كل محلول Carotene working st. إلى cuvette جافة (المسار الضوئي لها ١٠ مم) ثم يقاس الامتصاص absorbance على طول موجة ٤٥٠ nm (A_{450}) ضد أيثير بترولي كبلانك blank . يتم إجراء ذلك بدون تأخير (بسرعة) حتى تتلافى تبخر المذيب وتلف الكاروتينويدات carotenoids بواسطة الضوء .

تبخر محتويات الـ cuvettes حتى تمام الجفاف في حمام مائي على ٥٠ ° م بمعاونة تيار من النيتروجين (ويجفف كل منها بحذر) . تؤخذ الـ cuvettes ثم يضاف ١٠٠ μ ل كلوروفورم الى كل منها ثم تخلط جيداً وبسرعة بواسطة جهاز vortex mixer . تحضر أيضاً cuvettes تحتوي على ١٠٠ μ ل من كل محاليل retinol working st. يضاف ١,٠ مل جوهر TFA إلى cuvette البلانك التي تحتوي على ١٠٠ μ ل كلوروفورم ، ثم تخلط جيداً وتستخدم لضبط الأسبكتروفوتومتر على الصفر على طول موجة ٦٢٠ nm . يضاف بسرعة ١,٠ مل جوهر TFA لكل cuvette أخرى مع الخلط بسرعة ، ثم يقاس الامتصاص على طول موجة ٦٢٠ nm (A_{620}) بعد ثانيتين من إضافة الجوهر وتسجل القراءات .

كما هو معروف أن الـ TFA حامض قوى نو بخار مثير أو مهيج irritant vapour ، فلا بد من الاحتياط والحذر عند التعامل معه لتفادي سكبهِ وطرطشته splashing . ونحصل على أحسن النتائج إذا أضيف جوهر الـ TFA بواسطة ماصة آلية automatic pipette متصلة بجهاز الأسبكتروفوتومتر .

الحساب :-

يحسب تركيز الكاروتين والريتينول في السيرم بواسطة المعادلتين التاليتين :-

$$\text{Serum carotene (mg / l)} = \frac{A_{450} \text{ of Unknown}}{A_{450} \text{ of Standard}} \times \text{Concentration of standard} \times 3$$

$$\text{Serum retinol (mg / l)} = \frac{A_{620} \text{ of Unknown}}{A_{620} \text{ of standard}} \times \text{concentration of standard} \times \frac{3}{2}$$

$$\bar{A}_{620} = A_{620} - (F \times A_{450}) \quad \text{حيث أن :-}$$

وتقدر قيمة F كما يلي :-

قيمة F تختلف من معمل لآخر وعلى ذلك فلا بد من تقديرها في كل معمل ، ولتحديدها ، يعامل ٢,٠ مل من كل من Carotene working st. بنفس الطريقة التي عومل بها ٢,٠ مل من مستخلص الالبثير البترولي (عينة السيرم) بالضبط ويقاس الامتصاص لها على طول موجة ٦٢٠ nm) . (A_{620}) ثم تحسب قيمة F بقسمة A_{620} / A_{450} لكل working st. ويحسب المتوسط .

الطريقة الثانية (Neeld and Pearson , 1963)

لتقدير فيتامين أ والبيتاكاروتين في السيرم ، لابد من جمع عينات الدم لأشخاص صائمين ولا بد أن تكون العينات خالية من تحلل كرات الدم الحمراء haemolysis ويحافظ عليها من الضوء . وإذا لم تتاح الظروف للتقدير والعينات طازجة فيمكن حفظها على - ١٠ °م ، فيتامين أ يكون ثابتاً في هذه الظروف على الأقل لمدة أسبوعين .

الجواهر الكشفية :-

تستخدم جميع الجواهر الكشفية كما ذكرت في الطريقة السابقة .

التكنيك :-

- ١ - في أنبوبة طرد مركزي بغطاء زجاجي سعة ١٥ مل يوضع ١,٠ مل من السيرم .
- ٢ - يضاف إليها ٢,٠ مل كحول الإيثايل (٩٥٪ حجم / حجم) ، وتغلق جيداً وتخلط

محتويات الأنبوبة جيداً وترج بواسطة vortex mixer

٣ - يضاف ٣,٠ مل إيثير بترولى ثم توضع الأنابيب مغلقة فى هزاز (جهاز رج) بحركة دائرية shaker in the round أو فى أى جهاز رج آخر مناسب لكى يتم استخلاص الكاروتينات وفيتامين أ فى طبقة الإيثير البترولى .

٤ - بعد تمام الاستخلاص ، يتم طرد الأنابيب مركزياً على ٢٥٠٠ rpm لمدة ١٠ ق .

٥ - بدقة شديدة وبحذر تسحب طبقة الإيثير البترولى (الطبقة العليا) وتنقل إلى خلية قياس جافة (مثل 10 × 75 Coleman cuvette) ثم يقاس الامتصاص على طول موجة ٤٥٠ nm فى جهاز سبكتروفوتومتر مناسب ضد الإيثير البترولى كبلانك بدون أدنى تأخير لتلافى تبخير المذيب وتلف الكاروتينات بالضوء ، ولكن A_1 هى مقدار الامتصاص .

٦ - تبخر محتويات خلايا القياس حتى الجفاف فى حمام مائى على ٥٠ ° م بمساعدة تيار دقيق من النتروجين . وبعد ذلك تجفف كل خلية بدقة وحذر بواسطة ورق مانع للاحتكاك nonabrasive paper (لتلافى الخدش scratching أو أحداث) .

٧ - يضاف ٠,١ مل كلوروفورم لكل خلية قياس وتمزج جيداً بواسطة vortex mixer .

٨ - يضاف ١,٠ مل جوهر TFA لخلية قياس البلانك وتوضع فى جهاز الأسبكتروفوتومتر مضبوط على طول موجة ٦٢٠ nm وضبط على صفر امتصاص .

٩ - يضاف ١,٠ مل جوهر TFA مرة واحدة ويقوه إلى خلايا القياس الأخرى (لتسهيل الخلط فى الحال) ، ثم يقاس الامتصاص على نفس طول الموجة فى خلال ثانيتين بعد إضافة الجوهر وتسجل قيمة الامتصاص .

تحذير: - TFA حمض قوى ولا بد من مراعاة الدقة والحذر عند استعماله .

أحسن نتائج يمكن الحصول عليها لو أضيف جوهر TFA دفعة واحدة ويقوه forcefully بواسطة ماصه إليه . ولو أستعمل مسجل recorder ، فإنه يمكن قراءة قيمة

الامتصاص على الـ peak أو عند نقطة الانثناء inflection point بعد بدايه ارتفاع الـ peak فجاء نتيجة اضافة الـ TFA . هذا الـ peak الثانى أو نقطة الانثناء هذه تحدث بعد ثانيتين من اضافة جوهر اللون . هذا ولتكن قيمة القراءة هي A_2 .

الحساب : -

أ - البيتاكاروتين : - تقدر كمية البيتاكاروتين لكل مل من المنحنى القياسى للكاروتين وتجري الحسابات التالية : -

$$\mu\text{g } \beta\text{-carotene} / 100 \text{ ml serum} = \mu\text{g } \beta\text{-carotene} / \text{ml} \times 3.0 \times 100$$

حيث أن :

3.0 = حجم الإيثير البترولى الذى يحتوى على البيتاكاروتين من ١.٠ مل سيرم بعد الاستخلاص

$$100 = \text{معامل التحويل من تركيز } \mu\text{g} / \text{ml} \text{ الى } \mu\text{g} / 100 \text{ ml}$$

ب - فيتامين أ : - لحساب محتوى فيتامين أ بدقة ، من الضروري تصحيح الامتصاص الذى يرجع إلى وجود الكاروتينات على طول موجة ٦٢٠ nm .

$$A_3 = A_2 - (F \times A_1)$$

حيث أن : -

A_1 = امتصاص الكاروتين على طول موجة ٤٥٠ nm (الخطوة رقم ٥) .

A_2 = امتصاص الكاروتين وفيتامين أ على طول موجة ٦٢٠ nm (الخطوة رقم ٩) .

A_3 = أمتصاص فيتامين أ على طول موجة ٦٢٠ nm (تصحيح الامتصاص

الراجع الى وجود الكاروتين) .

F = معامل ، يحول امتصاص الكاروتين على طول موجة ٤٥٠ nm (الخطوة ٥)

إلى امتصاص مكافئ على طول موجة ٦٢٠ nm فى تفاعل اللون .

$$F = \frac{A_{620} \text{ of carotene using Vit.A procedure}}{A_{450} \text{ of petroleum ether solution of carotene}}$$

وهناك اختلافات كثيرة فى قيمة هذا المعامل ، لذلك فيوصى بتقدير قيمتها فى كل معمل .

هذا ، وبعد إيجاد قيمة A_3 ، يمكن حساب التركيز الحقيقى لفيتامين أ لكل ١٠٠ مل سيرم من المعادلة التالية : -

$$\mu \text{ Vit . A (free alcohol) } / 100 \text{ ml} =$$

$$\frac{A_3 \times \text{mg retinyl acetate st. / cuvet}}{A_{620} \text{ retinyl acetate st.}} \times \frac{3}{2} \times 100 \times 0.872$$

or

$$\mu \text{g Vit.A} / 100 \text{ ml} = \frac{A_3 \times \mu \text{g retinyl acetate st. / cuvet}}{A_{620} \text{ retinyl acetate st.}} \times 130.8$$

حيث أن : - 3 = حجم مستخلص الإيثير البترولى لكل ١٠٠ مل سيرم .

2 = كمية مستخلص الإيثير البترولى المستخدمة للتقدير .

100 = تحويل μg خلاص الريتينيل لكل مل إلى μg لكل ١٠٠ مل .

0.872 = نسبة الكتلة الجزيئية لخلاص الريتينيل . وهذا العامل يصحح استخدام

خلاص الريتينيل بدلاً من الريتينول كمادة قياسية .

التعبير Calibration :

١ - الببتاكاروتين : - توضع تركيزات معلومة من الببتاكاروتين القياسى working st. فى خلايا قياس مناسبة بحيث يتراوح تركيزها بين ٠.٥ إلى ٤.٠ $\mu \text{g} / \text{ml}$ ، ثم يقاس الامتصاص لكل منها على طول موجة ٤٥٠ nm ضد الايثير البترولى كبلانك . توقع التركيزات ($\mu \text{g} / \text{ml}$) ضد الامتصاص ، وبذلك يكون هناك المنحنى القياسى .

لفرض حساب معامل تصحيح الكاروتين F لطريقة فيتامين أ ، تعامل ٢.٠ مل من كل الببتاكاروتين القياسية كأنها عينة بالضبط ، بداية من الخطوة رقم ٦ فى طريقة تقدير الفيتامين ، ثم يحسب بعد ذلك متوسط نسبة الامتصاص على طول موجة ٦٢٠ nm إلى تركيز الببتاكاروتين ($\mu \text{g} / \text{ml}$) وتستخدم فى حساب معامل تصحيح الكاروتين (F) .

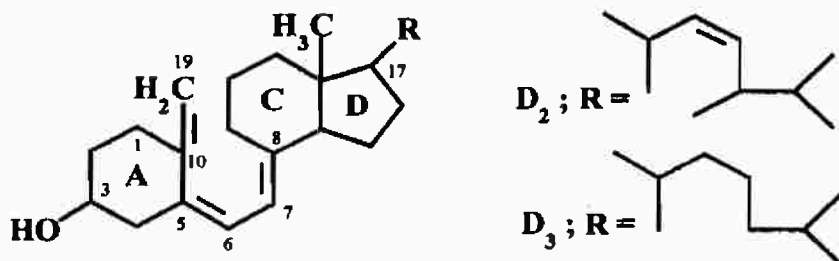
٢ - فيتامين أ :- يؤخذ حجم مقداره ٠.١ مل من كل retinyl acetate working st. فى خلايا قياس ثم تعامل كما فى طريقة فيتامين أ ، وبعد ذلك يرسم المنحنى القياسى الخاص بـ μg خلاص الريتينيل لكل خلية ضد الامتصاص الخاص بها على طول موجة ٦٢٠ nm .

المستويات الطبيعية : Normal values -

المدى الطبيعي لفيتامين أ في السيرم يكون بين ٢٠ و ٦٥ µg لكل ١٠٠ مل ، والقيم التي تزيد من ١٠٠ µg لكل ١٠٠ مل ربما توجد في المرضى بتسمم فيتامين أ Vit. A toxicity .

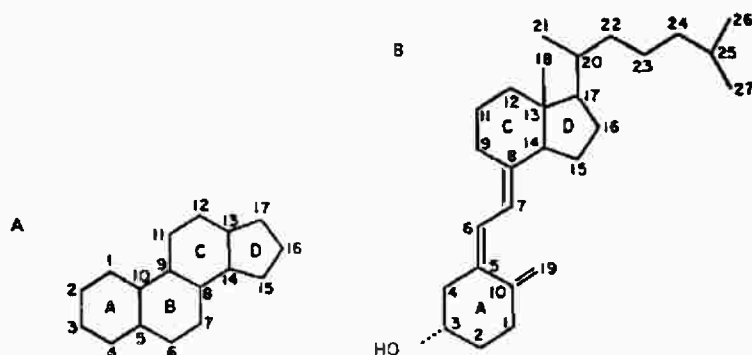
المدى الطبيعي للكاروتينات (أساساً كبيتاكاروتين وزانثوفيل xanthophyll) يكون بين ٦٠ و ٢٠٠ µg لكل ١٠٠ مل سيرم . المستويات العالية من الكاروتين في السيرم كثيراً ما تلاحظ في الأطفال الرضع وفي حالات hypothyroid وهي نتيجة لعدم قدرة الكبد على تحويل الكاروتينات إلى فيتامين أ . كما أن هناك حالات أخرى وهي زيادة المأخوذ منها مع الغذاء عن الحد اللازم (زيادة مفرطة)، وفي حالات زيادة ليبيدات الدم hyperlipemia المرتبطة بمرض السكر diabetes mellitus .

Vitamin D - فيتامين د



تشمل مجموعة فيتامين د مجموعة كبيرة من الفيتامينات تعطى أرقام من ٢ إلى ٧ وكل هذه المجموعة لها بادنات ذات تركيب أستيريدي ، ويتشعب هذه البادنات تتحول إلى فيتامين د . وشكل (٢٣) يعرض العلاقة التركيبية بين نواة الأستيريدي وفيتامين د ٣ ، كما يعرض السلاسل الجانبية لبادنات مجموعة فيتامين د والفيتامينات الناتجة منها بعد التشعب .

وتتميز هذه البادنات بتحولها إلى فيتامينات بالتشعب ، وهناك مسارات كيميائية ضوئية عديدة تسلكها هذه البادنات وشكل (٢٤) يعرض هذه المسارات .



Structural relationship of the parent steroid nucleus cyclopentano-perhydropheanthrene (A) to vitamin D₃ (B). The lettering of the four rings and the numbering of the carbon positions are in accordance with the standard IUPAC system for steroids.

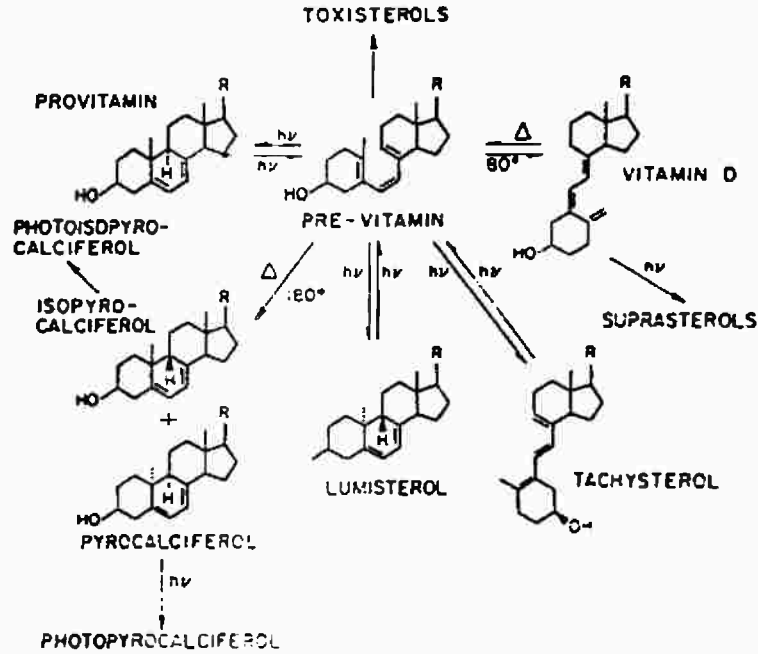
Side Chains of Provitamin D^a

Provitamin trivial name	Vitamin D produced upon irradiation	Empirical formula (complete steroid)	Side-chain structure
Ergosterol	D ₂	C ₂₈ H ₄₄ O	
7-Dehydrocholesterol	D ₃	C ₂₇ H ₄₄ O	
22,23-Dihydroergosterol	D ₄	C ₂₅ H ₄₆ O	
7-Dehydrositosterol	D ₅	C ₂₉ H ₄₈ O	
7-Dehydrostigmasterol	D ₆	C ₂₉ H ₄₆ O	
7-Dehydrocampesterol	D ₇	C ₂₈ H ₄₆ O	

^aNote that 22, 23-dihydroergosterol and 7-dehydrocampesterol are isomers at C-24.

شكل (٢٢) العلاقة التركيبية بين نواة الأستيرويد وفيتامين د ، والسلاسل

الجانبية لمادات فيتامين د ومجموعة فيتامين د الناتجة بعد تشعيها



شكل (٢٤) المسار الكيميائي الضوئي لتحويل البروفيتامين إلى فيتامين د

تفاعلاته :

مجموعة فيتامين د ثابتة للمعاملات التالية :

الأختزال :- reduction والحرارة والحامض والقلوى ، ولكنها غير ثابتة تحت ظروف الأكسدة oxidation والضوء .

الذوبان :- يذوب في المذيبات العضوية مثل الأسيتون والكلوروفورم والأيثانول والبنزين (مذيبات الليبيدات) ، ولا يذوب في الماء .

صورته :- يوجد في صورة أسترات (أسترات بالميتات palmitate) ، وصورة البلورية على شكل أبر دقيقة لالون لها ولا رائحة ، وأقصى امتصاص له (٣٤ ، ٣٥) على طول موجة ٢٦٥ nm ، ودرجة انصهارها ١١٦° م و ٨٣° م على التوالي .

انتشاره ومصادره :-

١ - وجوده في النباتات :- لا يوجد الفواكه ويوجد في زيوت الحبوب

والخضروات فى صورة بروفيتامين ، كما أنه لا يوجد فى النفل .

٢ - وجوده فى الحيوانات :- يوجد فى التونا tuna وفى زيت كبد الحوت وصفار البيض وفى اللبن المعامل بالأشعاع (UV) ، وفى العظام وأمعاء الحيوانات intestine والمخ brain والطحال spleen والكبد والدم ، كما يوجد فى بعض أنواع السمك وبعض أنواع المحار mollusks .

٣ - وجوده فى الكائنات الحية الدقيقة :- يوجد فى كل من الخميرة yeast والطالب وبعض البكتريا فى صورة بروفيتامين .

المصادر الغذائية :-

١ - المصادر الغنية :- يتراوح تركيزه فيها من ١٠٠٠ إلى ٢٥ × ١١٠ وحدة دولية لكل ١٠٠ جم ، مثل زيت السمك والتونا والحوت bonito sea bas .

٢ - المصادر المتوسطة :- يتراوح تركيزه فيها من ١٠٠ الى ١٠٠٠ وحدة دولية لكل ١٠٠ جم ، كما فى صفار البيض والمارجرين والشحوم الحيوانية lard والسالمون salmon والمأكريل mackerel و الرنجة herring والسردين sardine .

٣ - المصادر القليلة :- يتراوح تركيزه فيها من ١٠ - ١٠٠ وحدة دولية لكل ١٠٠ جم ، مثل زيوت الحبوب والخضراوات وبطارخ الحوت cod roe والزبد butter والكريمة cream و البيض والجبن cheese واللبن والكبد (بقر - خنزير - عجول - حملان) ولحم الحصان horse meat واللحم البقرى beef ولحم العجول veal .

الدور الطبى والغذائى :-

١ - وحدات فيتامين د :- وحدة دولية واحدة (IU) = ٠,٠٢٥ ميكروجرام µg

وحده دولية واحده (IU) = 1 USP

٢ - المستويات الطبيعية فى الدم :-

يبلغ تركيزه فى السيرم ٢,٧٥ ميكروجرام / ١٠٠ مل سيرم ، أو ما يعادل ٦٦ - ١٦٥

وحده دولية / ١٠٠ مل سيرم .

٣ - المقرارات الموصى بها :

للأطفال : - ٤٠٠ وحدة دولية لكل يوم .

للبالغين فى المناطق الاستوائية : - متاح فى الغذاء الطبيعى لهم .

للبالغين فى المناطق المعتدلة temperate : - ٤٠٠ وحدة دولية / يوم .

للحالات الخاصة : الحوامل والمرضعات : - ٤٠٠ وحدة دولية / يوم .

٤ - اعطاء فيتامين د :

يمكن اعطائه بعدة طرق هى :

أ - الحقن Injection : - إما تحت الجلد (s.c) أو فى الغشاء البريتونى (I.P) ، أو فى العضلات (I.M) ، ويعطى فى صورة استرات .

ب - موضعياً Topical : - يعطى فى صورة دهان حيث يمكن امتصاصه من خلال الجلد .

ج - عن طريق الفم Oral : - يعطى فى صورة كبسولات أو أقراص ، وتلك هى أفضل طريقة .

٥ - أعراض النقص : - فى حيوانات التجارب والإنسان :

١ - تأخير النمو وكساح rickets .

٢ - سوء تكوين العظام bone malformation خصوصاً الأسنان .

٣ - سوء تكوين الجهاز العظمى skelatal malformation .

٤ - قلة الكالسيوم والفوسفور الدم .

٥ - زيادة نشاط أنزيم alkaline phosphatase (A p) فى الدم .

٦ - قلة العناصر فى العظم bone demineralization .

٦ - أمراض النقص :

(١) الكساح rickets :

يعتبر الكساح مرض من امراض سوء التغذية وعاده ما يصيب الاطفال فى السنة الأولى والثانية بعد الولادة خصوصاً للأطفال التى لا تعرض لأشعة الشمس .
وأعراضه : - تقوس عظام الساقين وأعراض أخرى مثل فقر الدم والأرتخاء ، ومن أهم أسباب ظهوره نقص فيتامين د فى الجسم وذلك قد يرجع الى : -

أ - الرضاعة الاصطناعية .

ب - قلة التعرض لأشعة الشمس أو عدمه .

ج - فساد نظام الطفل الغذائى .

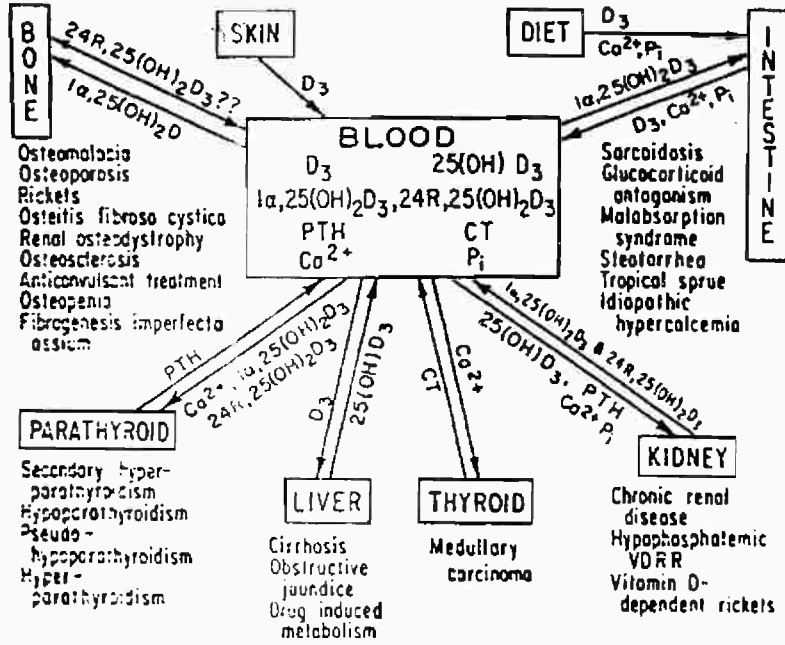
د - التسم المزمن ، وذلك بتناول الأدوية السامة مدة طويلة من الزمن .

(٢) مرض لين العظام عند البالغين osteomalacia .

(٣) التهاب اللثة ونزفها .

(٤) امراض أخرى .

أثبت العلم الحديث إن فيتامين د له صلة وثيقة بكثير من اعضاء الجسم مثل الامعاء الدقيقة والكلى و الكبد والعظام ، كما أنه على علاقة بالغدة الدرقية وبالغدة الجاردرقيه . وبذلك فإن هناك حالات مرضية كثيرة فى الإنسان ترتبط بفيتامين د . وشكل (٢٥) يلخص الحالات المرضية فى الإنسان وعلاقتها بفيتامين د .



شكل (٢٥) الحالات المرضية في الإنسان التي على صلة بفيتامين د

٧ - معاملة حالات نقص فيتامين د :

بالنسبة للأطفال الرضع infants المصابة بنقص فيتامين د تعطى ١٥٠٠ - ٢٥٠٠ وحدة USP من الفيتامين يومياً لمدة عدة شهور ، وتتضاعف هذه الجرعة بالنسبة للأطفال قبل سن البلوغ premature infants .

٨ - مصادره للأجناس التي تحتاج إليه :

كل الفقاريات تحتاج إليه (يعتبر فيتامين بالنسبة لها) .

أ - المصادر الخارجية : تحتاج إليه أطفال الفقاريات الرضع من المصادر الخارجية ، وأيضاً تحتاجه الفقاريات البالغة من المصادر الخارجية .

ب - المصادر الداخلية : يمكن للفقاريات الاستفادة من مصادر البروفيتامين الداخلية التي بها عن طريق التعرض لأشعة UV .

٩ - تأثير الجرعات العالية من الفيتامين على الإنسان :

إذا تناول الإنسان حوالى ٤٠٠٠ وحدة يولية / يوم أو أكثر فإنها تسبب الأعراض

التالية : اسهال diarrhea ، والتبول بكثرة poly uria ، وضعف العضلات muscular weakness ، وآلام فى المفاصل joint pains ، وزيادة الكالسيوم فى السيرم ، وتكلس calcification الأنسجة الرخوة (شرايين arteries وعضلات) ، وتلف شريانى arterial lesions ، وضرر كلوى Kideny injury ، و anorexia ، و thirst ، و nausea .

فصل وتقدير فيتامين د

أ - الاستخلاص :

يعتبر فيتامين د أكثر ثباتاً للأكسدة من فيتامين أ، لذلك فإن عملية فقدته أثناء الاستخلاص أقل . وأحسن طريقة للاستخلاص هى إجراء التصبن بأيدروكسيد بوتاسيوم كحولى ثم يليه استخلاص إيثيرى للمواد الغير متصبنة . ويمكن إضافة حمض الأسكوربيك كمادة مضادة للأكسدة كما سبق . وعند تحليل فيتامين د فى الأغذية يكون من المناسب أستخلاص من ٥٠ - ١٠٠ جم من المادة تحت التحليل وذلك لقلّة مستويات فيتامين د فيها . وأسهل طريقة لحل هذه المشكلة (كبر المادة المحللة نسبياً) ، هى استخلاص الدهون من العينة قبل التصبن ، فيما عدا إذا عرف مسبقاً وجود إستركبريتات الكولكالسيفيرونل cholecalciferol sulphate ester الذائب فى الماء كما فى لبن الإنسان والبقرة ، فلا بد من أخذ الاحتياط اللازم عند إجراء pre - extraction للدهن .

ب - الفصل والقياس :

الطرق الطبيعية - الكيميائية physico - chemical methods المختارة والمتاحة لتقديره هى القياسات اللونية والفلوريمترية وفى الـ UV والطرق الكروماتوجرافية المختلفة (HPLC - TLC - GC - الأعمدة) . والقياس اللونى ليس دقيقاً نظراً لافتقاده للدقة والتخصص خصوصاً فى عدم مقدرة هذا القياس فى التمييز بين الكولكالسيفيرونل والأرجوكالسيفيرونل . فى بعض الأغذية ذات مستويات كولكالسيفيرونل منخفضة جداً (أقل من ١ ميكروجرام / ١٠٠ جم) مثل الزيت والجبن واللبن ، وجد أن أحسن طريقة متاحة هى الطرق الحيوية باستخدام الحيوانات . وعموماً ففى الطرق الطبيعية - الكيميائية السابقة من

الضروري إجراء تنقية مبدئية للمستخلصات ، وعاده ما تكون بواسطة الفصل الكروماتوجرافي chromatographic separation .

وحيث أن فيتامين د يعتبر كاسترويد steroid ، فإنه من الأفضل استخلاصه من الأنسجة بطرق استخلاص الليبيدات الكلية (كلوروفورم : ميثانول = ٢ : ١) وبعد استخلاصه يمكن فصله هو ونواتج تمثيله metabolites باستعمال الطرق الكروماتوجرافية المختلفة . والفصل بطرق الكروماتوجرافي الورقي يتطلب وقتاً طويلاً ويعطى فصلاً غير واضحاً . مع إن الـ GC مفيد في هذا الفصل إلا أنه يعطى تشابه حراري thermal isomerization حيث يتحول فيتامين د إلى بيروكالسيفيرول pyrocalciferol وأيزوبيروكالسيفيرول isopyrocalciferol ، لذلك يفضل عنه الفصل بالأعمدة الكروماتوجرافية . ويمكن استخدام السيليكاجيل أو الألومينا أو floridin أو celite أو سيفادكس 20 - LH كموا د دعامية supports . وأحسنها هو السيفادكس لأنه يعطى فصل جيد خصوصاً لنواتج تمثيله في وقت سريع . وقد طبق الآن حديثاً الـ HPLC وقد كان أسرعها وأعطى نتائج جيدة .

وتفتقر الطرق الطبيعية أو الكيميائية إلى الحساسية مقارنة بالطرق الحيوية لذلك فالطرق الطبيعية - الكيميائية غير مناسبة لتقدير فيتامين د في مصادره الفقيرة ، ولكن أفضليتها تكون في العينات ذات المستوى العالي من الفيتامين لقلة الوقت الذي تستهلكه .

١- الامتصاص في منطقة الأشعة فوق البنفسجية UV absorpion : -

أول التكنيكات المتاحة للتقدير الكمي لفيتامين د تعتمد على قياس الامتصاص في الـ UV على طول موجة ٢٦٤ nm . فيستجيب نظام الروابط الزوجية الثلاث المتبادلة triene في أستيرويدات فيتامين د لطيف الـ UV ، حيث يحدث أقصى امتصاص لها عند طول موجة ٢٦٤ nm . وعلى ذلك يمكن حساب تركيز فيتامين د في محلوله من هذه الخاصية ، وذلك في وجود محلول قياسي له . ومع أن هذا التكنيك يتمتع بالسهولة والسرعة إلا أن أهم عيوبه أنه يجب أن تكون العينة نقية تماماً من أي مواد متداخلة لها امتصاص على طول موجة ٢٦٤ nm .

٢ - الطرق اللونية : -

تم اكتشاف عدة طرق لونية للتقدير الكمي لفيتامين د منذ سنوات عديدة . وهي تعتمد على عملية تشابه isomerization لفيتامين د إلى أيزوتاكسيستيرول isotachysterol . وهذه الطرق تستعمل ثالث كلوريد الأنثيمون ، والذي يمكنه الكشف عن فيتامين د بمدى يتراوح من ١ إلى ١٠٠٠ ميكروجرام . وحيث أنه يمكنه الكشف عن تركيزات عالية من الفيتامين ، فإن هذا التقدير يستخدم مبدئياً لتقدير محتوى فيتامين د في المستحضرات الطبية . وأصبحت هذه الطريقة الرسمية (official USP) لتقدير فيتامين د ٣ . وفي هذا التقدير يتم تحضير أربعة أنابيب اختبار ، الأولى تحتوى على فيتامين د قياسي ، والثانية تحتوى على العينة المجهولة مضافاً إليهما جوهر اظهار اللون color reagent ، والثالثة تحتوى على المذيب فقط وكلوريد الايثيلين ethylene chlororide مضافاً إليها جوهر اظهار اللون ، والرابعة تحتوى على كلوريد الايثيلين وأندريد خليك وجوهر اظهار اللون ، ويقاس الامتصاص على طول موجة ٥٠٠ nm بعد ٤٥ ثانية من اضافة الجوهر . ويتناسب تركيز الفيتامين مع امتصاصه والذي يتم تعديله ببلاطك المذيب وبالأنبوبة التي تحتوى على أندريد حمض الخليك . والطريقة تتبع قانون بير Beer's law إذا احتوت المحاليل على ٥٠ - ١٠٠ وحدة دولية من الفيتامين لكل مل من المحلول ، والتي غالباً توجد في العينات الطبية . أما في المستحضرات الأخرى ، فيلزم عملية تنقيه اما بكميات جرافى الامصاص أو التوزيع ، وبذلك تستهلك وقت أطول .

وقد قام Nield بتعديل جوهر كار - بريس المستخدم في تقدير فيتامين أ وذلك بأضافة كلوريد الأسيتيل acetyl chloride إلى ثالث كلوريد الأنثيمون المذاب فى 1, 2 dichloroethane مباشرة قبل الاستعمال . فيظهر معقد ملون بلون وردى pink سرعان ما يختفى مع فيتامين د ذات أقصى امتصاص على طول موجة ٥٠٠ nm بدون امتصاص على الموجتين السابقتين . ويثبط اللون بأضافة أندريد حمض الخليك . ومشكلة هذه الطريقة هي عدم تمييزها بين الأرجوكالسيفيرول والكلوكالسيفيرول .

وحيث أن هذا الجوهر غير متخصص ، فإنه من الضروري التخلص من الاستيرويدات sterols والكاروتينويدات وفيتامين أ قبل التقدير . وفي طريقة تقدير فيتامين د فى اللبن ، يتم اجراء عملية التصبن مرتين ثم يليهما ترسيب بالاستيرويدات بالـ digitonin ثم يمرر

المستخلص بعد ذلك على عمود كروماتوجرافى يحتوى على celit - poly- ethylene أو الومينا قاعدية غير نشطة بـ 8٪ ماء، ثم تتم عملية الاحلال بـ (2,2,4- triethylpropane (isooctane هذا وحساسية هذه الطريقة حوالى ٠,٢ ميكروجرام .

٣ - طرق الفلورة :

يتم تقدير الفيتامين على أساس تفاعله مع جوهر معين فينتج مركب له خاصية الفلورة . وتعتمد هذه الطرق على حقيقة ، وهى أن محلول أندريد حمض الخليك - حمض الكبريتيك الذى يحتوى على فيتامين د قادر على الفلورة إذا نشط المحلول بضوء ذات طول موجة معينة بالضبط . وكما فى الطرق اللونية فإنه تتداخل مجموعة من المركبات ذات التركيب المشابه للفيتامين فى خاصية الفلورة . وهذه الطرق عادة لا تستخدم فى تقدير تركيز فيتامين د فى مستحضراته .

٤ - الكروماتوجرافى الغازى (GC) :

يفضل الـ GC فى فصل وتقدير فيتامين د ومشابهاته عن الطرق اللونية لتقدير د_٣ ، د_٣ ، فلو حقن د_٣ و د_٣ فى جهاز GC ، فإن درجة الحرارة اللازمة لتطايرهما تكون أكبر من ٢٠٠ °م ، ويحدث لهما تحلق تركيبى بالحرارة thermal cyclisation وتعطى كروماتوجرام ذو two peaks لكل فيتامين (4 peaks) ، وهما للمشابهات البيرو pyro والايروبىرو isopyro لكل من د_٣ و د_٣ . وتستخدم هذه المشابهات الحرارية فى تقدير فيتامين د كميأ . أما الايزوتاكيستيرون isotaachysterol فلا يتحلق not cyclise ويعطى peak واحد . ويحدث لفيتامين د عملية تكوين مشابهات أخرى مع ثالث كلوريد الانتيمون فى الكلوروفورم أو مع حمض الأرثوفوسفوريك ortho phosphoric acid فى حمض خليك أو مع ثالث فلوريد الخليك TFA ، ويتحسن الكروماتوجرام (الفصل يكون أحسن) لو تحولت مجاميع الهيدروكسيل فى الفيتامين ومشتقاته إلى إيثيرات السيليل silyl ethers ويتم تكوين مشتق إيثير ثلاثى ميثايل السيليل (TMS) trimethyl silyl بالتفاعل مع N,O,bis- (trimethylsilyl) acetamide . ومن ميزة هذه الطريقة أنه يمكن استعمال أى صورة للفيتامين كمرجع داخلى internal

standard بشرط عدم وجودها فى العينة تحت الدراسة .

وكما هو متبع فى الطرق اللونية ، لابد من تنقية مستخلص العينة قبل الحقن فى الـ GC ، ويمكن استخدام الـ TLC - سيليكاجيل كفصل مبدئى قبل الـ GC .

٥ - GC - Mass Spectrometry " GC - MS " :

وهذا تكتيك حديث أعطى نتائج جيدة . وتم تطبيقه بنجاح على عينات تحتوى على أستيرويدات . وفى التكتيك يتصل الـ MS بالـ GC ، وبجهاز كمبيوتر يحتوى على كل المعلومات الخاصة بأجزاء الأستيرويدات عند تكسيدها (fragments) . فبعد فصل الفيتامين ومشتقاته بالـ GC يتم تحليل كل منهما بالـ MS وتحلل الناتج فى الكمبيوتر . هذا وما زال هذا التكتيك فى مراحل التطور الأولى .

٦ - HPLC :

أستخدم هذا التكتيك فى التحليل الكمى والوصفى لفيتامين د ونواتج تمثيله المختلفة ، ويستخدم فيها كواشف UV فى الكشف عن النواتج المفصولة ، وكانت حساسيتها ٥ نانوجرام ng ، ومن أهم مميزاتا قلة الجهد والوقت اللازمين للتحليل . وفى طريقة الـ USP الرسمية لتقدير فيتامين د يلزم لها خطوتين للتنقية يأخذا أكثر من ٨ ساعات قبل التحليل اللونى ، أما هذا التكتيك فيحتاج إلى أقل من ساعة هذا بالإضافة إلى كفاءة وفعالية وحساسية التقدير .

٧ - التقديرات الحيوية Biological assay :

بأستثناء فيتامين ب_{١٢} (Vit . B₁₂) ، يعتبر فيتامين د هو أكبر الفيتامينات فاعلية (كتعريف بكميه الفيتامين اللازمة لأظهار أستجابه حيوية) . وعلى ذلك فإن العينات البيولوجية والأنسجة الحيوانية عادة ما تحتوى على تركيزات صغيرة جداً من فيتامين د . فمثلاً مستوى فيتامين د فى بلازما دم الإنسان فقط ١٠-٢٠ نانوجرام/مل أو ٥-١٠ × ١٠^{-١٠} M وحتى يمكن تقدير هذا التركيز المنخفض جداً فلا بد من وجود طريقة حساسه ومتخصصة للتقدير .

ومن أهم الطرق المستخدمة فى هذا المجال ما يلى :

(١) Rat Line Test :

من عام ١٩٢٢ إلى ١٩٥٨ استخدمت هذه الطريقة كطريقة رسمية في تقدير فيتامين د في المستحضرات الطبية والأغذية . وهذه الطريقة قادرة على الكشف عن ١ - ١٢ وحدة دولية (٢٥ - ٢٠٠ نانوجرام) من فيتامين د ، وما زالت تستخدم حتى الآن في تقديره في عديد من الأغذية خصوصاً اللبن . وهذه الطريقة تستخدم فنران مفلطمة حديثاً وكسيحة recently weaned rachitic rats ، وتغذى هذه الفئران على عليقة مسببة للكساح rachitogenic diet ، وتغذى هذه الفئران على عليقة مسببة للكساح severe . ثم تقسم الفئران إلى مجاميع كل منها يحتوى على ٧ - ١٠ حيوانات وتغذى على علائق مدعمة بتركيزات متدرجة من الفيتامين (graded series) حيث تعتبر كمجموعته قياسية ، وتغذى مجموعة أخرى على العينة المجهولة المختبرة ، ويتم المحافظة على التغذية على هذه العلائق لمدة ٧ أيام ، ثم تشرح dissect radii ، وتنظف عظام الزند ulnae من الأنسجة اللاصقة بها ، وتقطع لشرائح slice بالطول وتوضع في محلول نترات فضة حيث يتم ترسيب deposition الفضة في مناطق العظام المتكونة حديثاً بتأثير المعاملة بفيتامين د ، ففي مكان ترسيب الكالسيوم الجديد ، تبدو هذه المناطق سوداء عند تعريضها للضوء ، وبذلك يمكن تقدير تأثير العينة المجهولة على ترسيب الكالسيوم في العظام بالمقارنة المرئية في وجود المعاملات القياسية .

(٢) AOAC chick assay :

وحيث أن rat line test يتم في الفئران ، فهو لا يميز بين فيتامين د_٢ و د_٣ ، وحتى يمكن قياس فيتامين د_٣ فإنها تتم على كتاكيت chicks . ففي الكتاكيت يكون جهد (فاعلية) فيتامين د_٣ أكبر ١٠ مرات من فيتامين د_٢ ، وهذا التقدير يعرف باسم AOAC chick assay ، وهو اساس للتقدير الدقيق لمستوى فيتامين د_٣ في مغذيات النواجن poultry feed . ويتم هذا التقدير بتغذية مجاميع من كتاكيت حديثة الفقس newly hatched كل منها ٢٠ كتكوت وتغذى على عليقة ناقصة في فيتامين د Vit. D deficient diet ، ثم تمد كل مجموعة بكميات معلومة ومختلفة من فيتامين د إما عن طريق الفم orally أو من خلال الوجبة dietarily وبكميات تتراوح من ١ إلى ١٠ وحدات دولية (٢٥ - ٢٥٠ نانوجرام) ، أو تمد بالمادة المختبرة في

العينة . ثم تستمر هذه المعاملة لمدة ٢ أسابيع بعدها تذبح الحيوانات وتقدر النسبة المئوية للرماد فى عظام bone ash الساق الاكبر tibiae لها . فعظام الطائر المصاب بكساح عادة ما يحتوى على ٢٥ - ٢٧ ٪ رماد بينما الطيور المدعمة بفيتامين د ذات ٤٠ - ٤٥ ٪ رماد . ولا تستعمل هذه الطريقة كثيراً لأنها تستهلك وقتاً طويلاً ومكلفه .

(٣) **أمتصاص الكالسيوم من الأمعاء Intestinal calcium absorption :-**
أستخدمت طرق حيوية أخرى على أساس قدرة فيتامين د على حث stimulate امتصاص الكالسيوم عبر الأمعاء الدقيقة . وفى هذه الطريقة أستغلت تلك الظاهرة ، وفيها يتم قياس تأثير المادة المختبرة على الكالسيوم المعوى المأخوذ intestinal Ca uptake فى تجارب تتم داخل الكائن الحى *in vivo* ، وفى بعض الطرق الأخرى كانت خارجه *in vitro* . وكل منهما له القدرة على كشف كميات فسيولوجية مثل ٢ - ٥٠ وحدة دولية (٥٠ - ١٢٥٠ ناتوجرام أو ١٣ ، ٠ - ٣ ، ٢ نانومول n mol) من فيتامين د . ويمكن توضيح فكرة عن هذه الطرق كما يلى :-

(أ) **التقدير داخل الكائن الحى *In vivo* technique :-**

وفى هذا التكنيك تستعمل ككتايت كسيحة مرباة على عليقة بها كالسيوم قليل (٠ ، ٦ ٪) ومسببة للكساح لمدة ٢ أسابيع ، ثم تعطى الطيور جرعة واحدة من المركب المختبر إما عن طريق الفم أو فى الغشاء البريتونى I.P أو فى داخل القلب intracardially . تخدر anesthetize الطيور بعد ٤٨ ساعة من الحقن ، ثم يعمل بها جرح incision صغير على البطن abdomen ويخرج من الجرح الأثنى عشر duodenal loop ويحقن بـ ٠ ، ٢ مل من محلول يحتوى على ٤ ، ٠ ملجم أيون كالسيوم $^{40}\text{Ca}^{++}$ وحوالى 6×10^6 DPM من كالسيوم مشع $^{45}\text{Ca}^{++}$. ثم يعاد الأثنى عشر مرة أخرى إلى التجويف البريتونى peritoneal cavity وتقل الفتحة بمشبك جروح wound clip ، ثم تذبح الكتاكيت بعد ٣٠ ق بفصل رأسها عن الجسم decapitation ويجمع دمها ويفصل منه السيرم ويؤخذ منه جزء صغير ليقدر فيه $^{45}\text{Ca}^{++}$ إما بعداد جايجر Geiger - Muller Counter أو بواسطة

Liquid Scintillation Counter

ب () التقدير خارج الكائن الحي *In vitro* technique :-

ويجرى التقدير خارج الكائن الحي بتقييم نشاط فيتامين د في حثه على نقل الكالسيوم في الأمعاء الدقيقة . وفي هذه التكنيكات يتم قلب عقد معوية intestinal loops وتحقن تحت ظروف *in vitro* بواسطة محلول كالسيوم مشع $^{45}\text{Ca}^{++}$. والتقدير يعتمد على حقيقة وهي أن السطح الميكروزي mucosal surface للنسيج سوف ينقل نشاط الكالسيوم خلال النسيج إلى الجانب المصلي الممزق serosal side للأمعاء . وقياس نسبة الكالسيوم المشع radioactive على جانبي الأمعاء (المخاطي والمصلي) بعد التحضين يعطى قياس قدرة الأمعاء intestine's ability على امتصاص الكالسيوم ، ومنها يمكن ايجاد كميته نشاط فيتامين د . وفي هذا التقدير يعطى كل من الفيتامين القياسى والمختبر عن طريق الفم أو فى الغشاء البريتونى قبل التقدير بمدة ٢٤ - ٤٨ ساعة ، ثم بعد ذلك تقتل الحيوانات ويؤخذ منها طول قدره ١٠ سم من الاثنى عشر duodenum وتقلب ثم يربط طرفيها ، وبذلك تصبح فى صورة كيس معوى gut sac نو سطح ميكروزي من الخارج outside و سطح مصلى من الداخل inside . ويملء الفراغ الداخلى لهذه الأكياس بواسطة ٠,٤ - ٠,٦ مل من بيئة تحضين تحتوى على $^{45}\text{Ca}^{++}$ ثم تحضن فى دورق يحتوى على ٢ - ٥ مل من بيئة $^{45}\text{Ca}^{++}$ لمدة ٢ - ٢ ساعة . تؤخذ أجزاء من كل وسط (الخارجى والداخلى) ويقدر فى كل منها النشاط الاشعاعى . ويعبر عن النتائج بنسبة الكالسيوم المشع فى كل منهما ، وفى الحيوانات المصابة بنقص فى فيتامين د تكون هذه النسبة ١ - ٢,٥ بينما فى الحيوان الذى أخذ فيتامين د تكون عالية فهي تتراوح بين ٦ - ٧ . وحيث أن طبيعة هذا التقدير مملّة ، فعادة ما يفضل التقدير داخل الكتاكيت *chick in vivo* . وهذا التكنيك (*in vivo*) يستخدم بكثرة فى الدراسات على الثدييات mammals عما فى الطيور .

٤ () ذوبان كالسيوم العظام Bone calcium mobilization :-

قياس آخر لنشاط فيتامين د غالباً ما يستعمل مقترناً مع بقياس امتصاص الكالسيوم فى أمعاء الكتاكيت ، وهو قياس ارتفاع الكالسيوم بالزيادة المتوسطة لفيتامين د . ويستخدم فى هذا التقدير كتاكيت كسيحة عمر ٢ أسابيع مغذاة على عليقة خالية من الكالسيوم لمدة ٢

أيام على الأقل قبل التقدير . وتلك الحالة تظهر مستويات منخفضة لكالسيوم السيرم (عادة ٤,٥ - ٥,٠ ملجم لكل ١٠٠ مل سيرم) . فلو أخذت هذه الطيور فيتامين د ، تحدث زيادة عالية لمستويات كالسيوم السيرم خلال ٢٤ - ٤٨ ساعة ، وهذه الزيادة تتناسب طردياً مع جرعة فيتامين د المعطاة ، وحيث أنه لا يوجد كالسيوم غذائي متاح (ميسر) ، فيكون المصدر الوحيد للكالسيوم اللازم لزيادة في السيرم هو العظم . وباستخدام هذا التقدير مع تقدير أمتصاص الكالسيوم من الأمعاء يمكن قياس وجهين مختلفين معاً لاستجابة الحيوان لفيتامين د .

٥) معدل النمو Growth rate : -

استجابة أخرى لفيتامين د وهي زيادة معدل النمو استجابة لأعطاء فيتامين د . وفي هذا القياس تربى ككتاكيت عمر يوم واحد على عليقة مسببة للكساح ثم تعطى كميات قياسية من فيتامين د٣ أو المركب المختبر ثلاث مرات يومياً . ويتم جدولة وزن الطيور ، وترسم علاقة الوزن مع العمر .

ففي حالة غياب فيتامين د من الضروري أن يستقر معدل النمو حتى الأسبوع الرابع . بينما ٥٠ وحدة دولية من فيتامين د لكل أسبوع تكون كافية للمحافظة على أقصى معدل maximal rate لنمو الكتاكيت . عائق هذه الطريقة هو المدة الطويلة لحد ما (٣ - ٤ أسابيع) ، واللازمة للتقدير الدقيق لمعدل النمو .

٦) التقدير المناعي للـ CaBP : -

وهذا يشمل ثلاث أنواع من الطرق المناعية لتقدير CaBP وهي : -

- a - Radial Immunoassay .
- b - Radioimmunoassay (RIA) .
- c- Enzyme - Linked Immunosorbant Assay (ELISA) .

فهذه الطرق هي أحدث الطرق البيولوجية ، حيث تستعمل وجود بروتين ربط الكالسيوم Ca - Binding Protein (CaBP) كدلالة لنشاط فيتامين د . فهذا البروتين الذي يعتمد على فيتامين د لايوجد في أمعاء الكتاكيت المصابة بنقص فيتامين د ويخلق في الأمعاء استجابة

لاعطاء فيتامين د . فالتكنيك الاول (a) قادر على كشف كميات ميكروجرامات من CaBP .
أما تكنيك كل من RIA , ELISA فكلاهما قادر على كشف كميات نانوجرامات من CaBP .
وعلى ذلك فهذه التقديرات تسمح بتقدير نشاط فيتامين د .

هذا ويعرض جدول (١٩) الفروق الأساسية بين حساسية الطرق الحيوية المختلفة

لتقدير فيتامين د .

Assay	Time required for assay	Minimal level detectable in assay		Usual working range
		ng	nmol	
Rat line test	7 days	12	0.03	25-300 ng
AOAC chick Intestinal Ca ²⁺ absorption	21 days	50	0.13	50-1250 ng
In vivo				
⁴⁵ Ca ²⁺	1 day	125	0.33	0.125-25 g
⁴⁷ Ca ²⁺	1 day	125	0.33	0.125-25 g
In vitro				
Everted sacs	1 day	250	0.65	250-1000 ng
Duodenal uptake of ⁴⁵ Ca ²⁺	1 day	250	0.65	250-1000 ng
Bone Ca ²⁺ mobilization				
In vivo	24 hr	125	0.32	0.125-25 g
Body growth	21-28 days	50	0.06	50-1250 ng
Immunoassays for calcium- binding protein	1 day	1	0.0025	1-20 ng

جدول (١٩) فروق الحساسية بين الطرق الحيوية المختلفة لتقدير فيتامين د .

الاختبار اللوني لفيتامين د (Stroev and Makarova, 1989)

يعتمد الاختبار على خاصية فيتامين د في تفاعله مع الأنيلين ، فعند تفاعل فيتامين د مع

الأنيلين - هيدروكلوريد تتكون نواتج ملونة .

الجواهر الكشفية :-

١ - زيت سمك .

٢ - جوهر الأنيلين - هيدروكلوريد ١٪ .

التكنيك :-

١ - فى أنبوبة اختبار نظيفة جافة ، يؤخذ ١٠ نقط من جوهر الأنيلين ثم يضاف إليها ٥ نقط من زيت السمك.

٢ - تسخن محتويات الأنبوبة بحذر شديد حتى الغليان مع الرج باستمرار

٣ - يغلى المخلوط لمدة ٢٠ ثانية .

٤ - فى حالة وجود فيتامين د ، يتكون مستحلب أصفر yellow emulsion فى البداية ثم يتحول إلى لون أخضر داكن dingy - green ثم إلى لون بنى - أحمر أو أحمر.

تقدير فيتامين د بالطريقة اللونية (Gyorgy and Rubin , 1950)

من خواص فيتامين د أنه يعطى لون برتقالى مع ثلاثى كلوريد الأنثيمون ، وأستغل هذا الأساس فى تقديرة لونياً ، ولكن تتمثل صعوبة تقديره فى طول خطوات أستخلاصه فى صورة نقية فعند اضافة محلول $SbCl_3$ الخالى من الكحول والجاف (مذاب فى كلوروفورم) إلى محلول فيتامين د_٣ أو د_٢ ، فإنه يتكون لون برتقالى يمكن قياسه سبكتروفو تومترياً أو بواسطة جهاز قياس الألوان على طول موجة ٥٠٠ nm . ومما هو جدير بالذكر إن ال tachysterol يعطى نفس التفاعل الذى يعطيه فيتامين د_٢ أو د_٣ . أما اذا وجدت الأستيرولات sterols مثل الكوليسيتروول فإنها لا تتداخل مع التفاعل حتى تركيز ٨٠ ضعف من تركيز فيتامين د فى المحلول المختبر . فيتامين أ أيضاً يعطى تفاعل كار - بريس مع $SbCl_3$ والذى له أقصى امتصاص مختلف (٦٢٠ nm) ، وعلى ذلك فهو لا يتداخل مع تقدير فيتامين د بشرط ألا يزيد تركيزه عن ٦ أضعاف تركيز فيتامين د . وإزالة جميع المواد المتداخلة مع التفاعل بواسطة طرق كروماتوجرافى الادمصاص يزيد حساسية التفاعل اللونى الخاص بتقدير فيتامين د .

الأعمدة الكروماتوجرافية :-

يلزم للفصل الكروماتوجرافى أعمدة 1.6×15 سم من زجاج البيركس ، وتنظف جيداً قبل أن تملء بعامل الإدمصاص بنقعها فى محلول حمض كروميك - $H_2 SO_4$ Conc. dichromic acid ، ثم تشطف جيداً بالماء ثم بالكحول وأخيراً تجفف جيداً .

وعامل الإدمصاص المستخدم يجب أن يكون على درجة عالية من النقاوة (AR) ، وعامل الإدمصاص المناسب هو (superfiltrol) activated bentonite clay ، وأعمدة الفصل الأولى تحضر بوضع قطعة صغيرة من القطن فى قاع العمود ويوضع عليها عامل الإدمصاص حتى ارتفاع 6 سم (مع مراعاة ملء العمود بالطريقة الصحيحة باستخدام التفريغ إذا لزم الأمر) . ونستمر فى ملء العمود بعامل الإدمصاص حتى يصبح ارتفاعه فى العمود المعبأ هو 3 سم . والأعمدة الأخرى اللازمة لفصل فيتامين د عن الأسيترولات تحضر بنفس الطريقة ، فيما عدا إن ارتفاع عامل الإدمصاص فى العمود المعبأ النهائى هو 1.5 سم.

الجواهر الكشفية :-

١ - عامل الإدمصاص Superfiltrol .

٢ - محلول KOH كحولية :- ويحضر بإذابة ١٤ جم KOH نقيه فى كحول إيثايل ٩٥٪ ويكمل إلى ٥٠٠ مل . ويجب المحافظة على هذا المحلول من غاز CO_2 ، كما يستعمل الرائق منه .

٣ - إيثير ثنائى الأيثايل AR : يمكن استخدامه بدون تنقيه لعملية أستخلاص المواد الغير متصبنه ولعملية الأحلال من العمود .

٤ - إيثير ثنائى الأيثايل AR لامائى (جاف) :- وينقى هذا الإيثير بغسيله بمحلول $Fe SO_4$ ١٪ لازاله البيروكسيدات منه ، ثم غسيله ١٠ مرات بالماء المقطر لازالة الكحول ، ويجفف بواسطة $P_2 O_5$ ثم يرشح ويخزن ومعه صوديوم ويقطر للتخلص من الصوديوم اذا لزم الأمر . يستخدم هذا الإيثير للفصل الكروماتوجرافى .

٥ - Skellysolve - : وينقى بالرج مع H_2SO_4 conc. ثم يغسل مرتين بمحلول ١٠٪
 ٥٪ Na_2CO_3 ثم بمحلول مكون من ١٠٪ Na_2CO_3 و ٥٪ $KMnO_4$ ، ويغسل
 ١٥ مرة بالماء المقطر وينقل إلى ورق جاف ويجفف بالصوديوم ، ثم بعد ذلك يقطر
 على $٦٨ - ٧٠^\circ C$ (للتخلص من الصوديوم) ، ويستبعد أول ٥٪ من المقطر وآخر
 ١٠٪ من ناتج التقطير .

٦ - كحول أيثايل مطلق .

٧ - كلوروفورم نقي (AR) : - يغسل بحوالي ٧ أمثال حجمة بالماء ثم يجفف بـ
 K_2CO_3 لامائية ، ويقطر (يستبعد أول ١٠٪ من ناتج التقطير) . وهذا
 الكلوروفورم المنقى نسبياً غير ثابت ، لذلك فيحضر بكميات صغيرة ويحفظ بعيداً
 عن الضوء ، وقبل أستعماله يختبر بمحلول نترات فضة (للكشف عن الكلوريدات) ،
 وبمحلول KI ونشأ (للكشف عن العوامل المؤكسدة) . في حاله عدم وجود هذه
 العوامل ، يرج الكلوروفورم مع فحم نشط ويرشح قبل الأستعمال مباشرة .

٨ - جوهـر $SbCl_3$: - ويحضر بإذابة ١٨ جم $SbCl_3$ (AR) في كلوروفورم نقي ، ثم
 يخفف إلى ١٠٠ مل ويضاف إليه بعد ذلك ٢ مل كلوريد أستيل acetyl chloide
 مقطر . والحصول على أفضل نتائج يحضر هذا الجوهـر وقت التقدير .

٩ - ثيوفين thiophen (AR) خالي من البنزين : - ويجفف بالصوديوم ، ثم يقطر
 ويرج مع superfiltrol قبل الأستعمال .

التكنيك : -

١ - توزن عينة زيت سمك بالضبط في ورق مخروطي ١٢٥ مل (العينات) التي
 تحتوي على ٤٠٠٠ - ١٠٠٠٠٠ وحدة USP من فيتامين د مناسبة لهذا التحليل) ،
 وفي حالة الزيوت الطبيعية تكون الوزن حوالى ٥٠ - ٢٠٠ جم بالضبط . اما في
 حاله المركبات تكون حوالى ١٠٠ جم بالضبط .

٢ - في حاله العينات التي وزنها ١ جم أو أقل ، يضاف ١٠ مل من محلول KOH

الكحولية ، أما فى حالة العينات الأكثر من ذلك فيضاف ١٠ مل KOH كحولية لكل ١ جم عينة .

٢ - تتم عملية التصبن فى حمام مائى على ٧٠ - ٧٥ °م فى وجود مكثف عاكس لمدة ساعة أو أكثر إذا لم تكتمل عملية التصبن ، ويرج النورق كل حين للمساعدة على اتمام التفاعل (عند هذه النقطة يمكن ترك العينة طوال الليل) .

٤ - تبرد العينة إلى درجة حرارة الغرفة ، ثم يضاف ٢٠ مل ماء لكل ١٠ مل من محلول KOH الكحولية ، وبعد ذلك تستخلص المواد الغير متصينة فى قمع فصل بالإيثير ٤ مرات (٢٥ مل لكل مرة) . وفى حالة تكون مستحلبات عند الفصل ، يضاف بضع نقط من الكحول لكسر هذا المستحلب . وأخيراً تجمع المستخلصات الإيثيرية مع بعضها البعض .

٥ - يغسل المستخلص الإيثيرى بـ ٥٠ مل ماء ، وعندما تكون الطبقتين رائقتين ، تهمل طبقة الماء وتكرر عملية الغسيل مرتين (٥٠ مل ماء لكل مرة) . الرج أثناء هذه العملية قد يسبب تكوين مستحلب ، ولكسره يضاف ٢ مل كحول و ٢٥ مل ماء ويرج جيداً ويترك حتى تنفصل الطبقتين . وتتم عملية الغسيل عدة مرات حتى يصبح الماء الناتج من الغسيل متعادل التأثير ولا يحتوى على أى آثار للقلوية (يختبر بدليل فينول فيثالين) .

٦ - يجفف المستخلص الإيثيرى بترشيحه خلال كبريتات صوديوم لامائية مع مرعاة غسيل قمع الفصل وكبريتات الصوديوم بـ ٢٥ مل إيثير إضافية لإزالة كل فيتامين د العالق بها . ولابد أن يكون المحلول عديم اللون .

٧ - يبخر الإيثير من المستخلص حتى الجفاف تحت ضغط منخفض فى حمام مائى على ٥٠ °م ، ثم تذاب المادة الباقية الجافة فى ٥ مل من مخلوط مذيبات خاص تم تحضيره من المذيبات النقاة (٥٠ جزء Skellysolve و ١٠ أجزاء إيثير جاف و جزء واحد من الكحول المطلق) . وتضاف نقطة محلول Sudan III (٢٥ ملجم /

لتر من المخلوط السابق) ، وهذا بمثابة color marker فى فصل فيتامين أ
والصبغات عن فيتامينات د .

٨ - يضاف ١٠ مل من مخلوط المذيبات السابق ذكره إلى العمود الكروماتوجرافى
(٣ سم ، موضوع أعلى دورق تفريغ ، ويمكن استعمال قمع بوخر بمضخة) ، ثم
تضاف العينة ويغسل الدورق بـ ٥ مل من المذيب ثم تضاف للعمود ، وأخيراً
يضاف ٣٥ مل من نفس المخلوط حتى تظهر الـ adsorption bands . وكل إضافة
من هذا المذيب تجرى قبل أن يجف سطح عامل الأدمصاص .

٩ - عندما تمر آخر ٣٥ مل من المحلول خلال العمود ، يجفف عامل الأدمصاص
بتمرير هواء خلال العمود لمدة ٥ - ١٠ ق ، ثم بواسطة ملعقة معمل bent - L
spatula تزال الطبقة العليا من العمود إلى نقطة ٢ مم أسفل باند السودان ٣
الحمراء red sudan III band ، فمع هذه الطبقة يزال فيتامين أ والصبغات ،
وعامل الأدمصاص الباقى فى العمود يحتوى على فيتامينات د و الأستيرولات .

١٠ - يوضع العمود الكروماتوجرافى على قمع تفريغ ويحل elute بواسطة ٢٥ مل
أيثير .

١١ - يجمع المحلول الراشح والمحلول المحل ويبخر حتى الجفاف تحت ضغط منخفض
ثم تذاب فى ١٠,٠ مل كلوروفورم نقى .

١٢ - فى دورق صغير ، يؤخذ ١٠ مل من هذا المحلول ويضاف لها ١٠ مل جوهر
 $SbCl_3$ وتحرك رحولاً لمدة ٣٠ ثانية ثم يقاس اللون فى جهاز قياسى الألوان على
طول موجة ٥٠٠ nm بعد ٣ ق بالضبط من إضافة جوهر الكشاف إلى عينة
الفيتامين . والعينة عند هذه النقطة تحتوى على فيتامين د والأستيرولات.

١٣ - لتصحيح الأمتصاص على طول موجة ٥٠٠ nm والذي يرجع إلى وجود
الأستيرولات ، يؤخذ ١,٠ مل من مستخلص الكلوروفورم ويبخر حتى الجفاف ثم
يذاب فى ٥ مل مخلوط مكون من skellysolve وبنزين (١ : ٢) ، وبعد ذلك تنقل

كمياً إلى العمود الكروماتوجرافى الصغير (١,٥ سم ، متصل بدورق تفريغ ومضخة) والمبلل بـ ٥ مل من مخلوط المذيب . يغسل الدورق الذى يحتوى على فيتامينات د والأسيترولات بـ ٥ مل اضافية من مخلوط المذيب وتوضع فى العمود ، وأخيراً تحل الأسيترولات من العمود بـ ٥ مل مخلوط مذيب .

١٤ - الباند التى تحمل فيتامين د تكون ثابتة على الجزء العلوى من العمود وتكون ملونة بلون بنفسجى شاحب - أزرق lavender - blue band ، أما الأسيترولات فقد مرت خلال العمود إلى الراشح .

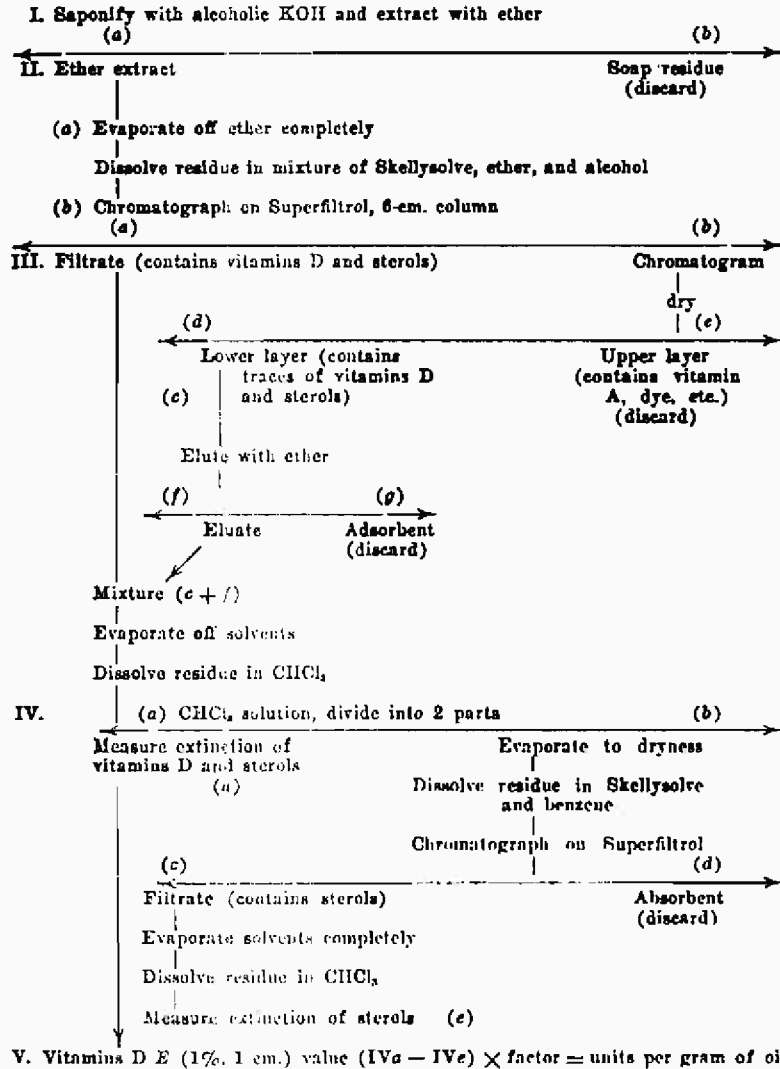
١٥ - يبخر الراشح حتى الجفاف تحت ضغط منخفض ثم تذاب المادة الباقية فى ١,٠ مل كلوروفورم ، ويضاف إليها ١٠ مل جوهر $SbCl_3$ ، وأخيراً يقاس اللون على طول موجة ٥٠٠ nm بعد ٣ ق بالضغط ، مثل المعاملة الأولى تماماً .

١٦ - من الفرق بين القراءتين السابقتين يمكن حساب كمية فيتامين د بوحدة USP لكل جرام من الزيت عند ضرب هذا الفرق فى عامل مقداره ١٩٣٠٠ . هذا ، وشكل (٢٦) يلخص خطوات هذه الطريقة .

التعليق :-

وجد توافق جيد بين هذه الطريقة اللونية والطريقة البيولوجية المعتادة ، وهذا بالنسبة للزيوت التى تحتوى على ٥٠٠٠ وحدة / جم فأكثر . أما بالنسبة للزيوت التى تحتوى على أقل من ذلك فهذه الطريقة غير كافية .

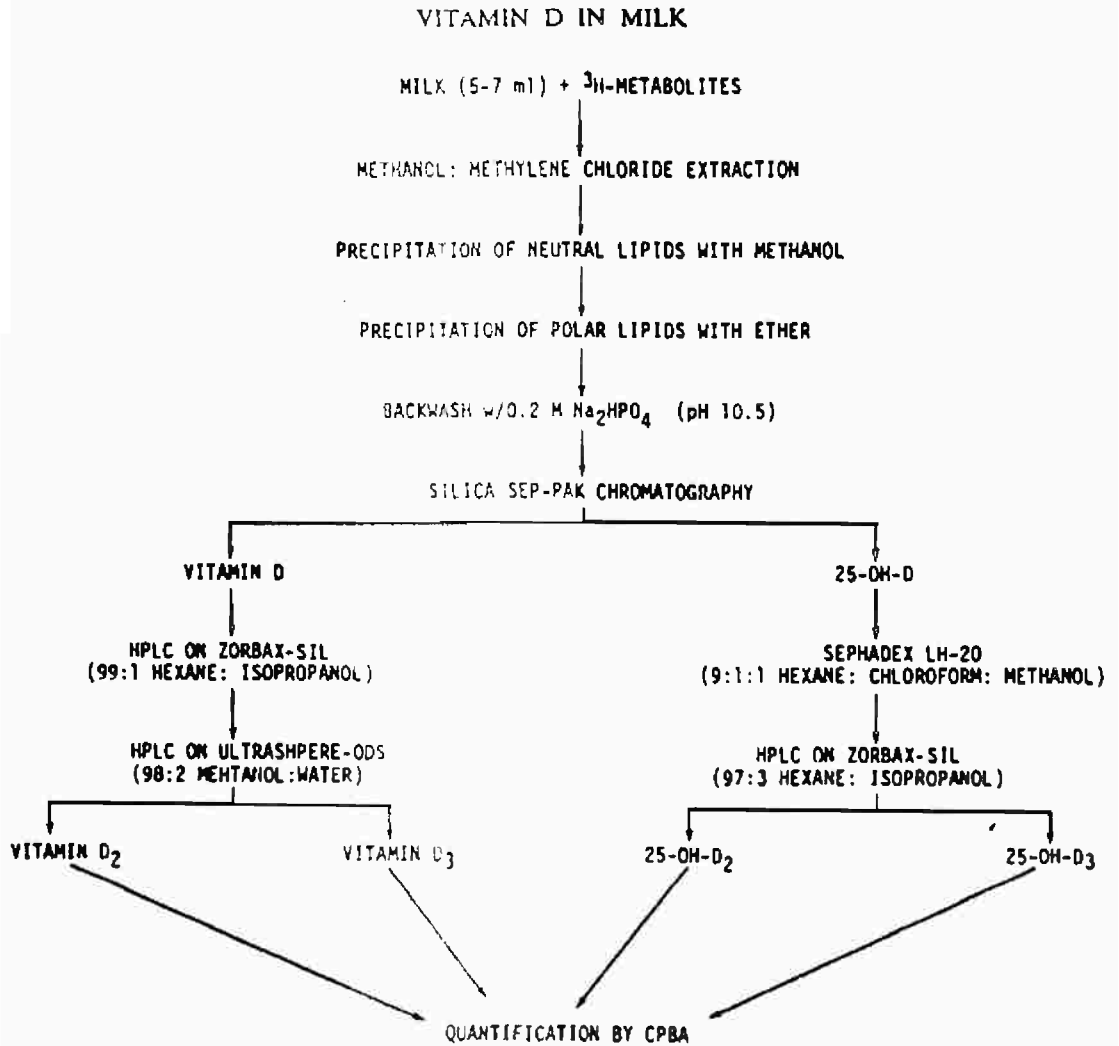
Schematic Outline of Vitamin D Determination



شكل (٢٦) خطوات تقدير فيتامين د بالطريقة اللونية

تنقية فيتامينات د (Hollis, 1983)

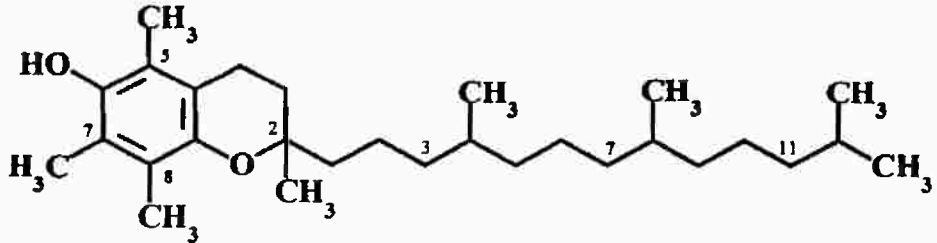
وما هو جدير بالذكر أن هناك طرق كثيرة لتنقية فيتامينات د من مصادرها الطبيعية حتى يتسنى تقديرها. ومن أبرز هذه الطرق، طريقه (Hollis, 1983) والتي تستخلص فيتامينات د من اللبن. وشكل (٢٧) يلخص خطوات تنقية فيتامينات د وتقدير كل منها كميًا.



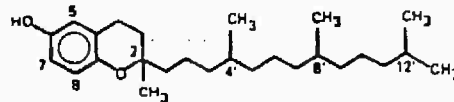
Schematic of the purification and ultimate quantification steps used for the assay of vitamin D₂, D₃, 25-OH-D₂, and 25-OH-D₃ in human milk.

شكل (٢٧) خطوات تنقية وتقدير مجموعة فيتامين د في لبن الإنسان .

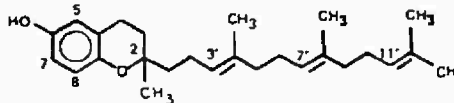
Vitamin E هـ فيتامين



تشمل مجموعة فيتامين هـ ثمانية مركبات مختلفة ، أربعة منها ينتمون إلى التوكوفيرول (T) وفيها تكون السلسلة الجانبية مشبعة ، أما الأربعة الباقية فينتمون إلى التوكوترائين (T-3) ، حيث يوجد على السلسلة الجانبية ٢ روابط زوجية . كما يختلف أفراد هاتين المجموعتين فيما بينهما في عدد ومكان مجاميع الهيدروكسيل على الحلقة ، فعلى المواضع ٥ ، ٧ ، ٨ تسمى ألفا (α) ، وعلى المواضع ٨ تسمى بيتا (β) ، وعلى المواضع ٧ ، ٨ تسمى جاما (γ) ، وعلى المواضع ٨ فقط تسمى دلتا (δ) . وشكل (٢٨) يعرض الصيغة البنائية لمجموعة فيتامين هـ .



Tocol Structure



Trienol Structure

Position of Methyls	Trivial Name (Abbreviations)
	Tocol Structure
	Trienol Structure
3, 7, 8	α-tocopherol (α-T) α-tocotrienol (α-T-3)
5, 8	β-tocopherol (β-T) β-tocotrienol (β-T-3)
7, 8	γ-tocopherol (γ-T) γ-tocotrienol (γ-T-3)
8	δ-tocopherol (δ-T) δ-tocotrienol (δ-T-3)

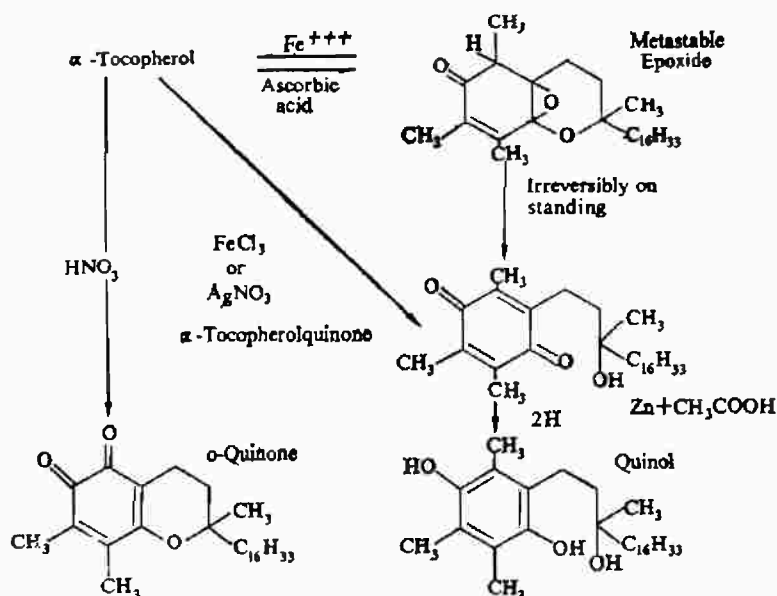
Formulas of eight members of the tocopherol series.

شكل (٢٨) الصيغة البنائية لمجموعة فيتامين هـ

تفاعلاته :

التوكوفيرولات ثابتة للحرارة ، والقلوى فى غياب الأكسجين ، وهى لا تتأثر بالحامض حتى ١٠٠ ° م . وتتأكسد ببطء بأكسجين الهواء الجوى وتزداد سرعة الأكسدة بالتعرض للضوء والحرارة والقلوى ووجود أملاح الحديد والنحاس . ويزداد فعل العامل المؤثر فى وجود عامل آخر . واسترات مجموعة الهيدروكسيل الفينولية ثابتة جداً للأكسدة بالأكسجين ، وعلى ذلك فإن التوكوفيرول يجهز تجارياً فى صورة استر الخلات ، ولذا فإن هذه الإسترات ليس لها فعل كمضادات للأكسدة . ونواتج الأكسدة تتضمن tocopheroxide و tocopheryl quinone و tocopheryl hydroquinone ، هذا بالإضافة إلى dimers و trimers .

ومما هو جدير بالذكر أنه عند معاملة الألفاتوكوفيرول بنترات الفضة يتأكسد أيضاً إلى ألفاتوكوفيرول كوينون ، وهذا بدوره يمكن اختزاله إلى كوينول بواسطة الزنك وحمض الخليك . كما يمكن أكسدة الألفاتوكوفيرول بواسطة حمض النيتريك إلى أورثوكوينون ذو لون أحمر ، واستغل هذا التفاعل فى تقدير التوكوفيرولات كميّاً . ويليخص شكل (٢٠) تفاعلات



شكل (٢٠) تفاعلات أكسدة الألفاتوكوفيرول بالعوامل المؤكسدة المختلفة

أكسدة التوكوفيرول بالعوامل المؤكسدة المختلفة ، أما جدول (٢٠) يعرض بعض الخواص الكيميائية لأربعة أفراد من مجموعة فيتامين هـ .

Chemical Properties				
Item	d,l- α -Tocopherol	d, α -Tocopherol	dl, α -Tocopheryl acetate	dl, α -Tocopheryl acetate
Color	Colorless to pale yellow, viscous oil	Colorless to pale yellow, viscous oil	Colorless to pale yellow, viscous oil	Colorless to pale yellow, viscous oil
Boiling point ($^{\circ}\text{C}$)	200-220 (0.1 mm)	-	224 (0.3 mm)	-
Molecular weight	430.69	430.69	472.73	472.73
Spectrophotometric data				
Absorption maxima (nm)	292-294	292-294	285.5	285.5
$E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (ethanol)	71-76	72-76	40-44	40-44

جدول (٢٠) الخواص الكيميائية لبعض التوكوفيرولات

الذوبان :

الألفاتوكوفيرول لا يذوب في الماء ولكنه يذوب تماماً في الزيوت والدهون والأسيتون والكحول والكلوروفورم والإيثير والبنزين ومذيبات الدهون الأخرى .

انتشاره ومصادره :

١ - وجوده في النباتات : - يوجد في الفواكه مثل التفاح والزيتون ، وفي الخضراوات مثل الخس والبقوليات legumes والسبانخ spinach والذرة وزيت فول الصويا والمستردة mustard والقلفل الأخضر green pepper والبطاطا sweet potatoes والقرنبيط cauliflower والكرنب Kale واللفت الأخضر . كما يوجد في البذور الزيتية مثل بذرة القطن وزيت النخيل palm oil والفول السوداني peanuts وجوز الهند coconuts . وفي الحبوب cereal كما في جنين الأرز وبنين القمح والشعير barley والراى rye والشوفان .

٢ - وجوده في الحيوانات : - يوجد في بيض الطيور، وفي كبد ودهن وعضلات الحيوانات الثديية ، وفي اللبن والغدد النخامية والكظرية والخصى testes .

٣ - وجوده في الكائنات الحية الدقيقة : - يوجد في الخميرة yeast .

المصادر الغذائية :

١ - المصادر الغنية : - يتراوح تركيزه فيها من ٥٠ - ٣٠٠ ملجم لكل ١٠٠ جم ،
كما في زيوت كل من بذرة القطن و الذرة و فول الصويا و جنين القمح و القرطم
safflower والخس .

٢ - المصادر المتوسطة : - ويتراوح تركيزه فيها من ٥ - ٥٠ ملجم / ١٠٠ جم ،
كما في زيوت كل من جوز الهند والفول السوداني والزيتون ، وفي بنور
التفاح والأفألفا alfa alfa و جنين القمح والشعير وفول الصويا الجاف وبنور
الفول السوداني والخميرة والشيكولاتة chocolate والسبانخ والأسبراجس
asparagus والكربن cabbage .

٣ - المصادر المنخفضة : - ويتراوح تركيزه فيها من ٠,٥ - ٥ ملجم / ١٠٠ جم ،
كما في الجزر والمستردة والذرة وأوراق الخس والحمص peas و البطاطا والفلفل
واللحم البقري beef وكبد البقر ولحم الخنزير pork ولحم الحمل lamb والزبد
والبيض والجبن . و دقيق كل من الذرة والقمح الكامل والشوفان وجوز الهند .

الدور الطبى والغذائى :

١ - وحدات فيتامين هـ :

١ ملجم ألفا - م - توكوفيرول $d \alpha - \text{tocopherol} = ١,٤٩$ وحدة دولية .

١ ملجم ألفا - م - ي - توكوفيرول $d l - \alpha - \text{tocopherol} = ١,٠$ وحدة دولية

٢ - مستويات الدم الطبيعى فى الإنسان :

١,١١ ملجم / ١٠٠ مل سيرم

٣ - المقررات الموصى بها :

للأطفال : ١٠ - ١٥ وحدة دولية / يوم .

للبالغين : ٢٥ وحدة دولية / يوم (للإناث) .

٣٠ وحدة دولية / يوم (للرجال) .

حالات خاصة : وذلك على حسب الأحماض الدهنية الغير مشبعة المأخوذة ، وتزداد المتطلبات اليومية منه للحوامل والمرضعات وفي حالات الجهد الشاق stress وحالات التخلص من السمية detoxification وفي مرحلة البلوغ .

٤ - إعطائه : -

يعطى عن طريق الحقن فى حالة الاحتياج إليه بجرعات عالية ، ويعطى سطحياً أيضاً فى صورة كريمات ومراهم ، وأفضل طريقة لإعطائه هى عن طريق الفم .

٥ - أمراض النقص : -

أ - فى الحيوانات المعملية : - موت وهمدم موضعى لخلايا الكبد necrosis ، لين

الدماغ encephalomacia ، سوء تكوين العضلات muscular dystrophy ،

تفسخ (انحلال) الأنسجة التناسلية degeneration of reproductive tissues

ب - فى الإنسان : - تحلل خلايا الدم الحمراء red cell hemolysis ، زيادة

الكرياتين فى البول creatinuria ، الأصفرار xanthomatosis ، تليف المرارة

steatorrhea ، تدفق دهنى skin collagenosis ، cirrhosis of gall bladder

٦ - أعراض نقصه : -

بالإضافة إلى الأعراض السابقة تظهر الأعراض التالية :-

تليف تكيسى للبنكرياس cystic fibrosis (للحيوانات الصغيرة) ، ضعف نشوء

العضلات وهزال عضلى فى حيوانات التجارب ، امتصاص الأجنة وانحلال الأنسجة الطلائية

الحديثة واضطراب الدورة الشهرية estrus cycle (فى الفئران) ، myocordial

degeneration (فى الكلاب والأرانب) ، لين الدماغ encephalomacia ، انحلال الجهاز

الوعائى الدموى vascular degeneration (فى الدجاج) .

٧ - تأثير الجرعات العالية :

عند اعطاء جرعات عالية منه ، من المحتمل انها تزيد ضغط الدم .

٨ - توزيعه فى أنسجة جسم الإنسان :

يختلف توزيع فيتامين هـ فى أنسجة جسم الإنسان اختلافاً كبيراً ، فأقصى كمية منه وجدت فى الأنسجة الدهنية والغدة الكظرية ، وأقل قيمة لوحظت فى خلايا الدم الحمراء .
وجداول (٢١ أ) يلخص ذلك .

٩ - توزيعه فى المكونات التحت خلوية (التوزيع التحت خلوى) :

تتمركز كمية كبيرة نسبياً من التوكوفيرول فى الميتوكوندريا الثقيلة ، وأقل كمية منه لوحظت فى النواة . ومن ذلك يدل على أهمية فيتامين هـ كمانع للاكسده ، حيث تتعرض الميتوكوندريا للاكسجين بكثرة فلذلك يلزم حمايتها من التلف بالاكسدة .
وجداول (٢١ ب) يلخص توزيعه التحت خلوى فى أنسجة الفأر .

١٠ - جميع الكائنات الحية تحتاج التوكوفيرولات

α -Tocopherol Content of Human Tissues

Tissue	Normal		Cystic fibrosis ($\mu\text{g/g}$)
	$\mu\text{g/g}$	mg/g Lipid	
Plasma	9.5	1.4	2.4
Erythrocytes	2.3	0.5	0.5
Platelets	30.0	1.3	—
Adipose tissue	150.0	0.2	—
Kidney	7.0	0.3	—
Liver	13.0	0.3	3.5
Muscle	19.0	0.4	2.6
Ovary	11.0	0.6	—
Uterus	9.0	0.7	—
Heart	20.0	0.7	—
Adrenal	132.0	0.7	—
Testis	40.0	1.0	—
Pituitary	40.0	1.2	—

Subcellular Distribution of Tocopherol in Rat Tissue

Cell fraction	Tocopherol in liver		Tocopherol in heart	
	$\mu\text{g/mg Protein}$	% ^a	$\mu\text{g/mg Protein}$	%
Soluble	0.002	.4	0.02	1.7
Heavy mitochondrial	0.27	53.8	0.26	21.8
Light mitochondrial	0.12	23.9	0.29	24.4
Microsomal	0.08	15.9	0.37	31.1
Nuclear	0.03	5.0	0.25	21.0

^aPercentage of total recovered in five fractions.

جدول (٢١) توزيع الألفاتوكوفيرول في أنسجة الإنسان (أ)

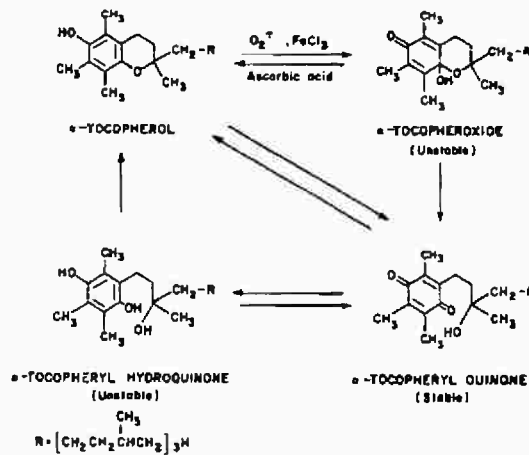
وفي المكونات تحت خلوية في أنسجة الفأر (ب)

تحليل فيتامين هـ

فصل وتقدير فيتامين هـ

أ - تحضير العينة والاستخلاص :-

العينات قليلة الليبيدات مثل بلازما الدم وبعض الأنسجة الأخرى يمكن استخلاصها مباشرة بمذيبات الدهون التقليدية مثل : - كلوروفورم - ميثانول ، أو هسكان - إيثانول ، أو الاسيتون ، أو بآى طريقة أخرى ، أما فى العينات الغذائية فيمكن تصبئها أولاً بمحلول بوتاسا كاوية كحولية ثم تستخلص بعد ذلك المواد الغير متصبئة والتي تحتوى عادة على الفيتامين بالايثير . وحيث أن التوكوفيرولات حساسة للاكسدة فى الوسط القلوى ، فعليه لابد من إجراء التصبئ تحت نيتروجين . ويفضل وجود مادة مانعة للاكسدة مثل حمض الأسكوربيك أو البيروجالول pyrogallol أو p-hydroxyacetanilid . ولابد أن تكون مدة التصبئ قصيرة قدر الامكان ، حتى لاتحدث تفاعلات الأكسدة (شكل ٢٩) .



شكل (٢٩) نواتج أكسدة ألفا توكوفيرول

هناك طريقة أخرى بديلة للاستخلاص ، وهى استخلاص الدهون مباشرة من العينة الغذائية بمذيب عضوى ثم تركيز الفيتامين هـ فى المستخلص بالبلورة crystallization على

درجة حرارة منخفضة ، ومن المناسب استخلاص الليبيدات بجهاز سوكسلت Soxhlet بكحول ساخن ، أو ٢ - بروبانول وكلوروفورم ساخن في حالة منتجات الحبوب والأغذية المجففة freeze - dried ، أما الانسجة الرخوة soft مثل الكبد فيمكن طحنها مع كبريتات صوديوم حتى يتم الحصول على مخلوط جاف ، ثم استخلاص الليبيدات منها بسوكسلت أو الرج مباشرة وبشدة مع المذيب العضوى . ويمكن بللورة الليبيدات من المستخلص بالتبريد بمخاليط أسيتون مع ثانى أكسيد الكربون الصلب (- ٦٥ إلى - ٧٠ ° م) ثم ترشيح المخلوط البارد على قمع بارد على نفس درجة الحرارة . ويحتوى الراشح filtrate على التوكوفيرولات الحرة والتي يمكن الحصول عليها بعد ذلك بتطاير المذيب ، أما إسترات فيتامين هـ فسوف تبقى فى الجزء المتبلى .

ويعد الاستخلاص يمكن تنقيتها باستعمال الطرق الكروماتوجرافية السابق ذكرها .

ب - فصل فيتامين هـ :

يمكن الحصول على فيتامين هـ من أحد مصادره (زيت فول صويا أو زيت جنين القمح أو زيت الأرز) كما يلى :

١ - إجراء عملية التصبن للزيت باستعمال بوتاسا كاوية فى ميثانول ، ثم استخلاص

المواد الغير متصبة والتي تحتوى على الفيتامين بالإثير .

٢ - ترسب الأسيترولات بإضافة Digitonin .

٣ - يتم التخلص من الزانثوفيلات xanthophylls بالاستخلاص بالميثانول .

٤ - تحول التوكوفيرولات إلى أسترات الوفينية allopphanate esters بالتفاعل مع HCN .

٥ - يتم بللورة هذه الاسترات والحصول عليها بالترشيح ، ثم تحليلها مائياً ، وأخيراً نحصل على فيتامين هـ بالاستخلاص بالإثير .

ج - الفصل والقياس :

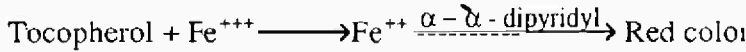
القياس اللونى والتحليل الكروماتوجرافى الغازى هما أكثر الطرق أنتشاراً فى تقدير

فيتامين هـ ، والقياس اللوني طريقة سريعة لتقدير المحتوى الكلى للتوكوفيرولات فى الأغذية ، فلو طلب معرفة كل توكوفيرول على حده فيمكن تطبيق الـ GC بنجاح . أما القياس الأسبكتروفوتومتري فى الـ UV فهو أقل استخداماً وذلك لانخفاض الامتصاص (molar absorbance) للتوكوفيرولات ، حيث أن الألفاتوكوفيرول له $\epsilon = 72$ على طول موجة 292 nm . والتوكوفيرولات تعطى وميض ، والقياس الوميضى ذو فاعلية كبيرة وذات حساسية كبيرة فى تقدير التوكوفيرولات .

١ - القياس اللوني Colorimetry :

تفاعل أمرى - أنجل Emmerie - Engel reaction :

يعتمد هذا التفاعل على تكوين لون أحمر أو أرجوانى purpale من التفاعل بين أيونات الحديدوز (Fe⁺⁺) ومركب α - α - dipyridyl . وحيث أن التوكوفيرولات ذات مقدرة عالية على اختزال أيونات الحديدك ferric إلى حديدوز ، فيمكن بذلك تقدير فيتامين هـ عن طريق تفاعله مع أيونات الحديدك ثم تقدير أيونات الحديدوز المتكونه بتفاعلها مع α - α - dipyridyl فيتكون لون أحمر أو أرجوانى كما يلى :



وقد تم تعديل هذا التفاعل باستعمال مركب 4,7 - Bathophenanthroline (diphenyl 1,10 phenanthroline) ، بدلاً من α - α - dipyridyl ، والذي يتميز بحساسيته الكبيرة ، ويتكون فى التفاعل ايضاً معقد ذو لون أحمر . وهذا التفاعل حساس ويعتمد على نتائجه بشرط إزالة المواد التى قد تتداخل فى التفاعل حيث يتأثر التفاعل بوجود الكاروتينويدات والمواد الملونة الأخرى ومضادات الأكسده مثل BHA و BHT . والعائق الرئيسى لهذا التفاعل هو أنه غير مناسب للتمييز بين التوكوفيرولات المختلفة كل على حده أو tocotrienols . ويمكن استخدام كروماتوجرافى الأعمده بالكرومينا غير منشطة بـ ١٠ ٪ ماء لتنقية المستخلصات قبل تقدير التوكوفيرولات بالقياس اللوني ، فلو تم الأحلل بمحلول ٧ ٪ إيثير فى هكسان حلقى cyclohexane ، يمكن فصل التوكوفيرولات عن الكاروتينويدات والريتينول وعن الكولستيرول (التفاعل اللوني يمكن أن يتحمل tolerate مستويات عالية من

الكولسيترول) .

ولا يمكن لهذا العمود ازالة المواد المضادة للاكسدة BHA و BHT ، ولا يمكنه أيضاً ازالة مشابهاة isomers التوكوفيرولات أن وجدت . ويمكن كشف الأخيرة بالـ TLC ، لذا فإن وجدت فيمكن أزالتهما على أعمدة سيليكاجيل جافة أولاً . ويستعمل الـ TLC على سيليكاجيل مع كلوروفورم كطور متحرك لفصل الـ BHT عن التوكوفيرولات .

وفصل هذا النظام الـ BHA عن الألفاتوكوفيرولات وليس عن الجاما توكوفيرول والذي له نفس التحرك مثل الـ BHA . ويمكن استعمال التوزيع بين أسيتونيتريل و acetonitrile و إثيربترولى لأزالة الـ BHA . ولكن هذه الطريقة تؤدي إلى فقد بعض من التوكوفيرولات .

واستخدم القياس اللوني لتقدير التوكوفيرولات كل منها على حده ، والـ tocotrienol فى زيوت الخضروات Vegetable بفضل مبدئى على TLC . ويمكن استخدام الـ TLC على اتجاهين حتى يعطى فصل أفضل . وأكبر اعتراض على استعمال الـ TLC فى التقدير الكمي لفيتامين هـ هو الفقد الكبير الذى يحدث عند ازالة الـ spots من على الألواح plates والتي يعقبها التقدير .

٢ - قياس الفلورة Fluorimetry :

التوكوفيرولات لها فلورة طبيعية قوية ، وتستخدم هذه الخاصية كطريقة حساسة لتقديرها فى السيرم والأنسجة وخلافه . وهذه الطريقة أبسط من الطرق اللونية ، فعند تقديره فى البلازما بهذه الطريقة لا يوجد تداخل مثلما يحدث فى التفاعلات اللونية لفيتامين أ .

وطبق هذا التكنيك فى تقدير التوكوفيرولات فى زيوت الخضروات وبعض الأغذية بعد فصلها على أعمدة كروماتوجرافية خاصة ، وأيضاً بعد فصل كل واحد منها بمفرده بواسطة HPLC . وعادة ما يقاس أنبعاث emission التوكوفيرول على طول موجة ٢٤٠ nm بعد الاثارة excitation على طول موجة ٢٩٥ nm . وقياسات الفلورة لا يمكن استخدامها فى تقدير كل توكوفيرول على حده (بمفرده) فى مخاليط منها معاً ، كما إن وجود كميات صغيرة من الريتينول لا تتداخل مع الفلورة ، ولكن الـ BHA يتداخل .

أما استرات التوكوفيرولات ليس لها فلورة ، وعلى ذلك فيمكن باستخدام هذا التكنيك في تقدير محتوى التوكوفيرول الحر والمؤستر. وقد استخدم Lithium aluminium hydride (LiAlH_4) في التحويل الكمي لأستر التوكوفيرول في السيرم إلى كحول حر ثم تقديره بالفلورة، وكل القياسات الفلورية عادة ما يلزم لها مذيبيات منقاه بطريقة خاصة .

٣ - التحليل الكروماتوجرافي :

أ) الطبقة الرقيقة TLC :

أستخدمت هذه الطرق في فصل التوكوفيرولات وهي طرق ممتازة ، ومن أهم مميزاتها أنها تتطلب تجهيزات بسيطة . وأهم الاحتياطات التي يجب أخذها في الاعتبار هي تلافى الأكسدة حيث أنها قد تفقد أثناء أو بعد الفصل إذا تعرضت لظروف مؤكسده .

ب) طرق الـ GLC :

وتستخدم هذه الطرق في التحليل الكمي والنوعي للتوكوفيرولات . وفيها تحول التوكوفيرولات ومشتقاتها أولاً إلى مشتقات متطايرة مثل أسترات كل من : acetate

، trimethyl silyl ، trifluoroacetate ، propionate حتى يمكن فصلها في الـ GLC . وهذه الطرق حساسه جداً (مع ميكروجرامات من التوكوفيرولات) . وأمكن حديثاً فصل أربع مشابهات راسيمية racemates وقدرت كمياً أيضاً .

وهناك طرق بديلة لفصل البيتا والجاماتوكوفيرول وهي تحويلهما إلى باراكوينونات p- quinones بالتفاعل مع كلوريد حديدك ثم فصلها على خليط مزيج من طورين ثابتين (50 - SE ، 60 - XE)

الاستيرولات خصوصاً الكولستيرول لها نفس زمن الاحتباس retention time للآلفا توكوفيرول، ولذلك فلا بد من التخلص منها أولاً وقبل إجراء التحليل بالـ GC . ويمكن إزالة الكولستيرول تماماً بترسيبه من أيثانول : ماء (٧٢ : ٢٨) ثم تكمله ترسيبه بأمرار المستخلص خلال عمود celite مشرب بـ ٦٪ digitonin . ومن أهم مميزات هذا التكنيك عدم تداخل مضادات الأكسدة BHT ، BHA في التقدير والفصل .

د (طرق الـ HPLC : -

طبق هذا التكنيك أيضاً في التحليل الكمي والوصفي لتوكوفيرولات الأغذية والأنسجة الحيوانية وغيرها ، ومن أهم مميزاته أنه ذو فاعلية عالية جداً في فصل وتقدير كل مشابهاة التوكوفيرولات ، بالإضافة إلى بساطتها ، فقد أمكن فصل ثمان مشابهاة منها بهذه الطريقة خلال ١١٠ ق ، كما أمكن استخدامها في فصل التوكوفيرولات والـ tocotrienols بعد استخلاص العينة بالأسيتون في جهاز سوكسلت ، وقد أمكن إزالة الليبيدات بتبريد المستخلص بواسطة مخلوط ثنائي أكسيد كربون صلب وأسييتون ، ثم حقن المستخلص الناتج مباشرة في عمود الـ HPLC ، وعلى ذلك ليس من الضروري إجراء تصبين قبل استعمال الـ HPLC.

استعمل نوعين من الكواشف في هذه الأجهزة هما كاشف فلورة وكاشف UV . وقد بينت النتائج أن النوع الأول من هذه الكواشف كان أكثر حساسية ، فهو يمكنه أن يكشف عن كميات نانوجرامات . كما أمكن أيضاً فصل التوكوفيرولات عن استراتها في مستحضرات مخاليط الفيتامينات multivitamin preparations وفي الأغذية الحيوانية .

د - الطرق الحيوية Bioassay procedures : -

النشاط الحيوي الحقيقي لفيتامين هـ يقدر عن طريق قدرته ability على منع أو إعاقة prevent ظهور أعراض النقص أو انعكاس أعراض نقصه المتخصصة في الحيوانات *in vivo* (مثل fetal resorption, muscular dystrophy , encephalomalacia) كما أن هناك اختبارات أخرى يمكن استعمالها للتقدير الحيوي مثل :- اختبار تحلل كرات الدم الحمراء erythrocyte hemolysis test واختبار التخزين في الكبد liver storage test وارتفاع التوكوفيرول في البلازما elevation of tocopherol plasma . وهذه الطرق لا تقيس النشاط الحيوي في داخل الكائن الحي *in vivo* مباشرة ، بل هي انعكاس للامتصاص النسبي للمركبات المختبرة ، إعادة تنظيمها turnover في الكبد أو في RBC. عموماً ، اختبارات تحلل كرات الدم الحمراء وتخزين الأنسجة ، تصحح جيداً بالطرق التي تتم *in vivo* . وقد تصحح بملاحظة فترة نصف الحياة للـ RBC في إنسان مصاب بنقص فيتامين هـ.

هذا وسوف نستعرض هذه الطرق الحيوية كما يلي : -

١ - امتصاص الأجنة Fetal resorption :

إن التقدير الحيوى المبني على أساس قدره الفيتامين على منع العقم anti - sterility يعتمد على قياس الامتصاص الجنيني fetal resorption فى إناث الفئران الحوامل . وهى طريقة لأختبار الفاعلية الحيوية biopotency لعديد من التوكوفيرولات ، حيث يتم استنزاف فيتامين هـ من أناث الفئران العذارى ثم يتم تزويجها لذكور عادية ، وبعد نجاح التزاوج تعطى كميات متنوعة ومعروفة من فيتامين هـ عن طرق الفم (للإناث) .

- وبعد قتل الفئران (بعد ٢٠ - ٢١ يوم من التزاوج) ، يحسب عدد الأجنة الحية living والميتة dead والممتصة resorbed ، ثم تقدر النسبة المئوية للأجنة الحية .

يقدر نشاط فيتامين هـ برسم منحنى قياسى للنسبة المئوية للأجنة ضد لوغاريتم الجرعة المعطاة log of dose . وعن طريق هذا المنحنى تحسب كمية فيتامين هـ فى العينة المراد تقديرها ، وهذه الطريقة مملّة وتستهلك وقت طويل وحيوانات كثيرة إلخ .

٢ - أختبارات الانحلال (التفسخ) العضلى

Muscular degeneration tests :

وتطبق هذه الطريقة على الدجاج ، حيث يتم تقييم التفسخ العضلى مباشرة بعد التغذية لمدة ٢ - ٤ أسابيع على علائق خالية من فيتامين هـ وأخرى مضافاً إليها ، ويتم فحص عضلات الصدر breast muscle وتعطى درجات scores من صفر إلى ٤ على حسب خطورة الضرر . ويمكن قياس التفسخ العضلى بطريقة غير مباشرة مثل تقدير الكرياتين فى البول creatinuria ومستويات البلازما من aspartate amino transferase , LDH كما فى البط والأرانب . والطرق التى تعتمد على قياس مستويات أنزيم plasma pyruvate kinase كمرجع هى من الطرق السريعة والحساسة وهى على درجة عالية من الثقة .

٣- اختبار تحلل كرات الدم الحمراء Erythrocyte Hemolysis Test :

الطريقة تعتمد أساساً على الفعل الواقي لفيتامين هـ ضد تحلل كرات الدم الحمراء بواسطة فوق أكسيد الهيدروجين أو بواسطة dialuric acid . وفيها يتم استنزاف الحيوانات rats من فيتامين هـ ، ثم تعطى جرعات من الفيتامين عن طريق الفم حتى تعطى مدى لتحلل كرات الدم الحمراء من ٢٠ - ٨٠ ٪ . يضاف dialuric acid إلى معلق الـ RBC المغسولة والمأخوذة من الحيوانات بعد ٤٠ - ٤٤ ساعة من إعطاء الجرعات المختبره test doses ثم تقدر النسبة المئوية للتحلل hemolysis . وهذه الطريقة معقولة وبسيطة وغير مكلفة وملائمة جداً عن التقدير الحيوى بطريقة امتصاص الأجنة أو بطريقة التخزين فى الكبد .

٤ - التخزين فى الكبد Liver storage :

تعتمد هذه الطريقة على ملاحظة وهى أن تخزين التوكول tocol فى كبد الفئران والدجاج له استجابة خطية linear لمستوى فيتامين هـ فى الغذاء . فى هذه التجربة تغذى الحيوانات (فئران - دجاج) المستنزف منها الفيتامين على علائق غذائية قياسية بها كميات معروفة بالضبط من فيتامين هـ ، وتغذى مجموعة أخرى على العلائق المختبرة لمدة ٢ - ١٣ يوم ، ثم يقدر محتوى الكبد من التوكول فى كل منها . ومن ذلك يستدل (بعد رسم علاقة بين الفيتامين وتخزين التوكول فى الكبد) على تركيز الفيتامين .

٥ - طرق أخرى Other methods :

مثل التقدير الحيوى الذى يعتمد على النمو growth و testicular degeneration و encephalomalacia .

التفاعل اللونى لفيتامين هـ (Stroev and Makarova , 1989)

الاختبار يعتمد على خاصية التوكوفيرول فى أنه تحت الظروف المؤكسدة القوية (مثل حمض النيتريك المركز) يتكون تركيب كوينويدى quinoid structure ذو لون أحمر .

الجواهر الكشافة :

١ - محلول توكوفيرول (٠,١ ٪ فى كحول) .

٢ - حمض نيتريك مركز .

التكنيك :

- ١ - فى أنبوبة اختبار نظيفة جافة ، يضاف ٥ نقط من محلول التوكوفيرول ثم يضاف إليها ١٠ نقط من حمض النيتريك المركز .
- ٢ - تخلط محتويات الأنبوبة بالرج ، ويلاحظ ظهور لون أحمر .

تقدير التوكوفيرول فى السيرم (Baker and Frank , 1968)

يمكن تقدير توكوفيرولات السيرم بقدرتها على اختزال أيونات الحديدك إلى حديدوز والتي تكون الأخيرة معقد أحمر مع مركب α -dipyridyl ، وحتى يتم ذلك تستخلص التوكوفيرولات والكاروتينات أولاً بالزيلين xylene ثم يقاس الامتصاص على طول موجة ٤٦٠ nm لتقدير الكاروتينات . ويجرى تصحيح correction للكاروتينات بعد اضافة كلوريد الحديدك ، حيث يقاس اللون على طول موجة ٥٢٠ nm .

الجواهر الكشفية :-

- ١ - كحول ايثايل مطلق وخالى من الالدهيد aldehyde - free .
- ٢ - زيلين .
- ٣ - جوهر α -dipyridyl : - ١,٢٠ جم / لتر فى بروبانول عاى n - propanal .
- ٤ - محلول كلوريد حديدك : - ١,٢٠ جم كلوريد حديدك ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) فى إيثانول ، ويحفظ فى زجاجات بنية .
- ٥ - محلول قياسى من DL - α - tocopherol : - ١٠ ملجم / لتر فى إيثانول .

التكنيك :-

- ١ - إلى ثلاث أنابيب طرد مركزي ذات غطاء زجاجى محكم ، يضاف على التوالى ١,٥ مل من السيرم ، أو ١,٥ مل محلول قياسى ، أو ١,٥ مل ماء (بلانك) . يضاف إلى الأنبوبة الأولى (test) والأخيرة (بلانك) ١,٥ مل إيثانول ، وإلى

الثانية التي تحتوى على المحلول القياسى (st.) يضاف ١,٥ مل ماء ، ثم يضاف إلى كل منها ١,٥ مل زيلين . تغلق الأنابيب جيداً ثم تخلط جيداً وتطرد مركزياً (على حوالى ٣٠٠٠ g لمدة ١٠ ق) .

٢ - يؤخذ ١,٥ مل من طبقة الزيلين من كل أنبوبة ويوضع فى أنبويه بغطاء نظيفة (مع مراعاة عدم أخذ جزء من رواسب البروتين أو الأيثانول) .

٣ - يضاف لكل أنبوبة ١,٥ مل جوهر dipyridyl ، ثم تغلق جيداً وترج .

٤ - ينقل ١,٥ مل من المخلوط إلى cuvette ويقاس الامتصاص لكل من ال test وال st. على طول موجة ٤٦٠ nm ضد البلاك وتسجل القراءات .

٥ - بداية بالبلاك يضاف ٠,٢٣ مل من جوهر كلوريد الحديدك ثم تخلط جيداً ويقاس الامتصاص على طول موجة ٥٢٠ nm بعد ١,٥ ق من الخلط (A₅₂₀) لكل من ال test وال st. ضد البلاك .

الحساب :-

يحسب تركيز التوكوفيرولات فى السيرم من المعادلة التالية

$$\text{Serum tocopherols (mg / l)} = \frac{\hat{A} \text{ of test}}{\hat{A} \text{ of st}} \times 10$$

$$\hat{A} = A_{520} - 0.29 \times A_{460} \quad \text{حيث أن :-}$$

تقدير التوكوفيرولات فى العينات الزيتيه (Pearson , 1976)

كما هو معروف أن فيتامين هـ ومشابهاته توجد فى الجزء الدهنى فى الأغذية ، وبالتحديد فى الجزء الغير متصبن منها . وقد استخدمت طريقة Emmerie & Engel (1939) لتقديره للأغراض الروتينيه ، ولكن وجد أن بعض المواد مثل الكولستيرول والكاروتينيدات تتداخل فى التقدير . أما طريقة (Dickes , 1966) ، فقد حلت هذه المشكلة عن طريق فصل فيتامين هـ باستعمال تكنيك ال TLC ثم بعد ذلك تطبيق تفاعل أمرى - أنجل ، الذى عن طريقها يتم تقدير كل من الألفا والبيتا توكوفيرول سبكتروفوتومترياً . أما فى هذه

الطريقة فتتم أكسده التوكوفيرولات بواسطة حمض النيتريك إلى توكوكوينون أحمر red tocoquinone . وهذه الطريقة أكثر تخصصاً عن طريقة أمري - أنجل ، ولكنها تحتاج إلى وقت أطول وكمية كبيرة من العينة فالتوكوفيرولات تتأكسد بسرعة في وجود القلوي ولكنها تكون ثابتة في الوسط الحامضي لذلك ففي هذه الطريقة يتم التصبن بواسطة حمض كبريتيك كحولي H_2SO_4 alcoholic .

الجواهر الكشفية :

١ - محلول حمض الكبريتيك الكحولي (1M) : - يحضر بإضافة ٢,٨ مل من حمض الكبريتيك المركز (٩٥٪ = ٣٦ M) إلى حوالي ٥٠ مل أيثانول ثم يكمل إلى ١٠٠ مل ، مع مراعاة التبريد .

٢ - حمض نيتريك مركز (AR) .

٣ - ايثير ثنائي الإيثايل .

٤ - كحول إيثايل مطلق .

٥ - كبريتات صوديوم لامائية .

التكنيك :

١ - في بورق سعة ١٠٠ مل مزود بمكثف عاكس reflux condenser توزن وزنة مناسبة بالضبط من الزيت (حوالي ١ جم) .

٢ - يضاف إليها ١٠ مل كحول مطلق و ٢٠ مل حمض كبريتيك كحولي ، ثم يوضع المكثف العاكس ، وتلف كل الوحدة برفائق الألومنيوم alum.foil جيداً (لحمايتها من الضوء) ، ويتم التسخين في حمام مائي لمدة ٤٥ ق وبعد ذلك تبرد .

٣ - يضاف ٥٠ مل ماء وتنقل المحتويات كميّاً إلى قمع فصل زجاجي نفاذية الضوء خلاله قليلة low actinic (أو في قمع عادي مغطى برفائق الألومنيوم) ، وتغسل محتويات البورق بـ ٥٠ مل ماء إضافية للتأكد تمام النقل الكمي .

٤ - تستخلص المواد الغير متصبنة بالايثير ٥ مرات وفى كل مره يستخدم ٢٠ مل ايثير ، وتجمع هذه المستخلصات فى وعاء معتم للضوء .

٥ - يغسل المستخلص الايثيرى بالماء عدة مرات حتى تمام التأكد بأنه لا يحتوى على إى حموضه ، ثم يجفف بواسطة كبريتات الصوديوم اللامائية .

٦ - يبخر المذيب على درجة حرارة منخفضة ، مع مراعاة عدم التعرض للضوء . ويمكن التخلص من الآثار النهائية من المذيب بواسطة تيار من النيتروجين ، ثم تذاب البقايا فى الحال ويسرعة فى ١٠ مل كحول مطلق .

٧ - يؤخذ حجم معلوم من المحلول فى ورق معيارى سعة ٢٠ مل ، وفى دوارق أخرى خاص بال standards تؤخذ حجوم مختلفة تحتوى على كميات معلومة بالضبط من فيتامين هـ (تركيزها بين ٠,٢ - ٢,٠ ملجم فيتامين هـ) وتكمل كلها إلى حجم ٥ مل بواسطة الكحول المطلق .

٨ - يضاف ١,٠ مل حمض نيتريك مركز (مراعاة الحرس الشديد عند أستعماله) ، وتوضع الدوارق فى حمام مائى على ٩٠° م لمدة ٢ ق بالضبط ، وهو الزمن اللازم لغليان الكحول .

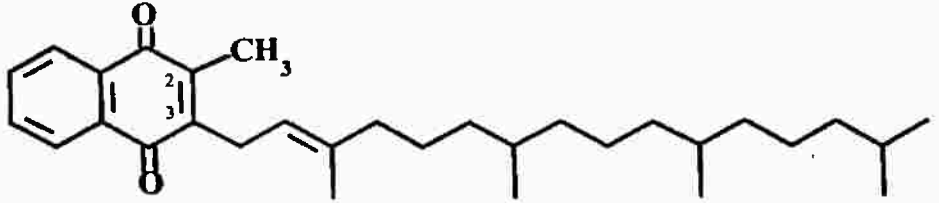
٩ - تبرد الدوارق بسرعة تحت الماء الجارى ويضبط الحجم مرة أخرى إلى ٦ مل بالكحول المطلق ، ثم يقاس الامتصاص على طول موجه ٤٧٠ nm فى وجود بلانك يحتوى على ٥,٠ مل كحول مطلق و ١,٠ مل حمض نيتريك مركز معامل بنفس النمط .

١٠ - يحسب التركيز من المنحنى القياسى .

ملاحظات :-

يمكن تطبيق هذه الطريقة على عينات أخرى غير العينات الزيتية ولكن يفضل أولاً أستخلاص الزيت ثم تطبيق الطريقة .

فيتامين ك - Vitamin K



المركبات التي لها نشاط فيتامين ك هي عبارة عن استبدالات لمركبات ١، ٤ نافثوكوينونات 1,4 naphoquinones ، وعلى ذلك فمعظم الخواص الكيميائية العامة لمجموعة فيتامين ك ترجع لهذا التركيب .

تفاعلاته :

يعتبر هذا الفيتامين ثابت للحرارة وللأكسدة ، ولكنه غير ثابت للعوامل التالية : -
الحامض (القوي) والقلوي والضوء والاختزال .

الذوبان :

ينوب في المذيبات العضوية (كلوروفورم ، بنزين ، كحولات) ، ولا ينوب في الماء .

صوره :

يوجد في صورة زيت أصفر ، والفيلوكوينون phylloquinone يوجد في صورة زيت أيضاً على درجة حرارة الغرفة ، ومن السهل بللورة الميناكوينونات menaquinones المختلفة من المذيبات العضوية ، فهي ذات درجة انصهار تراوح من ٢٥ الى ٦٠ °م ، وذلك على حسب طول السلسلة الايزوبرينية isoprenoid chain . أما فيتامين ك فله درجة انصهار = - ٢٠ °م ، ووزن جزيئي = ٤٥٠,٧ .

الخواص الطبيعية :

الصورة المؤكسدة لفيتامين ك تظهر امتصاصات في الـ UV مثلما تظهرها نواه الألفانافثوكوينون α - naphthoquinone ، حيث تظهر ٤ امتصاصات (peaks) بين طول موجة ٢٤٠ nm و ٢٨٠ nm وامتصاص غير حاد بين طول موجة ٢٢٠ - ٢٣٠ nm . ويتغير الامتصاص بدرجة كبيرة جداً عند أختزاله إلى هيدروكوينون ، ويختفى الـ peak الرئيسى الذى عند طول موجة ٢٧٠ nm . وتظهر أيضاً هذه المركبات خواص فى الـ IR و NMR متشابهة لما تحتوية من حلقة النافثوكوينون . وقد استخدم الـ MS فى تقدير طول السلسلة الجانبية ودرجة التشبع فى مشابهاة ومشتقات الفيتامين .

انتشاره وتوزيعه :

- ١- وجوده فى النباتات :- يوجد فى الفواكه مثل البرتقال والطماطم وفى الخضراوات مثل السبانخ والكرب والالفا أُلُفا والقرنبيط وزيت فول الصويا ، وفى النمل والبذور ، ويوجد الفيلوكوينون فى الأوراق الخضراء .
- ٢ - وجوده فى الحيوانات :- يوجد فى كبد الخنزير والبيض واللبن ولحم السمك fish meat . ويعتبر لحم السمك مصدراً للانتاج التجارى لفيتامين ك . كما أن بعض الأنسجة الحيوانية مثل الكبد يوجد بها الميناكوينونات .
- ٣ - وجوده فى الكائنات الحية الدقيقة :- يوجد فى البكتريا المعوية intestinal bacteria ، كما يوجد الميناكوينونات فى البكتريا أيضاً .

المصادر الغذائية :

- ١ - المصادر الغنية :- من ١٠٠ - ٣٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم كما فى السبانخ وفول الصويا والقرنبيط والكرب وكبد الخنزير وكبد البقر .
- ٢ - المصادر المتوسطة :- من ١٠ - ١٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم كما فى البطاطس والطماطم والالفا أُلُفا وصفار البيض وجنين القمح .
- ٣ - المصادر المنخفضة :- من صفر - ١٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم كما فى الذرة والجزر والبقدونس والبسلة واللبن .

الدور الطبى والغذائى :

١ - وحدات فيتامين ك :

وحده دولية واحدة IU = ٠,٠٠٠,٠٠٨ ملجم مناديون menadion .

وحدتين من وحدات دام Dem unit = وحده واحدة من وحدات ansbacher unit

٢ - المقررات الموصى بها :

فى الإنسان البالغ يتراوح المقرر الموصى به بين ٠,٥ و ١,٠ ميكروجرام فيتامين ك لكل كجم من وزن الجسم لكل يوم . وتزداد هذه المتطلبات للأطفال والرضع والحوامل . هذا والغذاء اليومى المتزن يحتوى على الكمية اللازمة للجسم .

٣ - إعطاء الفيتامين :

يعطى فيتامين ك بالحقن فى الوريد (I.V) أو فى العضل (I.M) ، وأحياناً يعطى عن طريق الفم ، ولا يفضل إعطاء موضعياً (على الجلد) .

٤ - أعراض النقص :

وهى تشمل الأعراض الآتية :

انخفاض البروثرومبين فى الدم hypoprothrombinemia .

زيادة النزف hemorrhage and bleeding .

زيادة الزمن اللازم للتجلط clotting time .

نزف حديثى الولادة neonatal hemorrhage .

٥ - تأثير الجرعات العالية Over dose :

عادة الجرعات العالية من فيتامين ك غير سامة nontoxic ولكن أحياناً تكون سامة إذا كانت كبيرة جداً .

ففى الإنسان من المحتمل تتكون جلطة فى الوعاء الدموى thrombosis وقيىء vomiting وزيادة البورفورين فى البول porphyrinuria . أما فى الكلاب فيفرز الألبومين فى البول albuminuria . وفى الفأر الصغير mouse يزداد الهيموجلوبين الحر فى الدم

hemoglobinemia ، كما تظهر حاله cytopenia . وفى الأرنب يزداد الوقت اللازم للتجلط ،

تحليل فيتامين ك

١ - الفصل والاستخلاص :

يتم فصل فيتامين ك من المواد الحيوية التى تحتوى بالطرق القياسية المستعملة للحصول على الليبيدات النشطة حيويًا ، ودائمًا ما يكون الفصل صعباً خصوصاً لو كانت المادة المراد فصلها من المستخلص الأولى كانت قليلة . وعادة ما يتم عمل المستخلصات الأولية باستعمال بعض أنواع من المذيبات النازعة للماء مثل كلوروفورم - ميثانول ، أو بطحن النسيج أولاً مع كبريتات صوديوم لامائية ثم استخلاصها بأسييتون وتتبعه استخلاص بهكسان أو أثير . ويمكن استخلاص العينات الكبيرة (كميات بالكجم) من الأنسجة بالأسيتون فقط . ويفصل بين ماء وهكسان حتى نحصل على الفيتامين الخام . أما العينات الصغيرة مثل الأجزاء التحت خلوية فيمكن استخلاصها برج المعلق المائى مع مخلوط من الأيزوبروبانول وهكسان . ويمكن فصل الطبقتين عن بعضهما بالطرد المركزى ، ثم يتم تحليل الطبقة العليا مباشرة .

مستخلص المذيب غير القطبى الخام للأنسجة يحتوى على كميات كبيرة من ليبيدات متداخلة وكثيرة بالإضافة إلى الفيتامين المرغوب فيه . ويتم تسهيل عملية التنقية إلى مدى أبعد من ذلك . ويمكن فصل عدد من صور الفيتامين عن بعضها البعض وعن الليبيدات الأخرى عن طريق reversed phase partition chromatography . فالطرق العامة لاستخلاص الليبيدات تستخلص معظم صور فيتامين ك من الأنسجة . وعند استخدام مذيب أكثر قطبية more polar يمكن استخلاص الصور الذائبة فى الماء من فيتامين ك water soluble forms من كل من مستخلصات الكبد والبكتريا .

وحيث أن فيتامين ك حساس للوسط القلوى ، فإنه يفضل الاستخلاص بالمذيبات مباشرة وبدون تصبى . وحيث أنه أيضاً يتلف بأشعاع الـ UV ، وعليه فلا بد من تلافى تعرضه لضوء النهار العادى daylight أثناء تحليله . وعادة ما تجفف العينات النباتية قبل الاستخلاص بوضعها فى مجفف تحت تفريغ ، أو بالتجفيد ، ثم ترج المادة الجافة بقوة مع

مذيب عضوى مثل الايثير أو الاسيتون أو ايثيريترولى . وبالمثل تجفف الأنسجة الحيوانية قبل استخلاص الماكرونونات منها . وقد أستخدم الاسيتون والايثير لاستخلاص الماكرونون - ٤ من كبد البقر . كما أمكن فصل الفيلوكوينون من أغذية الأطفال ، برج العينات أولاً مع الماء ثم اضافة حجم ايثانول مكافئ للماء ثم الاستخلاص بحجوم متعاقبة من الايثير والايثير البترولى . وعلى حسب طريقة الاستخلاص يتم تقدير كمية فيتامين ك الفعلية بلا تدخل مع الكيونونات الأخرى . ويمكن التغلب على هذه المشكلة بقياس الفرق بين صورة الفيتامين المؤكسده والمختزلة .

٢ - القياس اللونى :

بعض التفاعلات اللونية تعتمد على وجود نواة النفثوكوينون والأخرى على الكيونونات . وهناك عدة تفاعلات لونية استخدمت فى تقدير فيتامين ك ، ولكن كلها تقتصر إلى التخصص . فتتفاعل الفيلوكوينونات والماكوكوينونات مع ثنائى ايثايل ثنائى ثيوكربمات diethyldithiocarbamate وفى وجود ايثوكسيد الصوديوم sod. ethoxide وتعطى لوناً أزرقاً والذى يبهت ببطء متحولاً إلى لون برتقالى محمر redish-orange . ويمكن أستخدام اللون الأزرق فى التقدير الكمي لهما . ويعرف هذا التفاعل باسم irreverre - sullivan test ، وهو حساس لحوالى ٤ ميكروجرام فيلوكوينون . وهذا التفاعل غير مناسب للمناديون ، ويمكن تقديرها كميأً بقياس اللون الأزرق على طول موجه ٥٧٥ nm والذى يتكون مع ethylacetone فى وجود الامونيا . وهذا التفاعل حساس لحوالى ٥ ميكروجرام مناديون لكل ميللتر . هذا ، ويعطى كل من ثنائى ايثايل مالونات diethyl malonate والاسيتيل أسيتون acetylacetone نفس اللون مع المناديون . ويتفاعل المناديون مع القلويات ليكون لوناً أحمرأً ذو أقصى امتصاص بين طولى الموجه ٤٤٠ و ٤٥٠ nm ، والذى يمكن أستخدامه فى تقدير الفيتامين .

٣ - القياس الطيفى فى منطقة الأشعة فوق البنفسجية :

كل من الفيلوكوينون والماكوكوينونات والمناديون له امتصاص قوى فى ال UV . فأنطيف spectra الفيلوكوينون والماكوكوينونات غالباً ما تكون متماثلة بين طول الموجه ٢٤٠ - ٢٨٠ nm والمناديون لها امتصاص فى نفس المنطقة ولكنها تختلف فى مكان الامتصاص .

ويلزم التخلص من المذيبات التى أستخدمت فى أستخلاص فيتامين ك من الأغذية

(والتي أستخلصت معها ليبيدات أخرى) قبل التقدير بالقياس الطيفي فى الـ UV . ويمكن التخلص من الليبيدات بعملية بلورة على درجة حرارة منخفضة باستعمال خليط مجمد من الأسيتون ثانى أكسيد الكربون الصلب أو بتمرير الليبيدات على أعمدة حمض سيليسيك silicic acid أو ألومينا متعادلة . وأستخدمت الألومينا الغير نشطة (٨٪ ماء) فى فصل الفيلوكوينون عن الليبيدات بالإحلال elution ببينزين متدرج فى التركيز من صفر - ١٢ ٪ فى أثير بترولى .

وتجرى عملية فصل قبل قياس الامتصاص فى الـ UV ، ويتم ذلك على خطوتين على TLC سيليكاجيل . فيتم الجريات الأولى بأستخدام رابع كلوريد الكربون ، والثانى بأستخدام بنزين وفى نفس الاتجاه ، وأخيراً يقدر الفيلوكوينون على الـ spots التى على ألواح TLC .

وكل من الطرق اللونية والأسبكتروفوتومترية ذات أهمية (مفيدة) فى تقدير فيتامين ك فى المستخلصات التى تحتوى على كميات كبيرة منه ، مثل التى يحصل عليها من المزارع البكتيرية ، ولكن هذه الطرق ذات أهمية أقل عندما يتم تقدير الكمية الصغيرة من الفيتامين الموجودة فى معظم المصادر الطبيعية ، فهذه التقديرات تعتمد على التقدير الحيوى .

٤ - التحليل الكروماتوجرافى :

مع أن المواد النباتية تحتوى على فيتامين ك فى صورة فيلوكوينون phylloquinone ، فإن المصادر الحيوانية والبكتيرية غالباً ما تحتوى على مخلوطاً شاملاً لعدد من مشابهات الأيزوبرين isoprene analogs لمجموعة المناديون ، وفصل هذه الصور تم إنجازها على TLC مشبعة بكل من نترات الفضة والبرافين ، وهناك طرق كثيرة من الكروماتوجرافى تتضمن PC و TLC أخرى .

اجرى حديثاً بعض التعديلات المتقدمة فى فصل صور عديدة من فيتامين ك بطريقة توزيع التيار العكسى counter current distribution ، أو بطريقة كروماتوجرافى الطور البخارى vapor phase chromatography ، وأستخدم GC فى تقدير فيتامين ك فى النباتات الخضراء وخلافها من المصادر . كل طرق فصل المشابهات تستلزم مستخلصات مركزة لفيتامين ك ، ويجب أن تتم فى ضوء خافت حتى لا تتلف الـ UV فيتامين ك . والمركبات التى لها نشاط فيتامين ك أيضاً حساسه للقلوى ولكنها نسبياً ثابتة للاكسدة الهوائية والحرارة ويمكن تقطيرها تحت تفريغ حتى يحدث أقل تلف لها . وأهمية تمثيل فيتامين ك فى الأنسجة

الحيوانية وخصوصاً التحولات الداخلية لفيتامين ك ، ومركب 2,3 epoxide الناتج من تمثيلها أمكن تأكيدها باستعمال HPLC كأداة تحليلية لدراسة تمثيل فيتامين ك حيث استخدمت هذه الطريقة أولاً لفصل فيتامين ك ثم لتقديره . وكذلك تحول أيبوكسيد فيتامين ك سواء داخل أو خارج الكائن الحي (*in vitro* , *in vivo*) إلى فيتامين ك . وهذه الطريقة قادرة على فصل صورة فيتامين ك المؤكسدة عن المختزلة . وقد أمكن استعمالها في دراسة الدور الجزيئي molecular role لفيتامين ك . وأستعملت هذه الطريقة أيضاً في دراسة توزيع فيتامين ك في الإنسان عند حقنه به ، وأيضاً لدراسة مدى تحوله turnover . وعند استخدام الـ HPLC أمكن فصل الصورتين *cis* و *trans* للفيلوكوينون وصور الفيتامين الأخرى (4- MQ عن 10 - MQ) باستبدال العمود في HPLC . وهذه الطريقة أحسن بكثير جداً من الطرق الكروماتوجرافية السابقة .

ومن أهم خواص فيتامين ك والكوينونات المشابهة : -

أ - تختزل بسهولة إلى هيدروكوينونات hydroquinones .

ب - سهولة إسترجاعها بواسطة الأكسدة . وهذه المركبات تعتبر حساسة sensitive (سريعة التأثير) عند التقدير .

ولذلك فالطرق الكروماتوجرافية تلعب دوراً هاماً في التحليل . وعادة استخدم طريقة أو أكثر في خطوات الفصل شيء ضروري ولا بد منه ، وذلك لوجود نقص في طرق التقدير المتخصصة ، وعليه يجب التوسع في استخدام الطرق الكروماتوجرافية المختلفة (TLC ، GLC ، Pc) ، وخصوصاً الـ TLC .

ونظراً لكثرة مركبات الكوينونات بالإضافة الى أنواع فيتامين ك المختلفة ، فقد تم وضع رموز مختصرة abbreviation لهذه المركبات بواسطة IUPAC ، والجدول التالي يوضحها :-

حيث أن : $n =$ عدد وحدات الأيزوبرين (المشبعة أو الغير مشبعة) على السلسلة الجانبية .

Trivial Name	Suggestion	Abbreviations
Vitamin K ₁	Phylloquinone	K (K-4)
Vitamin K ₂	Menaquinone - n	MK - n
Vitamin K ₃	Menadione	
Plastoquinones	Plastoquinone-n	PQ - n
Ubiquinones.		
Coenzyme Q	Ubiquinone - n	Q - n
α - Tocopheryl quinone	α - Tocopheryl quinone	α - TQ

٥ - الطرق الحيوية :

الطرق العادية لتقدير كمية فيتامين ك حيويًا في مصدر مجهول تعتمد على تقدير الزمن اللازم لتجلط الدم whole blood clotting في الدجاج ، ويتم فيها أستنزاف فيتامين ك من جسم الدجاج الصغير بالتغذية على علائق خالية من الفيتامين حتى يصبح الزمن اللازم لتجلط الدم ٤ - ٧ مرات ضعف ما يلزم لتجلط الدم الطبيعي . ويتم التقدير بعد اضافة Ca^{++} وثروروبلاستين مخ الدجاج brain thromboplastin إلى الدم المضاف إليه سترات citrated blood . والمواد المراد تقدير الفيتامين فيها توضع داخل أقراص مع سكر مطحون جيداً وتمرر خلال المريء esophagus باستعمال مقبض crop مناسب . يعاد تقدير زمن التجلط بعد ٢٠ ساعة (أى يقدر قبل إعطاء القرص وبعده بعشرين ساعة) .

وتقارن أستجابة هذه المعاملة مع أستجابة كميات معلومة من فيتامين ك . هذا ، فإذا توافرت كميات كبيرة من المادة المراد تقدير الفيتامين فيها ، فيمكن أن تضاف إلى علائق خالية من فيتامين ك وتغذى بها الحيوانات (دجاج) لمدة اكبر من اسبوعين .

تقارن الأزمنة اللازمة لتجلط لدم مع تلك التى تعطى كميات معلومه من فيتامين ك ألا وهى ال standard ، هذا ، فالبرغم من أن تقدير التجلط clotting assay مازالت تستعمل ، إلا أنها جزئياً غير حساسة ، وهى إلى حدأماحيوية bioassay . وتستعمل طرق أكثر قياسية من تلك ، وهى قياس الأزمنة اللازمة لتجلط البلازما على مرحلة واحدة one stage plasma clotting times أو الطريقة المعدلة لها ، وتلك الطرق قياسية أكثر من الطرق التى تستعمل الدم الكلى whole blood .

درجة الحساسية لكلا الطريقتين تعتمد على ظروف التقدير نفسها والمصدر وطريقة

تحضير الثرومبوبلاستين المحضر والمستعمل فى القياس . وتم تطوير هذا الاساس بأحداث حاله أنخفاض البروثرومبين فى الدم hypoprothrombinemia بالتغذية على مشتقات الكيومارين coumarin . وهى مواد مانعة لتجلط الدم anticoagulant . وتلك أفضل من التغذية على علائق خالية من فيتامين ك . هذا التعديل المطور لطريقة التقدير الحيوية الأساسية تبخس النشاط الحيوى للمناديون ومشتقاته الكيميائية بدرجة كبيرة (تثبطه) فى الحيوانات الطبيعية . والتقدير الحيوى القياسى تم تعديله أيضاً بإضافة مستحضرات السلفا الطبية sulfa drugs إلى العلائق الغذائية ، وهذا التغيير يقلل إلى مشاركة لإى فيتامين ك الذى يخلق معوياً ، وبذلك تزداد حساسية التقدير .

الدجاج من أحسن الأجناس المفضلة لظهور حالة نقص فيتامين ك لأن متطلباتها من فيتامين ك نسبياً عالية ، وفيتامين ك المأخوذ عن طريق via coprophagy لا تشكل أى مشكلة . ولكن ظهور نفس الحالة فى الثدييات الصغيرة يكون صعباً .

كل الطرق الحيوية التى يتطلب فيها أخذ المواد عن طريق الفم oral assay ، تتعقد وتزداد صعوبتها بتأثير المعدلات المختلفة وطول أو اتساع مدى الامتصاص (من الأمعاء) المرغوب فيه من النواتج المختلفة له تأثير أيضاً على القياس . فعندما تتيسر مستحضرات أكثر نقاوة ، فإنه يمكن إعطاؤها عن طريق الحقن فى الوريد . والدجاج المصاب بحالة نقص البروثرومين فى الدم hypoprothrombinemia حساس بعض الشيء للنزف hemorrhage وذلك نتيجة لرقعة الشعيرات الدموية .

وأمكن استعمال فئران مصابة بنقص فيتامين ك لتقدير النشاط الحيوى لهذا الفيتامين . فتغذى الفئران على علائق خالية من فيتامين ك لمدة أسبوعين ، وذلك لتقليل مستويات البروثرومين إلى حوالى ٤٠٪ عن الطبيعى ، وتحقن الصور المختلفة من فيتامين ك فى قلب الحيوان intercardially ، وتقدر الاستجابة بعد ١٨ ساعة . فى هذه الطريقة ١٠ مول mol من الفيلوكوينون تعطى أقصى استجابة . وهذه الطريقة تستخدم فقط لو توافرت صور نقية نسبياً من الفيتامين .

الاختبار اللوني لفيتامين ك

(Naphthoquinone) (Stroev and Makarova , 1989)

يتفاعل فيتامين ك مع diethyldithiocarbamate فى الوسط القلوى ويعطى معقد ذو لون أزرق .

الجواهر الكشفية :

- ١ - محلول فيتامين ك مشبع فى كحول ايثايل ٧٠٪ .
- ٢ - محلول sodium diethyldithiocarbamate (DDC) (٢ ٪ فى كحول) .
- ٣ - محلول هيدروكسيد صوديوم كحولى (٤ ٪ فى كحول) .

التكنيك :

- ١ - فى أنبوبة اختبار جافه ، يضاف ٤ نقط من محلول فيتامين ك ، ثم يضاف إليها ٨ نقط من محلول sodium diethyldithiocarbamate ، وأخيراً ٤ نقط محلول هيدروكسيد الصوديوم الكحولى .
- ٢ - ترج محتويات الأنبوبة جيد ويلاحظ تكون اللون الأزرق .

تقدير فيتامين ك بالطريقة اللونية (Gyorgy and Rubin , 1950)

يتفاعل فيتامين ك مع sodium diethyldithiocarbamate (DDC) وكحولات صوديوم ويتكون لون أزرق كوبلتى غامق ، وأستغل هذا التفاعل لتقدير فيتامين ك لونياً .

الجواهر الكشفية :

- ١ - كحول ايثايل ٩٥ ٪ .
- ٢ - sodium alcoholate : - ويحضر بإذابة ٢ جم صوديوم فى ١٠٠ مل ايثانول ٩٥٪ .
- ٣ - محلول DDC (٥ ٪ فى ايثانول ٩٥ ٪) : - لو كانت مادته sodium diethyl dithiocarbamate غير نقيه ، فلا بد من أعاده بللورتها فى ايثانول ٩٥٪ دافىء مع إزالة اللون بواسطة carbaraffin ، ولا بد ان يكون محلول DDC فى الايثانول

عديم اللون ويستعمل طازجاً ولايحفظ لأكثر من يوم واحد .

٤ - محلول فيتامين ك نقى (٠ , ٥ ملجم / مل) .

التكنيك : -

١ - فى أنبوبة جافة نظيفة ، يوضع ٢ مل من محلول الأيثانول ٩٥٪ والذي يحتوى على المادة المختبره (تذاب وزنه معلومه بالضبط من المادة فى حجم معين من الكحول) ، ثم يضاف ٢ مل محلول DDC ، وأخيراً ١ , ٠ مل جوهر كحولات الصوديوم .

٢ - فى هذه الظروف يتكون لون أزرق كوبلتى غامض deep cobalt blue والذي تصل شدة كثافته بعد ٥ ق ، ثم يقل تدريجياً بعد ٨ ق .

٣ - يقاس اللون فى جهاز قياسى الألوان فى وجود فلتر أخضر مناسب ، وفى وجود البلاك (بدون فيتامين) .

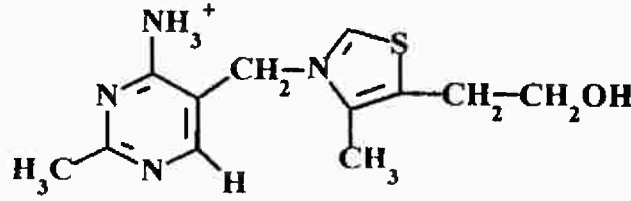
٤ - تحضر عده أنابيب تحتوى على المحاليل القياسية تتراوح بين تركيز ٠ , ٠١ ملجم / ٢ مل ، و ١ , ٠ ملجم / ٢ مل فى كحول أيثانيل . وتجرى عليها نفس التفاعل وبنفسى الطريقة التى أجريت على العينة ، ومنها يرسم المنحنى القياسى . وحيث أن اللون ثابت لعدة دقائق قليلة فلا بد أن تؤخذ القراءات كل دقيقة ولده ١٠ ق من بعد إضافة آخر جوهر ، وتستعمل أكبر قراءات . ومما هو جدير بالذكر ، إنه على التركيزات المنخفضة يكون اللون أكثر ثباتاً عنه على التركيزات المرتفعة .

٥ - يحسب تركيز الفيتامين فى العينة من خلال المنحنى القياسى .

تقدير فيتامين ك بالطرق الكروماتوجرافية : -

نظراً لصعوبة تقدير فيتامين ك بالطرق اللونية ، فقد أستخدمت الآن الطرق الكروماتوجرافية الحديثة لتقديره ، وسلسله كتب Chromatographic Science أهتمت بهذا الموضوع ونشرت عدداً خاصاً لتقدير الفيتامينات بالطرق الكروماتوجرافية (De Leenheer and De Ruyter , 1985).

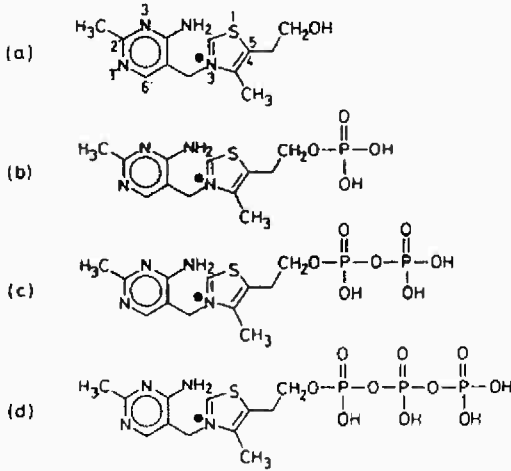
فيتامين ب_١ (الثيامين) - Vit . B₁ (Thiamine)



يلعب فيتامين ب دوراً كبيراً في عمليات التمثيل الغذائي في جميع الخلايا الحية في صورته معاون أنزيمي لكثير من الأنزيمات ، وصورته كمعاون أنزيمي تشمل الثيامين أحادي الفوسفات (TMP) ، وثنائي الفوسفات (TDP) ، والثلاثي الفوسفات (TTP) . وشكل (٣١) يعرض التركيب الكيميائي للثيامين وصورته كمعادن أنزيمي .

الثيامين هيدروكلوريد عبارته عن بلورات عديمه اللون وهي عادة hemihydrate ولها رائحة مميزة جداً وذات طعم مر bitter taste ، تنوب في الماء بدرجة كبيرة جداً ، يذوب جزئياً في الكحول والأسيتون ، وغير ذائب في الأثير والبنزين والهكسان و الكلوروفورم ومذيبات الدهون الأخرى .

بلورات الكلوريد (هيدروكلوريد) المحضرة من الكحول و الماء أو من الأسيتون والماء تكون hemihydrate . وعند تركها في الهواء الجوى فأنها تمتص الماء بحيث يصبح جزئ ماء لكل جزئ (مول / مول) ، ويمكن التخلص من الماء بالتسخين حتى ١٠٠ ° م أو تحت تفريغ باستعمال H₂SO₄ أو P₂O₅ . والفيتامين ثابت في الصورة الجافة ويتحمل حتى ١٠٠ ° م . المحلول المائي ٥ ٪ منه (لصورة الهيدروكلوريد) له pH حوالى ٣,٥ . الصورة أحادية النترات mononitrate لها pH = ٦,٥ - ٧,١ . المحاليل المائية ثابتة للحرارة على درجة pH أقل ٥,٥ (حتى في الأتوكلاف) وثابتة للاكسدة . أما على pH أعلى من ٥ ، فإنه يتلف



Thiamin and its coenzyme forms.

a. Thiamin (free base) with the ring atoms numbered; b. Thiamin monophosphate, TMP; c. Thiamin diphosphate, TDP; d. Thiamin triphosphate, TTP

شكل (٢١) التركيب الكيميائي للثيامين وصورة كمعيار أنزيمي

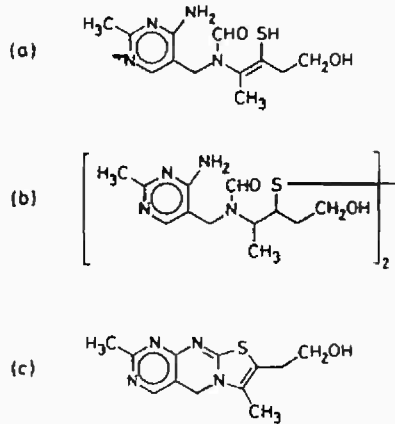
(i) الثيامين .

(b) الثيامين أحادي الفوسفات TMP .

(c) الثيامين ثنائي الفوسفات TDP .

(d) الثيامين ثلاثي الفوسفات TTP .

بسرعة نسبياً بالتعقيم في الأتوكلاف ، وعلى $pH = 7$ أو أعلى فإنه يتلف بالحرارة أو حتى في الجو العادي . وعند معاملة الفيتامين بأيدروكسيد الصوديوم والأكسجين ، تتكون مركبات عديدة أهمها الثيامين ثيول والثيامين ثنائي الكبريتيد والثيوكروم . وشكل (٢٢) يوضح التركيب الكيميائي لهذه النواتج .



Some products of treatment of thiamin with sodium hydroxide and oxygen

a. Thiamin thiol; b. Thiamin disulfide; c. Thiochrome

شكل (٣٢) نواتج معاملة الثيامين بأيديروكسيد الصوديوم والأكسجين

تفاعلاته :

هذا الفيتامين يتأثر بالحرارة والوسط القلوي والعوامل المؤكسدة والمختزلة والضوء UV ، وعلى ذلك فكل هذه العوامل تتلفه ، ولكنه ثابت في الوسط الحامض .

الذوبان :

ينوب في الماء (١ جم / ١ مل ماء) ، وفي المحاليل الكحولية ، ولاينوب في المذيبات الغير قطبية مثل البنزين والكلوروفورم والإيثير .

صوره :

الصورة النقية منه بلورية بيضاء .

خواصه :

الوزن الجزيئي ٣٣٧,٣ (كهيدروكلوريد) ، درجة انصهاره $MP = 244^{\circ}C$ ، يوجد في صورة ملح أحماض mononitrate (قاعدة عضوية) . المجموعات الهامة للنشاط هي : - C_2 of thiazole و C_2 of Pyrimidine و OH . وهو غير نشط ضوئياً .

أنتشاره ومصادره :

- ١ - وجوده فى النباتات : - كل الفواكه بها كمية قليلة من الثيامين ماعدا عنب الثعلب gooseberries والبرقوق plums فيوجد فيها كمية متوسطة من الفيتامين . وكل الخضروات بها كمية قليلة أيضاً عدا البقول . والخضروات التى تؤكل أوراقها والذرة والبسلة والبطاطس والقرنبيط فيوجد فيها كميات متوسطة من الفيتامين . كل النقل بها كميات متوسطة منه عدا جوز الهند coconut فيوجد فيه كمية صغيرة . وكل الحبوب grains يوجد فيها كميات متوسطة عدا غلاف الحبوب والنخالة وجنين القمح ونواتج تبيض الأرز فيوجد فيها كميات كبيرة .
- ٢ - وجوده فى الحيوانات : كل الحيوانات بها كميات متوسطة من الثيامين عدا لحم الخنزير فيوجد به كمية كبيرة . وبعض الأسماك يوجد بها كميات صغيرة منه .
- ٣ - وجوده فى الكائنات الحية الدقيقة : - الخميرة (الغير حية killed) ، وفى المشروم (عش الغراب) mushrooms فيوجد فيها كميات متوسطة .

المصادر الغذائية :

- ١ - المصادر الغنية : - من ١٠٠٠ إلى ١٠٠٠٠ لكل ١٠٠ جم كما فى جنين القمح ونخالة الأرز ودقيق فول الصويا والخميرة ولحم فخذ الخنزير المملح ham .
- ٢ - المصادر المتوسطة : - من ١٠٠ إلى ١٠٠٠ لكل ١٠٠ جم كما فى عنب الثعلب والبرقوق الجاف والخوخ والأسبراجس والبقول (بأنواعها) والقرنبيط والذرة والبطاطس والشعير والفول السودانى ولحم وأعضاء البقر والدجاج والخنزير والرومى والعجول ، وفى البيض واللبن والحوت والسالمون والماكريل وسمك الشبوط carp .
- ٣ - المصادر القليلة : - من ١٠ إلى ١٠٠ ميكروجرام لكل ١٠٠ جم كما فى التفاح والموز والفراولة والأنواع المختلفة من البطيخ والكريز والجريب فروت والليمون والبرتقال ، وفى الكرنب والخس والأبصال واللفت والسبانخ والبطاطا ، وفى الرنجة والتونا إلخ .

الدور الطبى والغذائى :

١ - وحدات فيتامين ب_١ :-

وحده دولية واحده = ٣ ميكروجرام ثيامين هيدروكلوريد .
= وحده واحده من وحدات usp .

٢ - المستويات الطبيعية فى الدم :-

فى الذكور :- 1.3 µg / 100 free base in serum
3.11 µg / 100 carboxylase in blood cells

٣ - المقررات الموصى بها :-

للأطفال :- من ٠,٦ إلى ١,١ ملجم / يوم .
للبالغين :- ١,٠ ملجم / يوم للإناث و ١,٤ ملجم / يوم للذكور .
حالات خاصة :- تزداد المتطلبات فى الحمل والرضاعة وذلك تبعاً لوزن الجسم
والسرعات المأخوذة والتخليق المعوى والامتصاص .

٤ - إعطاء الفيتامين :-

يعطى عن طريق الحقن (I.V و I.P) ، والطريق المفضل لأعطائه هو عن طريق الفم .

٥ - أعراض النقص :

أ) فى الإنسان :-

تظهر أعراض كثيرة وفى تشمل مايلى :- البرى برى beri beri ، فقدان الحس
anesthesia ، فرط الحساسية hyperesthesia ، تأخير النمو retarded growth ، انحلال
الخلايا العصبية neuron degeneration ، فقد الوزن weight loss ، تعب fatigue ، نقص
أكسجين الأنسجة anoxia ، كثرة الشكوى من الجهاز الهضمى ، ضعف weakness ، فقد
الانعكاسات اللاإرادية loss of reflexes ، احساس أهترازى vibratory sense ، تأثير على
القلب والجهاز الدورى circulatory and cardiac involvement ، اضطرابات عقلية
mental disturbances ، فقد الذاكرة (نسيان) memory loss ، سرعة الغضب

irritability ، ضمور عضلى فى الأطراف muscular atrophy in extremities ، زياده بيروفات ولاكتات الدم increased blood pyruvate and lactate .

ب (فى الحيوانات المعملية : -

زيادة الدهون المختزنة ، زياده درجة حرارة الجسم ، اضطرابات عصبية polyneuritis ، التهاب الأعصاب ، مرض فى الصحة والصوت tone ، أودىما edema ، بطء القلب bradycardia ، تضخم فى القلب cardiac enlargement ، خلل فى العين (فى الدجاج والرومى) opisthotonos .

تحليل الثيامين

١ - فصل وتقدير الثيامين :

على درجة $pH = 8$ أو أعلى ، يتحول الثيامين إلى اللون الأصفر ويتلف بسلسلة من التفاعلات المعقدة وغير العكسية فى الوسط القلوى القوي فى وجود عوامل مؤكسدة مثل $[Fe(CN)_6]^{3-}$ cyanogen bromide, $HgCl_2$ & ، وغيرها ، ويتحول الثيامين إلى ثيوكروم thiochrome والذى له خاصية فلورة زرقاء blue fluorescence والتي يستفاد منها فى تقدير الفيتامين . والثيامين يعطى عديد من التفاعلات اللونية مثل اللون الوردى pink مع diazotized p- sulfanilic acid ولون أحمر أرجوانى red purpl مع diazotized potassium bismuth ، وراسب أحمر برتقالى orang red مع aminoacetophenone ، وكل من iodide , mercuric chloride , gold chloride , picrolonic acid ، يعطى I_2 ، وراسب ملونة مع الثيامين .

ويترسب الثيامين مع التانينات tannins ومع عديد من القلويدات alkaloids ، ومع حمض البكريك picric acid ، quinine ، strychnine ومع iron anm . citrate . ويتكسر بسرعة بالمعاملة بالكبريتيت sulfite عند الـ methylene bridge إلى ثيازول وبريميدين على درجة $pH 6$ أو أعلى . وعلى درجة pH أقل من ٥ يقل معدل التلف بدرجة كبيرة . وعلى درجة $pH = ٥$ يعطى الثيامين أقصى امتصاص عند طول موجة ٢٦٧ و ٢٣٥ nm . ودرجة الامتصاص تعتمد على درجة الـ pH ، فمثلاً على درجة pH أقل من ٢ يعطى امتصاص واحد عند طول موجة ٢٤٧ nm .

وقد عرف منذ عام ١٩٣٥ إن أكسده الثيامين بالفري سيانيد ferricyanide فى الوسط القلوى alkaline oxidation تعطى ناتج له فلورة زرقاء كثيفة ، وقد سمي بالثيوكروم thiochrome .

وقد عدلت هذه الطريقة كثيراً . ولكن مازالت حتى الآن تستخدم بكثرة فى تقدير الثيامين فى الأغذية والمستحضرات الطبية والمواد الأخرى . وهى أساس الطريقة الرسمية لتقديره .

أ - طرق الفصل Isolation procedures :

تم فصل الثيامين من المصادر الطبيعية natural sources مثل نخالة الأرز rice bran و مستخلصات الخميره yeast extracts ، أو من جنين القمح wheat germ . وأساس الفصل يعتمد على أنه يدمص على بعض المواد مثل fuller's earth و مستحضر alum silicate مائى . وهذا الأساس يستخدم لفصل الثيامين عن المواد المصاحبة والمتداخلة معه من المستخلصات الكلية والمعقدة للأنسجة الحيوانية والنباتية أستعداداً لتقديرها سبكتروفوتومترياً أو فلورومترياً .

فالثيامين فى الصورة الكاتيونية cationic form يدمص على المواد النشطة التالية Permutit-T أو Thiochrome Decalso . أما المواد الأنيونية والغير أيونية & anionic nonionic substances فتتمر خلال العمود دون أدمصاص ، ثم يتم أحلال الثيامين eluti بأستعمال محلول كلوريد بوتاسيوم محمض ساخن hot acidic KCl و تم فصل الثيامين وأستراته الفوسفاتية وبعض مشابهاه بأستعمال طرق متعددة من كروماتوجرافى الأعمده بأستعمال مبادل كاتيونى ضعيف weak cation exchanger مع غسيل متدرج gradient elution أو مبادل كاتيونى قوى مثل Dowex 1×8 بأستعمال عمودين وراء بعضهما أوفى عمود واحد ويمكن استعمال Dowex 2×8 ومحلول أحلال مكون من formic acid (M ٠,٠١) متبوع بمحلول فورمات صوديوم (M ٠,٠٥) . كما أمكن فصل الثيامين أيضاً بطريقة ممتازة بأستعمال طرق الكروماتوجرافى على ورق ترشيح واتمان رقم ١ مع أستعمال مخلوط مكون من n- propanol : محلول خلاص منظم ($p^H = ٥$ ، تركيزه M ١) : ماء ، بنسبة ٧٠ : ٢٠ : ١٠ . أو بأستعمال ورق Munktel #00 مع أستعمال مخلوط مكون من n-propanol : محلول خلاص منظم ($p^H = ٤,٥$ ، تركيزه M ٠,٠٥) بنسبة ٦٠ : ٤٠ .

وأخيراً أمكن فصل الثيامين وإستراته وفصل فوسفات الثيامين عن فوسفاتات النيوكليوتيد nucleotide phosphate بأستعمال ورق واتمان رقم ١ ومذيب مكون من $(M1) EDTA : (M1) NH_4 OH : isobutyric acid$: بنسبة ١٠٠ : ٦٠ : ١,٦ وكانت قيم R_F بهذه الطريقة هي ٠,٨٧ للثيامين و ٠,٦٨ للثيامين ثنائي الفوسفات و ٠,٧٧ للثيامين أحادي الفوسفات و ٠,٥٥ للثيامين ثلاثي الفوسفات .

وتم فصل الثيامين عن إستراته ، وفصل الثيازول thiazole ، وفوسفات الثيازول thiazole phosphate على ورق واتمان رقم ١ بأستعمال مخلوط مكون من n-propanol : محلول خلات تنظم ($M ١ , ٥ = pH$) : ماء ، بنسبة ٧٠ : ١٠ : ٢٠ . وأيضاً تم الفصل على ورق واتمان 3MM بأستعمال إى من المذيبين التاليين : n-propanol : NH_4OH مركزة : $(N ٠ , ١) NaH_2PO_4$: ماء ، بنسبة ١٩٨ : ٢ : ٤٠ : ٥٨ ، أو n-propanol : ماء : محلول خلات منظم ($M ١ , ٥ = pH$) ، بنسبة ١:٢:٧ . وكانت قيم الـ R_F للمذيب الأول هي ٠,٨٤ للثيامين هيدروكلوريد و ٠,٧٠ للثيامين أحادي الفوسفات و ٠,٥٤ للثيامين ثنائي الفوسفات ، للمذيب الثاني ٠,٦٠ للثيامين هيدروكلوريد و ٠,٢٧ للثيامين أحادي الفوسفات و ٠,٠٦ للثيامين ثنائي الفوسفات .

تم أستخدام الـ TLC أيضاً لفصل الثيامين وإستراته ونواتجه على ألواح من السيليكا جيل (silica gel G) بأستعمال مذيبات مختلفة . وهذه الطريقة أحسن لأنها تستعمل كميات صغيرة من المادة تحت الدراسة ، كما أنها أسرع وأدق .

تم أستخدام الألكتروفروريسيس لفصل الثيامين وإستراته الفوسفاتية ، وأستخدام فى هذا التكنيك ورق Munktel 20 فى محلول خلات منظم ($M ٠ , ٥ , ٥ , ٤٤ = pH$) ، وفيها يجرى الثيامين وإستر أحادى الفوسفات إلى القطب السالب (⊖) negative أما فوسفات ثنائى وثلاثى الثيامين فتجرى إلى القطب الموجب (⊕) positive ، وفصلهم كان ممتازاً .

وتم أستخدام تكنيك الألكتروفروريسيس بأستعمال عمود معبأ بمسحوق السيلولوز وأستعمال محلول ammonium formate ($M ٠ , ٥ , ٥ , ٨ = pH$) كمذيب . وأخيراً فى السنوات الأخيرة تم فصل الثيامين وإستراته ومشتاباته بالـ HPLC .

ب - طرق الاستخلاص : Extraction procedures :

يوجد الثيامين أساساً في الأنسجة الحيوانية في صورة استرات الفوسفات ، فحوالي ٨٠٪ يوجد في صورة ثنائي الفوسفات diphosphate وكمية بسيطة فقط traces توجد في صورة أحادي الفوسفات monophosphate وثيامين حر . وحوالي ١٠٪ توجد في صورة ثلاثي الفوسفات triphosphate . أما في النباتات فيوجد الجزء الأكبر منه في صورة ثيامين حر . وفي كلا الحالتين يوجد الجزء الهام من الثيامين مرتبطاً بالبروتين protein bound . وعلى ذلك فإن طرق الاستخلاص يجب أن تصمم على أساس أنه في صورة حرة وأخرى مرتبطة بالبروتين .

وعند الاستخلاص تؤخذ عينة مناسبة من المادة الصلبة أو السائلة تحت الدراسة ، وتطحن وتخلط جيداً homogenize في محلول HCl (١ ، ٠ N) مقدار حجمه حوالي ١٠ - ١٥ مرة من الوزنة المأخوذة من العينة . ويسخن المخلوط بالبخار steam أو على حمام مائي يغلي لمدة ٦٠ ق . ويجب إضافة حامض أضافي لو كانت درجة الـ p^H لنواتج الغسيل أثناء الاستخلاص أكبر من ٢ ، ٠ .

والتقدير الثيامين الكلي يعادل بعد ذلك المستخلص إلى درجة $p^H = ٤ , ٥$ (عادة تتم بواسطة خلاص صوديوم) ثم تعامل بمستحضر أنزيمي يحتوى على الفوسفاتير phosphatase (مثل Takediastase أو Diastase أو Polidase أو Mutase أو Clarase) ، وتحضن لمدة ٤-٥ ساعات على $٤٠ - ٥٠^{\circ}C$ لتحليل استرات الفوسفات . وبالرغم من ذلك فإن استرات الفوسفات تكون أيضاً ثيوكروم وفوسفاتات الثيوكروم thiochrome - phosphates لا تنوب في الأيزوبيوتانول isobutanol وعليه فهي لا تستخلص ولا تقدر كل الفيتامين . ولو كان المطلوب تقدير الثيامين الحر فقط فإن خطوة المعاملة الأنزيمية تستبعد . والمعاملة الأنزيمية للمواد النباتية أيضاً تؤدي إلى تحليل مائي للنشا بكمية زائده ، ويمكن استعمال الطرد المركزي أو الترشيح لفصل المستخلص عن المواد الغير ذائبة .

ج - تنقية إضافية Further purification :

في معظم المواد البيولوجية المعقدة ، من الضروري تطبيق معاملة إضافية للتخلص من المواد المتداخلة interfering ، وفيها يوضع حجم مناسب من المستخلص في عمود مبادل أيوني ion exchanger مجهز ومغسول (سيليكات ألومنيوم aluminum silicate) ، ثم

يفسل العمود بعد ذلك عدة مرات بماء مقطر ساخن حتى تأخذ معها كل المواد الملوثة impurities ، ثم يتبع ذلك بإحلال elution الثيامين بـ ٢٥ مل من محلول ٢٥ % KCl في HCl (١,٠ N) ساخن مرتين أو ثلاث مرات ، ثم يضبط حجم المحلول النهائي إلى حجم معين (عادة ما يكون ٥٠ مل) .

د - تكوين الثيوكروم وقياس الفلورة :

الجواهر الكشفية :

(١) محلول فرى سيانيد القلوى : - يؤخذ ٣ مل من محلول بوتاسيوم فرى سيانيد $K_3 Fe (CN)_6$ (١ %) ، وتخفف إلى ١٠٠ مل بمحلول NaOH ١٥ % ، ويستعمل هذا المحلول حديث التحضير .

(٢) محلول NaOH ١٥ % .

(٣) أيزوبيوتانول خالى فى الفلورة .

الطريقة :

١ - يؤخذ حجمان مناسبان و متساويان من المحلول السابق (مستخلص الفيتامين) فى أنبوتين اختبار .

٢ - يضاف إلى الأولى ٣ مل محلول الفرى سيانيد القلوى مع الرج بطريقة فعالة .

٣ - يضاف إلى الثانية (بلانك Blank) ٣ مل من محلول NaOH .

٤ - يستخلص كل منهما بـ ١٥ مل أيزوبيوتانول بقوة (الرج بشدة) .

٥ - يتم الطرد المركزى ، ثم تؤخذ طبقة الأيزوبيوتانول الصافية .

٦ - وحتى تصبح الطبقة الكحولية خالية من الماء (جافة) وصافية ، ترج هذه الطبقة مع كبريتات صوديوم جافة .

٧ - تقرأ الفلورة فى طبقة الكحول فى جهاز photofluorometer أو spectrophotofluorometer على طول موجة اشارة ٣٦٥ nm وطول موجة انبعاث ٤٣٦ nm .

٨ - تتم أحياناً المعايرة بكوينين قياسى معروف known quinine standard ، ولكن لابد من إجراء نفس الخطوات باستعمال ثيامين قياسى للمقارنة .

هذا وقد وجد بعض العلماء إن كلوريد الزنبيق $HgCl_2$ أو بروميد السيانوجين cyanogen bromide ، أفضل من الفرى سيانيد كعامل اكسدة oxidant فى تحول الثيامين إلى ثيوكروم . وهناك بعض التعديلات ومنها اضافة H_2O_2 قبل قياس الفلورة للتخلص من الفرى سيانيد الزائد .

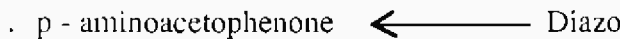
ويمكن تقدير كل من الثيامين و hydroxyethylthiamin و pyriithiamin فى نفس العينة بأختبار مناسب لكل من ظروف الأكسدة وأطوال الاثارة والانبعاث الموجية . هذا ، وفلورة الثيوكروم والبيريكروم pyrichrome تزداد بشده فى وجود الكحول وعلى ذلك فإن الاستخلاص بالأيزوبيوتانول له غرضين مهمين و هما : -

١ - فصل الثيوكروم عن المواد المتداخلة .

٢ - زياده حساسية التقدير .

هـ - طرق أخرى :

يمكن تقدير الثيامين سبكتروفوتومترياً بقياس الامتصاص فى الـ UV على طول موجة ٢٦٦ nm . ولكن هذا ملائم فقط فى عدم وجود مواد أخرى لها امتصاص على نفس الطول الموجى مثل الأحماض النووية (لها امتصاص قوى عند طول موجة ٢٦٥ nm) . والطريقتان الأسبكتروفوتومترية واللونية معاً يعتمدا على إنتاج أمين عطرى مع الثيامين كما يلى : -



وهذه الطريقة أقل فى حساسيتها بكثير جداً عن طرق فلورة الثيوكروم ، ولذلك فهى لا تستخدم بتوسع واستخدامها محدود بعض الشيء .

٢ - الطرق الحيوية Bioassay Procedures :

أ - باستعمال الحيوانات Using animals : -

إن أول طرق تقدير الثيامين حيويًا وكذلك الأبحاث المتعلقة بفصله وتنقيته ، كانت

تستعمل الدجاج والحمام rice birds , pigeons . وحيث أن هناك علاقة بين الثيامين وتمثيل البيروفات ، لذلك أستعمل هذا دليلاً على كميته . وأستعمل أيضاً كل من قياس معدل النمو فى الفئران أو relief brady cardia لتقدير الثيامين المتاح . وهذه الطرق تعاني من تغيرات كبيرة وتتطلب كميات كبيرة نسبياً من المادة تحت الدراسة وإلى مدة طويلة .

ب - التقديرات الميكروبيولوجية Microbiological assays :

أنواع عديدة من الكائنات الحية النقية تتطلب الثيامين لنموها وتكاثرها ، ومن أهم هذه الأنواع *L. fermenti* ، *L. viridescens* . وغيرهما . والبعض منها ليس متخصصاً فعلاً حيث أنها تستجيب للثيازول وبريميدين كبادئات precursors جيدة للثيامين . وكلا النوعين السابقين يستخدمان بكثرة لهذا التقدير لأنهما يستجيبان فعلاً للثيامين فقط .

والتقدير الميكروبيولوجى سهل ، وحساس جداً (يكشف به عن ٥ - ٥٠ نانوجرام ng) ورخيص التكاليف . والقيم المأخوذة من هذه الطرق لابد وأن تقارن مع تلك المأخوذة من طريقه الشيوكرام .

الأختبار اللونى للثيامين (Stroev and Makarova , 1989)

عندما يتفاعل الثيامين مع diazophenylsulphonic acid فى الوسط القلوى يتكون معقد نولون برتقالى - أحمر .

الجواهر الكشفية :

- ١ - مسحوق ثيامين Thiamine powder .
- ٢ - محلول sulphanilic acid (٨ ٪ فى الماء) .
- ٣ - محلول نيتريت صوديوم sodium nitrite حديث التحضير (٥ ٪ فى الماء) .
- ٤ - محلول كربونات صوديوم sodium carbonate (٨٠ ٪) .

التكنيك :

- ١ - فى أنبوبة أختبار نظيفة جافة ، يضاف ٥ نقط من محلول حمض سلفانيليك sulphanilic acid و ٥ نقط من محلول نيتريت الصوديوم ، ثم يضاف إلى المخلوط قليل من مسحوق الثيامين على طرف ملعقة معملية spatula - tip .

وأخيراً يضاف ٥ نقط من محلول كربونات الصوديوم إلى محلول جوهر الداي آزو diaso المتكون فى الأنبوبة مع الثيامين .

٢ - تخلط محتويات الأنبوبة جيد ، فيلاحظ تكون لون برتقالى - أحمر .

تقدير الثيامين فى العينات الغذائية بطريقة الثيوكروم

(Schanderl , 1970 ; A.O.A.C , 1975)

الجواهر الكشفية :

١ - محلول هيدروكسيد صوديوم (١٥٪) : - يذاب ١٥ جم NaOH فى ماء ، ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠ مل .

٢ - محلول بوتاسيوم فرى سيانيد Pot. ferricyanide (١٪) : - يذاب ١ جم $K_3Fe(CN)_6$ فى ماء ثم يكمل إلى ١٠٠ مل ، ويحضر هذا المحلول يوم الاستعمال .

٣ - جوهر التاكسد oxidizing reagent : - يؤخذ ٤,٠ مل من محلول بوتاسيوم فرى سيانيد فى ورق معيارى ١٠٠ مل ويكمل إلى العلامة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم ثم يخلط معاً جيداً ، ويستعمل هذا المحلول خلال ٤ ساعات من ساعة تحضيره .

٤ - Isobutanol : - مقطر فى جهاز تقطير زجاجى مرتين، ويستعمل إما لامائى anhydrous أو المشبع منه بالماء .

٥ - محلول Quinine sulphate stock : - يستخدم هذا المحلول لكى reproducibility of fluorometer ، ويحضر بأذابة ١٠ ملجم من كبريتات الكوينين فى محلول حمض كبريتيك (١ ، ٠ ، N) ويكمل الحجم إلى لتر بنفس محلول الحمض، ويحفظ هذا المحلول فى زجاجات معتمة لانتفاذ الضوء .

٦ - محلول كبريتات الكوينين القياسى : يخفف حجم واحد من المحلول stock (جوهر رقم ٥) ب ٢٩ حجم من محلول حمض الكبريتيك (١ ، ٠ ، N) ، ويجب أن يكون وميض (فلورة) هذا المحلول تقارب نفس درجة فلورة الثيوكروم المستخلص

بكحول الأيزوبيوتيل والمتحصل عليها من ١ ميكروجرام ثيامين هيدروكلوريد .
ويخزن هذا المحلول فى زجاجات معتمة غير منفذة للضوء

٧ - محلول Thiamine- HCl stock I : - يوزن بالضبط حوالى ٥٠.٠ - ٦٠.٠ ملجم من USP thiamine- HCl referece الذى سبق تجفيفه تحت P_2O_5 فى مجفف حتى يعطى وزن ثابت (وهذا لأن الثيامين مادة شاردة للماء hygroscopic ، ويحفظ الثيامين تحت هذه الظروف لتلافى أمتصاص الرطوبة) ثم تذاب الوزن فى محلول كحول ايثايل ٢٠٪ ودرجه الـ p^H له مضبوطة على ٢.٥ - ٤.٢ بحمض HCl ثم يخفف إلى الحجم اللازم بنفس محلول الكحول الحمض حتى يعطى تركيز ١٠٠ ميكروجرام ثيامين هيدروكلوريد لكل مل . ويحفظ هذا المحلول فى زجاجات محكمة الغلق وغير منفذة للضوء على ١٠° م .

٨ - محلول Thiamine - HCl stock II : - يخفف ١٠٠ مل من المحلول رقم (٧) إلى لتر بنفس المحلول الكحولى (٢٠٪ ، p^H ٢.٥ - ٤.٢) ، وتركيز هذا المحلول ١٠ ميكروجرام ثيامين هيدروكلوريد لكل مل (10 µg/ml) ، ويحفظ أيضاً فى زجاجات محكمة الغلق وغير منفذة للضوء .

٩ - محلول الثيامين هيدروكلوريد القياسى : - يؤخذ ١٠ مل من محلول رقم ٨ ويضاف إليها ٥٠ مل من محلول حمض HCl تركيزه حوالى ٠.١ N ثم يهضم digest أو يعقم فى الأوتوكلاف autoclave كما يحدث فى أستخلاص العينة تماماً . وبعد أن يبرد المحلول يكمل إلى ١٠٠ مل بنفس محلول الحمض ، وتركيز الواحد مل من هذا المحلول يساوى ١ ميكروجرام ثيامين هيدروكلوريد (1 µg / ml) . ويحضر هذا المحلول طازجاً كل وقت تحليل . وفى حالة العينات الفقيرة فى محتواها من الثيامين يخفف ٢٠ مل من هذا المحلول إلى ١٠٠ مل بنفس محلول الحمض ، وتركيز هذا المحلول المخفف هو ٠.٢ ميكروجرام ثيامين هيدروكلوريد لكل مل (0.2 µg / ml)

التكنيك :

أ - الاستخلاص Extraction :

١ - تؤخذ وزنة معلومة بالضبط من العينة وتوضع فى دورق نو حجم مناسب ، ثم

يضاف إليها حجم من حمض هيدروكلوريك (N . ١) بالمل وهذا الحجم مقداره ١٠ مرات من وزن العينة بالجرامات ولا يقل عن ذلك . فى حالة عدم ذوبان العينة بسهولة ، يتم سحقها تفتيتها جيداً فى محلول الحمض ، وإذا حدث تجمعات للعينة ، فيجب رج العينة جيداً حتى تصبح جميع حبيبات العينة فى المحلول . ثم تغسل جوانب الدورق بنفس المحلول .

٢ - يهضم المحلول لمدة ٣٠ ق على ٩٥ - ١٠٠ ° م فى حمام بخار أو حمام مائى مع التقليب باستمرار أو بالتعقيم فى أوتوكلاف لمدة ٣٠ ق على ١٢١ - ١٢٣ ° م . ثم يبرد المحلول . وفى حالة ما تكون هناك تجمعات ، فيتم رج المحلول حتى تنتشت الحبيبات فى المحلول .

٣ - يخفف المحلول المهضوم بواسطة حمض HCl (N . ١) إلى حجم معلوم بالضبط بحيث يعطى حوالى ٠,٢ - ٥,٠ ميكروجرام ثيامين لكل مل ، ثم يرشح .

ب - أكسدة الثيامين إلى ثيوكروم :

١ - يجهز عدد من الأنابيب (٤ على الأقل) بحيث تسع كل منها ٤٠ مل (يمكن أستعمال أوعية تفاعل خاصة reaction vessels) ويضاف لكل منها حوالى ١,٥ جم NaCl أو KCl .

٢ - إلى الأنبوبة الأولى (St.) يضاف ٥ مل من المحلول القياسى (الجوهـر رقم ٩) ، ويجب الأخذ فى الاعتبار إن دقة وصحة النتائج تعتمد على تماثل وتجانس المحلول ولذلك لابد من أتباع التعليمات التالية بالضبط وهى تلافى تعرض المحلول للضوء الذى يتلف الثيوكروم ، وتستعمل ماصة تدفع ٢ مل من جوهر الأكسدة فى زمن قدرة ١ - ٢ ثانية . ويوضع طرف الماصة التى تحتوى على ٣ مل من جوهر الأكسدة فى رقبة الأنبوبة ويقبض عليها بحيث لا يسيل المحلول أو يلامس جدار الأنبوبة الداخلى ، كما تلف الأنبوبة فى حركة دائرية بسيطة باستمرار . وفى الحال وبسرعة يضاف جوهر الأكسدة (٣,٠ مل) .

٢ - بعد أضافة الجوهـر ، تخرج الماصة وتستمر الحركة الدائرية للأنبوبة لتعام التأكد من خلط المحلولين جيداً .

- ٤ - بعد ذلك ، بسرعة وفى الحال يضاف ١٢ مل كحول أيزوبيوتاييل وتغلق الأنابيب ثم ترج بشدة (على الأقل لمدة ١٥ ثانية) .
- ٥ - تعامل الأنبوبة الثانية (St . blank) بنفس الطريقة وبنفس الخطوات ، فيما عدا يستبدل جوهر الأكسدة بمحلول NaOH ١٠٪ .
- ٦ - إلى الأنبوبة الثالثة (assay) يضاف ٥ مل من محلول العينة المراد تقدير الثيامين فيها ، ثم تعامل بنفس طريقة الأنبوبة الأولى (St.) .
- ٧ - إلى الأنبوبة الرابعة (assay blank) يضاف ٥ مل من محلول العينة وتعامل بنفس الطريقة التى عوملت بها أنبوبة St. blank .
- ٨ - بعد اضافة كحول أيزوبيوتاييل لكل أنبوبة ، وترج مره أخرى لمدة حوالى دقيقتين (لابد أن توضع الأنابيب فى shaker box لهذا الرج الاضافى) .
- ٩ - الطرد المركزى على سرعات منخفضة حتى نحصل على محلول رائق . يؤخذ بالماصة أو بعملية decantation حوالى ١٠ مل من المستخلص الكحولى (الطبقة العليا) من كل أنبوبة وتنقل إلى cuvette لقياس فلورة الثيوكروم .
- ح - قياس فلورة الثيوكروم :**
- ١ - تقاس شدة كثافة فلورة كل مستخلص كحولى بجهاز فلوره مناسب ، وطول موجة الاثارة ٣٦٥ nm ، أما طول موجة الانبعاث (أو الخارج out put) هو ٤٣٥ nm . ويستخدم محلول كبريتات الكوينين القياسى حتى يمكن التحكم فى reproducibility of fluorometer .
- ٢ - يقاس وميصر المستخلص الكحولى المتحصل عليه من أكسدة العينة (assay) ، ولتكن القراءة هى A .
- ٣ - يقاس وميصر المستخلص الكحولى المتحصل عليه من محلول العينة والذى تم معاملته بواسطة ٢ مل محلول NaOH ١٥٪ (assay blank) ، ولتكن القراءة

هي b .

٤ - وبالمثل تقاس فلورة المستخلص الكحولي المتحصل عليه من محلول الثيامين القياسي (St.) ، ولتكن القراءة هي S .

٥ - تقاس أيضاً الفلورة الخاصة بـ St . blank ، ولتكن القراءة هي d .

د - الحساب :

يحسب عدد ميكروجرامات الثيامين هيدروكلوريد في ٥ مل من محلول مستخلص العينة

من المعادلة التالية :

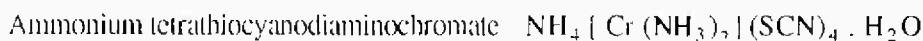
$$\mu\text{g thiamine} - \text{HCL in } 5 \text{ ml assay solution} = \frac{(A - b)}{(S - d)}$$

هـ - التطبيقات العملية :

تطبق هذه الطريقة على عينات غذائية جافة ومطحونة مثل دقيق القمح أو الذرة أو الشعير إلخ ، وعلى المكرونة وغيرها من الأغذية ، مع مراعاة أن تكون العينة مطحونة جيداً حتى يكون الاستخلاص على الوجه الأكمل . ويمكن تطبيقها على العينات الأخرى أيضاً مع مراعاة إجراء التعديلات المناسبة .

تقدير الثيامين بالطريقة اللونية (Schanderl , 1970)

تعتمد هذه الطريقة على تفاعل الثيامين مع Reinecke salt وتكوين راسب يمكن إذابته في أسيتون ، ثم يقاس لونياً على طول موجة مقدارها ٥٢٥ nm . ومحلول Reinecke salt (جوهر الكشف) هو عبارة عن :



الجواهر الكشفية :

١ - محلول Reinecke salt .

٢ - محلول ثيامين هيدروكلوريد المرجع (١ ، ٠ ٪ ثيامين هيدروكلوريد مذاب

فى حمض HCl ٨٪) .

٣ - محلول خلاات منظم ($p^H = ٤,٨,٠$ N) .

٤ - أسيتون .

التكنيك : -

١ - يؤخذ ١٠ مل من محلول العينة التى تحتوى على ٢ - ٥ ملجم ثيامين هيدروكلوريد فى محلول الخلاات المنظم (ويمكن الاستعانة بالطريقة السابقة لتجهيز العينة (AOAC , 1975) . , ثم يضاف إليها جوهـر Reinecke salt (الكمية تعتمد على تركيزه , ولذلك تجرى أختبارات بسيطة قبل التقدير لتحديد حجمها) , ثم يسمح للتفاعل بأن يتم وتكوين الراسب .

٢ - يجمع الراسب باستعمال بوتقة زجاج sintered glass crucible ويفسل جيداً .

٣ - يذاب الراسب فى ١٠ مل أسيتون , ثم يكمل إلى حجم معلوم ويقاس اللون على طول موجة ٥٢٥ nm ضد البلاك .

٤ - يتم عمل منحنى قياسى , بتطبيق نفس التكنيك على حجـوم مختلفة من الثيامين القياسى المذاب فى محلول الخلاات المنظم . ويتطبيق قراءـة العينة على المنحنى القياسى يمكن حساب تركيز الثيامين هيدروكلوريد فى العينة .

تقدير تركيز الثيامين في مستحضرات البولي فيتامين

(Stroev and Makarova , 1989)

يقدر الثيامين في هذه المستحضرات polyvitamin preparations عن طريق أكسدته إلى الثيوكروم بواسطة بوتاسيوم فرى سيانيد في الوسط القلوي ، ثم يستخلص الثيوكروم بالبيوتانول ، وتقدر فلورته. وفي وجود محلول ثيامين قياسي ، يمكن حساب تركيز الثيامين في هذه المستحضرات .

الجواهر الكشفية :

١ - محلول حمض هيدروكلوريك (١ ، M٠) .

٢ - بيوتانول عادي n - butanol .

٣ - مخلوط الأكسدة oxidising mixture : - يضاف ٨ مل من محلول بوتاسيوم فرى سيانيد (١ ٪) إلى ٢٠ مل من محلول NaOH (٣٠ ٪) ، وتخلط المحتويات جيداً . يستخدم هذا المحلول حديث التحضير ، ويحضر وقت الاستعمال .

٤ - محلول ثيامين قياسي (١٠ µg / مل) .

٥ - إيثانول .

التكنيك :

١ - تطحن عينة البولي فيتامين جيداً بالهون (وزنة معلومة بالضبط) ، ثم يضاف إليها ٣٠ مل من محلول حمض الهيدروكلوريك على دفعات مع استمرار الطحن والتقليب .

٢ - إلى أنبوبة الكونتروال (الأولى) يضاف ٥ مل من محلول الهيدروكلوريك ، وفي الثانية (العينة) يضاف مل واحد من مستخلص البولي فيتامين و ٤ مل ماء مقطر ، وفي الثالثة (St.) يضاف ٥ مل محلول ثيامين قياسي .

٣ - يضاف لكل أنبوبة ١٠ مل من مخلوط الأكسدة ، ثم تخلط جيداً لتعمام تجانس المحاليل .

- ٤ - يضاف ٥ مل بيوتانول ، ثم تغلق الأنابيب جيداً وترج بشده لمدة ٥ دقائق .
- ٥ - تترك الأنابيب حتى تنفصل محتوياتها إلى طبقتين ، ثم يضاف ٥ ، ٠ مل ايثانول بحذر شديد وذلك لكي تروق طبقة البيوتانول .
- ٦ - تنقل طبقة البيوتانول عن طريقة decantation ، بحذر شديد إلى خلية قياس الفلورة ، ثم تقاس كثافة الفلورة fluorescence للثلاث أنابيب (العينه والكونتروال والـ St) بواسطة جهاز fluorometer .

الحساب :-

يحسب تركيز الثيامين من المعادلة التالية :-

$$X = \frac{(E_{\text{sample}} - E_{\text{control}}) \times 0.01 \times 1 \times 5.5}{E_{\text{st}} \times 30}$$

علما بأن

X = هي كمية الثيامين في البولي فيتامين بالمجم .

E_{sample} = هي كثافة فلورة محلول العينة (وحدات عرفية arbitrary units)

E_{control} = هي كثافة فلورة محلول الكونتروال بنفس الوحدات .

E_{st} = هي كثافة فلورة المحلول القياسى بنفس الوحدات .

0.01 = هو تركيز محلول الثيامين القياسى بالمجم / مل .

30 = هي حجم محلول استخلاص البولي فيتامين بالمل .

1 = هو حجم المستخلص المأخوذ للتحليل بالمل .

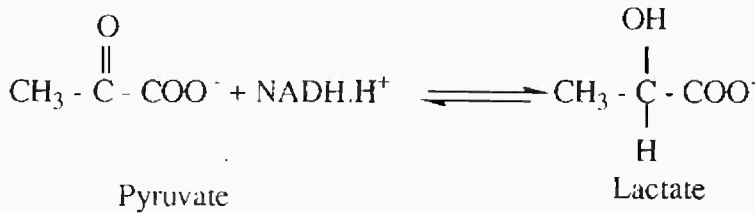
5.5 = هو حجم المحلول الرائق بواسطة الايثانول بالمل.

التطبيقات العملية Practical applications :-

يمكن استخدام هذه الطريقة لتقدير الثيامين في الأغذية والنباتات الطبية والأدوية الخام، كما تستخدم لتقديره في البول والدم وغيرها ، مع مراعاة اجراء التعديلات المناسبة .

تقدير البيروفات في الدم (Gloster and Harris , 1962)

هناك علاقة قوية تربط بين تركيز البيروفات pyruvate في الدم ونقص الثيامين . ففي حالة نقص الثيامين thiamine deficiency ، يقل نشاط الـ TPP (thiamine pyrophosphate) ولهذا السبب يعاق هدم catabolism البيروفات ، وعلى ذلك فإن تركيزها في الدم يزداد . وتقاس الآن البيروفات بطريقة أنزيمية باستعمال أنزيم Lactate (LDH) dehydrogenase ، ويسير التفاعل كما يلي :



تحول البيروفات بفعل أنزيم LDH وفي وجود NADH.H^+ إلى لاكتات ، ويتم هذا التفاعل على درجة $\text{pH } 6.9$. ويمكن تتبع التفاعل بقياس التغير في الامتصاص على طول موجة 240 nm والذي يعزى إلى NADH.H^+ . والطريقة التالية تم تعديلها بواسطة Boehringer

الجواهر الكشفية :-

١ - محلول TCA في HCl :- يذاب ١٠٠ جم ثلاثي كلورو حمض الخليك TCA في لتر من محلول حمض HCl تركيزه ٥٠٠ mM .

٢ - محلول فوسفات منظم (١،١ مول / لتر) :- يذاب ١٩،١٤ جم K_2HPO_4 في ١٠٠ مل ماء سبق تقطيره بجهاز تقطير زجاجي (GDW) .

٣ - محلول NADH.H^+ (reduced nicotinamide adenine dinucleotide) :-

يذاب ٥ ملجم NADH.H^+ في ١,٠ مل ماء مقطر (GDW). وهذه أحسن طريقة لتحضيره حيث أنه من المفضل استخدامه طازجاً ، ولكن يمكن حفظه لأيام قليلة على 4°C .

٤ - محلول أنزيم LDH : - ٠,٧٥ ملجم بروتين أنزيمي لكل مل واحد من محلول كبريتات أمونيوم . وهذا المحلول متوافر تجارياً .

٥ - البيروفات القياسية (٢٥٠ ميكرومول μmol / لتر) : - يذاب ٢,٣٥ ملجم بيروفات ليثيوم lithium pyruvate في ١٠٠ مل ماء مقطر (GDW) .

التكنيك :

١ - يؤخذ حوالي ٥ مل من الدم بواسطة حقنة syringe مناسبة مع مراعاة تلافي عملية ركود الدم الوريدي venous stasis ونشاط عضلات الساعد forearm muscles . فهذا أمر ضروري جداً لأخذ العينة بنجاح . وبعد أخذ العينة بسرعة ، يحقن الدم المأخوذ في أنبوبة طرد مركزي تحتوي على ٥ مل محلول TCA سبق وزنها . ترج الأنبوبة جيداً لتمام خلط محتوياتها ثم يعاد وزنها من جديد حتى نحصل على وزن الدم المضاف . ويمكن إيجاد حجم الدم المضاف بالقسمة على ١,٠٦٠ (الشغل النوعي specific gravity للدم) . ومن ناحية أخرى يمكن قياس حجم الدم بواسطة حقنة مدرجة .

٢ - يتم الطرد المركزي على ٢٠٠٠ r.p.m لمدة ١٠ ق ، ويؤخذ ٢,٠ مل من المحلول الزائق supernatant في أنبوبة و ٢,٠ مل ماء في أنبوبة أخرى (بلانك) ويضاف لكل منهما ٠,٧ مل محلول فوسفات منظم ، ثم ينقل ٢,٠ مل من كل منهما إلى خلايا قياس كوارتز quartz cuvettes مسار الضوء فيها ١٠ mm ، ويضاف إليها ١,٠ مل محلول فوسفات منظم اضافي ثم ٥٠ μl من محلول NADH.H^+ .

٣ - تخلط المحتويات جيداً بالتقليب stirring ، وبعد دقيقتين يقاس الامتصاص على طول موجة ٣٤٠ nm ضد البلانك . يعاد القياس مرة أخرى بعد دقيقة للتأكد من حالة ثبات الوضع على هذه القراءة . ولا بد أن تكون القراءة بين ٠,٥٠٠ .

و ٨٠٠,٠, ثم بعد ذلك يضاف ٥٠ مل من محلول الأنزيم وتخلط جيداً بقطيب زجاجي ويقاس الامتصاص بعد دقيقتين وبعد كل دقيقة لمدة ٢ ق أخرى حتى لا تحدث إى تغيرات فى القراءة .

٤ - بالنسبة للدم الطبيعى المأخوذ من أشخاص فى وضع الراحة ، عادة ما نحصل على أختلافات فى الامتصاص (ΔA) بين ٠,٠٥٠ و ٠,١٠٠

هذا ، ويتم ضبط الطريقة واختبارها على فترات متباعدة وذلك بتطبيق الطريقة على البيروفات القياسية .

الحساب :-

لو كان حجم الدم المأخوذ هو V مل وكان $\frac{2V}{5+V}$ مل من الدم هو الموجود فى ٢,٠ مل من المحلول الرائق وأضيفت ٠,٧ مل من محلول الفوسفات المنظم إليها ، فيكون الحجم النهائى هو ٣,١ مل . وعلى طول موجة ٣٤٠ nm فى cuvette مسار الضوء فيها ١ سم ، يكون التغير فى الامتصاص ΔA يعادل ١٦,١ ميللى مول mmol بيروفات لكل مل من مخلوط التفاعل . وعلى يمكن تطبيق هذه المعادلة :-

$$\text{Blood pyruvate } (\mu\text{mol} / \text{l}) = \frac{5+V}{2V} \times \frac{2.7}{2.0} \times \frac{\Delta A}{0.100} \times 3.1 \times 16.1$$

$$= 337 \times \frac{(5+V)}{V} \times \Delta A$$

التفسير :-

المستوى الطبيعى لبيروفات الدم المقدر بهذه الطريقة هو ٢٤ - ٨٠ $\mu\text{mol} / \text{لتر}$ ، وفى حالات نقص الثيامين الملحوظة فيبلغ مستوى البيروفات ٢٢٠ إلى ٣٠٠ $\mu\text{mol} / \text{لتر}$ ، ولوحظ ارتفاع مستوى البيروفات أيضاً فى مرض السكر diabetes mellitus وفى حالات الاسهال diarrhea وحالات اضطراب الهضم الأخرى وفى حالات تلف الكبد الحاد وفى بعض حالات العنبرى الحادة .

تقدير الثيامين فى البول بتفاعل الثيوكروم (Varley et al., 1976)

الأساس النظرى للتقدير :-

يقدر الثيامين فى البول بعد تنقيته ، باكسدته إلى ثيوكروم بمحلول فرى سيانيد قلوئى . ويستخلص المشتق الناتج من الأكسدة (الثيوكروم) بكحول بيوتايلى أو ايزوبيوتانول ثم تقاس الفلورة بعد ذلك .

الجواهر الكشفية :-

١ - Decalso أو Permutit نشطة :- لكى تدمص أكبر كمية من الثيامين على هذا العامل المدمص ، لابد أن تتم عملية الأدمصاص بسرعة و لاتزيد عن دقيقتين . فيتم أولاً عمل معلق من عامل الأدمصاص (٢٠٠ ملجم) مع حمض خليك ٠.١ ٪ فى مخبر كبير ، ثم تفصل الحبيبات التى لم ترسب خلال دقيقتين على الأكثر بعملية decantation . تغلى هذه الحبيبات ٣ مرات مع حمض خليك مخفف مع تغيير الحمض فى كل مرة بعملية decantation أيضاً ، ثم تغسل أخيراً بالماء المقطر وتجفف على ١١٠ ° م . إذا أضيف محلول بوتاسيوم فرى سيانيد إلى الراشح الناتج من الغسيل وأعطى لون أزرق بروسيا ، فيتم غسيل الرواسب مرة أخرى بمحلول حمض HCl متوسط التركيز ودافئ . ولابد من اختبار كفاءة عامل الأدمصاص أولاً على ثيامين قياسى . ويظل نشاط هذا العامل المدمص ثابتاً لعدة شهور إذا حفظ جافاً .

٢ - محلول كلوريد بوتاسيوم (حوالى ٢٥٠ جم / لتر) .

٣ - محلول أيدروكسيد صوديوم (١٥٠ جم / لتر) .

٤ - محلول بوتاسيوم فرى سيانيد (٢.٥ جم / لتر) حديث التحضير .

٥ - كحول أيزوبيوتايلى أو بيوتايلى عادى .

٦ - حمض خليك ثلجى حوالى (١٠ مل / لتر ماء) .

٧ - محلول stock standard thiamine-hydrochloride (٤٠ ملجم / لتر) :-

يذاب ٤,٤٨ ملجم ثيامين - هيدروكلوريد في ١٠٠ مل ماء .

٨ - محلول working standard ($400 \mu\text{g} / \text{L}$) : - يخفف ١,٠ مل من محلول stock standard (٧) إلى ١٠٠ مل بالماء ويضاف إليه ٤٠٠ ملجم حمض أكساليك .

الطريقة : -

١ - تجمع عينه البول ليوم كامل (٢٤ ساعة) في أوعية زجاجية وتحفظ في زجاجات معقمة ويضاف إليها ١٠٠ ملجم حمض أكساليك لكل ٢٥ مل بول .

٢ - يؤخذ ٢ مل بول (يؤخذ ٠,٥ مل لو كان تركيز الثيامين عالى) ، و ٢ مل محلول ثيامين قياسي ، و ٢ مل ماء (بلانك) في ثلاث أنابيب زجاجية ذات غطاء .

٣ - لكل واحدة منهم يضاف ٢٠ ملجم عامل إدمصاص نشط ثم تخلط بالرج بشدة (١٠ مرات) ، وتصل أقصى كفاءة للادمصاص على درجة $\text{pH} = 3 - 6$ ، ويتم التأكد من ذلك (ضبط pH) باستخدام حمض أكساليك .

٤ - يضاف ٨ مل حمض خليك ، وتخلط جيداً عن طريق قلب الأنبوبة (١٠ مرات) ، ثم تترك فترة بسيطة ويتم التخلص من المحلول الرائق . تعاد هذه العملية (غسيل) عدة مرات حتى يمكن التخلص من المواد المتداخلة وأخيراً يتم الحصول على عامل الادمصاص وقد أدمص عليه الفيتامين .

٥ - يضاف ٠,٥ مل من محلول كلوريد البوتاسيوم ثم يرج برفق مع مراعاة تجانس عامل الادمصاص مع المحلول المحل بالكامل . تتم عملية الاحلال هذه في خلال ٣٠ ثانية .

٦ - يضاف ٠,١ مل من محلول بوتاسيوم فرى سيانيد ، و ٠,٢٥ مل من محلول أيديروكسيد الصوديوم مع الرج بعد كل إضافة .

٧ - يضاف ٢ مل كحول أيزوبيوتانول وتقف الأنبوبة وترج بشدة لمدة حوالى دقيقة (حوالى ٢٥ مرة وترج لأعلى وأسفل) .

- ٨ - تترك حتى تنفصل إلى طبقتين أو تطرد مركزياً لفترة وجيزة .
- ٩ - ينقل الجزء الرائق إلى أنبوبة قياس ، ثم تقاس الفلورة في جهاز fluorometer على طول موجة ٤٣٥ nm باستعمال طول موجة ٣٦٥ nm للإثارة excitation ، مع ضبط الجهاز على الصفر باستعمال البلاك .

الحساب : -

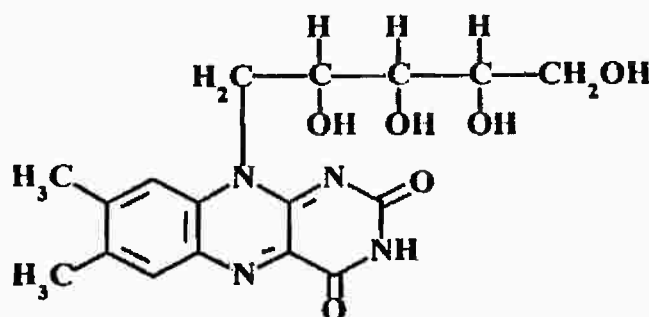
يحسب تركيز الثيامين في البول من هذه المعادلة : -

$$\text{Urinary thiamine chloide } (\mu\text{g} / 1) = \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Reading of standard}} \times \frac{800}{V}$$

حيث أن : -

V هي حجم البول بالمل المأخوذ للتحليل .

فيتامين ب ٢ (الريبوفلافين) - Vit. B₂ (Riboflavin)



تفاعلاته :

هذا الفيتامين ثابت للحرارة ، ولكنه يسود blacken عند ٢٤٠ م° ، وغير ثابت في الوسط القلوي حيث يتحول إلى lumiflavin ، ويتلف بالأكسدة . أما بالاختزال فيتحول بسهولة إلى leucoriboflavin ، ويتحلل ضوئياً photolysis إلى lumiflavin ويعطى فلورة زرقاء كثيفة على طول موجة ٥٦٥ nm . وهو ثابت في الوسط الحامضي وينوب في الماء الحامضي .

الذويان :

ينوب في الماء (٠.٠١ جم / ١٠٠ مل ماء) ، وغير ذائب في الكحول والأسيتون والبنزين والكلوروفورم .

صورته النقية :

يكون في صورة مسحوق أصفر - برتقالي ، والصورة البلورية له أبرية needles . ويوجد في صورة ملح بورات أو فوسفات أو خلات .

خواصه :

أقصى امتصاص له عند الأطوال الموجية ٢٢٠ و ٢٦٧ و ٣٣٦ و ٤٤٦ nm . وهو ذات طبيعة كيميائية مختزلة (عامل مختزل) ، وهو عباره عن نيكلو تيد بيورين مستبدل .

انتشاره ومصادره :

١ - وجوده في النباتات : يوجد في كل الفواكه والخضروات بكمية قليلة ، ماعدا في ورق الطماطم فيوجد بكمية كبيرة . وفي الخضروات الورقية والذرة والبقول والقرنبيط فيوجد بكمية متوسطة . وفي النفل يوجد بكمية متوسطة . وفي زهور الزعفران saffran يوجد بكمية كبيرة .

٢ - وجوده في الحيوانات :- يختلف تركيزه على حسب نشاط العضو ، فهو في الكبد < الكلى < القلب < الأنسجة الأخرى .

٣ - وجوده في الكائنات الحية الدقيقة :- يوجد في كل الكائنات الحية الدقيقة خصوصاً الخميرة والبكتريا اللاهوائية ، فيوجد فيها بتركيزات عالية .

المصادر الغذائية :

١ - المصادر الغنية :- من ١٠٠٠ إلى ١٠٠٠٠ ميكروجرام لكل ١٠٠ جم ، كما في الأغنام والعجول والبقر والخنزير (كبد وكلى) ، وفي الدجاج (كبد) ، والخميرة (الغير حية) .

٢ - المصادر المتوسطة :- من ١٠٠ إلى ١٠٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم ، كما في الأفوكادو avocados (فاكهه) والاسبراجس والبقول بأنواعها والقرنبيط والذرة والبسلة وفول الصويا (الجاف) والسبانخ والفول السوداني وجنين القمح ونخالة الأرز والشوفان والجبن والبيض واللبن . وفي لحم البقر والدجاج والبط والأوز الخنزير والرومي والسلمك والأغنام .

٣ - المصادر القليلة :- من ١٠ - ١٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم ، كما فى التفاح والموز والمشمش apricots والفراولة والكريز والعنب والجريب فروت والبرقوق والكرنب والجزر والباذنجان egg plant والخس والأبصال والفلفل والبطاطس والفجل والبطاطا والطماطم والشعير والأرز .

الدور الطبى والغذائى :

- ١ - وحدات فيتامين ب٢ :- : وحداته وزنية ملجم أو ميكروجرام .
- ٢ - المستويات الطبيعية فى الدم :- ٦,٦ ميكروجرام / ١٠٠ مل .
- ٣ - المقررات الموصى بها :
- للأطفال يوصى بأعطاء ٠,٦ - ١,٢ ملجم / يوم .
- والبالغين يوصى بأعطاء ١,٥ ملجم / يوم للإناث ، و ١,٧ ملجم / يوم للذكور .
- ٤ - اعطاءه :- عن طريق الحقن (I.V) وبالفم وهذا هو الطريق المفضل .
- ٥ - أعراض النقص :-

فى الإنسان :-

التهاب الفم stomatitis و التهاب اللسان glossitis cheilosis والتهاب جلدى مع فرط افراز الغدد الدهنية seborrheic dermatitis . كما تظهر أعراض متعلقة بالعين والخوف من الضوء photophobia والرؤية غير الواضحة indistinct vision وزيادة الضغط الوعائى فى القرنية corneal vascularity .

فى الفئران :-

نمو هزيل poor growth وأعراض عينية غير عادية و التهاب جلدى (أكزيما eczema) وثقوب فى الأنف nostrils والعيون eyes وانحلال النخاعين myelin degeneration ، و تلف الخصى testicular atrophy و انكماش الثيموس thymus involution .

فى الكلاب :

فقد الوزن و كبد دهنى fatty liver وهزال عضلى muscle weakness وعتامة أغشية

القرنية opacity of conreal epithelium .

في الدجاج :-

انخفاض انتاج البيض ، وانخفاض نسبة الفقس ، و انحلال عصبى nerve degeneration .

في القروود Monkey :-

أنيميا (فقر دم) anemia ، ونقص عدد كرات الدم البيضاء leukopenia .

٦ - أمراض النقص :

التهاب اللسان والتهاب جلدى مع فرط افراز الغدد الدهنية وفقر دم وزيادة الضغط الوعائى فى القرنية .

٧ - مصادره للأجناس التى تحتاج إليه :- جميع الكائنات تحتاج اليه .

أ - مصادر داخلية Endogenous :- تستطيع النباتات العالية والطحالب وبعض البكتريا وبعض الفطريات تخليقة .

ب - مصادر خارجية Exogenous :- كل الحيوانات وبعض البكتريا والفطريات تحتاجه من مصادر خارجية ، والبكتريا المعوية يمكنها تخليقة ولكن فى معظم الحالات يكون غير متاح unavailable للإنسان .

٨ - تأثير الجرعات العالية :

فى الإنسان ، أساساً فيتامين ب_٦ غير سام nontoxic ، ولكنها تشوش الحس paresthesia وتسبب الحكة (هرش) itching . أما فى الفئران فتسبب إنباس فى البول anuria وزيادة المواد النيتروجينية فى الدم نتيجة لخلل فى الكلية azotemia وقلة كفاءة الكلية kidney insufficiency .

تحليل فيتامين ب_٦

أ - فصل فيتامين ب_٦ :

يمكن فصل الريبوفلافين من مصادره الطبيعية بتتابع العمليات التالية :

١ - الاستخلاص بمذيب مناسب .

٢ - الادمصاص على أعمدة كروماتوجرافية .

٣ - الاحلال elution بالمذيبات العضوية مثل (الأسيتون - ميثانول - إيثانول - بيوتانول) ، سواء على درجة حرارة الغرفة أو على درجة غليانها ، وهي تستخدم لفك أو لتحرير liberate الفيتامين من الصور المرتبطة .

ويمكن وضع المستخلص فى عمود كروماتوجرافى يحتوى على مادة مدمصة مناسبة مثل florasil أو fuller's earth فى محلول حامض أو على frankanite فى محلول متعادل . وهناك محلول مُحل eluent ممتاز لذلك وهو pyridine مخفف بإيثانول أو ميثانول مائى . وهناك Eluents أخرى يمكن استخدامها وهى أسيتون ٨٠٪ ، إيثانول ٦٠٪ يغلى ، أمونيا ، triethanolamine .

وبالرغم أن الفحم المنشط charcoal يرتبط بقوة مع الريبوفلافين ، إلا أنه من الصعب أنحلله elute من هذا العامل المدمص .

ويمكن بعد إنحلال الفيتامين وبلورته باستخدام مذيب الاستخلاص ثم الترسيب . ومن أحسن مذيبات البلورة (مخلوط مائى من أسيتون و Pet - ethanal) . والريبوفلافين المختزال غير ذائب بدرجة كبيرة وهذه ميزة حسنة لبلورة الفيتامين ، فعلى سبيل المثال فى مستحضرات الريبوفلافين التجارية المتحصل عليها من التخليق البكتيرى ، يضاف sodium dithionite إلى بيئة البكتريا broth بعد التخمر ، فيترسب الريبوفلافين المختزل نتيجة تجميعه . ويتم تنقيته ثم أكسده رجعياً إلى الريبوفلافين .

ب - تقدير فيتامين ب ٢ :

يقدر محتوى الريبوفلافين فى كل من الأنسجة والسوائل الحيوية biological fluids بكل من الطرق الفلورومتريّة والميكروبيولوجية . وبالرغم من أن الطرق الميكروبيولوجية أكثر حساسية ، إلا أنها تتطلب ١ - ٢ أيام حتى تكتمل . أما الطرق الفلورومتريّة فإنها تكتمل خلال عمل يوم واحد .

كل من المعاونين الأنزيمين FAD و FMN (صورة الريبوفلافين فى الأنسجة) يرتبطا مع البروتين ويجب فكهما وأحلالهما قبل التقدير أو التحليل . ويمكن إجراء هذا سواء

بالمعاملة بحامض أو بالانزيمات .

١ - الطرق الفلورومترية :

تعامل السوائل الحيوية أو محلول النسيج الحيوى المجنس تماماً homogenate بمحلول مخفف من TCA لفصل الفلافينات flavins عن البروتين . فتحضين المواد المحتوية على FAD مع الـ TCA يؤدي إلى تحليل مائى لـ FAD إلى FMN . والريبوفلافين و FMN لهما فلورة متساوية . أما الـ FAD فله فلورة فقط ١٤ ٪ من هذه القيمة .

فى بعض الطرق تعامل المستخلصات بمحلول $KMnO_4$ مخفف لأكسدة المركبات التى لها فلورة والتى قد تتداخل مع التقدير ، وفى طرق أخرى تمرر المستخلصات خلال عمود florasil ثم تحل elute بمحلول بيريدين - حمض خليك . وفى هذه الطريقة ، يعد جهاز قياس الفلورة fluorometer باستعمال fluorescen قياسى ، وتقرأ العينات قبل وبعد اضافة محلول sodium hydrosulfite $(NaHSO_3)$ ، والانخفاضات الأخيرة quenches تمثل فلورة الريبوفلافين . وتلك الطريقة تجعله ممكن تقديره (الريبوفلافين) مميزاً عن إى ماده أخرى فى العينة لها خاصية فلورة أيضاً .

و الريبوفلافين ينوب فى كحول البنزيل benzyl alcohol بدرجة كبيرة جداً ، أما FMN و FAD فلا ينوبان ، لذلك فهذا المذيب ممتاز لتقدير الريبوفلافين الحر .

٢ - الطرق الميكروبيولوجية :

أول طريقة ميكروبيولوجية لتقدير الفيتاميات كانت على الريبوفلافين . وتحضر العينات الناتجة من المعاملة بحمض HCl (٠.١ N) بالتعقيم فى الأتوكلاف autoclaving للتحرير الفلافينات . وكل من الريبوفلافين و FAD و FMN لهم نفس النشاط على الكائنات الحية الدقيقة على أساس جزيئى (فرق بينها وبين الطرق الفلورومترية) . ويمكن معاملة العينة بأنزيم مثل clarase لتحرير الفلافينات ، ثم يرشح خلال ورق خاص للتخلص من الأحماض الدهنية والتى تتداخل مع النمو البكتيرى .

ويعمل المنحنى القياسى باستخدام ريبوفلافين نقى برسم العلاقة بين التركيز و إنتاج الحامض أو نفاذية الضوء . وتستخدم بكتريا casei . لهذا التقدير والتى تحتاج إلى ريبوفلافين للنمو ، وتقاس العكارة turbidity (والتى ترجع لنمو البكتريا) على جهاز قياس

الألوان (أو قياس العكارة) بعد ١٦ - ٢٤ ساعة والنامية على ٢٧ ° م . ويمكن تقدير حمض اللاكتيك الناتج من نمو البكتريا بعد ٧٢ ساعة ، والناتج من تخمر الجلوكوز وذلك بالمعايرة بمحلول قلوئ مخفف في وجود دليل مناسب . ويقدر الريبوفلافين في العينات باستخدام المنحنى القياسى أيضاً .

٣ - الطرق الحيوية :

ويتبع فيها الأساس العام لهذه الطرق حيث تضاف المادة المراد تقدير الفيتامين فيها إلى علفه خالية تماماً منه وتحتوى كل متطلبات الغذاء الأخرى . ويستخدم لهذا التقدير rats . وفى هذه الطرق يتم تغذية الفئران المفلومة weaning rats على علائق خالية من الفيتامين لمدة ٢ - ٣ أسابيع حتى يتوقف النمو . ثم تقسم الحيوانات إلى مجموعات متجانسة فى الوزن والجنس وتضاف المادة المختبرة إلى العليقة بمستويات مختلفة (مدة التقدير عادة ٤ أسابيع) . ويرسم منحنى قياسى لعلاقة معدل النمو للمجموعات الكونترول والجرعات المعطاة لها ، ويقدر منه كمية الريبوفلافين فى العينة المختبرة . هذا وقد أمكن استخدام الدجاج فى التقدير أيضاً .

الطرق الحيوية تتطلب مادة ذات فاعلية عالية ، اما المواد ذات فاعلية منخفضة فإنها تضاف بكميات كبيرة ، بالرغم من أن ذلك يؤثر على محتوى العليقة من الدهن والبروتين والكربوهيدرات وخلافه . أحسن طرق التقدير الحيوية هى الطرق الميكروبيولوجية فهى الطريقة المختارة لأنها أقل تكلفة وأقل فى الوقت المستهلك ، كما إنها تعطى نتائج جيدة عند مقارنتها بطرق animal bioassay .

اختبار تمييز الريبوفلافين ومعاونات الأنزيمات الفلافينية

(Stroeve and Makarova , 1989)

يعتمد هذا الاختبار على أن الصور المؤكسدة للريبوفلافين ومعاونات الأنزيمات الفلافينية (FAD , FMN) عند تعرضها لضوء الأشعة فوق البنفسجية تعطى وميض ذو لون أصفر - أخضر .

الجواهر الكشفية :

١ - محلول ريبوفلافين (٠.٠٠٢٪) .

- ٢ - محلول Riboflavin mononucleotide (FMN) (٠.٠٠٢ ٪) ، وهذا المركب متوفر في صورة محلول في أمبولات inpoules تركيزه ٠.٠١ ٪ .
- ٣ - محلول flavinate (٠.٠٠٢ ٪) ، وهو متوافر في صورة محلول صيدلي في أمبولات أيضاً (المركب الفعال فيها هو FAD) .
- ٤ - مسحوق Sodium hydrosulphite .

التكنيك : -

١ - في أنبوبة اختبار نظيفة ، يؤخذ ١٠ نقط من محلول الريبوفلافين ، وفي أنبوبة أخرى يؤخذ ١٠ نقط من محلول FMN ، وفي ثالثة يؤخذ ١٠ نقط من محلول الفلافينات (FAD) flavinate ، ثم يضاف إلى كل منها ٥ مل ماء مقطر وتخلط جيداً .

٢ - توضع الأنابيب في fluoroscope cuvette holder وتقارن كثافة الوميض بينها بالعين المجردة .

٣ - يضاف لكل أنبوبة قليل من مسحوق sodium hydrosulphite ، والذي يعمل كعامل مختزل reductant ، ثم يلاحظ اختفاء الفلورة .

تقدير تركيز الريبوفلافين في مستحضرات البولي فيتامين

(Stroev and Makarova , 1989)

والأساس النظري للتقدير هو نفس الأساس النظري لاختبار تمييز الريبوفلافين السابق ذكره .

الجواهر الكشفية : -

- ١ - محلول حمض هيدروكلوريك (١ ، ٠ M) .
- ٢ - حمض خليك ثلجي glacial acetic acid .
- ٣ - محلول برمنجنات بوتاسيوم KMnO_4 ٤ ٪ .
- ٤ - محلول فوق أكسيد هيدروجين H_2O_2 ٣ ٪ .

٥ - محلول ريبوفلافين قياسي ٠,٠٠٥ ملجم / مل .

التكنيك :-

١ - تطحن وزنة معلومة بالضبط من عينه البولى فيتامين فى هون ويضاف إليها ٣٠ مل من محلول حمض الهيدروكلوريك على دفعات مع أستممرار الطحن التقليب .

٢ - يضاف ٧ مل ماء مقطر إلى أنبوبة الكونترول ، وفى أنبوبة ثانية (أنبوبة العينة) يضاف ٢ مل من مستخلص البولى فيتامين و ٥ مل ماء مقطر ، أما فى الأنبوبة الثالثة (St.) فيضاف ١,٠ مل من محلول الريبوفلافين القياسى و ٦ مل ماء مقطر .

٣ - إلى كل أنبوبة يضاف ١٠ نقط من حمض الخليك الثلجى و ١,٥ مل من محلول برمنجات البوتاسيوم (لأكسدة المواد المتداخلة التى لها فلورة) .

٤ - ترج الأنابيب ثم يضاف إليها ٥ فقط (نقطة نقطة مع الخلط بحذر) من محلول فوق أكسيد الهيدروجين مع أستممرار التقليب بساق زجاجى حتى يصبح المحلول رائقاً تماماً .

٥ - تترك الأنابيب لمدة ٥ ق حتى ينعدم تصاعد الفقائيع الدقيقة microbubbles .

٦ - تنقل المحاليل إلى خلية قياس الفلورة لتقدير قيمة فلورة كل منها .

الحساب :-

يحسب التركيز من المعادلة التالية :-

$$X = \frac{E_{\text{sample}} - E_{\text{control}} \times 2 \times 0.005 \times 7}{E_{\text{st.}} \times 30}$$

حيث أن :-

X = هى كمية الريبوفلافين فى العينة .

E_{sample} = هى كثافة فلورة محلول العينة (orbtrary uints) .

E_{control} = هى كثافة فلورة محلول الكونترول .

E_{st.} = هى كثافة فلورة المحلول القياسى .

- 30 = هي حجم محلول أستخلاص البول في فيتامين بالمل .
- 2 = هي حجم محلول المستخلص المأخوذ للتحليل بالمل .
- 0.005 = هو تركيز محلول الريبوفلافين القياسي (ملجم / مل) .
- 7 = هي حجم المحلول المأخوذ لقياس الفلورة بالمل .

التطبيقات العملية :-

يمكن تطبيق هذه الطريقة على المواد المختلفة (غذاء ومستحضرات طبية وبول ودمالخ) ، مع مراعاة إجراء التعديلات المناسبة .

تقدير الريبوفلافين في العينات الغذائية بطريقة الفلورة

(Schanderl , 1970)

الجواهر الكشفية :-

- جميع المواد الكيماوية المستخدمة يجب أن تكون AR (reagent grade) .
- ١ - محاليل حمض HCl : - يستعمل ٣ تركيزات مختلفة منه : ٠.١ N و ١.٠ N و ١٠.٠ N .
- ٢ - محاليل هيدروكسيد صوديوم : - يستعمل ٣ تركيزات مختلفة أيضاً ٠.١ N و ١.٠ N و ١٠.٠ N .
- ٣ - محلول برمنجنات بوتاسيوم $KMnO_4$ (٣ ٪) حديث التحضير .
- ٤ - محلول فوق اكسيد الهيدروجين (٣ ٪) حديث التحضير : - ويحضر بتخفيف المحلول المركز (٣٠ ٪) بنسبة ١ : ١٠ بالماء
- ٥ - محلول Stock riboflavin standard (٢٥ μg / مل) .
- ٦ - محلول Riboflavin working standard (٠.٥ μg / مل) : - ويحضر في الحال وقبل الاستعمال بتخفيف مل واحد من المحلول رقم (٥) إلى ٥ مل بالماء المقطر .
- ٧ - Stock solution of sodium fluorescein : - يذاب ٥٠ ملجم Sodium

fluorecein فى ماء ويكمل إلى ١٠٠ مل .

٨ - Dilute solution of sodium fluorescein : - يخفف مل واحد من الجواهر

رقم (٧) إلى ١٠٠ مل بالماء (٥٠ µg / لتر) .

٩ - Sodium hydrosulfide (dithionite, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

التكنيك : -

أ - استخلاص العينة : -

توزن وزنة معلومة بالضبط من العينة بحيث تحتوى على حوالى ٥ - ١٠ ميكروجرام ريبوفلافين ، وتنقل كمياً إلى ورق سعة ١٢٥ مل ، ثم يضاف إليها ٥٠ مل من محلول حمض HCl ٠,١ N وتعمق فى الاتوكلاف لمدة ٣٠ ق على ضغط مقداره ١٥ رطل / بوصة ٢ .

ب - ترسيب المواد المتداخلة interfering impurities : -

١ - بعد التعقيم والتبريد ، تضبط درجة الـ pH للمحلول على ٦,٠ باستخدام محلول NaOH ٠,١ N بحذر شديد ، ويضاف محلول NaOH بكميات صغيرة رويداً رويداً مع الرج باستمرار لتلافى تركيز القلوى فى مكان دون الآخر ، فهذا يؤدي إلى تلف الفيتامين .

٢ - يعاد ضبط درجة الـ pH إلى ٤,٥ مرة أخرى ، وفى الحال باستعمال حمض HCl ٠,١ N ، ثم يخفف إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر ثم يرشح .

٣ - يؤخذ ٥٠ مل من الراشح ويضاف إليها حمض HCl ٠,١ N نقطة نقطة حتى لا تتكون رواسب أخرى مع مرعاة الرج والتقليب باستمرار وبحركة ثابتة ، ثم تضاف نقطة أخرى لتامم التأكد من ترسيب كل المواد المتداخلة .

٤ - تضاف تقريباً نفس عدد النقط من محلول NaOH ٠,١ N ، ثم يخفف المحلول إلى ١٠٠ مل بالماء ، ثم يرشح المحلول إذا لزم الأمر ، وتضاف كمية أخرى من حمض HCl ٠,١ N بعد إضافة محلول NaOH للتأكد من أن الـ pH لم تزد عن ٦,٦ .

ج - تحمض acidification المستخلص : -

١ - يؤخذ ١٠ مل من محلول العينة فى أنبوبة اختبار ويضاف إليها مل واحد ماء ثم

تخلط المحتويات جيداً .

٢ - يؤخذ ١٠ مل من محلول العينة أيضاً في أنبوبة أخرى ويضاف إليها مل واحد من محلول الريبوفلافين القياسي ثم تخلط المحتويات جيداً .

٣ - يضاف لكل أنبوبة مل واحد حمض خليك ثلجى وتخلط المحتويات جيداً .

٤ - يتم عمل زوج double لكل تقدير .

د - الأكسدة :

١ - يضاف ٠,٥ مل من محلول البرمنجنات ٣٪ إلى كل أنبوبة وتخلط جيداً وتترك دقيقتين بالضبط ، ثم بعد ذلك يضاف ٠,٥ مل من محلول فوق أكسيد الهيدروجين ٣٪ والخلط جيداً وبشدة .

٢ - لا بد أن يزول اللون الأحمر خلال ١٠ ثوان ، ولو تكونت رواسب دقيقة من ثانى أكسيد المنجنيز MnO_2 تفصل بالطرد المركزى .

هـ - قياس الفلورة Fluorometry :

١ - يضبط الجهاز بمحلول رقم (٨) sodium fluorescein ($50 \mu g$ / لتر) حتى يعطى انحراف deflection مقداره ٨٠ على تدريج الجلفانومتر galvanometer scale ، ويعاد ضبط الجهاز بين القراءات وبعضها ، ويختبر الجهاز أيضاً قبل القراءة بتركيزات مختلفة من محاليل الـ fluorescent القياسية .

٢ - تقاس فلورة الأنبوبة التى تحتوى على ١٠ مل مستخلص العينة و ١,٠ مل ماء ، ولتكن القراءة هي A .

٣ - يضاف إليها مع الخلط ٢٠ ملجم $Na_2S_2O_4$ ، ثم تقاس الفلورة مرة أخرى خلال ١٠ ثوان ، ولتكن القراءة هي C .

٤ - تقاس فلورة الأنبوبة التى تحتوى على الريبوفلافين المضاف ، ولتكن القراءة B .

و - الحساب :

يحسب تركيز الريبوفلافين بالميكروجرام لكل جرام عينة من هذه المعادلة :

$$\text{Riboflavin content in } \mu\text{g / g sample} = \frac{A-C}{B-C} \times \frac{\text{Riboflavin increment}}{10 \text{ ml aliquot}} \times \frac{1}{\text{dilution factor} \times \text{sample wt.}}$$

حيث أن : -

Riboflavin increment = هو عبارة عن تركيز الريبوفلافين المضاف ، وهو يساوى ٠,٥ ميكروجرام .

dilution factor = هو معامل التخفيف المستخدم فى تخفيف العينة من خطوة الاستخلاص حتى التقدير

sample wt. = وزن العينة المستخدم فى التقدير .

10 ml aliquot = حجم مقداره ١٠ مل المستخدم فى القياس .

ز - التفسير :

إن تكنيك الزيادة increment technique المستخدم هنا (يضاف الريبوفلافين القياسى إلى ريبوفلافين العينة) ، يسمح بتقدير الريبوفلافين فى وجود مواد متداخلة مثل الأملاح والألوان الغريبة .

هذا ، ويمكن تطبيق هذه الطريقة على عينات غذائية عديدة مثل دقيق القمح ودقيق الذرة أو الشعير إلخ . وينصح بتطبيق هذه الطريقة على العينات التى تحتوى على مواد متداخلة قليلة التركيز حيث تعطى قراءات blank صغيرة .

تقدير الريبوفلافين بالطريقة الرسمية (A.O.A.C,1990)

الجواهر الكشفية : - جميع الجواهر المستخدمة يجب أن تكون AR .

١ - محاليل الريبوفلافين القياسية :

ملحوظة : - لاترج هذه المحاليل المخزنة تحت طولوين toluene .

أ - المحلول stock (١٠٠ ميكروجرام / مل) : - يذاب ٥٠ ملجم من الريبوفلافين القياسى USP ref. (سبق تجفيفه فى الظلام فى مجفف يحتوى على P_2O_5) فى

قليل من حمض الخليك (N ٠,٠٢) ثم يكمل إلى ٥٠٠ مل . ولتسهيل الذوبان تذاب الوزن أولاً فى حوالى ٣٠٠ مل حمض خليك دافئ مع استمرار التقليب وانتدئة فى حمام بخار حتى تمام الذوبان ، ثم يبرد ويكمل الحجم إلى ٥٠٠ مل بنفس الحمض ، يخزن تحت طولوين على حوالى ١٠ ° م .

ب - المحلول الوسط intermediate (١٠ ميكروجرام / مل) :- تخفف ١٠٠ مل من المحلول ال stock إلى لتر بنفس محلول حمض الخليك ، وتخزن أيضاً تحت طولوين على ١٠ ° م .

ح - محلول ال working solution I (ميكروجرام / مل) :- ويحضر بتخفيف ١٠ مل من المحلول الوسط إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر ، ويحضر طازجاً عند كل تقدير .

د - محلول ال working solution II (٠,١ ميكروجرام / مل) :- ويحضر بتخفيف ١٠ مل من المحلول الوسط إلى لتر بالماء المقطر ، ويحضر أيضاً طازجاً عند كل تقدير .

٢ - مسحوق sodium hydrosulfite :- عالى النقاوة ويخزن بعيداً عن الضوء والهواء ويختبر جزء منه كما يلى : إلى أنبويتين أو أكثر يضاف ١٠ مل ماء مقطر ومل واحد من محلول الريبوفلافين القياسى يحتوى على ٢٠ ميكروجرام ويعامل كما فى خطوه القياس (كما سيلي ذكرها) ويضاف إليها ٨ ملجم $Na_2S_2O_4$ ، يجب أن تختزل كل كمية الريبوفلافين بالكامل خلال ٥ ثوان أو أقل بهذه الكمية من ال $Na_2S_2C_4$.

٣ - محلول الاستخلاص :- يخلط ٢٠ مل ميثانول و ١٠ مل بيريدين و ١٠٠ مل ماء و ١٠ مل حمض خليك (ويمكن تحضير كمية أصغر من ذلك ، ولكن بنفس النسب) .

التكنيك :-

أ - تحضير محلول العينة :-

ملحوظة :- يجب تلافى تعرض المحاليل للضوء ، ودرجة ال pH لاتزيد عن ٧ ، وخلال الترشيح المباشر على ورق ترشيح ، لابد من استعمال ورق ترشيح معروف أنه لايدمص الريبوفلافين (ورق الترشيح الخالى من الرماد مناسب لهذا) .

تؤخذ وزنة معلومة بالضبط من العينة وتوضع فى دورق نو حجم مناسب وتطبق إحدى

الطرق التالية للاستخلاص كما يلي :-

١ - بالنسبة للمواد الجافة dry والنصف جافة semidry التى بها كميات صغيرة أو كميات لا يمكن أدراكها من المواد الأساسية basic substances :- يضاف حجم من حمض HCl (N ٠,١) يعادل ١٠ مرات أو أكثر (بالمل) وزن العينة بالجرامات . والمحلول الناتج لابد أن يحتوى على أقل من ٠,١ ملجم ريبوفلافين / مل . لو كانت العينة غير قابلة للنوبان ، يستمر فى محاوله نوبانها مع استعمال الرج بقوة ثم يغسل السطح الداخلى للورق بنفس محلول الحمض . يسخن المخلوط فى أتوكلاف على ١٢١ - ١٢٣ ° م (١,١ - ١,٢ كيلو جرام / سم^٢) لمدة ٢٠ ق ثم تبرد . وإذا حدث تجمعات للعينة فلابد من الرج حتى تتفتت حبيبات العينة . تضبط درجة الـ pH للمحلول على ٦,٠ - ٦,٥ بواسطة محلول NaOH مع الرج باستمرار . ثم فى الحال يضاف حمض HCl مخفف حتى لا تظهر أى رواسب مع أى اضافة جديدة (عادة الـ pH حوالى ٤,٥ . وهى نقطة التعادل الكهربى لبروتينات عديدة) .

يخفف المخلوط إلى حجم معلوم بحيث يحتوى على أكثر من ٠,١ ميكروجرام ريبوفلافين لكل مل . ثم يرشح خلال ورق ترشيح (فى حالة صعوبة الترشيح يمكن اجراء الطرد المركزى والترشيح خلال fritted glass أو أى منهما) . ثم يؤخذ جزء صغير من الراشح الرائق ويختبر لوجود البروتينات الذائبة بإضافة نقطة من حمض HCl مخفف ، فإذا لم تظهر رواسب يضاف محلول NaOH مخفف مع الرج بقوة وتضبط درجة الـ pH إلى ٦,٨ ، ويكمل حجم النهائي بحيث يحتوى على حوالى ٠,١ ميكروجرام ريبوفلافين لكل مل . وإذا كان هناك أى تعكير فى المحلول يرشح مرة أخرى . وفى حالة ظهور رواسب مع حمض HCl المخفف (بعد خطوة الترشيح الأولى) ، يضبط المحلول مرة أخرى إلى النقطة التى عندها تعطى أقصى ترسيب ، ثم يخفف إلى حجم يحتوى على أكثر من ٠,١ ميكروجرام ريبوفلافين لكل مل ، ثم يرشح ويؤخذ منه جزء ليختبر لتكون الرواسب فيه . ثم تضبط الـ pH إلى ٦,٨ بمحلول NaOH مخفف كما سبق ذكره . لو كان محتوى الريبوفلافين فى العينة أقل مما ينبغى أن يكون طبقاً لحساسية هذه الطريقة ، فإنه يتم تركيز المحلول الرائق المتحصل عليه على درجة pH ٤,٥ إلى حجم مناسب باستخدام الحرارة وتحت تفريغ ، ثم يرشح إذا دعت الضرورة وبعد ذلك تضبط درجة الـ pH إلى ٦,٨ .

٢ - بالنسبة للمواد الجافة والنصف جافة التى تحتوى على كميات محسوسة والتي يمكن ادراكها من المواد الأساسية : - تضبط درجة الـ pH للمخلوط الى ٥,٠ - ٦,٠ بواسطة حمض HCl مخفف ثم تضاف كمية من الماء حتى يكون الحجم الكلى للمحلول (بالمل) يعادل ١٠ مرات أو أكثر من وزن المادة الجافة بالجم (يجب أن يكون المحلول الناتج يحتوى على ٠,١ ملجم ريبوفلافين لكل مل أو أقل) ، ثم يضاف ما يعادل ١,٠ مل حمض HCl (تركيزه ١٠ N) لكل ١٠٠ مل من المحلول ثم يعامل كما سبق ذكره فى الخطوة (١).

٣ - بالنسبة للمواد السائلة : - تضبط درجة الـ pH إلى ٥,٠ - ٦,٠ بواسطة حمض HCl مخفف أو بواسطة محلول $NaOH$ المخفف مع الرج بشدة ثم تطبيق الخطوات كما سبق ذكرها فى الخطوة رقم (٢) .

٤ - بالنسبة للمركبات concentrates والأضافات عديدة الفيتامينات premixes multivitamin supplements : - توضع وزنة معلومة بالضبط منها فى دورق ويضاف حجم من محلول الاستخلاص (جوهر رقم ٣) يعادل ١٠ أمثال (بالمل) وزن العينة بالجم أو أكثر بحيث يحتوى المحلول الناتج على ٠,١ ملجم ريبوفلافين لكل مل أو أقل . ولو كانت العينة غير قابلة للنوبان ، يتم الرج بشدة ، ثم تغسل جدران الدورق من الداخل بمحلول الاستخلاص وحتى يتم الاستخلاص على أحسن وجه يسخن مخلوط العينة مع محلول الاستخلاص تحت مكثف عاكس لمدة ساعة ثم يبرد . وإذا كان هناك تجمعات، فيتم الرج حتى تتفتت هذه التجمعات فى المحلول . يخفف المخلوط إلى حجم معلوم بواسطة محلول الاستخلاص ويسمح لأى حبيبات أن ترسب أو ترشح أو تطرد مركزياً لو أستدعى الأمر . يؤخذ جزء معلوم من المحلول الرائق ويجفف بالماء إلى حجم معلوم بحيث يحتوى على حوالى ٠,١ ميكروجرام ريبوفلافين / مل ، ويرشح إذا كان المحلول غير رائق ، ثم يقدر فيه محتوى الفيتامين كما فى الخطوة (د) .

ب - التقدير : -

١ - تجهز ٤ أنابيب أو أكثر (يمكن أستعمال أوعية تفاعل reaction vessels) ويضاف إلى كل منها ١٠ مل من محلول العينة (لو كان الفلورومتر يلزمه tubular cuvettes ، فيمكن إجراء كل التفاعلات فيها) .

٢ - إلى اثنين من هذه الأنابيب يضاف مل واحد من محلول الريبوفلافين القياسى

working I (جوهر ١ - ج) ، ويخلط جيداً ، وإلى الأنبويتين الآخرين يضاف مل واحد ماء ويخلط جيداً .

٣ - يضاف لكل أنبوبة مل واحد حمض خليك وتخلط جيداً ثم يضاف مع الخلط ٠,٥ مل محلول برمنجات بوتاسيوم ٤,٠ ٪ (قد يزيد هذا الحجم لمحلل العينات التي تحتوى على كميات زائدة من المواد القابلة للأكسدة ، ولكن ٠,٥ مل أو أقل عادة ما تكون كافية لأكسدة المواد الغريبة) .

٤ - تترك الأنابيب لمدة دقيقتين ثم يضاف لكل أنبوبة مع الخلط ٠,٥ مل محلول H_2O_2 ٣,٠ ٪ ، ولابد أن يزول لون البرمنجات خلال ١٠ ثوان .

٥ - ترج الأنابيب بقوة حتى يخرج الأكسجين الزائد ، ولو كان هناك فقائيع غاز على السطح الداخلى للأنابيب بعد توقف الفوران يتم إزالتها بقلب الأنابيب ببطء .

٦ - تقاس فلورة محلول العينة التي تحتوى على مل واحد من محلول الريبوفلافين القياسى working I فى جهاز الفلورومتر ولتكن القراءة هى (X) ، ثم تقاس فلورة محلول العينة التي تحتوى على مل واحد ماء ولتكن القراءة هى (B) ، يضاف مع الخلط ٢٠ مل جرام مسحوق $Na_2S_2O_4$ إلى أنبويتين أو أكثر ثم تقاس الفلورة خلال ٥ ثوان ولتكن القراءة هى (C) .

ح - الحساب :-

يحسب تركيز الريبوفلافين من المعادلة التالية :-

$$\text{mg Riboflavin / ml final sample solution} = \left[\frac{(B-C)}{(X-B)} \right] \times 0.10 \times 0.001$$

ملحوظات :-

١- لابد أن تكون قيمة $\left[\frac{(B-c)}{(X-B)} \right]$ تساوى ٠,٦٦ أو أكثر ، ولاتزيد عن ١,٥ .

٢ - كمية $Na_2S_2O_4$ أكثر من ٢٠ ملجم ربما تختزل الصبغات الغريبة أو المواد المتفلورة الغريبة أو كلاهما معاً لذلك فهى تسبب نتائج خاطئة .

د - التقدير البديل :

يطبق هذا التقدير في حالة العينات ذات المستوى العالي من الريبوفلافين .

١ - إلى خليتين قياس أو أكثر يضاف ١٠ مل من محلول العينة وإلى خليتين أخرتين يضاف ١٠ مل من محلول الريبوفلافين القياس working II (جوهر رقم ١ - د) ، ثم يضاف مل واحد حمض خليك إلى كل أنبوبة ، وتخلط المحتويات جيداً .

٢ - تقاس فلورة الأنابيب كلها ، ثم يضاف مع الخلط ٢٠ ملجم مسحوق $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ إلى أنبوبة واحدة من أنبوبيتي العينة وإلى أخرى من أنبوبيتي المحلول القياسى ، ثم تقاس الفلورة خلال ٥ ثوان .

٣ - يحسب التركيز من هذه المعادلة :

$$\text{mg Riboflavin / ml final sample solution} = \left[\frac{(I - Q)}{(I' - Q')} \right] \times 0.1 \times 0.001$$

حيث أن :

I و I' = هي كثافة الفلورة في كل من محلول العينة والمحلول القياسى على التوالي ←

Q و Q' = هما فلورة محلول العينة والمحلول القياسى بعد اضافة $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ على التوالي .

تقدير الريبوفلافين فى البول (Slater and Morell , 1946)

الأساس النظرى للتقدير :

يستخلص الريبوفلافين من حجم معلوم من العينة بواسطة مخلوط من حمض الخليك و البيريدين والبيوتانول ، وبعد أكسدة الصبغات البولية المتداخلة بالبرمنجات ، يقاس تركيز الريبوفلافين بطريقة فلورومترية .

الجواهر الكشفية :

١ - حمض أكساليك جاف .

٢ - مخلوط بييريدين و حمض خليك (١ : ١)

- ٣ - محلول برمنجنات بوتاسيوم ٤٠ جم / لتر .
- ٤ - محلول فوق أكسيد الهيدروجين ١٠ حجم .
- ٥ - كحول ايزوبيوتاييل نقى أو بيوتانول عادى نقى . ويجب اختباره قبل الاستعمال من حيث الفلورة فى الـ UV ، فإذا أعطى فلورة ، يجب إعادة تقطيرة .
- ٦ - كبريتات صوديوم لامائية .
- ٧ - محلول stock standard riboflavin (٤٠ ملجم / لتر) .
- ٨ - محلول working standard (١٠٠ ملجم / لتر) : - يخفف ٢,٥ مل من محلول الـ stock إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر ، ويضاف إليها ٤٠٠ ملجم حمض أكساليك .

الطريقة : -

- ١ - تجمع عينة البول لمدة يوم كامل (٢٤ ساعة) فى زجاجات معقمة ويضاف إليها ١٠٠ ملجم حمض أكساليك لكل ٢٥ مل بول ويجب تلافى تعرض العينة أثناء التحليل للضوء المباشر وضوء الشمس .
- ٢ - يؤخذ ٠,٥ مل بول و ٠,٥ مل محلول قياسى و ٠,٥ مل ماء (بلانك) فى ثلاث أنابيب اختبار بغطاء محكم ونظيفة تماماً .
- ٣ - يضاف إلى كل منها ٠,٥ مل مخلوط البيريدين وحمض الخليك .
- ٤ - يضاف نقطة من محلول البرمنجنات ، وترج جيد لمدة حوالى دقيقة واحدة .
- ٥ - يضاف بعد ذلك نقطتين من محلول فوق أكسيد الهيدروجين ، ثم ترج مرة أخرى . يجب أن يختفى لون البرمنجات خلال ثوانى قليلة ، فإذا لم تختفى تضاف نقطة اضافية من محلول فوق أكسيد الهيدروجين ثم يدفئ المحلول إلى ٢١° م حتى يختفى لون البرمنجات .
- ٦ - يضاف ١,٥ مل كحول أيزوبيوتاييل أو البيوتانول العادى ، ثم تغطى الأنابيب وترج بشده لمدة حوالى دقيقة واحدة أو أكثر (٢٥ مره) .
- ٧ - تترك الأنابيب حتى تنفصل الطبقات ، ثم تضاف كمية قليلة من كبريتات

الصوديوم اللامائية ، وتحرك الأنابيب بين راحة اليدين بالدوران حتى تصبح طبقة الكحول رائقة ، وتترك لمدة دقيقة أو دقيقتين حتى تنفصل الطبقات تماماً .

٨ - ينقل ١,٠ مل من طبقة الكحول العلوية الرائقة فى أنبوبة القياس وتقاس الفلورة على طول موجة ٥٢٥ nm باستعمال طول موجة ٤٥٠ nm للإثارة excitation ، ويضبط الجهاز على الصفر باستعمال البلاك . يبقى مستخلص الكحول ثابتاً لمدة ساعتين على الأقل .

٩ - وللحصول على قراءة الريبوفلافين الحقيقية (المحسنة) ، يتم تعريض مستخلص الكحول لضوء UV قوى لمدة ٦٠ ق بعد أخذ القراءة الأولى ، ثم تقاس الفلورة الباقية من جديد . فالاختلاف بينهما يرجع إلى الريبوفلافين ، فكمية الفلورة الباقية تكون ثابتة نسبياً عند حوالى خمس (١/٥) القراءة الأولى فى معظم عينات البول المجمعة بدون جرعات زيادة loading doses من الريبوفلافين .

الحساب :

يحسب الريبوفلافين فى البول من المعادلة التالية :

$$\text{Urinary riboflavin (mg / l)} = \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Reading of standard}}$$

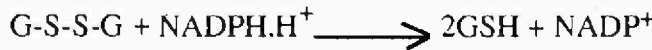
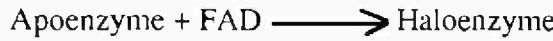
التفسير :

كمية الريبوفلافين المفرزة مع البول يومياً كثيراً ما تتأثر بمحتوى الطعام من الريبوفلافين ، وفى الحالة العادية يكون الخارج output منه ٠,٥ - ٠,٨ ملجم / يوم ، والاختبارات التى تعتمد على اعطاء جرعة ثابتة من الريبوفلافين تعطى نتائج مرضية أكثر من تلك التى تجرى تحت الظروف القاعدية basal conditions ، فلو أعطى الشخص السليم ١٦ ملجم ريبوفلافين لكل كيلوجرام من وزن الجسم بالحقن فى الوريد (i.v) ، فإنه على الأقل ٢٥٪ من هذه الجرعة يفرز خلال ٤ ساعات .

ومما هو جدير بالذكر إن التداخلات التى ترجع إلى وجود المواد التى لها خاصية الفلورة فى البول ، تحت هذه الظروف ، قد تسبب فى بعض الأحيان اضطراباً فى النتائج .

تقدير نشاط أنزيم Glutathione reductase فى كرات الدم الحمراء (Sauberlich et al., 1972)

يقدر نشاط هذا الأنزيم فى كرات الدم الحمراء التى سبق لها عملية تحليل haemolysis فى وجود الـ FAD أو عدم وجوده ، ويقاس النشاط سبكتروفوتومترياً بتقدير معدل استهلاك الـ NADPH.H^+ كما يلى :-



حيث أن :-

G-S-S-G هو الجلوتاثيون المؤكسد oxidised glutathione .

GSH هو الجلوتاثيون المختزل reduced glutathione .

ونشاط هذا الأنزيم هو انعكاس لمستوى الفيتامين فى كرات الدم الحمراء (مستوى الـ FAD) ، وتلك بدورها هى انعكاس لمستواه فى الجسم . وفى حالة نقص الفيتامين يزيد معامل نشاط هذا الأنزيم (Activity Coefficient ; AC) .

الجواهر الكشافة :-

- ١ - محلول كلوريد صوديوم (١٥٠ m mol / لتر) .
- ٢ - محلول فوسفات بوتاسيوم منظم (١٠٠ m mol / لتر ، pH ٧,٤) .
- ٣ - محلول NADPH.H^+ (٢ m mol / لتر) :- يذاب ١٦,٦ ملجم من ملح NADPH.H^+ رباعى الصوديوم فى ١٠ مل من محلول بيكربونات صوديوم (١٠٠ جم / لتر) ، ويستعمل هذا المحلول حديث التحضير .
- ٤ - محلول الجلوتاثيون المؤكسد (٧,٥ m mol / لتر) :- ويحضر يومياً أو وقت التقدير (حديث التحضير) بإذابه ٤٦ ملجم جلوتاثيون فى ٩,٩ مل ماء (مقطر مرتين DDW , double distilled water) و ١٠٠ µl محلول هيدروكسيد صوديوم (١ mol / لتر) .

٥ - محلول FAD (٢٠٠ μmol / لتر) : - ويحضر بإذابة ٢,٤ ملجم من ملح FAD أحادي الصوديوم في ١٠ مل DDW ، ويحضر أيضاً وقت التقدير .

٦ - محلول EDTA (٨٠ nmol / لتر) : ويحضر بإذابة ١,٥ جم ملح EDTA ثنائي البوتاسيوم في ٥٠ مل DDW .

التكنيك : -

١ - تحضير العينة للتقدير : - تؤخذ عينة دم وردى من الشخص الصائم (أو الحيوان الصائم) باستعمال الـ EDTA أو الهيبارين heparin كعوامل مانعة للتجلط anticoagulants ، وبمجرد أخذ العينة تبرد في حمام ثلجي . يؤخذ منها ٢٠٠ μl وتخلط مع ١,٠ مل محلول ملحي بارد cold saline (٩,٠ % NaCl) في أنبوبة طرد مركزي ، ثم يتم الطرد المركزي على حوالي ٢٠٠٠ rpm لمدة ١٠ ق ، ويزال المحلول الراشح منها . تعاد هذه الخطوة مرتين أو أكثر (غسيل كرات الدم الحمراء) . يضاف إلى رواسب كرات الدم الحمراء في الحال وبسرعة وقبل التقدير ١,٥ مل DDW ، ثم تخلط جيداً ويعاد طردها مركزياً حتى نحصل على الـ dilute haemolysate . يوضع هذا المحلول في حمام ثلجي حتى القيام بالتقدير .

٢ - قياس النشاط الأنزيمي : - يتم هذا التقدير في أنبوبيتي قياس (2 cuvettes) ، حيث يضاف إلى الأولى ١٠٠ μl محلول FAD وإلى الأخرى ١٠٠ μl DDW . ثم يضاف إلى الأولى ٢,٠ مل محلول فوسفات منظم و ٥٠ μl محلول EDTA و ١٠٠ μl haemolysate و ١٠٠ μl محلول جلوتاثيون . يتم خلط المحتويات جيداً ثم تترك على ٢٧ °م لمدة ٨ ق ثم يضاف إليها ١٠٠ μl محلول NADPH.H⁺ ثم يقاس الانخفاض في الامتصاص (Δ A₁) على طول موجة ٣٤٠ nm ضد الماء كبلانك بعد مدة ١٠ ق كحد أقصى . تعاد نفس الخطوات بالضبط على الأنبوبة الثانية حتى نحصل على Δ A₂ .

الحساب : -

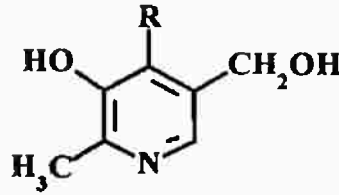
تحتسب نتائج معامل نشاط الأنزيم activity coefficient (AC) ، أو الزيادة النسبية في نشاط الأنزيم الناتجة من إضافة الـ FAD (in vitro) من المعادلة التالية : -

$$AC = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2}$$

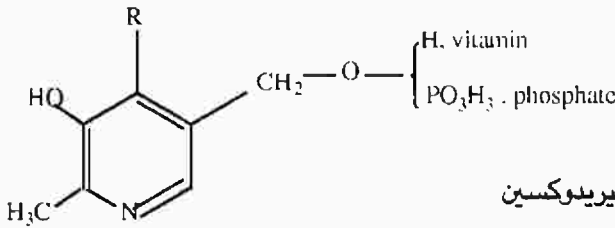
التفسير :-

من قيم الـ AC يمكن الاستدلال على حالة مستوى الفيتامين في الجسم كما يلي :-
لو كانت الـ AC أقل من ١,٢ يكون مستوى الفيتامين مقبول ، ولو كان ١,٢ - ١,٤ تكون هناك حالة نقص بسيط في الفيتامين mild deficiency . أما لو زادت عن ١,٤ فتكون هناك حالة نقص معنوي . ومما هو جدير بالذكر ، إنه لا يمكن انجاز هذا الاختبار في حالة معاناة كرات الدم الحمراء من نقص أنزيم glucose - 6 - phosphatase .

فيتامين ب₆ (البيريدوكسين) - Vit.B₆ (Pyridoxine)



تضم مجموعة فيتامين ب₆ ثلاث أعضاء توجد كلها في الطبيعة ، وهي من الناحية الكيميائية مرتبطة بعضها ببعض ، وتتكون من البيريدوكسين نفسه والبيريدوكسامين pyridoxamine والبيريدوكسال pyridoxal . وتعتبر كلها مشتقات للبيريدين pyridine . وتركيبها الكيميائي يختلف فقط في نوع المجموعة R المرتبطة بالحلقة كما يلي :-



$\text{CH}_2\text{OH} = \text{R}$ في حالة البيريدوكسين

$\text{CH}_2\text{NH}_2 =$ في حالة البيريدوكسامين

$\text{CHO} =$ في حالة البيريدوكسال

وأي صورة غذائية للفيتامين توجد في صورة أسترات الفوسفات 5-phosphate esters ، فإنها تتحلل مائياً بفعل أنزيم intestinal alkaline phosphatase قبل امتصاصها الى صورة حرة ، وهي تتحول إلى 5 - phosphate (PLP) pyridoxal والذي يعتبر معاون coenzyme لأنزيمات عديدة تدخل في التمثيل الغذائي للبروتين والدهون والكاربوهيدرات ، ومن أهمها أنزيمات الـ transaminases والـ decarboxylases . أيضاً الـ PLP معاون أنزيمي لأنزيم kynureninase (EC.3.7.1.3) والذي يحفز تفاعل تحويل الـ kynurenine

والـ 3-hydroxynurenine إلى 3-hydroxyanthranilic acid وanthranilic acid ، على التوالي ، وذلك أثناء هدم الحمض الأميني التربتوفان tryptophan .

وعند نقص البيريدوكسين ، يقف هذا التفاعل (شكل ٣٣) ويفرز كل من الـ xanthurenic acid والـ kynurenic acid في البول . فكلهما يتحول جزئياً إلى 8-hydroxyquinaldic acid و quinolinic acid ، على التوالي ، الـ PLP يلزم أيضاً لتخليق δ- aminolaevulinic acid من glycine و succinyl CoA في بداية تخليق الهيم haem . ونتاج التكسير الرئيسي لهذا الفيتامين ومشتقاته هو 4- pyridoxicacid ويشترك بأكسدة مجموعة الألاهيد في البيريدوكسال الى مجموعة كربوكسيل ، ويفرز في البول .

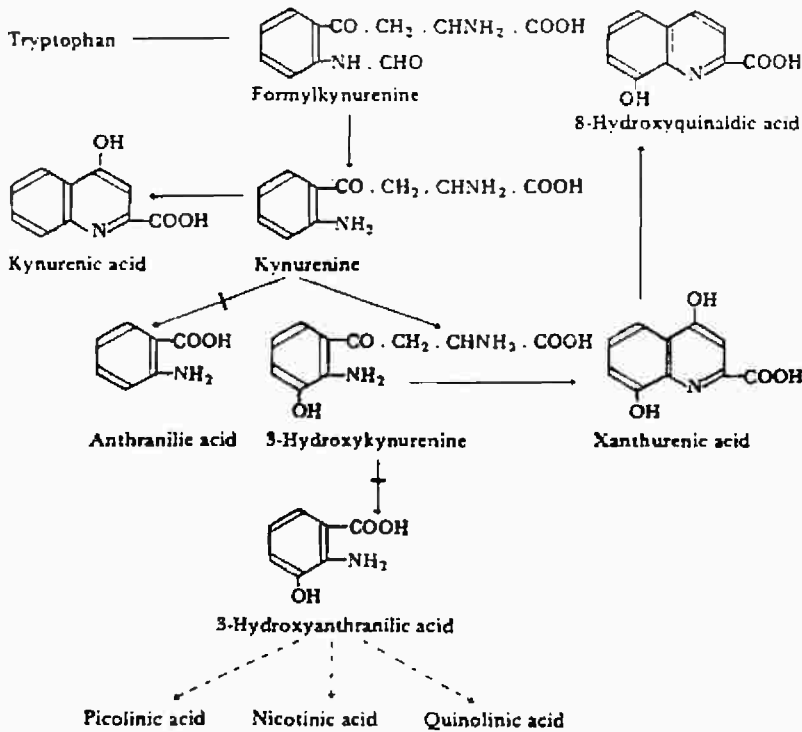


Fig. 35.1. The Catabolism of Tryptophan via the Kynurenine Pathway.
The blocks in pyridoxine deficiency are indicated by bars on the arrows.

شكل (٣٣) هدم التربتوفان خلال مسار الـ Kynurenine ، وفي حالة نقص البيريدوكسين يتوقف تفاعل تحويل الـ Kynurenine إلى Anthranilic acid وتفاعل تحويل الـ 3-Hydroxykynurenine إلى 3-hydroxyanthranilic acid والتي يشار إليها بخط مستعرض على السهم الخاص بالتفاعل .

تفاعلاته :-

فيتامين ب_٦ ثابت لكل من الحرارة والقلويات والأحماض ، وغير ثابت فى الوسط المؤكسد والوسط المختزل ، وحساس للضوء . وفى الماء يكون تأثيره قلوياً (قاعده نيتروجينية هيدروكسيلية ضعيفه) .

الذوبان :

ينوب فى الماء بنسبة كبيرة (٠.٢ جم / مل) ، وينوب أيضاً فى الأستيون والكحول . ولكنه غير ذائب فى المذيبات الغير قطبية مثل البنزين والأثير والكلوروفورم .

صوره وخواصه :

مسحوق أبيض (الصورة النقية) ، أما الصورة البلورية فهى على شكل صفائح platelets . أهم أملاحه هى ملح الهيدروكلوريد وملح الكالسيوم Ca^{++} . الوزن الجزيئى يبلغ ١٦٩ (بيريدينوكسين) ودرجة أنصهاره هى ١٦٠ ° م . أقصى امتصاص له على طولى موجة ٢٥٦ و ٣٢٧ nm .

انتشاره ومصادره :

١ - فى النباتات :- كل الفواكه تحتوى على كميات صغيرة منه ماعدا الموز ، أما الأفوكادو avocados والعنب والكمثرى pear فهى تحتوى على كميات متوسطة منه . وكل الخضروات تحتوى على كميات صغيرة أو متوسطة منه . وكل النفل تحتوى على كميات عالية منه . ويوجد فى الحبوب بكميات متوسطة عدا الأرز البنى وجنين القمح فهما يحتويان على فيتامين ب_٦ بكميات كبيرة ، ويحتوى المولاس أيضاً على كميات كبيرة منه .

٢ - فى الحيوانات :- كل الحيوانات تحتوى على كميات متوسطة منه عدا الكبد والسالمون والرنجة ففيهما كميات عالية منه .

٣ - الكائنات الحية الدقيقة :- كل أجناس الكائنات الحية الدقيقة تحتوى على كميات عالية أو متوسطة منه ، والخميرة وبكتريا الأمعاء الدقيقة وبعض الأجناس الأخرى تحتوى على كميات عالية منه .

المصادر الغذائية :

١ - المصادر الغنية :- (١٠٠٠ - ١٠٠٠٠ µg لكل ١٠٠ جم) وتشمل الكبد

(كبد البقر والعجل والخنزير) ، والسالمون والرنجة ، وجنين القمح والأرز البنى ، والفول السودانى والجوز walnut ، والخميرة والمولاس .

٢ - المصادر المتوسطة : - (١٠٠ - ١٠٠٠ μg لكل ١٠٠ جم) وتشمل الموز والعنب والأفوكادو والكمثرى والشعير والجوز والذرة والبسلة والبطاطس والراى والشوفان والكرنب والطماطم والقمييط والسبانخ وفول الصويا ، واللحم (البقر والخنزير والضانى) ، وفى العجول veals (القلب والكلى والمخ) ، وفى الحوت والماكريل والسردين والتونا والبيض .

٣ - المصادر المنخفضة : - (١٠ - ١٠٠ μg لكل ١٠٠ جم) وتشمل التفاح والجريب فروت والليمون والكتالوب والبرتقال والفروالة والبطيخ والكريز والفول والخس والبصل والأسبراجس والجبن واللبن .

الدور الطبى والغذائى :

- ١ - الوحدات : - وحدات فيتامين ب ٦ بالوزن ملجم mg وميكروجرام μg .
- ٢ - المستويات الطبيعية فى الدم : - ١١,٢ ميكروجرام لكل ١٠٠ مل .
- ٣ - المقررات الموصى بها : - ٢,٠ ملجم / يوم . أما للحوامل والمرضعات فيوصى ب ٢,٥ ملجم / يوم .
- ٤ - إعطاء الفيتامين : - يفضل إعطاءه عن طريق الفم ، ويمكن إعطاءه بالحقن سواء تحت الجلد أو فى الوريد .
- ٥ - أعراض النقص : -
 - أ - أعراض عامة : - أنيميا ، وزيادة افراز xanthurenic acid فى البول ، وخلل عصبى متضمناً تشنجات convulsions ، وأضرار جلدية .
 - ب - فى حيوانات التجارب : - زيادة مستوى اليوريا فى الدم وفى البول ، وانخفاض الهيموجلوبين والجاما جلوبيولين α - globulin ، وزيادة الأكسالات فى البول ، وانخفاض الأنسيولين ، وعجز القدرة على التناسل .
- ٦ - تأثير الجرعات العالية منه : - سميته محدودة على الإنسان (فقط على جرعة ٢ جم / كجم من وزن الجسم) ، ولكن يحدث تشنجات عصبية عند إعطاءه

بجرعة ٤ جم لكل كجم (فى الفرن) .

٧ - مصادره للأجناس التى تحتاج إليه : - كل الحيوانات تحتاج إليه من المصادر الخارجية ، وبعض البكتريا (البكتريا المعوية) تخلقه ولكن ليس كله متاح للإنسان ، أما النباتات والفطريات والبكتريا المعوية فهى تخلفه بداخلها (مصدر داخلى) .

تحليل فيتامين ب ٦

الفصل :

يعتبر رجب الكون ونواتج تبيض الأرز والخميرة من أهم المصادر التى يستخلص منها هذا الفيتامين ، والطريقة المتبعة فى الاستخلاص تتضمن تحليل مائى للعينة بمحلول حامضى (HCl قوته أقل من عيارى N) ، ثم أدمصاص الفيتامين على فحم نشط أو fuller's earth ، ولى ذلك أحلال الفيتامين بأيدروكسيد الباريوم ثم ترسيب المواد المتداخلة والمحل مع الفيتامين بأيونات المعادن الثقيلة . وأخيراً يرسب فيتامين ب ٦ بحمض فوسفوتنجستيك .

طرق التقدير :

لابد أن تكون الطرق المستخدمة فى تحليل فيتامين ب ٦ كمياً قادرة على الكشف عن كل صور الفيتامين ، وأيضاً تكون حساسة ودقيقة فى تقدير كميات صغيرة منه (نانوجرامات) فى وجود مواد متداخلة عديدة مع الفيتامين . وحيث أن الفيتامين يوجد فى النظم الحيوية مرتبطاً بالبروتين ، فلا بد من تحليله مائياً أولاً ثم استخلاصه .

والتقدير الحيوى باستخدام الحيوانات يتضمن استخدام إما الفرن أو الدجاج ، وفيها تغذى الحيوانات على عليقة أساسية فقيرة فى الفيتامين ، وبعد الحصول على أعراض النقص تضاف كميات معلومة منه فى العليقة ويسجل معدل النمو المصاحب لهذه الزيادة (عامل الاستجابة هو النمو) . وحيث أن هذه الطريقة تستلزم كثيراً من الوقت وغالية التكاليف وتعطى نتائج متغيرة variable ، لذا فلا يفضل استخدامها وتستخدم الطرق الأخرى فى التقدير . ومما هو جدير بالذكر ، يستخدم عد كرات الدم الحمراء فى التقدير الحيوى للفيتامين . ومن أهم التقديرات الحيوية أيضاً كل من rat acrodynia test, tryptophan loading test ، والطريقة القياسية للتقدير الكمي لفيتامين ب ٦ فى الأغذية هى الطريقة

الميكروبيولوجية ويستخدم فيها خميرة *Saccharomyces uvarum* ، وميزة هذه الطريقة أن صور الفيتامين المختلفة (بيريدوكسال ، بيريدوكسين ، بيريدوكسامين) ذات نشاط متساوى على هذا الميكروب (على أساس جزيئي molar basis) . وفيها لابد من إجراء تحليل مائي أولاً وقبل التقدير حتى يمكن التخلص من البروتين والفوسفات لأن هذه الخميرة تنمو فقط على الصورة الحرة للفيتامين . وعادة ما تعلق suspend العينة في حمض HCl ثم تعقم في الأتوكلاف ، والطريقة الرسمية AOAC تتضمن استخدام حمض HCl قوته 0.44 N للعينات النباتية و 0.55 N للعينات الحيوانية . ويتم تسخين العينات النباتية في الأتوكلاف على ١٢١ ° م لمدة ساعتين والعينات الحيوانية لمدة ٥ ساعات . وهناك طرق أخرى تستخدم للتحليل المائي . وتقاس استجابة الكائن الحي الدقيق للنمو في بيئة أساسية خالية من فيتامين ب ٦ وتقارن مع مجموعة بهما كل الإضافات القياسية وأخرى بها إضافات العينة المجهولة في نفس البيئة .

بعض الباحثين أمكنهم تقدير صور الفيتامين المختلفة كل على حده في عينات الأغذية المحللة مائياً . فاستخدمت البكتريا *L. casei* في تقدير البيريدوكسال كميأ ، واستخدمت *Strep. faecali* لتقدير البيريدوكسال والبيريدوكسامين معاً . واستخدمت *S. uvarum* لتقدير فيتامين ب ٦ الكلى . ومن أهم الاعتراضات على الطرق الميكروبيولوجية مايلي :-

- ١ - هذه الطرق تستهلك وقتاً طويلاً .
- ٢ - وجود اختلافات في الاستجابة للنمو للفيتامين باختلاف أنواع الكائنات الحية الدقيقة .
- ٣ - قد تحدث عملية طفرة للكائنات الحية الدقيقة .
- ٤ - قد تكون صور الفيتامين غير متاحة ميكروبيولوجياً نتيجة للاستخلاص بالحمض .
- ٥ - قد يكون نمو الميكروب مرتبطاً ببعض المواد المستخلصة من الطعام مع الفيتامين .
- و استخدم الـ GLC في السنين الأخيرة للكشف عن فيتامين ب ٦ وتقديره أيضاً .
- وففي بعض هذه الطرق يتم تحضير مشتقات الـ (TMS) trimethyl silyl للفيتامين ، وقد أعطت هذه الطريقة فصلاً جيداً ونتائج يعتمد عليها . وقد أمكن استخدام المشتقات التالية للفيتامين والتي أعطت فصلاً جيداً وتشمل :-
- trifluoroacetyl و acetylene و heptafluorobutyl و N-methyl bistrifluoroacetamidyl

حديثاً استخدام الـ HPLC في فصل وتقدير الفيتامين ، ومن أهم مميزاته السرعة واستخدامه لأقل كمية من الفيتامين (٥٠ ng) ، ويمكن فصل مشابهاة الفيتامين المختلفة بهذا التكنيك وأعطى نتائج أفضل بكثير من نتائج الطرق الميكروبيولوجية . وأمكن فصل الصور المفسفرة والغير مفسفرة من الفيتامين باستخدام أعمدة تبادل أيوني في الـ HPLC . ويجب مراعاة نظافة العينة تماماً وخلوها من المواد المتداخلة عند تطبيقها في هذه الطريقة . هذا ، وتعتبر هذه الطريقة هي الطريقة المختارة والجيدة لفصل صور الفيتامين المختلفة بكفاءة عالية

أخيراً ، تستخدم الخاصية الكيميائية الطبيعية (الفلورة) لمركب pyridoxic acid - 4 (الناتج الرئيسي لهدم فيتامين ب_٦) لتقديره في البول .

الطريقة الفلورومترية لتقدير xanthurenic acid في البول (Sato and Price, 1958)

في هذه الطريقة يتم ادمصاص كل من xanthurenic acid , kynurenic acid على المبادل الأيوني Dowex 50W في صورة H^+ ، في عمود كروماتوجرافي ، ثم يتم احلالها فقط بالماء وتبقى باقى المواد المتداخلة مرتبطة مع المبادل بدون احلال . ويقاس xanthurenic acid فلورومترياً في محلول قلوى ، بينما فلورة kynurenic acid فتكون طفيفة جداً لدرجة أنه يمكن اهمالها .

الجواهر الكشفية :

- ١ - المبادل الأيوني : α 400 mesh . Dowex 50W (H^+ form) .
- ٢ - محاليل حمض HCl : - ٥ mol / لتر ، ١ mol / لتر ، ٢٠٠ m mol / لتر .
- ٣ - محلول فوسفات منظم (٥٠٠ m mol / لتر ، pH ٧,٤) : - يذاب ١٣,٠٠ جم KH_2PO_4 لامائية ، و ٧١,٩٧ جم من $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ في ماء ويكمل الحجم إلى لتر . تختبر درجة الـ pH وتضبط إلى ٧,٤٠ إذا اقتضت الضرورة .
- ٤ - محلول فوسفات منظم مخفف (٥ m mol / لتر ، pH ٧,٤) : - يخفف الجواهر رقم ٣ بنسبة حجم إلى ١٠٠ حجم بالماء المقطر .
- ٥ - محلول هيدروكسيد صوديوم مشبع .

٦ - محلول stock standard xanthureinc acid (١ جم / لتر) : - يذاب ١٠٠ ملجم من الحمض في ١٠٠ مل محلول هيدروكسيد صوديوم (١٠٠ m mol / لتر) .

٧ - محلول working standard xanthurenic acid (١٠ ملجم / لتر) : - يخفف الجهر رقم ٦ بنسبة حجم إلى ١٠٠ حجم بالماء المقطر قبل الاستعمال .

التكنيك :

١ - تستخدم أعمدة كروماتوجرافية زجاجية ، ويفضل عمود بطول ١٥ سم وقطر خارجي قدره ١,٢ سم . توضع سدادة من الصوف الزجاجي أعلى صنبور العمود ، ثم يضاف معلق المبادل الأيوني حتى ارتفاع ٣ سم من العمود .

٢ - يغسل المبادل بـ ٥٠ مل محلول حمض HCl (٥ mol / لتر) ، ثم يتبع ذلك الغسيل بـ ٢٠٠ مل ماء .

٣ - تؤخذ عيقتان (duplicate) من البول ، عادة ٥٪ من حجم البول الكلي خلال ٢٤ ساعة ، ويقل الحجم إلى ٢٪ في حالة التركيزات العالية .

٤ - إلى أحد العينتين يضاف ١,٠ مل من محلول stock standard (١ ملجم من حمض xanthurenic acid) حتى تختبر قدرة المبادل على الاستعادة recovery .

٥ - تخفف العينتين إلى ١٢٠ مل بالماء المقطر ثم يضاف ٣٠ مل حمض HCl (١ mol / لتر) وتخلط جيداً .

٦ - يضاف كل محلول (كل على حده) إلى الأعمدة الكروماتوجرافية التي سبق تجهيزها ، ويسمح للمحلول بأن يمر خارج العمود ، ثم يغسل كل منها بـ ٥٠ مل حمض HCl (٢٠٠ m mol / لتر) ويتبع بالغسيل بـ ٢٠ مل ماء مقطر .

٧ - يتم الأحلال لكل عمود بواسطة ٣٩٦ مل ماء مقطر ، ويضاف لكل من المحاليل المحلة ٤ eluats مل محلول فوسفات منظم (٥٠٠ m-mol / لتر) .

٨ - يؤخذ ١ و ٢ و ٤ مل من كل مخلوط ويضاف إليها محلول فوسفات منظم إلى حجم نهائي قدره ٥ مل .

٩ - تحضير المحاليل القياسية كمايلي : - يخفف ١,٠ و ٠,٥ و ١,٠ و ٢,٠ مل من محلول working standard ويخفف إلى ٥ مل بمحلول الفوسفات المنظم وبذلك نحصل على تركيزات ٠,٢ و ١ و ٤ ملجم / لتر .

١٠ - يضاف إلى كل منها (العينات والمحاليل القياسية) ٥ مل محلول هيدروكسيد صوديوم مشبع ، ويخلط جيداً ويترك على الأقل لمدة ساعة ، ثم يطرد مركزياً وتقاس الفلورة ضد بلانك يتكون من محلول هيدروكسيد صوديوم نصف مشبع على طول موجة إنبعاث emission مقدرها ٢٥٥ nm وطول موجه إثارة excitation مقدرها ٣٧٠ nm .

الحساب : -

لو كان حجم المحلول الذي تم احلاله هو V مل والذي خفف إلى ٥ مل ، فإن تركيز xanthurenic acid في المحلول المحل يحسب من المعادلة التالية : -

$$\text{Elute concentration (mg / l)} = \frac{\text{Read of unknown}}{\text{Read of standard}} \times \text{concentration of standard} \times \frac{5}{V}$$

ولو كانت X هي النسبة المئوية المأخوذة من حجم البول خلال ٢٤ ساعة فيحسب تركيز الحمض في الـ ٢٤ ساعة من المعادلة التالية : -

$$\text{Urinary xanthurenic acid (mg / 24 h)} = \text{concentration in eluate} \times \frac{40}{X}$$

ملاحظات : -

١ - حتى تكون هذه الطريقة سليمة ١٠٠٪ ، فلا بد من الحصول على استرجاع recovery للحمض المضاف بنسبة ٩٥ ± ٥ ٪

٢ - بالرغم من أن فلورة kynurenic acid تكون في المحلول الحامض إلا أن فلورته في الوسط القلوي تكون بسيطة جداً ، ويمكن إهمالها ، وتدخلة غير محتمل فيما عدا في حالات أفرازه بكميات كبيرة .

اختبار تحمل التربتوفان

Tryptophan loading test (Price et al ., 1965)

١ - بعد تجميع البول ليوم كامل (٢٤ ساعة) ، يعطى الشخص ٢ جم حمض أميني تربتوفان L- tryptophan فى عصير برتقال ، وفى حالة الأطفال الصغيرة يعطى الفرد ١ ، ٠ جم لكل كجم من وزن الجسم و بعد أقصى ٢ جم ، ثم يجمع البول المفرز خلال ٢٤ ساعة التالية لاعطاء التربتوفان فى زجاجة خاصة تحتوى على ٢٥ مل حمض HCl (١ mol / لتر) .

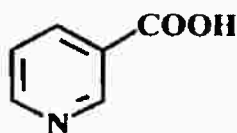
٢ - يقدر xanthurenic acid فى عينة البول .

٢ - حيث أن أقصى زيادة فى افراز xanthurenic acid تحدث فى أول ١٢ ساعة بعد تناول التربتوفان ، لذلك تجمع عينات البول قبل وبعد هذه الزيادة بـ ٦ ساعات .

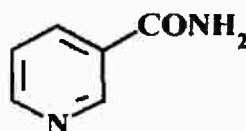
التفسير :-

يفرز الشخص العادى ١ - ٣ ملجم xanthurenic acid يومياً ، ومن ٢ إلى ١١ ملجم فى خلال ٢٤ ساعة بعد تناول جرعة التربتوفان . وفى حالة نقص البيريدوكسين تكون الاستجابة للتربتوفان كبيرة ويصل المفرز من الحمض إلى ٦٠ ملجم فى خلال ٢٤ ساعة .

Niacin – النياسين



Niacin



Nicotinamide

النياسين أو حمض النيكوتينيك nicotinic acid في صورته الأميد يسمى نيكوتيناميد nicotinamide ، وهو مكون رئيسي لمعاونين أنزيمين مهمين وهما nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) ، dinucleotide (NAD⁺) . nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺) . وهذين الصورتين يوجدان في معظم الخلايا ويمثلا العوامل المستقبلية للهيدروجين hydrogen acceptors لعدد من أنزيمات الأكسدة والاختزال oxido reductases .

يوجد حمض النيكوتينيك والنيكوتيناميد في الغذاء ويمتص بسرعة من الصائم jejunum (الجزء الأوسط من الأمعاء الدقيقة) ويظهر في الدم وفي سائل النخاع الشوكي cerebrospinal fluid ويخزن جزء صغير منه كما هو ، ولكن معظم الخلايا تحوله إلى معاونات أنزيمية NAD⁺ و NADP⁺ ، تكسير هذه معاونات الأنزيمية يتم بواسطة الـ microsomal deaminase وتطلق منه حمض النيكوتينيك والذي يفرز في البول أساساً في صورة 1-methylnicotinamide وكمية بسيطة من 1-methyl-3-carboxamide-6-pyridone .

تفاعلاته :

ثابت للعوامل التالية : - الحرارة و الحمض و القلوي و الأكسدة والضوء ، ولكنه غير ثابت ضد العوامل المختزلة ، وعند ذوبانه في الماء يكون تأثيره حامضى ويكون أملاح مع الأحماض (HCl) ومع المعادن Na (مع الكربوكسيل) .

الذوبان :

يذوب في الماء بنسبة كبيرة (١ جم / ١٠٠ جم) ، وفي الكحول ، ولكنه غير ذائب في المذيبات الغير قطبية .

صوره وخواصه :

صورته البلورية بيضاء أبرية ، والوزن الجزيئي له ١٢٢,١ ، ودرجة أنصهاره ٢٢٤ - ٢٣٧ ° م ، وأقصى امتصاص على طول موجة ٢٦١,٥ nm ، وهو غير منشط ضوئياً .

انتشاره ومصادره :

١ - في النباتات : - كل الفواكه تحتوي على كميات صغيرة منه عدا الأفوكادو ، والتين الجاف والبلح dates والخوخ الجاف prunes فيوجد فيها بنسبة متوسطة . وكل الخضروات تحتوي أيضاً على كميات صغيرة منه عدا الفول والحمص والبطاطس والاسبراجس والذرة والبقدونس parsley والكرب فتحتوي على كميات متوسطة منه . وكل النفل تحتوي على كميات متوسطة منه عدا البكان وجوز الهند فهي فقيرة فيه .

٢ - في الحيوانات : - كل الحيوانات تحتوي على كميات متوسطة منه عدا الكبد والكلى والقلب ولحم الرومي والدجاج (الأبيض منه) والأرانب والتونا وسماك أبو سيف swordfish فإنها تحتوي على كميات عالية منه .

٣ - الكائنات الحية الدقيقة : - كلها تحتوي على كميات عالية منه .

المصادر الغذائية :

١ - المصادر العالية :- (١٠ - ١٠٠ ملجم / ١٠٠ جم) وتشمل النقل و الكبد (بقر - عجل - دجاج - خنزير - ضأن) و القلب (عجل) و الكلى (بقر - خنزير) و لحم الأرانب والرومي والدجاج (الأبيض) و مستخلص اللحم و التونا وسماك أبو سيف والخميرة .

٢ - المصادر المتوسطة :- (١ - ١٠ ملجم / ١٠٠ جم) وتشمل الأفوجادو والبلح و التين (الجاف) والخوخ (الجاف) والفول والذرة والاسبراجس والبقدونس والحمص والبطاطس وفول الصويا والشعير والقمح والراي rye والشوفان والأرز البنى وجنين القمح

والمولاس . كما يوجد فى لحم البقر والدجاج (اللحم الغامق) والبط والضأن والسّمك (عدا التونا وأبوسيف) .

٣ - المصادر المنخفضة : - (٠,١ - ١,٠ ملجم / ١٠٠ جم) وتشمل التفاح والموز والفراولة والكريز والليمون والجريب فروت والبرتقال والبطيخ والخوخ والبلح والبنجر والكرنب والجزر والقرنبيط والباذنجان والخس والبصل والسبانخ والبطاطا والطماطم والفجل وجوز الهند والبان و البيض واللبن .

الدور الطبى والغذائى :

- ١ - وحدات النياسين : بالوزن (ميللى جرام) .
- ٢ - المستويات الطبيعية فى الدم : - ٠,٤٢ - ٠,٨٤ ملجم / ١٠٠ مل .
- ٣ - المقررات الموصى بها : - يوصى للأطفال بـ ٨ - ١٥ ملجم / يوم ، والبالغين الذكور ١٨ ملجم / يوم ، وللإناث ١٢ ملجم / يوم . والنسبة للحوامل فيوصى بـ ١٥ ملجم / يوم ، وللمرضعات يوصى بـ ٢٠ ملجم / يوم .
- ٤ - اعطائه : - يفضل اعطائه عن طريق الفم ، كما يعطى بالحقن فى الوريد .
- ٥ - أعراض النقص : -

أ - الأعراض العامة فى الإنسان : -البلاجرا pellagra ونقص النمو وضعف الجسم (هزال) weakness وضعف الذاكرة و التهاب جلدى dermatitis وفقد الشهية للطعام anorexia و عسر الهضم indigestion وسهال diarrhea و كسل lassitude والاصطباغ pigmentation وسرعة الغضب والاثارة irritability وصداع headaches وأرق insomnia .

- ب - تغيرات هستولوجية فى الجهاز العصبى المركزى CNS (فى الكلاب والقطط) .
- ج - سيل اللعاب من الفم drooling (فى الكلاب والقطط) .
- د - perosis وقلة الريش poor feathering (فى الدجاج) .
- ٦ - مصادره للأجناس التى تحتاج إليه : - كل الأجناس تحتاج إليه . ومصادره هى : -

أ - المصادر الخارجية : - يلزم مد الحيوانات بمصدر خارجي من الفيتامين (غير متاح من بكتريا المعوية في الإنسان) ، ولكن جزء من التريتوفان يتحول اليه في الأنسجة ، كما يلزم مد البكتريا والفطريات به .

ب - المصادر الداخلية : - تخلقه النباتات والطحالب وبعض البكتريا والفطريات ، كما تستطيع بعض أجناس الحيوانات أن تخلقه كلية من التريتوفان والبعض الآخر تخلقه جزئياً .

٧ - تأثير الجرعات العالية : - في الإنسان : سميته محدودة تبدأ بجرعة حوالى ١,٤ جم لكل كجم من وزن الجسم مع حساسية تختلف من فرد لآخر ، و أنخفاض كولستيرول السيرم وكبد دهنى . حث الجهاز المركزى وزيادة معدلات التنفس والنبض pulse وأنخفاض ضغط الدم ، وحكة جلدية itching skin وتحرق burning وتوسع الأوعية الدموية vasodilation الخارجية . وفى الفئران : تسبب حالة ketosis وشلل تنفسى respiratory paralysis . أما فى الكلاب فهى تسبب الموت ، وفى الدجاج فهى تثبط النمو وتؤدى إلى تكوين كبد دهنى .

تحليل النياسين

الفصل :

١ - حمض النيكوتينيك Nicotinic acid : - يمكن فصل حمض النيكوتينيك بسهولة من المواد البيولوجية ، والطريقة المختارة تعتمد على نوع المادة وعلى الغرض من الفصل . فى معظم الحالات مع المواد الحيوانية ، عند الحاجة فقط إلى استخلاص حمض النيكوتينيك الحر فإنه يفضل إجراء تحليل مائى قاعدى . أما التحليل المائى الحامضى فإنه يحول بعض من حمض الكوينولينيك quinolinic acid الموجود فى الأنسجة أو عينة السيرم إلى حمض النيكوتينيك . وعلى ذلك فإنه يجب أولاً وقبل التحليل المائى إجراء استخلاص مبدئى بمذيب عضوى ، ثم استخلاص حمض النيكوتينيك بعد التحليل المائى بالمذيبات العضوية ، ثم تركز تحت تفريغ ويفضل تجفيفها تحت التفريغ أيضاً .

وهناك طرق أخرى تتضمن تكوين استرات أو أملاح النحاس والتي تسرع من فصله . وأبسط طريقة لفصل كميات صغيرة منه من البول تتضمن تحليل مائى قاعدى ثم تعادل

وتجفف ، ثم استخلاص البقايا بالميثانول ، ويلي ذلك تجفيف المستخلص الميثانولي ، ثم يمرر على عمود يحتوى مبادل أيوني 8 - Dowex 50 فى محلول مائى ، ثم يحل بواسطة محلول HCl وبعد ذلك تركيز المحاليل المحلة حتى الجفاف تحت تفريغ ، ويمكن إعادة بلورتها فى ٥٠٪ أيثانول .

٢ - النيكوتيناميد Nicotinamide : - الطريقة الشائعة المعروفة لفصل النيكوتيناميد هى الاستخلاص بالماء ثم التحليل المائى بحمض كبريتيك (N . ١) لتحرير النيكوتيناميد من التركيبات الأنزيمية المتعددة . يستخلص هذا المحلول بكحول بيوتانول أو كلوروفورم ثم يقطر المستخلص (الذى يحتوى على النيكوتيناميد) جزئياً على ١٥٠ - ١٦٠ °م تحت ضغط ١٠ × ١٠^{-٤} ميليمتر زئبق mm Hg . ويمكن إعادة بلورة ناتج التقطير بالبنزين أو كلوروفورم أو إيثيلين جليكول ethylene glycol .

٣ - نيكلوتيدات البيريدين pyridine nucleotides : - تم فصل الـ NAD من خميرة الخبيز ومن كبد الغنم والعجول والبقر والخنزير ، ولكن أعلى إنتاج تم الحصول عليه كان من الخميرة . والطريقة المناسبة لذلك هى الاستخلاص بالماء الساخن ثم التخلص من المواد المتداخلة من المستخلص بخلات الرصاص القاعدية ثم فصل الـ NAD من الراشح فى صورة ملح فضة . وهذا الملح يتحلل بواسطة كبريتيد الهيدروجين H₂S ، حيث تترسب الفضة وينوب الـ NAD ، ويتم ترسيب الأخير من الراشح بالأسيتون كحامض . ويمكن الحصول على نقاوة ٩٥٪ باستخدام كروماتوجرافى التبادل الأيوني على راتنج Dowex - 1 .

طرق التحليل :

١ - الطرق الميكروبيولوجية (للنياسين والنيكوتيناميد) : - وهى طريقة حساسة جداً لتقدير النياسين والنيكوتيناميد والمركبات التى على صلة بهما فى معظم العينات . وفيها يستخدم الكائن الحيوى الدقيق *L. arboris* . ويمكن تحليل عينات السيرم والبول والأغذية أو الأنسجة بهذه الطريقة .

٢ - الطرق الكيميائية : - وهذه الطرق أقل حساسية من الطرق الميكروبيولوجية وعادة ما تتطلب استخلاصاً للفيتامين أولاً ثم تنقيته . وهناك طريقتان تم التوصية بهما لتقديره ، وكلاهما يستخدم الميتول metol (F-methylaminophenol sulfate) كقاعده عطرية تستعمل لظهور لون مع النياسين . والطريقة الأولى تعتمد على تحليل مائى

حامضى والثانية تعتمد على تحليل مائى قاعدى لتحرير النياسين من العينة . أما الطريقة الرسمية فتعتمد على أستعمال حمض السلفانيليك sulfanilic acid كمظهر للون .

٣ - تحليل المستحضرات الطبية (نيكوتيناميد) : - وفى هذه الطرق تستخدم عينات نقيه ، ويتميز هذه الطرق بالبساطة والسهولة حيث يتم التفاعل مباشرة بين النيكوتيناميد فى وجود فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين مع بروميد السيانونجين cyanogen bromide و حمض . الباربيتيوريك barbituric acid (عامل مختزل) . وهذا التفاعل يعطى لون قرمضى purple والذي له اقصى امتصاص على طول موجة ٥٥٠ nm .

٤ - الطريقة الدقيقة للتقدير السيرم ٢٣٥ : - يمكن تحليل (NMN) -methylnicotinamide chloride N^+ والنيكوتيناميد فى السيرم بتركيزات صغيرة جداً picomolar . وهذه الطريقة فلورومتريه وفيها يتم تحويل المركب الأول السابق ذكره والموجود فى مستخلص السيرم الخالى من البروتين إلى مشتق ذو فلورة بالمعاملة بواسطة acetophenone فى بوتاسا كاوية كحولية ثم أضافة حمض فورميك ٩٩٪ إليه . وأساس التفاعل هو أن N^+ -methylnicotinamide يتكثف مع الأسيتون فى الوسط القلوى المائى ويعطى مركب ذو فلورة عند معاملته بـ حمض مخفف . وعند أستبدال الأسيتون بالـ 2- butanone يعطى مشتق ذو فلورة أيضاً . وبذلك طورت الطريقة بأستخدام acetophenone لأنها تعطى علاقة خطية واضحة وحساسة عن المواد الأخرى بحوالى ٢٠ ضعف .

٥ - تحليله فى البول : - وفى هذه الطريقة يتم إزالة المواد المتداخلة من البول على عمود راتنج ، ويمكن أزلتها أيضاً بأستعمال أعمدة فحم نشط ولكنها تدمص بعض N^+ -methylnicotinamide ، ولكن تفضل الراتنجات الأنيونية Dowex 1 - acetate والتي تزيل الأيونات المتداخلة بدون فقد فيه ، وأستخدام كلوريد المنجنيز $MnCl_2$ فى الأسيتون ليزيد من فلورة المركب الناتج من التكثيف ، وأقصى طول موجة للثارة هي ٢٥٠ nm . وهذه الطريقة عالية الحساسية وتعطى نفس النتائج عند أعادتها وتستخدم بدرجة كبيرة فى تقدير النياسين فى بول الإنسان .

٦ - تقدير نيكلوتيدات البيريدين "PN" Pyridine nucleotides

أ - فى الدم : - تتفاعل الـ PN مثل النيكوتيناميد أحادى النيكلوريتيد (NMN)

مع جواهر الأسيتون القلوى وتعطى ناتج ذو فلورة عالية . ويستخدم هذا التفاعل فى تقدير مستويات من هذا المعاون الأنزيمى تبلغ ١ ميكروجرام فى عينات الدم الكلى مقدارها ٠,٥ مل أو ٠,٢ مل كرات دم حمراء . وفى هذه الطريقة ، يتم التخلص من البروتين فى عينات الدم المعاملة بالأكسالات (oxalated) بواسطة TCA ، ويتم اجراء تفاعل التكتيف فى الراشح الناتج . وبعد ١٠ ق من الترشيح تقرأ الفلورة . ويستعمل NMN كمادة قياسية ، وتحسب النتائج فى صورة NMN قياسية أو NAD لكل مل من الدم أو من الـ RBC .

ب - فى الأنسجة (الطريقة الأسبكتروفوتومترية) :- وفيها يتم تجنيس الانسجة المجمدة فى مجنس يحتوى على ٢٪ TCA أو مع TCA وفوق أكسيد هيدروجين H_2O_2 ، وذلك على حسب الرغبة فى تقدير الصورة المؤكسدة أو الصورة المؤكسدة و المختزلة معاً من الـ PN . ويمرر المحلول الرائق والناتج بعد التجنيس على عمود Nuchar C تم تحل الـ PN بمحلول بيريدين ١٠٪ . وبعد معاملة العينات الناتجة من الاحلال بواسطة $NaHCO_3$ أو $NaHCO_3 + Na_2SO_4$ يتم أكسدتها كلها ويقرأ الامتصاص على طول موجة ٢٤٠ nm فى جهاز الأسبكتروفوتومتر . والفرق بين القراءة بعد الأكسدة أو بعد الاختزال يستخدم كمقياس لـ PNH_2 . ففى خلية القياس ١ سم تحتوى على ١٠٠ µg من PNH_2 / مل تعطى O.D. مقدارها ٠,٨٤٠ ، وعن طريق معرفة حجم المحلول ووزن النسيج يمكن معرفة محتوى الـ PN .

ج - فى الأنسجة (الطريقة الأنزيمية) :- تحتوى مستخلصات الأنسجة القاعدية التى يتم معاملتها بعد ذلك على $NADPH.H^+$ و $NADH.H^+$ وعلى كميات صغيرة من NAD^+ ، $NADP^+$. وباستخلاص النسيج فى وسط قاعدى يتم الحصول على الصور المختزلة فقط ، والاستخلاص بالوسط الحامضى يتم الحصول على الصور المؤكسدة فقط . وعليه يمكن قياس الـ NAD^+ الكلى (المؤكسد والمختزل) و $NADP^+$ الكلى والنسب بين $NADP^+ / NADH.H^+$. وفى هذه الطرق تستخدم كلا الطريقتين الفلورومترية والأنزيمية .

٧ - الطرق الحيوية :- تواجه الطرق الحيوية لتقدير النياسين أو النيكوتيناميد صعوبات عديدة ، وعليه فهذه الطرق غير مرضية للتقدير الكمى . وأهم هذه الصعوبات :-

- ١ - يتحول التربتوفان إلى نياسين فى الأنسجة .
- ٢ - يخلق النياسين بواسطة البكتريا المعوية بدرجات متباينة وذلك على حسب تركيب الغذاء المعطى للحيوان .

هذا ، وتستخدم الكتاكتيت والفئران الرضيعة والكلاب الصغيرة puppies لتقدير النياسين ، ولكن فقط تحت ظروف غذائية معينة . وبالطبع يستلزم لها وقت طويل ، كما أنها قليلة الحساسية (لا يعتمد عليها) . وعند تطبيقها فى تقدير محتوى النياسين فى المواد البيولوجية يستخدم عامل الاستجابة المناسب وهو قدرة النياسين على شفاء والوقاية من مرض أسوداد اللسان black tongue فى الكلاب البالغة . أما الفئران فهى تظهر استجابة كبيرة لتقدير النياسين أو التريتوفان عند تغذيتها على عليقة سكروز وكازين ٩٪ نقى . واستبدال السكروز بالدكستروز أو الجلوكوز فى العليقة يعطى نفس استجابة النمو عند اضافة النياسين فى العليقة . وعلى ذلك فلا بد أن تحتوى العليقة على أقل كمية ممكنة minimal من التريتوفان أو الكريبيدات التى تؤثر على تخليق النياسين . وبالطبع التجارب على الكلاب باهظة التكاليف، هذا بالإضافة إلى عدم تطورها أو تقدمها .

التقدير الحيوى باستخدام الكتاكتيت : - عند تغذية الكتاكتيت على علائق نقية خالية من النياسين . فإن نموها يبطئ وتظهر عليها أعراض نقص نموذجية وهى التهاب الحوصلة crop والفم والجزء العلوى من المريء esophagus أما طرف اللسان فيظهر أبيضاضاً . واعطاء النياسين يعالج أعراض النقص فى أيام قليلة ويزيد النمو . وتظهر أعراض النقص على الكتاكتيت عمر يوم بعد حوالى أسبوعين من تغذيتها على علائق بنقصها النياسين . وتربى الكتاكتيت فى أقفاص كل مجموعة ٦ كتاكيت ويعطى لها الطعام ad libitum ويقاس نشاط النياسين بنمو الكتاكتيت لمدة ٢ - ٤ اسابيع . فى البداية تغذى الكتاكتيت على جرعات متدرجة من النياسين على ٥ - ٦ مستويات لتقدير الجرعة اللازمة لزيادة الوزن بصورة خطية مع لوغاريتم الجرعة من النياسين . أخيراً تغذى مجموعتين على جرعة نياسين قياسى ومجموعتين على المادة المختبرة بحيث أحد المجموعتين تأخذ ضعف الكمية التى تأخذها المجموعة الأخرى

تقدير النياسين بالطريقة الرسمية (A.O.A.C. , 1990)

أ - الجوهر الكشفية :

١ - محاليل النياسين القياسية :

أ- محلول النياسين القياسى stock standard (١٠٠ ميكروجرام/ مل) : - يحضر بإذابة ٥٠ ملجم نياسين قياسى (سابق تجفيفه وتخزينه فى الظلام وفى مجفف

- تحت P_2O_5) فى كحول ٢٥ ٪ ويكمل إلى ٥٠ مل ، ويخزن على حوالى ١٠ ° م .
- ب - محلول working st. I (١٠ ميكروجرام / مل) : - يؤخذ جزء من محلول (أ) stock ويترك فترة حتى تصبح درجة حرارته مثل درجة حرارة الغرفة ثم يؤخذ منه ١٠ مل وتخفف إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر .
- ج - محلول working st. II (٤ ميكروجرام / مل) : - يخفف ٢ مل من المحلول (أ) stock (درجة حرارته مثل درجة حرارة الغرفة) إلى ٥٠ مل بالماء المقطر .
- ٢ - محلول أيدروكسيد أمونيوم مخفف : - يخفف ٥ مل من محلول NH_4OH إلى ٢٥٠ مل بالماء المقطر .
- ٣ - محلول حمض هيدروكلوريك مخفف : - يخفف حجم واحد من الحمض المركز مع ٥ حجم ماء .
- ٤ - محلول فوسفات منظم ($pH = ٨$) : - يذاب ٦٠ جم $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ و ١٠ جم KH_2PO_4 فى ماء دافئ وتكمل إلى ٢٠٠ مل بالماء المقطر .
- ٥ - محلول cyanogen bromide (CNBr) (١٠ ٪) : - يحضر فى خزانة الغازات ، يدفىء ٣٧٠ مل ماء مقطر إلى ٤٠ ° م فى دورق كبير ثم يضاف إليها ٤٠ جم CNBr ويرج المحلول حتى تمام الذوبان ويبرد ثم يخفف إلى ٤٠٠ مل .
- تحذير : - يراعى عدم ملامسة المحلول للجلد ، فهو سام جداً . ويخزن فى الثلاجة .
- ٦ - محلول حمض سلفانيليك Sulfanilic acid ، ١٠ ٪ : - يضاف محلول NH_4OH (مل بعد مل) إلى مخلوط مكون من ٢٠ جم حمض سلفانيليك و ١٧٠ مل ماء مقطر حتى ينوب الحمض ، ثم تضبط درجة الـ pH إلى ٤,٥ بواسطة محلول HCl (حمض ١ + ماء) باستعمال دليل bromocresol green (تختبر نقط على شريحة زجاجية) ، ثم يكمل إلى ٢٠٠ مل ، بالماء المقطر ولا بد أن يكون المحلول عديم اللون colorless .

- ٧ - محلول حمض سلفانيليك (٥٥ ٪) : - يضاف ٢٧ مل ماء و ٢٧ مل أيدروكسيد أمونيوم إلى ٥٥ جم حمض سلفانيليك ويرج حتى ينوب (يدفىء المحلول إذا دعت الضرورة) ، ثم تضبط درجة الـ pH إلى ٧ باستخدام بضع نقط من NH_4OH

أو HCl (قوته ٥ N) ثم يخفف إلى ١٠٠ مل ، ويحفظ فى الظلام .

ب - تحضير العينة والمحاليل القياسية :-

١ - **المستحضرات الصيدلانية :-** يؤخذ عدد مقداره ٥ أو أكثر من الأقراص أو الكبسولات فى حجم قليل من الماء وتشتت فيها مع استعمال الحرارة (وفى حالة الأقراص ، يمكن جرشها أو طحنها قبل هذه العملية) . وبعد ذلك تبرد وتنقل إلى دورق معيارى وتخفف إلى حجم معين بحيث يحتوى على ٥٠ - ٢٠٠ ميكروجرام نياسين لكل مل . يؤخذ ١٠ مل من هذا المحلول فى دورق ٢٥٠ مل ثم يضاف إليها ١٠ مل حمض HCl وتبخر على سخان كهربائى إلى حوالى ٢ مل ثم تبرد ويضاف حوالى ٢٥ - ٥٠ ماء وتضبط درجة الـ p^H إلى ٢,٥ - ٤,٥ بواسطة محلول NaOH أو ٤٠٪ KOH وتنقل المحتويات كميأ إلى دورق معيارى مناسب بحيث تعطى تركيز نياسين فى المحلول قدره ٤ ميكروجرام كل مل ، ويكمل إلى حجم معلوم ثم ترشح إذا دعت الضرورة ، ويستبعد أول ١٠ مل من الراشح ويستعمل باقى الراشح فى التقدير .

٢ - **المغذيات feeds والأغذية التى لا تحتوى على حبوب :-** توزن وزنة معلومة بالضبط من العينة (حوالى أوقية = ounce = حوالى ٣٠ جم) فى دورق مخروطى سعة لتر ، ثم يضاف إليها ٢٠٠ مل محلول حمض كبريتيك مخفف (قوته ١ N) وتخلط المحتويات وتسخن لمدة ٣٠ ق فى الأتوكلاف على ضغط قدره ١٥ رطل . تبرد المحتويات وتضبط درجة الـ p^H إلى ٤,٥ بواسطة محلول NaOH (١٠٪) باستعمال دليل bromocresol green كدليل خارجى (تختبر درجة الـ p^H خارج المخلوط بأخذ نقط منه مع الدليل على شريحة زجاجية) ، ثم تخفف إلى ٢٥٠ مل بالماء وترشح . يوزن ١٧ جم كبريتات أمونيوم فى دورق معيارى ٥٠ مل ويوضع فيها ٤٠ مل من محلول العينة وتخفف بالماء إلى العلامة وترج جيداً . يرشح المحلول ويؤخذ منه مل واحد لظهار اللون (التقدير) . وفى حالة العينات التى تحتوى على ١٦ ملجم نياسين / رطل ، يستعمل المحلول النهائى بحيث يحتوى المل الواحد منه على حوالى ٣,٢ ميكروجرام نياسين .

وبالمثل يؤخذ ٤٠ مل من المحلول القياسى working st. II ، وتضاف إلى دورق معيارى ٥٠ مل يحتوى على ١٧ جم كبريتات أمونيوم وتخفف إلى العلامة بالماء ، فهذا المحلول القياسى يحتوى على ٣,٢ ميكروجرام / مل .

٣ - منتجات الحبوب Cereal products :- إلى ٦ دوارق مخروطية سعة ٢٥٠

مل يضاف لكل منها ١,٥ جم أيديروكسيد كالسيوم Ca(OH)_2 ثم يضاف إليها صفر و ٥ و ١٠ و ١٥ و ٢٠ و ٢٥ مل من المحلول القياسي I woking st. ، على التوالي . يوزن بالضبط حوالى ٢,٥ جم من العينة بحيث تحتوى على حوالى ١٠٠ ميكروجرام نياسين وتوضع فى بورق آخر (اللورق رقم ٧) يحتوى أيضاً على ١,٥ جم أيديروكسيد كالسيوم . إلى كل اللوراق يضاف ماء إلى حوالى ٩٠ مل ثم ترج لتعام الخلط وتسخن فى الأتوكلاف لمدة ساعتين على ١٥ رطل . ترج المخاليط وهى ساخنة باستمرار حتى تبرد إلى درجة حراره حوالى ٤٠ ° م ، وتنقل إلى بوراق معيارية ١٠٠ مل ، ثم تخفف إلى ١٠٠ مل (إذا لزم الأمر ، يمكن تخزين العينة فى الثلجة أيام قليلة) .

ينقل حوالى ٥٠ مل من المحلول الرائق من كل بورق إلى أنابيب طرد مركزى وتوضع فى حمام ثلجى لمدة ١٥ ق أو فى الثلجة لمدة ساعتين أو أكثر . يتم الطرد المركزى لمدة ١٥ ق ثم يؤخذ ٢٠ مل من المحلول الرائق من كل أنبوبة وتنقل إلى أنابيب طرد مركزى أخرى تحتوى على ٨ جم من كبريتات الأمونيوم و ٢ مل محلول فوسفات منظم . ترج الانابيب لذوبان محتوياتها وتدفع إلى ٥٥ - ٦٠ ° م . تطرد الانابيب مركزياً ثم ترشح خلال ورق ترشيح واتمان رقم ١٢ أو أى نوع آخر من ورق الترشيح يماثله . يعاد الترشيح إذا دعى الأمر حتى نحصل على محلول رائق ، ثم يؤخذ للتقدير .

ح - التقدير :-

١ - بالنسبة للمستحضرات الصيدلية والمغذيات والأغذية التى لا تحتوى

على حبوب :-

إلى ٤ انابيب تضاف الكميات التالية (بالمل) مع مرعاه اضافة محلول حمض السلفانيليك ومحلول CNBr بواسطة سحاحات أو ماصات خاصة متصلة بشفط ميكانيكى (لأن هذه المحاليل سامة) ، وفى خزانه الغازات ، ويستعمل المحلول القياسى working st. II

Solution	Standard blank	Sample blank
1 - St. solution or sample	1.0 (st.)	1.0 (sample)
2- H ₂ O	5.0	5.0
3 -dil.NH ₄ OH	0.5	0.5
4 - 10% sulfanilic acid	2.0	2.0
5 - dil. HCl	0.5	0.5

Solution	St. solution	Sample solution
1 - St. or sample sol.	1.0 (st.)	1.0 (sample)
2- dil . NH ₄ OH	0.5	0.5
3 -CNBr	5.0	5.0
4 - 10% sulfanilic acid	2.0	2.0
5 - H ₂ O	0.5	0.5

تحضير البلاك : - عند تحضير البلاك ، يراعى تحضير بلاك لكل عينة على حدة (فى حالة وجود أكثر من عينة) ، ويوضع ١,٠ مل من المحلول القياسى فى أنبوبة مناسبة و ١,٠ مل من المحلول القياسى فى أنبوبة أخرى ثم يضاف ٥,٠ مل ماء إلى كل منها . ويراعى إضافة كل المحاليل بالتتابع السابق ذكره فى الجدول فى كل أنبوبة ، ويقاس اللون قبل إجراء نفس العملية على الأنبوبة الأخرى. يقلب الـ st.blank بحركة رحوية دائرية swirl حتى نحصل على حركة دائرية فى المحاليل داخل الأنابيب ، وبسرعة وفى الحال تضاف كبريتات الأمونيوم المخففة وتحرك الأنابيب رحوياً مرة أخرى، ثم يضاف حمض السلفانيليك وتحرك مرة ثالثة . أخيراً وبسرعة يضاف حمض HCl المخفف (٥ : ١ مل) ويخلط المحلول ثم يوضع فى جهاز قياس الألوان photoelectric colorimeter ، ويضبط الجهاز على امتصاص صفر (0A) على أى طول موجة متخصصة بين ٤٣٠ و ٤٥٠ nm خلال ٣٠ ثانية بعد اضافة محلول حمض السلفانيليك .

تحضير المحلول القياسى :-

يعامل المحلول القياسى بنفس الطريقة التى عومل بها الـ st. blank ويضاف محلول كبريتات الامونيوم المخففة إلى المحلول القياسى ، وتحرك الأنبوبة رحولياً بمجرد اضافتها ، ثم يضاف محلول CNBr وتحرك مرة ثانية ، وبعد ٣٠ ثانية من اضافة الـ CNBr يضاف محلول حمض السلفانيليك وتحرك رحولياً مرة ثالثة ، وفى الحال وبسرعة يضاف الماء وتخلط جيداً وتغلق الأنبوبة ، وبواسطة الجهاز الذى سبق ضبطه على 0A بواسطة st. blank كما سبق ذكره ، يقاس الامتصاص A للمحلول القياسى عندما يبلغ اللون أقصاه (يبلغ اللون أقصى درجة بعد ١,٥ ق بعد إضافة الحمض ، ثم يقل ببطء) .

تحضير محلول العينة :-

يحضر بنفس الطريقة كما فى تحضير المحلول القياسى ولكن يقاس امتصاص العينة ضد الـ sample blank . محتوى النياسين يتناسب مع A لو كان المحلول القياسى ومحلول العينة لهما تقريباً نفس التركيز .

٢ - بالنسبة لمنتجات الحبوب :-

إلى أنبوتى اختبار ، يضاف ٥ مل من المحلول القياسى وإلى أنبوتين أخرتين يضاف ٥ مل من محلول العينة ، وإلى أنبوبة خامسة اضافية يضاف ٥ مل ماء (تعتبر reagent blank) . إلى إحدى أنبوتى المحلول القياسى ومحلول العينة (يستعمل كبلانك) يضاف ١٠ مل ماء إلى كل منها . تترك الأنابيب تبرد فى حمام ثلجى مجروش جيداً لمدة ٣٠ ق (يفضل ذلك عن الثلجة) . وإلى الأنبوتتين الباقيتين وأنبوبة الـ reagent blank يضاف ١٠ مل محلول CNBr بارد ، ثم بعد ٣٠ ثانية يضاف ١,٠ مل محلول حمض السلفانيليك ٥٥٪ ، ثم تخلط بسرعة بعد اضافة كل جوهر (يتم تحريك الأنابيب رحولياً بعد بكل اضافة) ، ثم تغلق الأنابيب التى تحتوى على جوهر CNBr وتوضع فى الحمام الثلجى . يضاف إلى كل من بلانك العينة والبلانك القياسى st. blank مل واحد من محلول حمض السلفانيليك ٥٥٪ .

يضبط جهاز قياسى الألوان على الصفر 0A وعلى طول موجة ٤٧٠ nm بواسطة بلانك القياسى ، ويقاس امتصاص الأنابيب مرة الأخرى بعد ١٢ - ١٥ ق من اضافة حمض السلفانيليك . هذا ، ولا بد أن تكون الأنابيب متماثلة فى البرودة ولا بد أن تكون كل أنبوبة جافة

وتم مسحها جيداً قبل أن توضع في الجهاز مباشرة ، ولو كانت الأنابيب مضطربة fog (عليها ضباب ، بخار ماء متكثف) ، فأنها تغمر لبرهة بسيطة في حمام مائي ساخن ثم تجفف وتمسح جيداً قبل قراءتها . تصحح قيم A الخاصة بقراءات المحاليل القياسية مع reagent blank ثم يرسم المنحنى القياسي للعلاقة بين قيم A وكمية النياسين (ميكروجرام / مل) في صورة خط مستقيم ومنه يحسب تركيز النياسين في العينة (C) بعد تصحيح قيمة A لمحلل العينة من reagent blank ومن sample blank . وتحسب كمية النياسين بالمجم لكل ١٠٠ جم عينة من المعادلة التالية :-

$$\text{mg Niacin / 100 g sample} = \frac{(C)}{10 \times \text{g sample}}$$

تقدير النيكوتيناميد في المستحضرات عديدة الفيتامينات

(A.O.A.C, 1990) (Multivitamins)

وفي هذه الطريقة ، يتم استخلاص النيكوتيناميد بواسطة محلول KH_2PO_4 على درجة pH حوالي ٤,٥ ثم يسمح بتفاعله مع جوهر CNBr و barbituric acid فيتكون مركب ملون (أقصى امتصاص له على طول موجة ٥٥٠ nm) يقاس بواسطة جهاز قياس الألوان . ولايتداخل النياسين إلا لو كان تركيزه ٢ أمثال تركيز الأמיד .

الجوهر الكشفية :-

١ - محلول CNBr (١٠ ٪) :- ويحضر كما سبق تحضيره في الطريقة السابقة ، ويترك على درجة حرارة الغرفة لفترة قبل استعماله حتى يأخذ نفس درجة الحرارة.

٢ - محاليل الفوسفات المنظمة (KH_2PO_4) :-

محلول أ (٢ ٪) :- ويحضر بإذابة ٢,٠ جم KH_2PO_4 في لتر ماء مقطر .
محلول ب (٠,٢ ٪) :- ويحضر بتخفيف حجم واحد من المحلول (أ) مع ٩ حجوم ماء مقطر .

٣ - محلول barbituric acid المنظم :- ويحضر الحجم اللازم منه للتحليل كما يلي :
يضاف ٢ جم barbituric acid (AR) إلى ١٠٠ مل محلول فوسفات منظم (٣ ٪) ، ثم يقلب لمدة ساعة (ميكانيكياً) ، ويرشح قبل الاستعمال .

٤ - محاليل النيكوتيناميد القياسية :-

أ - المحلول الـ stock (٢٥٠ ميكروجرام / مل) :- يذاب ٥٠ ملجم من USP Nicotinamide ref. st. في كحول ٦٠٪ ثم تخفف إلى ٢٠٠ مل . يخزن على حوالى ١٠ ° م .

ب - المحلول الـ woking (٥ ميكروجرام / مل) :- يترك جزء من المحلول (أ) ليدفء ويأخذ درجة حرارة الغرفة ثم يخفف ٢ مل منه إلى ١٠ مل بواسطة المحلول المنظم (٠,٣ ٪) .

تحضير العينات :-

يؤخذ ٥ أقراص أو كبسولات أو حجم مناسب من المستحضرات السائلة لكل تقدير . تطحن جيداً حتى تصبح مسحوقاً ناعماً ثم يؤخذ منها وزن معلوم بالضبط ويوضع فى ورق مخروطى (بالنسبة للكبسولات الجيلاتينية ، يضاف حوالى ٢ مل ethylene chloride للمساعدة على التفتيت) . يضاف حجم من محلول الفوسفات المنظم ٠,٣ ٪ (بالمل) يعادل على الأقل مرتين لكل ملجرام نيكوتيناميد متوقع فى الوزنة المأخوذة . وفى حالة عدم ذوبان العينة بسهولة ، يرج المحلول لكى تتفتت وتسخن لمدة ١٥ ق فى حمام مائى يغلى أو فى أتوكلاف على ضغط ١٥ رطل ، ثم تخفف إلى حوالى ٥ ميكروجرام / مل بواسطة محلول الفوسفات المنظم (٠,٣) ، ويرشح إذا دعى الأمر .

التقدير :-

يحضر بلانك لكل عينة على حده باستبدال الـ CNBr بالماء .

١ - يوضع ١,٠ مل من المحلول القياسى الـ working ، أو من محلول العينة فى أنبوبة اختبار أولخية قياس ، ثم ٠,٥ مل محلول CNBr وتخلط جيداً وتغطى وتترك لمدة ٢٥ - ٣٠ ق (وحتى نتجنب الانتظار أكثر من ٣٠ ق فى حالة تحليل عدة عينات ، يتم تنظيم اضافة الـ CNBr بحيث يضاف بفرق زمنى مقداره ١ - ٢ ق بين كل تقدير) .

٢ - يضاف ١٠ مل محلول barbituric acid ثم تحرك الأنبوبة رحولياً (فى حالة صعوبة اضافة هذا المحلول بعد ٣٠ ق ، تنقل الأنابيب إلى حمام ثلج مجروش

لتثبيت تفاعل الـ (CNBr).

٣ - يضبط جهاز الأسبكتروفومتر على صفر أمتصاص 0A وعلى طول موجة مقداره ٥٥٠ nm ضد بلانك مناسب والذي يستبدل فيه الـ CNBr بالماء ، ويقاس الأمتصاص A الخاص بنواتج التفاعل عند أقصى ظهور للون (حوالى ٢ - ٤ ق بعد إضافة محلول الـ barbituric acid ، ثم يبقى اللون ثابتاً لمدة دقيقة وبعد ذلك يقل ببطء) .

الحساب :-

يحسب تركيز النيكوتيناميد بالمجم فى الوزن الأصلية المأخوذة من العينة بواسطة هذه المعادلة :-

$$\text{mg Nicotinamide in original wt. sample taken} = \frac{A \times 5 \times \text{dilution factor}}{\bar{A} \times 1000}$$

حيث أن :-

A = هى أمتصاص العينة .

$\bar{A}$ = هى أمتصاص المحلول القياسى .

5 = هى عدد ميكروجرامات النيكوتيناميد لكل مل واحد من المحلول القياسى .

هذا ، ويمكن نسبة تركيز النيكوتيناميد إلى عدد الأقراص أو الكبسولات أو لحجم معين من المستحضر السائل .

تقدير 1-methylnicotinamide فى البول

(Huff and Perlzweig , 1947)

يتم أمتصاص الـ 1-methylnicotinamide على عمود يحتوى على زيوليت مخلوق Synthetic zeolite على درجة $\text{pH} 4.5$ ، ثم يحل بواسطة كلوريد بوتاسيوم ، ويتحول هذا المركب إلى مركب آخر له خاصية الفلورة عند معاملته بالقلوى . يتم أستخلاص المركب المفلور بواسطة بيوتانول ثم تقاس الفلورة .

الجواهر الكشفية :-

الجواهر من رقم ١ إلى ٥ فى هذا التقدير هى نفس الجواهر الخاصة بتقدير الفيتامين فى الطريقة السابقة والتي لها التتابع التالى :- ١ ، ٢ ، ٣ ، ٥ ، ٦ .

٦ - محلول stock standard 1-methylnicotinamide chloride (١٠٠ ملجم / لتر فى ماء) .

٧ - محلول working standard (٥ ملجم / لتر) :- يخفف ٥ مل من المحلول رقم (٦) إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر ويضاف إليها ٤٠٠ ملجم حمض أكساليك .

التكنيك :-

١ - تجمع عينة البول كما ذكر فى تقدير الثيامين ، وتنفذ نفس الخطوات حتى أول تخلص من المحلول الرائق .

٢ - تغسل مرة إضافية فقط باستعمال ٨ مل حمض خليك ثم يزال المحلول الرائق ويهمل .

٣ - يضاف ٥٠٠ مل محلول كلوريد بوتاسيوم ثم يرج جيداً ، وبعد ذلك يضاف إليها ٢٠٠ مل بيوتانول و ٢٥٠ مل محلول هيدروكسيد صوديوم ، وتغلق الأنبوبة جيداً وترج وتقلب الأنبوبة حوالى ٢٥ مرة لمدة أكثر من دقيقة .

٤ - يجرى طرد مركزي على حوالى ٢٠٠٠ rpm لمدة ١٠ ق ، ثم ينقل ١٠٠ مل من الطبقة العليا (طبقة البيوتانول) إلى أنبوبة قياس الفلورة لاجراء القياس .

٥ - تسجل القراءات الفلورومترية على طول موجة أنبعاث مقدارها ٤٦٠ nm ، وعلى موجة اثاره يبلغ ٣٦٠ nm (ليس قبل ٥ ق من بعد اضافة القلوى) .

٦ - يتم ضبط حساسية الجهاز على الصفر بواسطة مستخلص blank extract .

الحساب :-

يحسب التركيز من المعادلة التالية :-

$$\text{Urinary 1-methylnicotinamide (mg / l)} = \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Reading of standard}} \times \frac{10}{V}$$

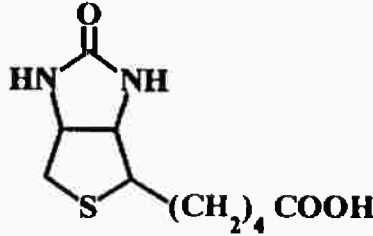
حيث أن : -

V هي حجم البول بالمل المأخوذ للتحليل .

التفسير : -

متوسط المفرز يومياً من 1-methylnicotinamide (عند تناول حمض النيكوتينيك بحد كافي) هو حوالي ٧ ملجم ، و مدى المفرز منه هو ٢ - ١٧ ملجم . (الحدود الطبيعية) .

Biotin – البيوتين



تفاعلاته :

البيوتين ثابت للحرارة والضوء فقط ، ولكنه غير ثابت في الوسط القلوي والحامضي والعوامل المؤكسدة . وبالاختزال يكون desthiobiotin . والبيوتين حامضي التأثير عند نوبانه في الماء .

الذوبان :

ينوب في الماء بنسبة ٠.٠٣ جم / ١٠٠ مل ، وينوب أيضاً في الكحول ، ولكنه غير ذائب في الأسيتون والمذيبات الغير قطبية (بنزين ، كلوروفورم ، ايثير) .

صوره وخواصه :

صورته النقية عبارة عن مسحوق أبيض ، أما الصورة البللورية الألفا (α) فهي ذات شكل معينى orthorhombic والصورة البيتا (β) فهي عديمة اللون . والوزن الجزيئي للبيوتين هو ٢٤٤,٣ ، ودرجة الانصهار ٢٣٠,٣٢ ° م . ويوجد في صورة ملح صوديوم ، و أقصى امتصاص له على طول موجة ٢٣٤ nm . وطبيعته الكيميائية حمض أحادي القاعدية ، ثنائي الأمين diamino , monocarboxylic acid . وعلى ذلك فله نقطة تعادل كهربي $P_i = ٣,٥$.

انتشاره ومصادره :

- ١ - فى النباتات :- تحتوى كل الفواكه والخضروات على كميات قليلة منه عدا البقول والقرنبيط ، أما الحبوب والنقل فهى تحتوى على كميات متوسطة منه .
- ٢ - فى الحيوانات :- تحتوى الحيوانات على كميات بسيطة منه عدا الأعضاء خاصة الكبد ، أما الكلى فهى تحتوى على كميات عالية منه .
- ٣ - الكائنات الحية الدقيقة :- أحسن مصدر للبيوتين هو الكائنات الحية الدقيقة خصوصاً الخميرة .

المصادر الغذائية :

- ١ - المصادر الغنية :- (١٠٠ - ٤٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) وتشمل الغذاء الملكى للنحل royal jelly ، والخميرة وكبد الضأن والخنزير .
- ٢ - المصادر المتوسطة :- (١٠ - ١٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) وتشمل القمح والأرز والذرة والشوفان والشعير والبيض وكبد البقر والدجاج وعيش الغراب (المشروم) والحمض وفول الصويا والقرنبيط والشيكلاته و الماكربل والسالمون والسردين والبكان والفول السودانى .
- ٣ - المصادر المنخفضة :- (صفر - ١٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) وتشمل التفاح والموز والفرولة والكانتالوب والجريب فروت والعنب والبرتقال والخوخ والأفوكادو والبطيخ .

الدور الطبى والعلاجى :

- ١ - الوحدات :- بالوزن (ميكروجرام μg) .
- ٢ - المستويات الطبيعية فى الدم :- فى الإنسان يبلغ مستواه ٠,٩٥ - ١,٦ ميكروجرام لكل ١٠٠ مل سيرم ، و ٠,٧٥ - ١,٧٣ ميكروجرام لكل ١٠٠ مل دم كلى .
- ٣ - المقررات الموصى بها :- للبالغين يوصى بـ ١٥٠ - ٣٠٠ ميكروجرام / يوم ، وربما تحتاج هذه الكمية من البكتريا المعوية والغذاء اليومى الطبيعى .
- ٤ - أعطاء البيوتين :- الطريقة الأساسية لتناوله هى عن طريق الفم ، ويمكن

اعطاه بالحقن فى العضل .

٥ - أعراض النقص : -

أ - أعراض عامة فى الإنسان : - تقشر desquamation الجلد ، و ألم فى العضلات ، وفرط الحساسية hyperesthesia و التهاب جلدى مصحوب بزيادة إفراز الغدد الدهنية ، ونعاس somnolence وكسل وتعب من أقل مجهود .

ب - فى الفئران :- سقوط الشعر alopecia ، وقوف الحيوان مثل الكانجرو ... الخ .

ج - فى الدجاج والرومى : - التهاب جلدى ، و perosis .

د - فى الكلاب : - نقص أيون البوتاسيوم ، وعجز أوشلل متقدم .

هـ - فى الخنازير : - سقوط الشعر و تشنج الأرجل الخلفية .

و - فى القروء : - حل الشعر thinning ، وضياع لونه .

٦ - أمراض نقصه فى الإنسان : - التهاب جلدى وزياده افراز الغدد الدهنية مع التهاب جلدى فى الأطفال . ظهور خرايج ودمامل furunculosis .

٧ - مصادره للأجناس التى تحتاج إليه : - كل الأجناس تحتاجه .

أ - المصادر الخارجية : - معظم الفقاريات والافقاريات تحتاجه من مصادر خارجية . أيضاً بعض البكتريا والفطريات لا يمكنها تخليقه وتحتاجه من المصادر الخارجية . هذا ، و البكتريا المعوية تمد الإنسان بما يحتاجه من البيوتين .

ب - المصادر الداخلية : - النباتات الراقية ومعظم البكتريا والفطريات تخلفه ، ولذلك فهى لا تحتاجه من الخارج .

٨ - تأثير الجرعات العالية منه : - لم تلاحظ إى أعراض سمية عند إعطائه بكمية مقدارها جم واحد لكل كجم من وزن الجسم ، وهو غير سام للإنسان بكميات كبيرة .

تحليل البيوتين

أ - الفصل :

استخدمت مصادر طبيعية مختلفة لفصل البيوتين في صورة أستر الميثايل ، ومن هذه المصادر صفار البيض وكبد البقر واللين ، ويفصل من صفار البيض عن طريق الاستخلاص بالأسيتون ثم ترسيبه بالايثانول . ويتم التخلص من المواد المتداخلة (الشوائب) بالترسيب على مراحل باستعمال خلاات الرصاص أو كلوريد الزئبقيك أو حمض الفوسفوتنجستيك ثم ينقى المستحضر بادمصاصه على فحم نشط ، ثم يحل منه ويؤستر باستعمال كلوريد هيدروجين ميثانولي فيترسب و يقطر تحت تفريغ . وتعاد للورته باستعمال مخلوط من الكلوروفورم والايثير البترولي . والناتج له درجة انصهار $146 - 147^{\circ}$ م. وعند فصله من الكبد ، يتم تعقيمها مع الحمض في الاتوكلاف ، ثم تهضم بالبباين papain ، أو تحلل مائياً تحت ضغط عالى قبل البدء في فصل البيوتين ، ثم يفصل كما سبق (الترسيب بحمض الفوسفوتنجستيك ثم أستترته) . ويمكن أيضاً فصله من اللبن المركز بنفس هذه الطريقة . وبعد الفصل يتم التأكد من نقاوته بالتحليل الكروماتوجرافى على أكسيد الومنيوم نشط .

ب - طرق التحليل :

١ - الطرق الميكروبية : -- كثير من الكائنات الحية الدقيقة تحتاج إلى البيوتين كعامل نمو ، وعلى ذلك فإن عديد من هذه الكائنات تستخدم في تقدير البيوتين ، ومنها *L. casei* على سبيل المثال . ومن هذه الميكروبات مايستجيب لمشابهات البيوتين كمنشطات مشجعة للنمو والبعض لا يستجيب لها . والكائنات الحية الدقيقة لا تستجيب للبيوتين المرتبط بالبروتين ، لذلك يجب تحريره منها بمعاملة المادة تحت الدراسة بحمض كبريتيك (تحليل مائى) أو الهضم بالبباين . وتتداخل الأحماض الدهنية الغير مشبعة في التقدير لذلك يجب التخلص منها إما بالترشيح أو عن طريق الاستخلاص بالايثير . ويقدر محتوى البيوتين للعينات المختبرة بقياس نمو الكائن الحى الدقيق (عامل الاستجابة) بعد تحضيره . ويقدر النمو بقياس العكارة ، وتقارن بنموات قياسية مع تركيزات معلومة من البيوتين .

٢ - طريقة التآلف مع الأفيدين : - استخدم التآلف العالى للأفيدين avidin (مشع) لمجموعة الـ ureido في البيوتين في التقدير . وهذا التقدير حساس جداً حتى مع التركيزات الصغيرة (٤ - ٤١ بيكومول) ، وأعطت نتائج جيدة ودقيقة عند مقارنتها بالطرق

الميكروبية . وفى هذه الطريقة يتم تحليل البيوتين المرتبط بالحمض أو هضمه بالببائين .
ويستخدم قياس الإشعاع لتقدير محتوى البيوتين لبروتينات البيوتين أو لتقدير مشابهاً
البيوتين . وأمكن حديثاً تعديل هذه الطريقة (قياس ارتباط البيوتين بالأفيدين) وفيها يتم
ارتباط البيوتين باليود ١٢٥ (مشع) مع الأفيدين . وهذه الطريقة أكثر حساسية وأستخدمت
بنجاح فى تقدير البيوتين فى بلازما الإنسان وغيرها من العينات .

٣- الطرق الأنزيمية :- نشاط الأنزيمات التى تعتمد على البيوتين يقل فى
الحيوانات التى تعاني من نقص البيوتين ، واستخدام هذا الأساس فى تقدير البيوتين (قياس
النشاط الأنزيمى) . ومن هذه الأنزيمات acetyl CoA carboxylase (يدخل فى تركيبه
البيوتين) فنشاطه يرتبط بحالة البيوتين فى الجسم . ويستخدم اختبار تنشيط أنزيم acetyl
CoA carboxylase فى تقدير حالة البيوتين فى الجسم وذلك عن طريق حث نشاط هذا
الأنزيم فى كبد الكتاكيت بالبيوتين (*in vitro*) . أما تقدير نشاطه فى الدم ، فلا يعطى نتائج
ثابتة يعتمد عليها . أنزيم آخر يحتوى على البيوتين وهو pyruvate carboxylase (PC).
ويوجد أيضاً فى دم الدجاج المنزلى ، وهو دليل أكثر حساسية لحالة البيوتين فى الجسم عن
أنزيم acetyl CoA carboxylase . ويستخدم قياس نشاط أنزيم PC الدم مباشرة لتقدير
حالة البيوتين فى جسم الدجاج والرومى ، أو يقدر نشاطه فى الدم أيضاً ولكن قبل وبعد
إضافة البيوتين (*in vitro*) إلى كرات الدم الحمراء أو إلى الكبد .

٤ - الطرق اللونية :- وتوجد طرق لونية عديدة منها :-

- ١ - طرق تعتمد على تفاعل البيوتين مع p-(dimethylamine) cinnamaldehyde .
- ٢ - طرق تعتمد على قياس امتصاص اليود المتكون أثناء أكسدة البيوتين إلى الصورة
sulfone بيوريد البوتاسيوم .
- ٣ - طرق تعتمد على إزاحة صبغة 2- carboxylic - 4 - hydroxyazobenzene
acid من الأفيدين بالبيوتين .
- ٥ - طرق أخرى :- استخدمت الطرق الكروماتوجرافية والبلازموغرافية
polarography فى تقديره أيضاً .
- ٦ - الطرق الحيوية :- تستخدم الفئران والكتاكيت فى التقدير الحيوى للبيوتين

بتغذيتها على عليقة خاصة . وفيها يتم تغذية فئران رضية في نفس العمر والوزن (٣٥ - ٤٠ جم) على عليقة مصنعة تجريبية تحتوى على بياض بيض نىء raw (طازج أو مجفف) أو على أفيدين . واحتواء العليقة على الأفيدين يمنع استفادة الحيوانات من البيوتين بتكوين معقد غير قابل للامتصاص unabsorbable مع الفيتامين ، وبعد فترة استنزاف الفيتامين وهى حوالى ٦ - ٧ أسابيع تلاحظ على الفئران أعراض نقص البيوتين وتوقف النمو . وتعطى المجموعة القياسية كميات متدرجة من البيوتين النقى ، وتعطى المجموعة الأخرى كميات متدرجة أيضاً من بيوتين العينة المختبرة . وحيث أن الطعام يحتوى على أفيدين ، فإن البيوتين المعطى (القياسى أو العينة) يعطى عن طريق آخر غير معوى (غير الفم) حتى تتيسر الاستفادة منه . ويمكن معرفة محتوى البيوتين فى العينة من منحنيات استجابة النمو ، حيث يتناسب وزن الجسم المكتسب مع لوغاريتم جرعة البيوتين .

ويستخدم نفس التكنيك فى الكتاكت ، ولكنها تحتاج إلى جرعات بيوتين أكبر من الفئران . ويمكن أحداث حالة النقص فى الكتاكت بتغذيتها على علائق منخفضة فى البيوتين بدون إضافة أفيدين إليها . وفى هذه الحالة (عدم إعطاء أفيدين) يمكن إعطاء جرعات البيوتين القياسية والخاصة بالعينة عن طريق الفم مع العليقة .

تقدير البيوتين بالطريقة الفلورومترية (Lin and Kirsch , 1977)

كما هو معروف إن هناك تآلف قوى بين البيوتين والأفيدين ، وقد أستخدمت هذه الخاصية لتقدير البيوتين أو الأفيدين أو كلاهما معاً . فالأفيدين له خاصية الفلورة التى ترجع إلى وجود التريتوفان ولكن عند ارتباطه بالبيوتين تقل هذه الفلورة بنسبة ارتباطهما معاً (علاقة عكسية بين فلورة الأفيدين وكمية البيوتين المرتبطة معه) . ويشترط أن تكون هذه المحاليل خالية من المواد المفلورة خلاف الأفيدين ، لذلك فهذه الطريقة مناسبة للمواد النقية نسبياً . ويقدر الأفيدين كميأ بمعايرة محلوله بواسطة محلول بيوتين قياسى مع قياس الفلورة (طول موجة الاثارة ٢٩٠ nm وطول موجة الانبعاث ٣٥٠ nm) . أثناء المعايرة يلاحظ انخفاض الفلورة باستمرار المعايرة ، وتتوقف المعايرة عندما لا يكون هناك أى انخفاض اضافى فى الفلورة نتيجة إضافة أى كمية زيادة من البيوتين . أما فى حالة تقدير البيوتين ، يتم معايرة محلول البيوتين المجهولة التركيز بمحلول قياسى من الأفيدين . والفلورة تحت هذه الظروف تكون ثابتة طالما أنه يوجد بيوتين فى وعاء المعايرة ولكن عندما يقضى عليه نهائياً

يلاحظ زيادة الفلورة مع كل إضافة جديدة من محلول الأفيدين (زيادة طردية) . وتتوقف المعايرة عند أول نقطة تزيد عندها الفلورة . ومن مميزات هذه الطريقة هو إمكان تقدير ٢٠ نانوجرام ng من البيوتين .

الجواهر الكشفية :

- ١ - محلول أفيدين قياسي (٢٥٠ ميكروجرام / مل) .
 - ٢ - محلول بيوتين قياسي (٢٠ ميكروجرام / مل) .
- وكلا الجوهرين يحضرا في محلول فوسفات صوديوم (١٥ ، ٠ ، N ، $p^H = ٧$) ، وقوة أيونية ionic strength = ٠,٢٥ .

التكنيك :

أ - تعيير محلول الأفيدين :

- ١ - في أنبوبة قياس الفلورة تسع ٤ مل ، يوضع ٢ مل من محلول البيوتين القياسي ، وتوضع في الجهاز استعداداً لمعايرتها بمحلول الأفيدين .
- ٢ - يضاف إليها محلول الأفيدين القياسي (بواسطة سحاحة دقيقة syring micro buret) على دفعات ، في كل دفعة يضاف ٢,٠ µl وتسجل الفلورة بعد كل إضافة (excitation monochromator على طول موجة ٢٩٠ nm باستعمال band width مقداره ٤ nm ، وتؤخذ قراءات الفلورة على طول موجة ٣٥٠ nm ، باستعمال band width مقداره ١٦ nm) .
- ٣ - تستمر عملية المعايرة حتى تعطى قراءة ثابتة (دلالة على انتهاء مكافئات البيوتين) ، ثم يعرف حجم البيوتين المستخدم للمعايرة .
- ٤ - من هذه النتائج يمكن تعيير الأفيدين (حجم أو وزن الأفيدين اللازم للارتباط مع كمية معينة من البيوتين) .

ب - معايرة بيوتين العينة :

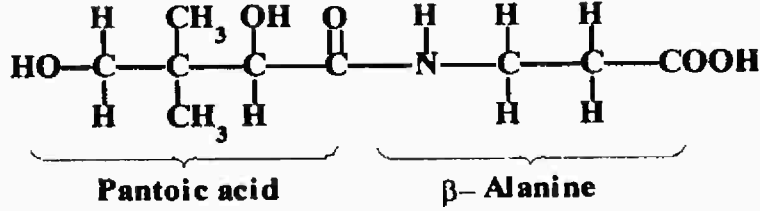
- ١ - كما سبق تعيير الأفيدين بالبيوتين ، تتم معايرة ٢,٠ مل من محلول البيوتين المجهول التركيز (العينة) بواسطة محلول الأفيدين القياسي على دفعات ، مقدار

كل منها ٢,٠ | مل وتسجل القراءة عند كل إضافة .

٢ - تستمر عملية المعايرة حتى النقطة التي تبدأ عندها الفلورة في الزيادة الحادة (تدل على نقطة المكافىء) .

٣ - تحسب كمية البيوتين من النشاط النوعى specific activity لمحلل الأفيدين الذى سبق تعيينه (تعبيره) فى الخطوه أ .

حمض البانتوثينيك - Pantothenic acid



تفاعلاته :

هذه الفيتامين ثابت فقط ضد العوامل المؤكسدة والعوامل المختزلة ، ولكنه غير ثابت للحرارة وللأحماض والقواعد (الساخنة) . عند نوبانه في الماء يكون تأثيره حمضى ، ويوجد أساساً في صورة أملاح ، خصوصاً ملح الكالسيوم ، وأحياناً ملح الصوديوم . ويعتبر هذا الفيتامين حمضاً عضوياً عديد الهيدكسيل ، وحمضاً أمينياً مرتبطاً أيضاً .

الذوبان :

ينوب في الماء بنسبة عالية (٧ جم / ١٠٠ مل ماء) ، وينوب أيضاً في الأسيتون والكحول ، ولكنه غير ذائب في المذيبات الغير قطبية (بنزين ، كلوروفورم ، إيثير) .

صوره وخواصه :

صورته النقية زيتية لزجة القوام ، ذات لون أصفر ، الوزن الجزيئى له ٢١٩,٢٤ ، وأقصى امتصاص له على طول موجة ٢٥٨ nm .

انتشاره ومصادره :

- ١ - في النباتات :- تركيزه في كل الفواكه منخفضاً ، وفي الخضروات منخفضاً أيضاً أو متوسط التركيز ، أما في النقل فتركيزه يختلف من نوع لآخر .
- ٢ - في الحيوانات :- ينتشر في كل الحيوانات بصورة متوسطة أو مرتفعة ، وأهم

الأعضاء التي تحتوي على تركيز عالى منه هى : المخ والقلب والكلى والكبد .

٣ - فى الكائنات الحية الدقيقة : - ينتشر بكثرة فى الخميرة (عالى) ، وفى بكتريا الكرش فى الغنم والبقر ، وفى الفطريات أيضاً .

المصادر الغذائية :

١ - المصادر الغنية : - (من ٢ إلى ١٠ ملجم / ١٠٠ جم) وتضم البقر (مخ وقلب وكبد وكلى) ، وفى الخنزير (كبد وكلى) ، وفى كبد الضأن والدجاج وكلى الحملان وفى البيض ، وفى الرنجة ومبيض الحوت cod ovary ، وفى جنين القمح والفول السودانى والحمض الجاف والخميرة والغذاء الملكى وأخيراً فى النخالة .

٢ - المصادر المتوسطة : - (من ٠,٥ إلى ٢ ملجم / ١٠٠ جم) كما فى السالمون والماكريل وفول الصويا والشوفان والحمص والقرنبيط والأفوكادو والجزر والأرز والسبانخ وفى لحم كل من البقر والخنزير والدجاج والحملان ، وفى المشروم (عش الغراب) والقمح والجبن .

٣ - المصادر المنخفضة : - (من ٠,١ إلى ٠,٥ ملجم / ١٠٠ جم) كما فى الموز والبرتقال والخوخ والمشمش والتفاح والعنب والجريب فروت والليمون والطماطم والبلح ، وفى البصل والفاصوليا والكرنب والخس والقلفل والبطاطس والبطاطا ، وفى اللبن وعسل النحل والمولاس ، وفى لحم العجول وبعض أنواع السمك .

الدور الطبى والعلاجى :

١ - وحدات حمض البانتوثينيك : - بالوزن (ملجم) .

٢ - المستويات الطبيعية فى الدم : - تتراوح بين ١٩ و ٢٢ ميكروجرام لكل ١٠٠ مل .

٣ - المقررات الموصى بها منه : - يوصى للبالغين بحوالى ١٠ - ١٥ ملجم / يوم ، وبالنسبة للحالات الخاصة (حمل ورضاعة) فيوصى بزيادة هذه الكمية على حسب الحالة .

٤ - إعطاء حمض البانتوثينيك : - الطريق الأمثل لإعطائه هو تناوله عن طريق

الفم ، كما يمكن اعطائه عن طريق الحقن فى الوريد أو العضل .

٥ - أعراض النقص :-

أ - الأعراض العامة :- وتتضمن اضطراب الحركات العصبية واضطراب الأوعية القلبية cardiovasculars ، واضطرابات هضمية ، وقابلية كبيرة للعدوى بالأمراض ، وضعف وهبوط فى القوى الحيوية والنشاط الوظيفى .

ب - فى الفئران :- انخفاض انتاج الأجسام المضادة ، واضطرابات فى وظائف الكبد وفى الجلد (يصبح قرنى) ، وأخيراً التعب عند إداء أقل مجهود (كسل عام) .

ج - فى الدجاج :- اضطرابات فى الجلد (قرنى) والكبد ، وعجز فى انتاج البيض والتكاثر .

٦ - أمراض النقص :

أ - فى الفئران :- عدم تلون الشعر achromatrichia ، تلون شعر الشوارب بلون أحمر دموى bloody whiskers ، وسقوط الشعر وصلع .

ب - فى الكتاكيت :- التهاب جلدى .

٧ - مصادره للأجناس التى تحتاج إليه :- كل الكائنات الحية تحتاج الى هذه الفيتامين .

أ - المصادر الداخلية :- فقط النباتات الخضراء والفطريات هى التى تخلفه بداخلها

ب - المصادر الخارجية :- كل الكائنات الحية الأخرى خلاف السابق ذكرها تحتاج إليه من مصادر خارجية . والإنسان يحتاج إليه من مصادر خارجية لأن البكتريا المعوية لا تخلفه .

٨ - تأثير الجرعات العالية منه :- غير سام بالنسبة للإنسان عند تناوله بكميات كبيرة ، أما فى الفئران عند اعطائه بكمية كبيرة (١٠ جم / كجم) أدى إلى عجز فى القدرة على التنفس respiratory failure .

تحليل حمض البانتوثينيك

أ - الفصل :

أهم المصادر التي يفضل أن يفصل منها (الغنية به) هي الأرز والكبد والخميرة والنخالة bran ، وطريقة استخلاصه تتضمن مايلي : -

- ١- أستخلاص الكبد بحول إيثانول ٩٠٪ .
- ٢ - التخلص من القواعد العضوية بإدمصاصها على Fuller's earth .
- ٣ - ادمصاص الفيتامين على فحم نشط على درجة $\text{pH} 6, 3$ ، ثم إحلالة بالأمونيا .
- ٤- تستخلص صورة الأملاح شبه القلوية brucine بالكوروفورم .
- ٥ - تحول صورة هذه الأملاح إلى ملح كالسيوم .
- ٦ - تنقى هذه الأملاح بالترسيب التجزيئي fractional precipitation من المذيبات العضوية .

ب - تقدير حمض البانتوثينيك :-

يقدر محتوى المواد الغذائية المختلفة من حمض البانتوثينيك بعدة طرق مختلفة وهي :
القياس الميكروبيولوجي ، و التقدير الحيوي على الحيوانات ، و (radioimmunoassay (RIA والطرق الكيميائية .

١ - الطرق الميكروبيولوجية : - أول تقدير ميكروبيولوجي لحمض البانتوثينيك كان على الخميرة *S. cerevisiae* . وهذا التقدير كان يفتقر إلى التخصص لأن هذا الجنس من الخميرة ينتج هذا الفيتامين بالفعل ، ولكن استخدمت بعد ذلك سلالات مختلفة من البكتريا لا يمكنها تخليقه ، منها *L. bulgaricus* , *L. casei* .

٢- الطرق الحيوية : - استخدمت الكتاكت منذ القدم في تقدير محتوى الأغذية من حمض البانتوثينيك (معدل النمو) ، ولكن مازالت تستخدم حتى الآن طرق التقدير الشفائية أو العلاجية curative assay في الكتاكت لأنها متاحة أكثر ومنخفضة التكاليف .

٣- القياس الأشعاعي المناعي (RIA) : - وهي حساسة جداً لتقدير تركيز المواد المختلفة الموجودة بكميات صغيرة جداً في السوائل البيولوجية ، فهي تستخدم في

التقدير الكمي للهرمونات والأدوية والفيتامينات . وتقدير محتوى الدم الكلى من حمض البانتوثينيك ، يتم معاملته بأنزيم Alkaline phosphatase (AP) ومستخلص الكبد ، ثم تحليله بتكنيك الـ RIA (فى صورته kits) ، ومن هذا التحليل يمكن ايجاد تركيز الفيتامين . وقد قورنت هذه الطريقة بالطرق الميكروبيولوجية وتفوقت عليها .

٤ - طريقة Liquid scintillation : - استخدم هذا التكنيك لتحليل الفيتامين

بطريقة ميكروبية ، وفى هذه الطريقة تحضن العينة فى بيئة تحتوى على كربون مشع ^{14}C ، ثم يتم مسك trap ثانى أكسيد الكربون المشع المتحرر من التفاعل بواسطة 2-phenylethylamine ويقدر فيه الاشعاع ، ومن كمية الاشعاع يقدر النشاط الأنزيمى (أوالميكروبي) الذى يعتمد فى تفاعله على هذا الفيتامين . هذا ، وقد استخدمت هذه الطريقة لتقدير الثيامين والبيريدوكسين وحمض البانتوثينيك .

٥ - الطرق الكيميائية : - طبيعة المركبات المعقدة المصاحبة للفيتامين تعوق من

استخدام الطرق الكيميائية لتقدير حمض البانتوثينيك . وقد استخدم الـ GLC فى تقدير أملاح البانتوثينات والبانتوثينيل pantothenyl فى مستحضرات ومخاليط الفيتامينات . وفى هذه المستحضرات عادة ما يوجد الفيتامين فى صورة ملح الكالسيوم calcium pantothenate . ومن الصعب تحليل محتوى هذه المستحضرات من الفيتامين ويرجع ذلك إلى حدوث تداخل بين الفيتامينات وبعضها وإلى تأثيرات التخزين على حمض البانتوثينيك .

ويقدر الفيتامين لونياً أو بالفلورة بعد تحليله مائياً حيث ينتج بيتا ألانين β -alanine ، وملح حمض بانتويك pantoic acid . ويلزم استخلاص البيتا ألانين من العينة بعد التحليل المائى حتى يكون التقدير متخصصاً ، ويقدر البيتا ألانين بطريقة لونية أو فلورومترية . ومن تركيزه يمكن ايجاد تركيز الفيتامين فى العينة .

٦ - الطرق الأنزيمية : - يعتبر هذا الفيتامين معاون لأنزيم (CoA transferase

citrate codensing enzyme) ، فهو منشط لهذا الأنزيم ، حيث يدخل فى تركيب الـ CoA . وعند طريق تقدير نشاط هذا الأنزيم فى الكبد ، يمكن معرفة كمية الـ CoA وكذلك كمية الفيتامين .

تقدير بانتوثينات الكالسيوم بالطريقة الرسمية (A.O.A.C , 1975)

يمكن تطبيق هذه الطريقة على المستحضرات الطبية والصدلية ، وهذه الطريقة لا تميز بين الصورتين D-and L-isomers . فلو افترضنا أن المخلوط الراسيمي racemic لبانتوثينات الكالسيوم يتكون من ٥٠:٥٠ (D- : L-) فلا بد من قسمة النتائج المتحصل عليها على ٢ حتى نحصل على المحتوى النشط منها (الصورة - D) .

والأساس المبني عليه تقدير البانتوثينات في هذه الطريقة هو كسر جزئي البانتوثينات بالحمض فينتج من هذه المعاملة β -alanine ، الذي يعامل بمحلول كلورة chlorinating solution ، ثم بيوريد بوتاسيوم KI ، فينفرد يود يقدر سبكتروفومترياً .

الجواهر الكشفية :-

١ - المبادل الأيوني : - 100 - 200 mesh ; 4 (H⁺ form) ; Dowex 50W

٢ - المبادل الأيوني : - 60 - 100 mesh ; Florisil

٣ - محلول بورات منظم borate buffer (٠.٠٥ M ، ١٠.٥ pH) :-

ويحضر بإذابة ٣.١ جم حمض بوريك (AR) Boric acid و ٣.٧ جم KCl في حوالي ٩٠٠ مل ماء ، ثم تضبط درجة الـ pH إلى ١٠.٥ بالضبط بواسطة محلول NaOH (٢٠.٠ N) ثم يكمل إلى لتر بالماء المقطر .

٤ - محلول الكلورة chlorinating solution :- يخفف حجم واحد من محلول NaOCl ٤ - ٦٪ مع ٣٠ حجم من محلول البورات المنظم ، ويحضر هذا المحلول يوم التقدير ، ويحفظ بعيداً عن الضوء .

٥ - محلول فينول محمض acidified phenol :- ٠.٥ ٪ في حمض HCl (٠.١ N) .

٦ - محلول يوديد بوتاسيوم KI :- محلول مائي ١ ٪ ، ويحضر كل أسبوع ، ويحفظ بعيداً عن الضوء .

٧ - محلول دليل فينول فيثالين phenolphthalein :- ٠.٢ ٪ في كحول ايثايل أو كحول أيزوبروبيل .

٨ - محلول بانتوثينات الكالسيوم القياسي (٠.٥ ملجم / مل) :- ويحضر بإذابة

٥٠,٠ ملجم بانتوثينات كالسيوم قياسية USP فى ١٠٠ ماء ، ثم يخفف ١٠,٠ مل منه إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر ، ويخزن على ١٠ ° م .

تجهيز الأعمدة الكروماتوجرافية : -

يتم تجهيز الأعمدة الكروماتوجرافية من زجاج البيركس (١٢ مم قطر خارجى × ٣٠٠ مم طول) والمزودة بأقراص كلسية خشنة coarse fritted disks ، وقمة مجهزة بحيث يمكن غلقها بالمطاط ، ثم تملأ بالمبادلات كما يلى : -

يفسل كلا المبادلين بالماء لإزالة معظم الدقائق المصاحبة ويخزن فى الماء لحين الاستعمال . ويستعمل عمودين لكل عينة مراد تحليلها وعمود ثالث للمحلول القياسى . يضاف لكل عمود الـ florasil إلى ارتفاع ٥ سم ثم يحشر insert بعدها طبقة رقيقة من الصوف الزجاجى glasswool ، ثم يضاف المبادل الآخر 4 × Dowex 50W - بم ارتفاع ٥ سم أيضاً . يفسل المبادلين بحوالى ١٥ مل محلول حمض HCl (N ١) ثم يشطف بواسطة ١٥٠ مل ماء مقطر . هذا ، ويراعى تحضير أعمدة جديدة قبل كل تقدير .

التقدير : -

١ - يحضر محلول مائى من العينة بحيث تحتوى على ٠,٠٥ ملجم بانتوثينات كالسيوم لكل مل (وذلك على أساس التركيز المتوقع فى العينة) . قد تسخن الأقراص أو الكبسولات فى ماء لتسهيل الاستخلاص ، ويزال الغطاء الملون المغلف للأقراص بالغسيل بالماء بحذر شديد ، أما الكبسولات فمن السهل قطعها والحصول على مكوناتها للتحليل .

٢ - يؤخذ ١٠ مل من محلول العينة أو المحلول القياسى وتضاف إلى الأعمدة الكروماتوجرافية ويتم أحلال كل منها بواسطة ٧٠ مل ماء فى دورق مخروطى سعة ٢٠٠ مل ، ثم يضاف إلى كل محلول ٥ مل محلول حمض HCl (N ٢) وتسخن فى الأتوكلاف لمدة ٣٠ ق على ١٢١ ° م ، ثم تبرد وتخفف إلى ١٠٠ مل .

٣ - يحضر الـ sample blank بأضافة ١٠ مل من محلول العينة إلى عمود الفصل وتحل بواسطة ٧٠ مل ماء ، ثم يخفف البلاتك إلى ١٠٠ مل بالماء .

٤ - يؤخذ ١٠ مل من كل من محلول العينة والمحلول القياسى (المعاملين حرارياً) ،

- ومن محلول sample blank وتنقل إلى دوارق سعة ٥٠ مل مزودة بغطاء زجاجي .
- ٥ - يضاف نقطتين من محلول دليل الفينول فيثالين لكل دورق ثم يعاير بواسطة محلول NaOH (٢ N) حتى اللون الأحمر وبعد ذلك يعاير رجعياً بواسطة محلول حمض HCl (١, ٠ N) حتى نقطة عديم اللون .
- ٦ - يضاف مل واحد من محلول جوهر الكلورة لكل منها وتخلط ثم تقفل الدوارق وتترك لمدة ١٥ ق ، وبعد ذلك يضاف مل واحد من محلول الفينول المحمض للقضاء على الهيبوكلوريت الزيادة ، ثم تحرك رجوياً لكي تفسل جوانب الدوارق الداخلية بالمحلول وتغلق ، وتترك ٥ ق .
- ٧ - يضاف مل واحد من محلول KI ، وبسرعة يضاف ٢٠ مل كحول مطلق لكل دورق (الاضافة تكون بسرعة لأن لون اليود يقل بسرعة في المحلول المائي) .
- ٨ - تنقل المحاليل إلى دوارق معيارية سعة ٥٠ مل وتكمل للعلامة بواسطة الكحول المطلق وتخلط جيداً .
- ٩ - تترك الدوارق ١٠ ق أو أكثر حتى يظهر اللون إلى أقصاه ، ثم يقاس الامتصاص الضوئي للمحاليل على طول موجة ٣٥٨ nm في الأسبكتروفوتومتر ضد reagent blank (0A) والذي يحتوى على ١٠ مل ماء وجميع الجواهر المستخدمة كما في العينة والمحلول القياسى ونفس الفترات ، هذا ، فتحت هذه الظروف يكون لون اليود ثابت لمدة ٢٤ ساعة .

الحساب :-

يحسب تركيز بانتوثينات الكالسيوم فى العينة الأصلية من المعادلة التالية :-

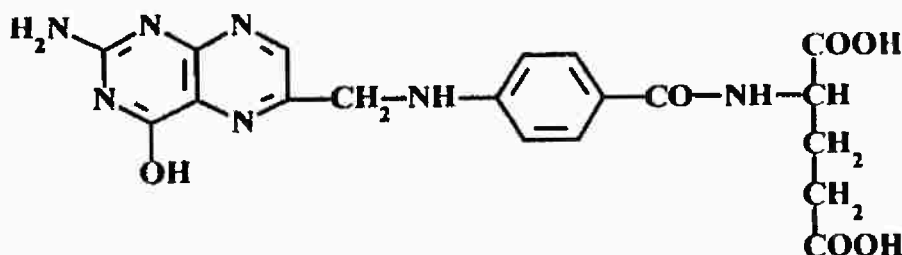
$$\text{Conc. of Ca pantothenate in original sample} = \frac{A}{\hat{A}} \times \text{declared potency}$$

حيث أن :-

A = هى امتصاص العينة .

$\hat{A}$ = هى امتصاص المحلول القياسى .

حمض الفوليك - Folic acid



تفاعلاته :

هذا الفيتامين ثابت لكل من القلويات والعوامل المختزلة ، ولكنه يتأثر بدرجة كبيرة بالحرارة (فى المحاليل) وبالأحماض وبالعوامل المؤكسدة ، وينوب فى الماء وتأثيره حامضى فيها ($pH = 4,4$) ، وثابت فى الماء ويوجد فى صورة أملاح صوديوم .

الذويان :

ينوب فى الماء بنسبة ضئيلة جداً (٠.٠١ ملجم / مل) ، وغير ذائب فى المذيبات القطبية (كحول ، أسيتون) والغير قطبية أيضاً (بنزين ، كلوروفورم ، إيثير) .

صوره وخواصه :

الصورة النقية عبارة عن بلورات عدسية الشكل ، صفراء اللون ، والوزن الجزيئى له ٤٤١ ، ٢ ، ويحترق قبل أن ينصهر على ٢٥٠°م ، وأقصى امتصاص له طول موجة ٢٨٢ و ٣٥٠ nm على $pH = ٧,٠$.

انتشاره ومصادره :

١- فى النباتات :- تحتوى الفواكه على كمية صغيرة منه ، ولكنه يوجد بكثرة فى

أوراق الخضروات الطازجة والنقل مثل الفول السوداني ، وفي الحبوب مثل الشعير والشوفان والقمح والراى rye .

٢ - فى الحيوانات :- يوجد فى الكبد والكلى وفى الفراشات (فى صبغات الأجنحة xanthopterin) ، وفى حراشيف السمك ichthyopterin .

٣ - فى الكائنات الحية الدقيقة :- يوجد فى البكتريا المعوية والخميرة والفطريات والطحالب وعيش الغراب (المشروم) .

المصادر الغذائية :

١ - المصادر الغنية :- (٩٠ - ٢٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) كما فى كبد البقر والخنزير والدجاج والحملان ، وفى السبانخ والقمح والنخالة والفول الجاف والخميرة .

٢ - المصادر المتوسطة :- (٢٠ - ٩٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) كما فى كلى البقر .

٣ - المصادر القليلة :- (من صفر إلى ٢٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) كما فى لحم كل من البقر ، وفى الخنزير والبكان وجوز الهند ، وفى البنجر والجزر والكرنب والقرنبيط والأرز البنى والبصل وعش الغراب والحمص والفلفل والبطاطس والطماطم والخس والبامية والمسطرده .

الدور الطبى والغذائى :

١ - وحدات حمض الفوليك :- بالوزن (ملجم) .
٢ - المستويات الطبيعية فى الدم :- فى الإنسان يصل تركيزه ٢,٥٢ ميكروجرام لكل ١٠٠ مل .

٣ - المقررات الموصى بها :- للأطفال والبالغين قدرت بحوالى ٠,٤ ملجم لكل يوم ، والبكتريا المعوية تزود الإنسان بجزء كبير منها . وتزداد المقررات الموصى بها فى الحالات الخاصة مثل الحمل وفى فترات المرض .

٤ - إعطاء الفيتامين :- المسار الطبيعى والمفضل لاعطاءه هو عن طريق الفم

ويمكن تناوله فى حالات خاصة بالحقن تحت الجلد .

٥ - **اعراض النقص** : - اضطرابات معوية ، ونقص كرات الدم البيضاء leukopenia والتهاب اللسان glossitis ، وفقر دم مصحوب بتضخم كرات الدم الحمراء macrocytic anemia ، وأنيميا خبيثة ، وإسهال sprue ، والتهاب اللثة ، و agranulosis (فى القروء) ، وقلة الريش (فى الدجاج) ، وكسل ونعاس وتشنجات (فى خنزير غينيا) ، وإستسقاء الرأس وتضخم الطحال (فى الفئران) .

٦ - **أمراض النقص** : - الأنيميا بأنواعها (خبيثة وتضخم كرات الدم الحمراء) والتهاب اللسان ، وإسهال ، وأضرار فى الجهاز الهضمى ، وسوء الامتصاص من الأمعاء الدقيقة .

٧ - **مصادره للأجناس التى تحتاج إليه** : - معظم الحيوانات تحتاج إليه من مصادر خارجية .

أ - **المصادر الخارجية** : - الفقاريات واللافقاريات وبعض البكتريا تحتاج إليه من هذه المصادر الخارجية ، والبكتريا المعوية تمد الإنسان والفئران والكلاب والأرانب والخنازير بما تحتاجه منه .

ب - **المصادر الداخلية** : - البكتريا المعوية والفطريات والخميرة تستطيع تخليقه ، لذلك فهى لا تحتاج إليه من المصادر الخارجية .

٨ - **تأثير الجرعات العالية** : - لم يقرر حتى الآن إن له سمية على الإنسان ، ولكن فى الفئران فهى تسبب فشل كلوى وتشنجات . والجرعة المميتة للنصف LD₅₀ هى ٦٠٠ ملجم / كجم من وزن الجسم ، والجرعات العالية تسبب وقف انقسام الخلايا فى طور الـ metaphase فى الكناكيت .

تحليل حمض الفوليك

الفصل :

أهم المصادر التي يفصل منها حمض الفوليك هي السبانخ والكبد والخميرة والألفا ألفا ونخالة القمح . ولا بد أن يتم فصل الفولات folate من مصادرها الطبيعية تحت ظروف خاصة حتى لا تتأثر سلسلة oligo γ - glutamyl الجانبية للفولات وفي صورة مختزلة . ولكي تفصل أقصى كمية من الفولات بصورة سليمة ، يتم فرم mince العينة (كبد) ثم تسخينها على ٩٥ °م لمدة ١٠ ق في وجود مواد مانعة للأكسدة antioxidants ، وذلك حتى تتلف أنزيمات تمثيل الفولات وأشهرها (γ - glutamyl hydrolase (conjugase) . ثم بعد ذلك يتم تجنيس العينة في وسط مائي على درجة $\text{pH} = 2.0$. وتستعمل المواد المانعة للأكسدة حتى تحمي الفولات من الأكسدة ويكون في صورة مختزلة . ومن أنسب هذه المواد أسكوربات الصوديوم (٨٪) أو " ME " 2-Mercaptoethanol (٢،٠ M)) وحيث أن الفولات ترتبط مع الجزيئات الكبيرة برابطة تعاونية مثل serum binding protein والأغشية الحيوية membranes ، فلا بد من معاملة المستخلص بالحرارة حتى تتحرر الفولات من هذه الجزيئات ، ثم بعد ذلك يستخدم تكنيك الادمصاص حتى نحصل على الفيتامين في صورة نقية . ويتم ذلك كما يلي :

- ١ - الادمصاص على Norite ثم الأحلال بايثانول - أيديروكسيد أمونيوم .
- ٢ - الادمصاص على Superfiltrol ($\text{pH} = 1.2$) ، ثم الأحلال بنفس المذيب السابق .
- ٣ - الترسيب بواسطة أيونات الباريوم Ba^{++} على درجة $\text{pH} = 7.0$ في كحول .
- ٤ - أستترته مع ميثانول ثم استخلاصه بالبيوتانول العادي .
- ٥ - الادمصاص على Superfiltrol ($\text{pH} = 7.0$) ، ثم أحلال الاستر بواسطة أسيتون ٧٥ ٪ .
- ٦ - البلورة مع الايثانول الساخن ، ثم تحليل الاستر مائياً .
- ٧ - إعادة البلورة في ماء ساخن .

هذا ، ويمكن استخدام كروماتوجرافى الأعمدة فى خطوات الأدمصاص السابق ذكرها .

طرق التحليل :

تختلف طرق تحليل الفولات عن بعضها ، فبعض الطرق تستخدم لمعرفة نوع وحدة الكربون المرتبطة بالفولات والصورة المختزلة للفولات ، والبعض الآخر يستخدم لمعرفة طول سلسلة الأوليجوجلوتاميل ، أو لتحليلهما معاً . وتعتمد الطرق المستخدمة أيضاً على صور الفولات الغير متجانسة والغير معروفة أيضاً .

١ - الطرق الكروماتوجرافية :-

لو كانت الفولات المجهولة خليط من صور رئيسية وثنائية عديدة ، فلا بد أولاً من تفريدها على عمود كروماتوجرافى أنيوني anionic مثل - DEAE (diethylaminoethyl) cellulose باستعمال محلول ملحي متدرج فى التركيز . بعد هذه التنقية الجزئية ، يمكن تمييز الصورة الرئيسية عن بعضها البعض ، فتقدر صورة الفولات المختزلة والتي تحتوى على وحدة كربون بعد إزالة سلسلة الأوليجوجلوتاميل منها بتحضيرها مع أنزيم γ -glutamylhydrolase ، ثم تطبيقها على عمود كروماتوجرافى يحتوى على - DEAE cellulose ، ومقارنة الـ peak الناتج مع فولات أحادية الجلوتامات قياسية ، ويمكن تقدير طول سلسلة الأوليجوجلوتاميل بالتحليل الكروماتوجرافى مباشرة للفولات المنقاة على عمود سيفادكس G - 25 . ويمكن أيضاً تمييز سلسلة الأوليجوجلوتاميل وتحديد طولها بعد كسرها من الفولات وإنتاج سلسلة (PABAGlun) p -aminobenzoyl- γ -oligoglutamylate ثم تقاس هذه السلسلة بمفردها باستعمال عمود كروماتوجرافى DEAE-cellulose أو تقاس بعد تحويلها إلى صبغة أزرق مطابقة ثم تحلل كروماتوجرافياً على جيل عديد الاكريل اميد polyacrylamide . وكسر الفولات يتأثر بنوع الطريقة المستخدمة سواء أختزالية باستعمال الزنك فى حمض ، أو تأكسدية باستعمال البرمنجنات فى قلوى ، فكلتا الطريقتان تكسران كل أنواع الفولات كمياً . وهناك طريقة أخرى لتحليل السلسلة الجانبية (الأوليجوجلوتاميل) وهى تتضمن تحويل كل صور الفولات إلى 5-methyltetrahydrofolate ثم تحليلها كروماتوجرافياً . هذا ، وأستخدم حديثاً تكنيك الـ HPLC فى فصل وتمييز الفولات أحادية أو عديدة الجلوتامات من المصادر الطبيعية .

٢ - الطرق الفلورومترية :

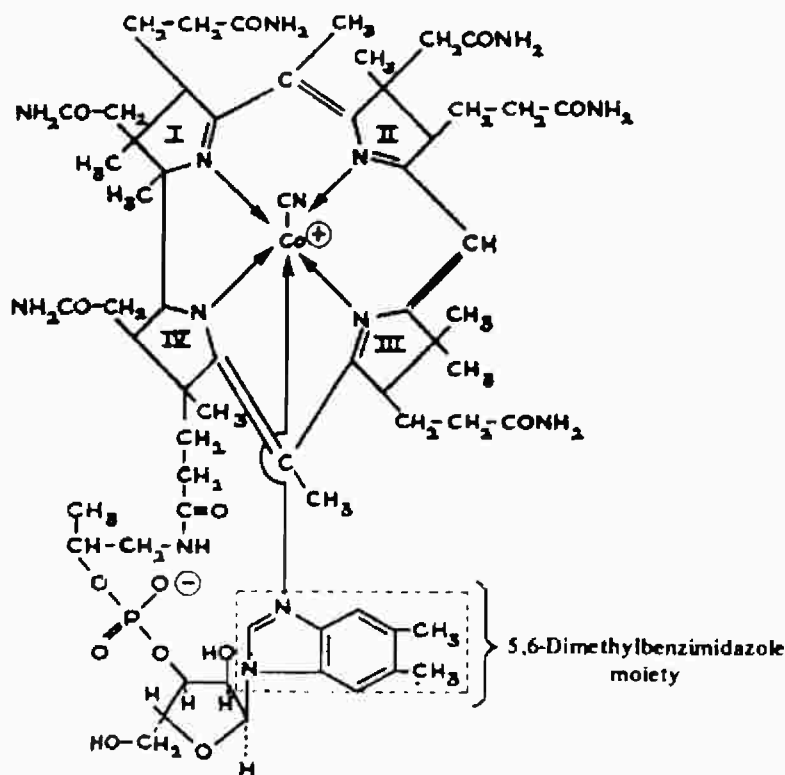
وفيها تقاس فلورة حمض الفوليك النقى على طول موجة ٤٧٠ nm .

٣ - الطرق الكيميائية :

وفيها يقدر الأمين العطرى بعد تكسير حمض الفوليك بالزنك والحمض ، وذلك بتحويل الأمين العطرى إلى مشتق أزو azo ملون بلون بنفسجى .

٤ - الطرق الميكروبيولوجية والحيوية :

يمكن تقدير محتوى المصادر الطبيعية من الفولات أو الأنواع المختلفة من الفولات والمتحصل عليها من التحليل الكروماتوجرافى بالطرق الميكروبيولوجية . ويمكن الكشف عن أقصى نشاط لإزالة سلسلة الأوليجوجلوتاميل بأنزيم الـ conjugase عن طريق التقدير باستخدام بكتريا *L. casei* . وهذه الطريقة تعطى أقصى نشاط للفولات لذلك فهي تقدر الفولات الكلية . وتستخدم خطوة التحليل المائى بالأنزيم لأن البكتريا لا يمكنها الاستفادة من الفولات ذات السلسلة الجانبية الطويلة لذلك فلا تستطيع النمو . ويمكن تقدير الفولات الحرة والمرتبطة بالفرق بين التقدير قبل وبعد التحليل المائى بأنزيم الـ conjugase . ويمكن تقدير 5- methyltetrahydrofolate باستخدام السلالة *L. faecalis* . وفيها أيضاً تعامل الفولات بأنزيم conjugase قبل التقدير . وهناك بكتريا حمض لاكتيك أخرى لا تستجيب للصورة الغير مختزلة للفولات (Pte Glu) ولا تستجيب أيضاً لـ 5-methyl-H₄PteGlu الـ H وهى *P. cerevisiae* . وهذا الميكروب مفيد فى التحليل الكروماتوجرافى للفولات المجهولة حيث يمكن معرفة هذه المشتقات من الفولات بعد فصلها لعدم استجابة البكتريا لها . وأخيراً كانت تقدر الفولات بالطرق الحيوية على الكتاكيت بقياس معدل تكوين الريش فيها feathering ، وفى الفئران بقياس معدل تطور قناة التبويض oviduct .

فيتامين ب_{١٢} - Vit- B₁₂

تفاعلاته :

هذا الفيتامين يتأثر تقريباً بكل العوامل ، فهو غير ثابت تجاه كل من الحرارة والأحماض والقواعد والعوامل المؤكسدة والمختزلة والضوء أيضاً ، وتأثيره متعادل ، وهو عامل مختزل ، وهو أيضاً قاعدة عديدة الحامضية polyacidic base .

الذوبان :

يذوب في الماء بنسبة متوسطة (١.٢٥ جم / ١٠٠ مل) وفي الكحول أيضاً ، ولكن غير ذائب في الأسيتون والمذيبات الغير قطبية (بنزين ، إيثير ، كلوروفورم) .

صوره وخواصه :

صورته النقية عبارة عن مسحوق أحمر ، وصورته البلورية أبرية ذات شكل معين والوزن الجزيئي له يبلغ ١٣٥٧ ، ويسود على ١٩٠° م قبل أن ينصهر ، وأقصى امتصاص له

على ٣ أطوال موجية مختلفة وهي ٢٧٨ و ٣٦١ و ٥٥٠ nm (فى الماء) .

انتشاره ومصادره :

- ١ - فى النباتات :- تركيزه منخفض جداً فى الخضروات والبذور والنقل ، ويوجد فى الجزر والحمص وال فول الأخضر والقمح وفول الصويا .
- ٢ - فى الحيوانات :- يوجد فى كل الحيوانات خصوصاً الأعضاء النشطة وهى الكبد والكلى والقلب والطحال والمخ والمعدة والأمعاء ، ويوجد أيضاً فى المنتجات الحيوانية مثل البيض واللبن .
- ٣ - فى الكائنات الحية الدقيقة :- يوجد فى بعض البكتريا والبكتريا المعوية وبكتريا التربة والبروتوزوا .

المصادر الغذائية :

- ١ - المصادر الغنية :- (٥٠ - ٥٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) وتشمل كبد كل من البقر والعجل والحملان والخنازير ، وفى كلى البقر والحملان ومخ البقر .
- ٢ - المصادر المتوسطة :- (٥ - ٥٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) فى كلى الأرانب وكبد الأرانب والدجاج وقلب البقر والأرانب والدجاج والضأن وفى الجبن واللبن والبيض .

الدور الطبى والغذائى :

- ١ - وحدات فيتامين ب_{١٢} :- وحدة USP = ١ ميكروجرام فيتامين ب_{١٢} وتساوى أيضاً ١١٠٠٠ وحدة LLD (L . lactis Dorner) .
- ٢ - المستويات الطبيعية فى الدم (الإنسان) :- تقاس مستوياته فى سيرم دم الإنسان بالبيكوجرام pg لكل مل . والمستوى الطبيعى يتراوح بين ٢٠٠ - ٩٠٠ بيكوجرام / مل . وأقل من ١٠٠ بيكوجرام لكل مل سيرم تعتبر حالة نقص فيتامين ب_{١٢} . وعادة ما يفضل استخدام هذه الوحدات (بيكوجرامات) نظراً لقلة تركيزه والحاجة إليه . متوسط مستواه فى الدم يصل حوالى ٠.٠٨ ميكروجرام لكل ١٠٠ مل ، و ٠.٠٣ ميكروجرام لكل ١٠٠ مل سيرم .

٣ - المقررات الموصى بها : - يوصى للأطفال بـ ٢,٥ ميكروجرام لكل يوم ، وللبالغين ٥,٦ ميكروجرام لكل يوم . وتزداد فى الحالات الخاصة ، وفى الحمل يوصى بـ ٨ ميكروجرام / يوم ، وفى الرضاعة يوصى بـ ٦ ميكروجرام / يوم . كما تزداد الجرعة فى حالات أمراض سوء الامتصاص المعوى وكبر السن وسوء التغذية ومدمنى الكحول alcoholism وحالات فقد الشهية للطعام والأمراض العصبية neurophathies .

٤ - إعطاء فيتامين ب_{١٢} : - الطريق الرئيسى لإعطاءه هو مع الطعام خلال الفم ، ولكن عند إعطاءه فى حالات نقصه يفضل بالحقن فى العضل .

٥ - أعراض النقص : - ضعف النمو ، وزيادة تحلل كرات الدم الحمراء ، وأنيميا مصحوبة بتضخم كرات الدم الحمراء ، والتهاب اللسان ، وأمراض عصبية وانخفاض ليبيدات الدم والأنسجة ، واضطراب التمثيل الغذائى للكربوهيدرات ، وافران methylmalonic acid ، وتغيرات فى الجهاز الهضمى ، وضخم النخاع . وفى الدجاج الأعراض هى : - ضعف تكوين الريش وانخفاض نسبة فقس البيض . وفى الفئران الأعراض هى : - فقد القدرة على التكاثر ، وتغيرات كبيرة فى الشوارب porphyrin whiskers . وفى الخنازير الأعراض هى : - التهاب جلدى ، وفقد القدرة على التناسل أيضاً .

٦ - أمراض النقص : - الانيميا بأنواعها (حادة - تضخم كرات الدم الحمراء hyperchrmic) ، واسهال ، والتهاب اللسان ، وتثبيط النمو ، وتحلل الحبل الشوكى .

٧ - مصادره للأجناس التى تحتاج إليه : - معظم الفقاريات وبعض البروتوزوا والبكتريا والطحالب تحتاج إليه .

أ - المصادر الخارجية : - معظم الفقاريات تأخذ من مصادر خارجية (لا يتيسر للإنسان عن طريق البكتريا المعوية) ، وبعض البكتريا تحتاجه من الخارج ولا تستطيع تخليقه .

ب - المصادر الداخلية : - باقى أنواع البكتريا تخلفه بداخلها وكذلك الـ actinomycetes .

٨ - تأثير الجرعات العالية : - تؤدي إلى زيادة عدد كرات الدم عن الحد الطبيعي بدرجة كبيرة polycythemia ، وعادة ما يكون تأثيرها العام ضعيف .

تحليل فيتامين ب ١٢

الفصل :

أهم المصادر المستخدمة لفصله هي الكبد و fish solubles ، وتتضمن طريقة الفصل ما يلي : -

- ١ - الاستخلاص بكحول مائي .
- ٢ - ادمصاص فيتامين ب ١٢ على فحم نشط ثم احلاله بكحول ٦٥ ٪ .
- ٣ - الادمصاص على عمود كروماتوجرافي يحتوى على سيليكات أو ألومينا .
- ٤ - الغسيل بالأسيتون ثم الأحلال بالكحول .
- ٥ - البلورة .

طرق التقدير :

١ - طرق التقدير الأكلينيكية clinical : - عندما فصلت بللورات فيتامين ب ١٢ أول مرة سمي بالعامل المضاد للأنيميا الخبيثة (APA) antipernicious anemia ، وتم تقديره بصعوبة بطريقة نصف كمية في مرضى بالأنيميا الخبيثة عن طريق قدرته على زيادة عدد كرات الدم الحمراء والهيموجلوبين ، وزيادة النسبة المئوية لـ reticulocytes .

٢ - الطرق الكيميائية :

أ - الطرق الأسبكتروفوتومترية : - وهذه الطريقة سريعة ودقيقة وتعتمد على امتصاص السيانونوكوبالامين cyanocobalamine على طول موجة ٢٦١ nm . ويمكن لهذه الطريقة تقدير ٢٥ ميكرو جرام / مل . وكثير من مشابهاة الكوبالامين لها امتصاص على طول موجة ٢٦١ nm ، لذلك فهذه الطريقة مفيدة لتقدير فيتامين ب ١٢ الكلى بشرط أن تكون العينات نقية وخالية من أى مواد متداخلة .

ب - الطرق اللونية : - من أهم الطرق الحساسة لتقدير السيانونوكوبلامين تعتمد على تقدير محتوى السياند cyanide ، حيث يتم تحرير السياند بالاختزال أو بالتحليل الضوئي photolysis ، ثم يقاس بعد ذلك بطرق لونية حساسة . وبالطبع فهذه الطريقة لا تميز بين السيانونوكوبلامين والمشابهاة التي تحتوى على سيانيد . وقد اقترحت طريقة مناوبة لذلك وهى تعتمد على الفرق بين طيف السيانونوكوبلامين ومعقده من ثنائى السيانيد ذو اللون البنفسجى . وهناك طرق لونية أخرى تعتمد على وجود 5,6-dimethylbenzimidazole وعلى نواتج التحليل المائى الناتجة من معاملة السيانونوكوبلامين بحمض HCl القوى . ومع أن هذه الطرق الكيميائية دقيقة وحساسة جداً ، إلا أنه يستلزم لها وقت طويل ومملة ، وعلى ذلك فهى لا تحبذ للتقديرات الروتينية لعدد كبير من العينات .

٣ - الطرق الميكروبيولوجية : - الطرق الميكروبية لتقدير السيانونوكوبلامين حساسة ويمكن تطبيقها على المواد الخام مباشرة . وهى واسعة الانتشار وتستخدم عملياً لتقدير محتوى الفيتامين فى عينات الدم والأنسجة . ولكن هناك مشكلة لتخصصها حيث أن مشابهاة الكوبلامين تعطى أستجابات مختلفة للكائنات الحية الدقيقة ، وأول ميكروب استعمل فى تقدير السيانونوكوبلامين كان *E. coli* ، وتكنيكه كان صعباً جداً ، ثم بعد ذلك وجدت أنواع أخرى من نفس السلالة أكثر استجابة . أما الـ *Lactobacilli* فإنها تستجيب للمشابهاة المختلفة من الكوبلامين والثيميدين thymidine وتستجيب أيضاً لنيكوسيدات الذى أوكسى الأخرى . واستخدمت الـ *E. coli* فى التقدير أيضاً ولكنها أقل حساسية وتستجيب لمشابهاة عديدة ولا تستجيب لنيكوسيدات الذى أوكسى . ومن كل الكائنات المختبرة وجد أن *E. gracilis* هو الأكثر حساسية لتقدير السيانونوكوبلامين ، ومن أهم مميزاته أن نموه بطيء ، ويتطلب ٥ أيام لأقصى نمو . وتكنيك الطرق الميكروبيولوجية يتطلب عدة أيام ويجب الحذر من تطبيقه على عينات المرضى الذين يتناولوا أدوية تؤثر على نشاط البكتريا مثل المضادات الحيوية .

٤ - الطرق الحيوية : - وهى تتضمن استخدام حيوانات راقية ، وعلى ذلك فهى أكثر صعوبة ويستلزم لها وقت طويل بالمقارنة بالطرق الميكروبيولوجية . والمشكلة الكبيرة تتركز فى تخزين كميات كبيرة منه فى الحيوانات الصغيرة النامية والتي

قد أستخدمتها من الأم . ويتم التغلب على هذه المشاكل بأضافة عوامل أجهاد stress factor لزيادة أستنزاف الفيتامين ، أو التغذية على علائق تزيد متطلبات الحيوان من الكوبلامين . والتقدير بأستخدام الكتاكيت هو الأكثر أستعمالاً عن الفئران فى هذا النوع من التجارب .

• **Radioisotope dilution** - ويتم فيها تحرير الكوبلامين أولاً من المادة المرتبطة به ثم قياس الأشعاع بعد أرتباط السيانوكوبالامين مع أماكن أرتباط معنية على بروتين خاص . وهذه الطريقة سهلة وحساسة ، و تستخدم حالياً فى صورة محاليل جاهزة kits. وعند تحليل عينة الدم ، يلزم أولاً أستخلاص الكوبلامين المرتبط من عينة السيرم ثم تحويله إلى سيانوكوبلامين ، وأخيراً يتم أرتباطه مع ليجاند خاص cobalamine ligand وهو بروتين أرتباط binding protein نو تخصص وتآلف عالى جداً للفيتامين . وهذه الطريقة هى المفضلة لتقدير الكوبلامين ، حيث لوحظ أن أكثر من ٩٠ ٪ من تقديرات الكوبلامين كانت بهذه الطريقة . وتوصى الجهات البحثية والمعنية بأستخدام هذه الطريقة .

الاختبار اللونى لفيتامين ب١٢

(Stroev and Makarova , 1989)

يعتمد الاختبار على خاصية الكوبلامين التى هى جزء تركيبى فى فيتامين ب١٢ ، فهذا الشق يتفاعل مع الثيوبوريا ويعطى معقد ملون بلون أخضر على درجة الحرارة المرتفعة .

الجواهر الكشافة :

١ - محلول فيتامين ب١٢ (متوافر فى أمبولات صيدلية) .

٢ - بللورات ثيوبوريا ، ويستعمل محلول ١٠ ٪ منها حديث التحضير .

التكنيك :

١ - على ورقة ترشيح خالية من الرماد ashless filter paper ، يوضع نقطتين أو ثلاث نقط من محلول الثيوبوريا (١٠ ٪) ، ثم تجفف بأستعمال تيار مستمر من الهواء الساخن (يمكن التجفيف أعلى اللهب الهادئ) .

٢ - توضع نقطة أو نقطتين من محلول فيتامين ب١٢ على spot الثيوبوريا ثم تجفف

مرة أخرى .

٢ - يلاحظ تكون حلقة لونها أخضر .

تقدير النقص فى فيتامين ب_{١٢} (Varley et al. , 1976)

هناك معاونات أنزيمية هامة يدخل فى تركيبها الكوبالامين وهى :

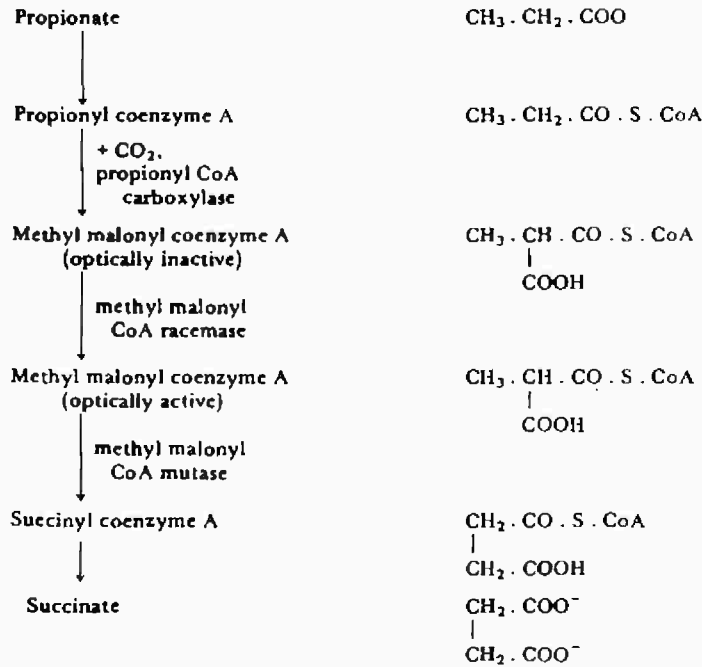
١ - معاون الأنزيم methyltransferase (THF) methyltetrahydrofolate - 5

والذى يسمح لك 5 - methyl THF (الصورة المختزنة للفولات) بأن تدخل إلى دورة الفولات folate cycle .

٢ - معاون أنزيمى لميثيلة methylation الحمض النووى soluble RNA .

٣ - معاون أنزيمى فى تحول الـ methylmalonyl coenzyme A إلى succinyl

coenzyme A (بواسطة أنزيم methylmalonyl Co A mutase) ثم إلى سكسينات succinate (شكل ٢٤) . والطرق التى تتعرض لدراسة نقص فيتامين ب_{١٢} نوعين ، الأولى مباشرة ويقدر فيها تركيز فيتامين ب_{١٢} مباشرة فى السيرم أو الكبد بطريقة ميكروبيولوجية والتى تستخدم فيها *L. leichmannii* أو *E. gracilis* . والنوع الثانى من الطرق هى الطرق الغير مباشرة indirect ، وفيها يقدر المفرز من حمض الميثايل مالونيك (MMA) methylmalonic acid فى البول خصوصاً بعد اجراء valine loading . وفى الظروف العادية يمثل الحمض الأميني فالين valine إلى بروبونات propionate ومنه إلى السكسينات، والأخيرة تدخل إلى دوره كرب . ولكن فى حالة نقص فيتامين ب_{١٢} وعند إعطاء جرعة كبيرة من الفالين (valine loading) عن طريق الفم (١٠ جم) فإنه لا يمثل كما ينبغى، وتتراكم موادتفاعل substrate الأنزيم الذى يعاونه فيتامين ب_{١٢} ، وهى methylmonic acid وتفرز فى البول . والطريقة التالية تتناول تقدير هذا الحمض لونيأفى البول .



Conversion of propionate to succinate.

شكل (٣٤) مسار تحول البروبيونات الى سكسينات

الجواهر الكشفية :-

- ١ - المبادل الايوني (1 P) Deacidite FF (mesh ٢٠٠) ، فى صورة كلوريد :-
ويغسل المبادل بالماء كميته مقدارها ٥ أضعاف كمية المبادل ، ويغسل ٣ مرات ،
ثم ينتقل فى صورة معلق مائى فى زجاجات بنية على درجة حرارة الغرفة .
- ٢ - ايثير ثنائى الايثايل :- ويغسل بحوالى عشر (١٠/١) من حجمه بمحلول
 NaOH (٥ مول / لتر) ، ثم بالماء حتى يصبح ماء الغسيل متعادلاً .
- ٣ - حمض HCl :- ١٠ و ١٠٠ m mol / لتر وحمض مركز .
- ٤ - محلول NaOH (٣ mol / لتر) .

٥ - محلول خلّات منظم (١ mol / لتر ، $p^H = 2,4$) : - ويحضّر بخلط ٤٢ مل حمض خليك ثلجى و ٢١,٨ جم خلّات صوديوم لا مائية ويكمل إلى لتر بالماء المقطر .

٦ - محلول أيدروكسيد أمونيوم (٥ mol / لتر) : - يخفف ٢٥٠ مل من محلول الأمونيا المركزة (الكثافة النوعية ٠,٨٨) إلى لتر بالماء المقطر .

٧ - جوهر الداي أزو diozo : - ويحضّر كما يلي : -

أ - محلول p - Nitroaniline : - يذاب ٧٥٠ ملجم منه فى لتر محلول HCl تركيزه ٢٠٠ m mol / لتر .

ب - محلول نيتريت صوديوم Sod . nitrite (٠,٥٠ جم / لتر) ويحفظ على ٤° م .

ج - محلول خلّات صوديوم ٢٠٠ m mol / لتر .

تبرد المحاليل السابقة إلى ٥° م ، ثم يحضر الجوهر بخلط أربعة حجّوم من محلول نيتريت الصوديوم و ١٥ حجّوم من محلول P-Nitroaniline ، ثم ٥ حجّوم من محلول الخلّات وتخلط جيداً ، ويحفظ على ٥° م لمدة لا تزيد عن ١٢ ساعة .

٨ - محلول stock st . of methylmalonic acid (١٠ m mol / لتر) : - ويحضّر بإذابة ١١٨,١ ملجم / ١٠٠ مللى ماء ، ويحفظ على ٤° م .

٩ - محلول working st. (٠,١ m mol / لتر) : - يخفف المحلول stock بنسبة حجم إلى ١٠٠ من محلول حمض HCl (١٠٠ m mol / لتر) .

١٠ - كحول أميل amyl alcohol .

١١ - كبريتات صوديوم لا مائية .

التكنيك : -

١ - يعطى الشخص ١٠ جم فالين ، وبعدها يجمع البول المقرّر خلال ٢٤ ساعة بدون مادة حافظة .

٢ - يحمض ٥ مل من البول بواسطة حمض HCl المركز حتى درجة $p^H = 2$ ، وتستخلص ثلاث مرات بالايثير (٥٠ مل ، ١٥ ق لكل مرة) . ويجرى

الاستخلاص فى جهاز رج ميكانيكى .

- ٣ - يحضر عمود كروماتوجرافى ($6 \times 1,5$ سم) ويملء بالمبادل الآيونى فى ماء .
- ٤ - تضاف المستخلصات التى تم تجميعها والتى سبق معاملتها بالأمونيا combined ammoniacal extracts إلى العمود ، وبعد أن تمرر خلال المبادل ، يغسل المبادل بـ ٥٠ مل ماء ، ثم بـ ٥٠ مل حمض HCl ($100 \text{ m mol} / \text{ لتر}$) ، ولا بد أن تكون درجة الـ p^H للمحلول الخارج من العمود حوالى ٥ .
- ٥ - يتم عمل احلال لحمض الميثايل مالونيك بواسطة ٢٥ مل حمض HCl ($100 \text{ m mol} / \text{ لتر}$) ، ويمكن بعد ذلك إعادة تنشيط المبادل بـ ٥٠ مل حمض HCl ($100 \text{ mmol} / \text{ لتر}$) ، ثم بـ ٥٠ مل ماء .
- ٦ - إلى ثلاث أنابيب اختبار مزودة بغطاء زجاجى (16×100 مم) ، يضاف ١,٥ مل محلول خلال منظم ثم يضاف إلى الأولى ١,٠ مل من المحلول المحل الخاص بالعينة ، وهى تمثل بذلك الـ test . وإلى الثانية ١,٠ مل محلول القياسى وهى تمثل St. وإلى الثالثة يضاف ١,٠ مل حمض HCl ($100 \text{ m mol} / \text{ لتر}$) وهى تمثل البلانك .
- ٧ - يضاف لكل الأنابيب ١,٥ مل جوهر diazo حديث التحضير ، ثم تخلط جيداً وتوضع فى حمام مائى على $95 \pm 1^\circ \text{C}$ لمدة ٢,٥ ق بالضغط ، ثم تبرد فى ماء لمدة دقيقة واحدة .
- ٨ - يضاف لكل أنبوبة مل واحد من محلول NaOH ، وبعد الخلط الجيد يضاف ٣ مل كحول أميل ويترك ١٠ ق ، ثم تغطى وترج جيداً وبشدة لمدة دقيقة .
- ٩ - وبعد أن تفصل الطبقتين ، تسحب الطبقة السفلى بعملية مص suction ، ثم يضاف حوالى ٠,٢ جم كبريتات صوديوم لا مائية إلى الطبقة العضوية وترج جيداً لإزالة ما بها من ماء .
- ١٠ - تتم عملية طرد مركزى وتنقل المحتويات إلى خلايا القياس وتقاس كثافة اللون على طول موجة ٦٥٠ nm ضد الماء . ولا بد أن يكون امتصاص البلانك يقع بين ٠,٠٢ - ٠,٠٥ والمحلول القياسى بين ٠,٦٠ - ٠,٦٥ لمسار ضوئى مقداره ٨

mm . وإذا كان أمتصاص العينة المختبرة كبير ، تخفف بكحول الأميل أو يعاد التقدير بأستعمال كميات أقل من المحلول المحل .

١١ - يمكن اختبار كفاءة أسترجاع recovery حمض الميثايل مالونيك عن طريق إضافة ٥ . مل من محلول ال stock st . إلى ٥ مل بول محمض قبل تطبيق هذه الطريقة ، ولابد أن يكون الأسترجاع يعادل 100 ± 10 .

الحساب :-

يحسب تركيز حمض الميثايل مالونيك في البول من المعادلة التالية :-

$$\text{Urinary methylmalonic acid (m mol / l)} = \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Reading of standard}} \times \frac{25}{5} \times 0.1$$

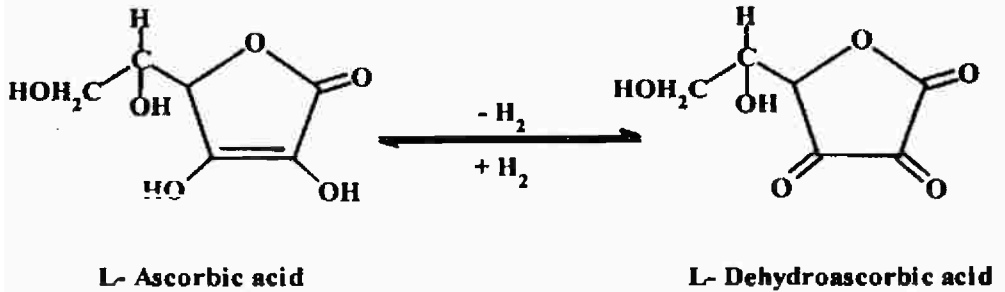
$$= \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Reading of standard}} \times 0.5$$

$$\text{Urinary methylmalonic acid (mg / l)} = \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Reading of standard}} \times 59$$

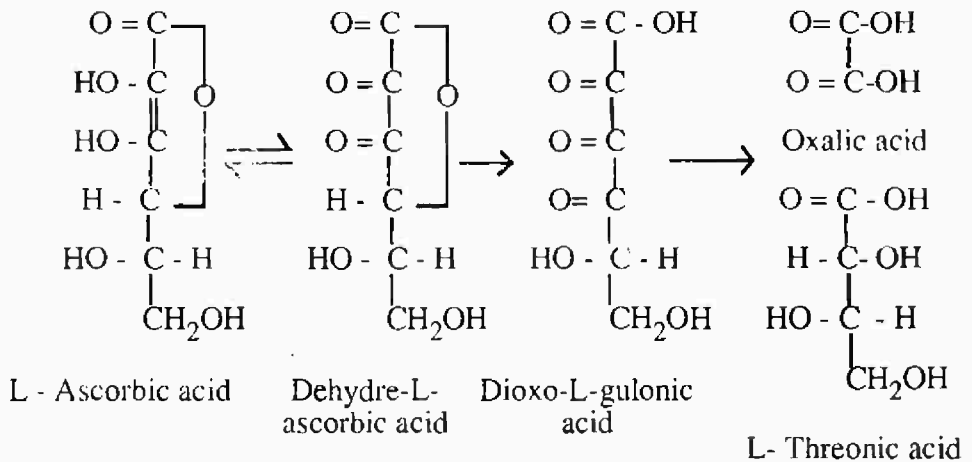
التفسير :-

في حالة الأشخاص الطبيعيين يكون المفرز من MMA هو ٢٥ Umol لكل ٢٤ ساعة (من صفر إلى ٤ ملجم / ٢٤ ساعة) في حالة التقدير بطرق ال GLC ، وتزداد إلى المستوى الأعلى إلى ٧٨ mol / ٢٤ ساعة (٩,٢ ملجم / ٢٤ ساعة) لو أستعمل internal standards . وهذه المستويات لا تزيد لو طبق ال valine loading . أما الطرق اللونية فهي تعطى نتائج عالية ، ربما ترجع إلى قلة التخصص . والمستويات تحت هذه الظروف تكون من صفر إلى ٣٩ μmol / ٢٤ ساعة (من صفر إلى ١١ ملجم لكل ٢٤ ساعة) بدون valine loading . وقد تصيح حوالى ٠,٢١ m mol / ٢٤ ساعة (٢٥ ملجم / ٢٤ ساعة) بعد جرعة فالين مقدارها ١٠ جم ، ولكنها أيضاً في المدى الطبيعي . أما في حالة نقص فيتامين ب_{١٢} فيرتفع ال MMA من ٠,٢٤ إلى أكثر من ١٠ m mol لكل ٢٤ ساعة (من ٤٠ ملجم / ٢٤ ساعة إلى عدة جرامات لكل ٢٤ ساعة) .

حمض الأسكوربيك (فيتامين ج) - L-Ascorbic acid (Vit.C)



كما هو معروف أن حمض الأسكوربيك له خواص حموضة واختزال قويين ، ففي المحاليل المائية (فيتامين ذائب في الماء) تتأكسد الأسكورات ascorbate بسرعة بواسطة الهواء الجوى إلى dehydro-L-ascorbate خصوصاً في وجود الأيونات المعدنية مثل Cu^{2+} . وكلا الصورتين نشطتين حيويًا ويتحولا لبعضهما البعض في الجسم . ومعدل أكسدة الأسكورات (in vitro) يزداد بزيادة درجة الـ pH ولكن على درجة pH أعلى من 5 تخضع الـ dehydroascorbate أيضاً لعملية أكسدة إضافية زائدة حيث يتم فتح الحلقة ويفقد النشاط الحيوي ، والناتج من هذه الأكسدة هو dioxo-L-gulonate والذي يتحول تلقائياً إلى L-threonate و oxalate كما يلي :-



ومما هو جدير بالذكر ، إن فيتامين ج لا يحتوى على مجموعة كربوكسيل حرة ولكنها فى صورة أستر داخلى (لا كتون) ، وعلى ذلك فالخواص الحامضية لهذا الفيتامين لا ترجع لهذه المجموعة ولكنها ترجع إلى مجموعة الهيدروكسيل OH - الموجودة على ذره الكربون رقم (٢) . فهذه المجموعة محصورة بين مجموعة كربونيل (الذرة رقم ١) ومجموعة الـ OH الأخرى (على الذرة رقم ٣) ، وتهجين ذرات الكربون الثلاث الأولى من نوع sp^2 ، فتحت هذه الظروف تتأين مجموعة الـ OH - التى على الذرة رقم ٢ مفردة بروتون (H^+) ، وبذلك يكون هناك تأثير حامضى ويكون ملح مع أيونات العناصر المختلفة (Na^+ و K^+ إلخ) .

الحيوانات كلها فيما عدا الإنسان والحيوانات الرئيسية (مثل القرود والشمبانزى) وخنزير غينيا ، يمكنها تخليق الأسكوريبات حيويًا فى جسمها من الجلوكوز ، أما التى لا تستطيع تخليقه فإنها تعاني من نقص فى أنزيم L- gulonolactone oxidase ، لذلك فلا يخلق فى أنسجتها .

فى الإنسان تمتص الأسكوريبات وصورتها المؤكسدة بسرعة من المعدة stomach ، ومن اللقائى ileum (الجزء الأخير من الأمعاء الدقيقة) ، ويدخل الى الدورة الدموية . وتنفذ الأسكوريبات إلى خلايا عديدة عن طريق الانتقال الغير نشط passive transportation ، بينما فى الصفائح الدموية platelets وفى خلايا الغدة الكظرية adrenal gland وخلايا شبكية العين retinal cells فإنه ينفذ خلالها عن طريق ميكانيكية النقل النشط active transportation . تنفذ الـ dehydroascorbate بحرية إلى الخلايا وتثبت فى صورة أسكوريبات . هذا ، ويفرز الفيتامين فى البول فى صورة أسكوريبات و dehydroascorbate ويهدم إلى أكسالات .

تفاعلاته :

حمض الأسكوربيك ثابت فقط فى الوسط الحامضى والوسط المختزل ، ولكنه يتأثر بدرجة كبيرة (غير ثابت) بالحرارة والقلويات والعوامل المؤكسدة والضوء . وهو يذوب فى الماء وتأثيره حمضى ($pH = 3$) ، ويعتبر عاملاً مختزلاً ويكون ملح مع القواعد مثل أملاح الصوديوم والكالسيوم والعناصر الأخرى .

الذوبان :-

يعتبر فيتامين ج من أكثر الفيتامينات ذوباناً فى الماء . حيث تصل نسبة ذوبانه إلى

٣٠ جم / ١٠٠ مل . وينوب بقلة فى الأسيتون والكحول ، وغير ذائب تماماً فى المذيبات الغير قطبية .

صوره وخواصه :

الصورة النقية عبارة عن مسحوق أبيض ، والصورة البلورية أبرية أو على شكل رقائق plates ، والوزن الجزيئى = ١٧٦, ١٢ ، ويتلف قبل أن ينصهر على ١٩٠ - ١٩٢ ° ، وأقصى امتصاص له على طول موجة ٢٤٥ nm (فى وسط حمضى) وعلى طول موجة ٢٦٥ nm (فى وسط متعادل) . وله جهد أكسدة وأختزال يساوى + ١,٦٦ فولت (على $P^H = ٤$) وله ثابتين انقسام الأول $pK_{a1} = ٤, ١٧$ ، والثانى $pK_{a2} = ١١, ٥٧$.

انتشاره ومصادره :

١ - فى النباتات : - ينتشر بكثرة وبتراكيزات عالية فى النباتات ، فيوجد فى الفواكه وفى الفراولة والحمضيات (الموالح) والجوافة والكريز وغيرها . وفى الخضر يوجد فى الكرنب والطماطم والفجل والذرة والبقونوس .

٢ - فى الحيوانات : - يوجد تقريباً فى كل الحيوانات ولكن يختلف تركيزه من عضو إلى عضو آخر وتركيزه فى القرنية < الغده النخامية < Adrenal cortex < Thymus < الكبد < المخ < الخصية < المبيض < الطحال < الغدة الدرقية < البنكرياس < الغدة اللعابية < الرئة < الكلى < الأمعاء الدقيقة < القلب < العضلات < كرات الدم البيضاء WBC < كرات الدم الحمراء RBC < البلازما .

٣ - فى الكائنات الحية الدقيقة : - لا تستطيع البكتريا المعوية تخليقه ، ما عدا البكتريا المعوية للفئران . وينتجه عديد من الفطريات . وتحتاج إليه البكتريا والخميرة والفطريات لعملية التضاعف multiplication .

المصادر الغذائية :

١ - المصادر الغنية : - (من ١٠٠ إلى ٣٠٠ ملجم / ١٠٠ جم) فى الفجل والفلل والبقونوس والكرنب المسلوق والجوافة والعنب الأسود .

٢ - المصادر المتوسطة : - (من ٥٠ إلى ١٠٠ ملجم / ١٠٠ جم) فى الكرنب والمسطردة والسبانخ والليمون والبرتقال والفراولة .

٣ - المصادر القليلة : - (من ٢٥ الى ٥٠ ملجم / ١٠٠ جم) فى الفول الأخضر والحمص والبصل والبطاطس وفول الصويا والبنجر الأخضر والجريب فروت والمانجو والكتالوب والطماطم .

الدور الغذائى والطبى : -

١ - وحدات فيتامين ج : - وحدة دولية واحدة IU = وحدة USP واحدة

= ٠,٠٥ ملجم حمض أسكوربيك

هذا ، وعادة ما يحسب تركيزه بالوحدات الوزنية (ملجم) .

٢ - المستويات الطبيعية فى الدم : - ٠,٥ - ١ ملجم % فى البلازما ، ٢٥ ملجم % فى كرات الدم البيضاء WBC . وتختلف تبعاً لنوع الغذاء .

٣ - المقررات الموصى بها : - للأطفال يوصى بـ ٤٠ ملجم / يوم ، وللبالغين ٦٠ ملجم / يوم للذكور و ٥٥ ملجم / يوم للإناث . وفى الحالات الخاصة تزيد إلى ٦٠ ملجم / يوم فى الحمل والرضاعة ، وتزيد عن ذلك فى حالات العنوى والإجهاد stress والتقدم فى السن وفى حالة زيادة استهلاك البروتين وفى حالات الحساسية allergies والجروح trauma . وأحسن طريق لإعطاء هو الفم ويمكن إعطاءه بالحقن فى العضل أو فى الوريد .

٤ - أعراض النقص : -

أ - الأعراض العامة : - ظهور بثرات ذات كيراتين عالية على الأرداف والسيقان، وأديما edema ، ونزيف دموى ، وعجز أو قصور فى إلتام الجروح ، و عيوب فى الأسنان واللثة ، وضعف وهزال وكسل ، وتخشن الجلد ، وآم فى المفاصل ، وتكوين عظام مصابة بالحفر (أسقربوطية scarbutic) .

ب - فى الحيوانات المعملية : - أنيميا ، وفقد الوزن، وتخليق كولاجين غير طبيعى ، وعدم تكوين المادة الأسمنتية اللاصقة بين الخلايا .

٥ - أمراض النقص : - الأسقربوط scurvy (تورم اللثة ونزف الدم منها) و ظهور أنيميا megaloblastic فى الأطفال .

٦ - مصادره للأجناس التى تحتاج إليه :

معظم الأجناس تحتاج إليه ، ومعظمها أيضاً تخلقه .

أ - المصادر الخارجية : - كل من الحيوانات الرئيسة primates (وهى تضم الإنسان) وخنزير غينيا وخفاش الفاكهة الهندي والبلبل الأحمر والثاقبات والخميرة ، كلها تحتاج إليه من مصادر خارجية .

ب - المصادر الداخلية : - باقى الفقاريات التى لم تذكر سابقاً واللافقاريات والنباتات وبعض الفطريات والبكتريا يمكنها تخليقه بداخلها ولا تحتاج إليه من مصدر خارجى .

٧ - تأثير الجرعات العالية :

لم تلاحظ أعراض جانبية نتيجة تناوله بكميات كبيرة فهو غير سام للإنسان ، ومن المحتمل أن يكون حصوات فى الكلى ، وله تأثير مثبط على مستوى الخلية (يثبط الأنقسام الميتوزى) . ربما يكون لحمض الديهيدوأسكوربيك dehydroascorbic acid تأثيراً مدمراً على الخلايا بيتا فى البنكرياس ، فيقل انتاج الأنسولين .

تحليل حمض الأسكوربيك

الفصل :

طرق تقدير وفصل حامض الأسكوربيك من النباتات والأنسجة الحيوانية والأغذية تتضمن الاستخلاص والتخلص من المواد المتداخلة clean up ، وأخيراً فصل أو تحليل الفيتامين فى المحلول . وكل من المذيبات المائية وغير المائية تستخدم فى الاستخلاص ، وفى حالة المستخلصات المائية فلا بد من أخذ الاحتياطات الكافية حتى لا يحدث تحليل مائى وأكسدة مما يعقبهما فقد للفيتامين خصوصاً عند وجود كميات صغيرة من الفيتامين فى العينة ، وأنسب المستخلصات المائية هى : -

١ - ٢ - ٦ ٪ حمض ميتافوسفوريك يحتوى على حمض خليك و EDTA .

٢ - ٠,٥ - ٢ حمض ألكساليك .

٣ - محلول ثلاثى كلورو حمض الخليك TCA مع EDTA .

٤ - حمض بيركلوريك perchloric acid مخفف .

٥ - ٥,٠ ٪ محلول 2,3- dimercaptopropanol .

ومن أهم مميزات حمض الميتافوسفوريك و TCA انهما يعملان على تقليل أكسدة حمض الأسكوربيك لأقل درجة ممكنة وذلك من خلال ترسيبهما لأيونات المعادن التي تعمل كعامل مساعد في الأكسدة . ومن ناحية أخرى ، فهما يرسبا البروتين وبذلك يصبح المحلول رائقاً . ويضاف حامض الخليك إلى المستخلص حتى يمنع فقد الفيتامين من الادمصاص على الفحم الحيواني .

والمذيبات الغير مائية المستخدمة في استخلاص فيتامين جـ من العينات المختلفة هي الأيثانول أو الميثانول ، وعادة ما يحتويان على آثار من حمض الميتافوسفوريك أو حمض أكساليك أو مادة مانعة للأكسدة مثل كلوريد القصديوز . وقد استخدم مخلوط من البنزين و dimethylformamide مع حمض سكسينيك للاستخلاص أيضاً . وبعض الطرق تضمنت استخدام الأسيتون في الاستخلاص للتخلص من ثاني أكسيد الكربون الموجود في الأغذية والذي يتداخل مع فيتامين جـ .

لا بد أن تتم عملية الاستخلاص بسرعة بعيداً عن الضوء وتحت غاز خامل قدر الامكان لتلافى التأثير الضار للضوء وللأكسجين خصوصاً عندما تكون كمية الفيتامين صغيرة . ثم ترويق المستخلص والتخلص من الشوائب فيه ، وهذا يعتمد على طبيعة المواد المتداخلة الموجودة في العينة وعلى نوع المحلول . وعادة ما تتم هذه العملية باستعمال الكربون للتخلص من اللون decolorization أو بالأعمدة الكروماتوجرافية والاستخلاص بمذيب يحتوي على كلوريد الميثيلين للتخلص من المواد المتداخلة . وأحسن الغازات الخاملة التي تم استخدامها لحماية الفيتامين في المحلول قبل التقدير أو الفصل هي الهيدروجين وكبريتيد الهيدروجين ، والغاز الأخير طبق بنجاح عن غاز ثاني أكسيد الكربون أو النيتروجين .

ومن أحسن المصادر المستخدمة لفصل فيتامين جـ هي عصائر الحمضيات و adrenal cortex . هذا ويتم ترسيب فيتامين جـ من المستخلصات الرائقة في صورة معقد مع الرصاص ثم يبلور من مخلوط كحول و إثير بترولى .

طرق التقدير :

١ - الطرق الحيوية : - أول تقدير حيوى لفيتامين ج اعتمد على الوقاية من مرض الاسقربوط (اختبار ال prophylactic test) أو علاجه (اختبار علاجي curative test) فى خنازير غينيا . وهذه الطرق تستهلك وقتاً طويلاً ، وتتطلب حوالى ١٠ أسابيع للوصول إلى تمام استنزاف الفيتامين .

وقد تم استبدالها بالطرق الأخرى (الكيمائية والكيمائية الطبيعية والكروماتوجرافية) والتي تتميز بسرعتها وقلة تكاليفها . ولكن مازالت تستخدم الطرق الحيوية لأغراض المقارنة مع الطرق الأخرى . وحتى اليوم لم تكتشف طريقة ميكروبيولوجية بسيطة لتقديره ، ويرجع ذلك إلى عدم وجود الميكروب الذى يتطلب فيتامين ج بصورة مطلقة .

٢ - الطرق الكيمائية : - أول تقدير كيميائى لفيتامين ج كان بالمعايرة التأكسدية مع صبغة ٦,٢ ثنائى كلوروفينول أندوفينول (DCPIP) وقد أدخل عليها تعديلات عديدة ، ومازالت تستعمل حتى الآن بكفاءة عالية . وتستعمل العوامل المؤكسدة التالية فى تقديره ، وهي N-bromosuccinamide , pot. hexacyanoferrate III , Iodine . chloramine, 1,2-dinaphthoquinone -1- sulfonic acid, methylene blue .

ويعاب على هذه المواد عدم تخصصها ، وتتداخل المواد المختزلة الأخرى الموجودة فى الأغذية والمنتجات الطبيعية فى التقدير مثل ثانى أكسيد الكبريت والأحماض الأمينية وأيونات المعادن الصبغات النباتية والكيوتونات المختزلة reductones . لذا يجب التخلص هذه المواد المتداخله قبل التقدير . وتتضمن الطرق النموذجية للتخلص من ثانى أكسيد الكبريت معاملة العينة بالنيتروجين أو أسيتون أولاً ، وترسيب الأحماض الأمينية والبروتينات والأيونات المعدنية . وتستعمل الطرق الكهربية electrometric methods لتلافى تأثير الكيوتونات المختزلة . ويتم ربط الأحماض الأمينية الكبريتية (تتداخل فى المعايرة بواسطة o-iodobenzoate) بعملية cyanoethylation . وتفضل هذه الطريقة لتقدير فيتامين ج فى المستحضرات الطبية والأغذية والسوائل الحيويه . كما تستخدم بعض الطرق (kits) أحد مشتقات التترازوليم كعامل مؤكسد ، ويحدث فيها أيضاً بعض التداخلات ، ولكن يقدر البلاك فيها بتحضير العينة مع أنزيم L-ascorbate oxidase والفرق بينهما يعبر عن كمية فيتامين ج الفعلى . وقد استخدمت طريقة لونية لتقدير الفيتامين حيث تعتمد على تكثيف حمض الاسكوربيك مع

أحد مشتقات النيتروأنيلين أو مع معقد من أيونات الحديدوز وأحد مشتقات التراى أزين triazine فتتكون نواتج ملونة يمكن قياسها بجهاز قياس الألوان ، وتم تطوير هذه الطريقة بحيث تطبق أتماتيكياً (آلياً) لتحليل فيتامين ج في المستحضرات الطبية والأغذية .

٣ - الطرق الأسبكتروفوتومترية : -

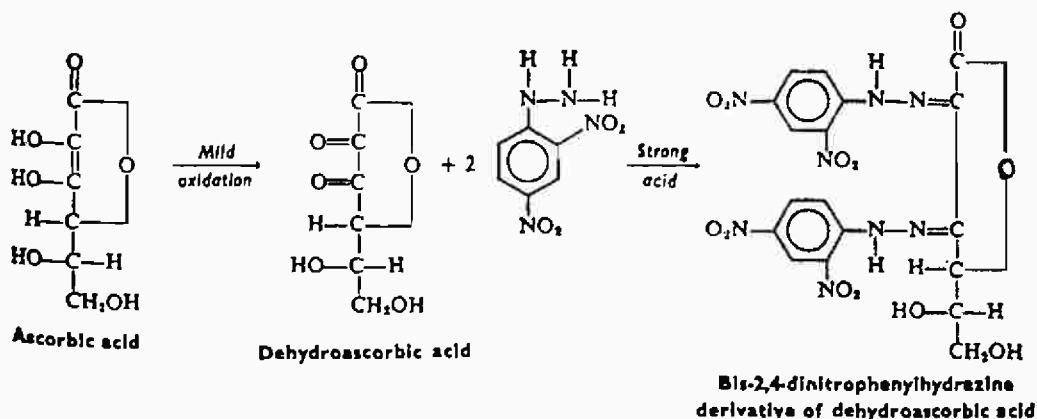
حيث أن حمض الأسكوربيك نفسه يمتص الموجات فوق البنفسجية UV بقوة ، وعليه قد تم تقديره سبكتروفوتومترياً مباشرة وبعد استخلاصه بصورة نقية من المشروبات والفواكه والمستخلصات النباتية . ولكن يقاس امتصاص نفس العينة قبل وبعد التحضين مع أنزيم L-ascorbate oxidase ، والفرق بينهما يعبر عن كمية الفيتامين .

٤ - طرق ضوئية (فوتومترية) : -

تعتمد هذه الطريقة على تكوين لون مع (DNPH) 2,4-dinitrophenylhydrazine باكسدة حمض الأسكوربيك إلى حمض ديهيدرو أسكوربيك ثم تحليله مائياً إلى 2,3-L-gulonic dioxoacid والذي يتفاعل مع DNPH ويتكون dinitrophenylhydrazone لون أحمر (شكل ٣٥). وتتداخل في هذا التقدير أيضاً السكريات الخماسية والسداسية وحمض الجلوكورونيك والـ reductone والأحماض الامينية .

٥ - طرق كهربية : -

استخدم حديثاً طريقة كهربية سريعة لتقدير فيتامين ج مباشرة تعتمد على أكسدة بالهواء الجوى إلى حمض ديهيدرو أسكوربيك والذي يقاس بأستعمال chronoamperometry . واستخدم وأنزيم L-ascorbate oxidase لتصحيح المواد المتداخلة. وهذا ، وقد حضرت أقطاب مختارة تحتوى على أنزيم L-ascorbate oxidase ، فهذه الأقطاب الأنزيمية حساسة فقط لحمض الأسكوربيك ولا تستجيب لأي مادة متداخلة أخرى ، وهذه أدق طريقة استخدمت بدون أى تداخل يذكر .



The dinitrophenylhydrazine reaction for vitamin C.

شكل (٣٥) تفاعل DNPH مع حمض الاسكوربيك

٦ - الطرق الكروماتوجرافية :

طبق تقنية الـ HPLC و GC فى تقدير حمض الاسكوربيك فى المواد الحيوية ، وأيضاً لهذه الطرق أهميتها الخاصة فى التقدير من حيث الدقة وعدم تداخل المواد فى التقدير .

تقدير الأسكوريات فى البول بالمعايرة بصبغة

(Harris and Ray , 1935) DCPIP

كما سبق القول أنه مازالت تستخدم طريقة المعايرة بصبغة DCPIP لتقدير فيتامين ج حتى الآن ، وهى تعتمد على الخواص الاختزالية للفيتامين والخواص التأكسدية للصبغة . وتعتبر هذه المعايرة بطبيعة الحال معايرة أكسدة واختزال redox titration ، فمعايرة محلول الصبغة بواسطة محلول حمض الاسكوربيك فى الوسط الحمضى يؤدى إلى اختزال اللون الأزرق للصبغة وتتحول إلى الصورة المختزلة عديمة اللون colorless leucobase ، بينما تتأكسد الأسكوريات متحولة إلى dehydroascorbate . ويمكن تقدير الأخير باختزاله أولاً إلى أسكوريات فى الوسط الحامضى بواسطة hydrogen sulphide . ومن ناحية أخرى فإن

المواد المختزلة التي ربما قد توجد مصاحبة للأسكوربات ، خصوصاً في البول ، تتفاعل مع الصبغة ، وعلى ذلك فإنها تؤثر على كفاءة الطريقة ودقتها .

الجواهر الكشفية :

١ - حمض خليك ثلجي .

٢ - محلول صبغة ٦,٢ ثنائي كلوروفينول أندوفينول DCPIP : - يوزن بالضبط ٤٠ ملجم من الصبغة ثم تذاب في ١٠٠ مل ماء مقطر (١ مل من محلول هذه الصبغة يكافئ ٠,٢ ملجم حمض أسكوريك) . وحيث أن هذا المحلول يتلف بسرعة (لا يستعمل بعد تخزينه لمدة أكثر من أسبوع) ، لذلك لابد من استعمال محلول حديث التحضير أو تضبط قوته بالمعايرة بمحلول قياس من حمض الأسكوريك. ويتم ذلك بإذابة ٤٠ ملجم حمض أسكوريك نقي جاف في ١٠٠ مل حمض خليك ١٠ ٪ ثم يخفف ٥ مل منه إلى ١٠٠ مل بحمض الخليك ١٠ ٪ ، ويعاير ٠,٥ مل من الصبغة بهذا المحلول .

التكنيك :

١ - يؤخذ ٠,٥ مل من محلول الصبغة في أنبوبة اختبار (١٥ × ٢,٥ سم) ثم يضاف إليها ١,٠ مل حمض خليك ثلجي .

٢ - تجرى المعايرة بمحلول البول ببطء مع مراعاة الرج الثابت حتى يظهر اللون الأحمر للصبغة ، ثم يسجل حجم البول اللازم لهذه المعايرة .

الحساب :

حيث أن ٠,٥ مل محلول صبغة (٤٠ ملجم / ١٠٠ مل) تتفاعل مع ٠,١ ملجم حمض أسكوريك . ، فعلى ذلك يمكن حساب كمية الفيتامين في البول من المعادلة التالية : -

$$\text{Urinary ascorbate (mg / l)} = \frac{100}{\text{ml urine required}}$$

طريقة أخرى :

وفي هذه الطريقة يخلط جزء من البول مع كمية من حمض الخليك الثلجي

مقدارها تُسع (١/٩) حجم عينة البول ، ثم يقدر الحجم اللازم منه لاختزال ٠,٥ مل من محلول الصبغة . وهذا يضمن تركيز متساوى من حمض الخليك ، وتحسب كمية الأسكورات من المعادلة التالية : -

$$\text{Urinary ascorbate (mg /1)} = \frac{100}{\text{ml urine required}}$$

ملاحظات : -

١ - تتم عملية المعايرة بعينات طازجة (خلال بضع دقائق من بعد أخذ العينة) لأن الفيتامين يتأثر بالهواء الجوى ، كما وإن حالة البول عادة ما تكون حامضية (يفقد الفيتامين بسرعة) ، لذلك لابد من إضافة حمض الخليك لعينة البول مباشرة وبسرعة بعد أخذ العينة وبنسبة جزء حمض خليك إلى ٩ أجزاء من البول . وفى هذه الظروف يمكن حفظ العينة لمدة ساعات .

غالباً ما يتم هذا التقدير على عينات البول تم تجميعها كجزء من اختبارات التشبع ، واختبار التشبع بـ حمض الأسكوربيك هو أحدها ، حيث تتم المعايرة فى الحال . وتضاف كمية كبيرة من حمض الخليك إلى البول لوقاية العينات لمدة ٢٤ ساعة ، ولكن تقدير حمض الأسكوربيك فى هذه الحالة يكون غير ملائم .

٢ - المواد الاختزالية الأخرى ، خصوصاً مركبات السلفهيدريل sulphhydryl ، والتي ربما قد توجد فى البول ، تتفاعل أبطء من حمض الأسكوربيك على درجة $\text{pH} = 3$ ، لذلك فهذه الطريقة تكون دقيقة بدرجة كافية لمعظم الأغراض الكلينيكية . أما فى اختبارات التشبع ، حيث توجد كمية كبيرة جداً من الأسكورات ، فيكون تأثير هذه المواد المتداخلة قليل الأهمية لدرجة أنها تهمل .

التفسير : -

كمية الأسكورات المفرزة (output) فى اليوم عادة ما تكون حوالى ٢٠ - ٣٠ ملجم ، وهى حوالى نصف المأخوذ يومياً . والحد الأدنى للمأخوذ يومياً والذي يلزم للوقاية من مرض الأسقربوط يبلغ حوالى ٦٠ ملجم . وفى حالات نقص الفيتامين ، غالباً ما تختفى الأسكورات من البول ، والكميات الصغيرة المقدرة فى هذه الحالات ربما تعزى للمواد المختزلة الأخرى .

وأخيراً ، كمية المفرز منه خلال ٢٤ ساعة ليس دليلاً جيداً لحالة نقص الفيتامين ، ولكن يلزم إجراء اختبار التشبع .

اختبارات تشبع حمض الأسكوربيك Ascorbic acid saturation tests

فى هذه الاختبارات يفترض ما يلى : - لو كانت كمية الفيتامين التى سبق تناولها غير كافية ، فإن الأنسجة سوف تأخذ كميات كبيرة جداً من حمض الأسكوربيك عند اعطائه حين إجراء الاختبار ، لذلك فإنه تفرز كمية صغيرة منه فى البول أو ربما لا يفرز نهائياً (يأخذ بالكامل) . أما فى حالة الأشخاص الذين يتناولون كميات كافية من الفيتامين ، فإن الكمية المفرزة فى البول نتيجة تناول حمض الأسكوربيك حين إجراء الاختبار تكون متناسبة مع كمية الفيتامين المعطاه . وفى هذا الاختبار تعطى جرعات مختلفة ومعلومة من الفيتامين إما عن طريق الفم orally أو بالحقن فى الوريد ثم تجمع عينات البول على فترات زمنية مختلفة ويقدر فيها الفيتامين .

التكنيك : -

١ - يعطى الشخص جرعة من حمض الأسكوربيك مقدارها ١١ ملجم فيتامين لكل كيلو جرام من وزن الجسم عن طريق الفم (متوسط وزن الجرعة للشخص البالغ يبلغ حوالى ٧٠٠ ملجم) . وتعطى هذه الجرعة فى الماء إما والشخص صائماً أو بعد ساعتين أو ثلاث ساعات من تناول الوجبة الغذائية .

٢ - تجمع فقط عينة بول بعد فترة زمنية قدرها ٤ - ٦ ساعات من تناول الجرعة عندما يكون الإفراز أقصى ما يمكن maximal .

٣ - تقدر كمية الفيتامين فى البول ومنها تحسب كمية الفيتامين المحتبسة فى أنسجة الجسم .

ويمكن تقدير الاختبار كما يلى : -

١ - الساعة ١٠٠٠ تعطى جرعة فيتامين ج مذابة فى حوالى ١٥٠ مل ماء .

٢ - الساعة ١٤٠٠ تفرغ المثانة بالكامل ويستبعد البول .

٣ - الساعة ١٦٠٠ تفرغ المثانة بالكامل ويقدر محتوى حمض الأسكوربيك فيها فى

الحال كما سبق شرحه فى الطريقة السابقة . ويكرر الاختبار يومياً حتى نحصل على استجابة طبيعية .

التفسير : -

فى حالات تناول فيتامين ج بصورة طبيعية لابد أن يكون الخارج منه حوالى ٥٠ ملجم فى اليوم الأول والثانى ، وفى حالات النقص المتوسطة ، نجد أن هذه القيمة تقل ، ولابد من أنقضاء ٦ - ١٠ أيام حتى نحصل على القيمة الطبيعية (٥٠ ملجم) ، أما فى حالات النقص الحاد ، ربما يلزم ١٤ - ٢١ يوم حتى نبلغ المستوى الطبيعى السابق ذكره .

فى حالات النقص ، النتائج تبين إفراز ظاهرى يبلغ ٢ ملجم أسكوروبات وهذه قيم خاطئة ترجع إلى المواد المختزلة الأخرى ، وتظل هذه القيمة ثابتة حتى تتعدل حالة النقص . ويزداد محتوى عينات البول من الأسكوروبات يوم بعد يوم حتى يبلغ ٤٠ - ٥٠ ملجم (الكمية الموجودة فى الحالات الطبيعية) . وفى حالة عينات البول الغنية بالأسكوروبات يجب تخفيفها من ٥ - ١٠ أضعاف بالماء المقطر قبل المعايرة حتى يقل الخطأ التجريبى .

هذا الاختبار أنتقد ، ولكنه من الناحية العملية يكون ملائماً وكافياً ، كما أن إى حالة نقص فى الأسكوروبات تعالج أثناء اجراء الاختبار .

تقدير حمض الأسكوريك فى البلازما بالمعايرة بوسط DCPIP
(Varley,1988)

الجواهر الكشفية : -

١ - جوهر الترسيب : مخلوط ثلاثى كلورو حمض الخليك TCA (١٠٠ جم / لتر) وحمض ميتافوسفوريك (٥٠ جم / لتر) حديث التحضير .

٢ - محلول صبغة ٦,٢ ثنائى كلوروفينول أنثرفينول : - تحضر كما سبق ، ثم يخفف ٥ مل منه إلى ٢٥ مل ، وعليه فكل ١,٠ مل يكافىء ٤٠ ميكروجرام حمض أسكوريك .

الطريقة : -

١ - يخلط حجمين متساوين من البلازما المفصولة بسرعة مع جوهر الترسيب (٤ مل من كل منهما) .

٢ - يرشح المحلول الناتج ، أو يطرد مركزياً .

٣ - يؤخذ ٠,٢ مل من الصبغة المخففة فى أنبوبة اختبار وتعاير بالمحلول الرائق المتحصل عليه من البلازما حتى يختفى اللون الأزرق ويظهر لون محمر reddish

الحساب :

حيث أن ٢٠٠ المليمتر من محلول الصبغة يكافئ ٨ ميكروجرام أسكورات ، فإنه يمكن تطبيق المعادلة التالية لنحصل على تركيز الأسكورات فى البلازما :

$$\text{Plasma ascorbate (mg / l)} = \frac{16}{\text{ml titration}}$$

ملاحظات :

١ - بالرغم من ان حمض الميتافوسفوريك له ميزة عن الـ TCA ، إلا أن صورته الصلبة غير ثابتة بمجرد فتح زجاجته ، ولكن ثبات الـ TCA يكون كافى ولأبعد الحدود .

٢ - يمكن تجميع عينات الدم فى هيبارين أو EDTA أو أكسالات ، ومن المستحسن فصل البلازما ومعايرتها بمجرد فصلها ، ولكن إذا دعت الضرورة تخزين البلازما ، فيمكن تخزين المحلول الرائق الخالى من البروتين لعدة ساعات على ٢٠° م . ويمكن جمع ٤ - ٥ مل من الدم فى أنبوبة اختبار تحتوى نقطة واحدة من محلول سيانيد بوتاسيوم (٥٠ جم / لتر) ونقطة من محلول أكسالات بوتاسيوم (٢٠٠ جم / لتر) .

التفسير :

مستويات الأسكورات فى البلازما تكون محدودة (صغيرة جداً) فى حالات النقص الشديد من هذا الفيتامين . ومع تناول وجبة متزنة ، تكون مستويات الأسكورات ٤ - ٢٠ ملجم / لتر ، وغالباً ما تكون ٨ - ١٤ ملجم / لتر . المستويات التى أقل من ٢ ملجم / لتر توحى بأنه توجد حالة نقص ملحوظة . وتختفى الأسكورات من البلازما بسرعة أكبر عما يحدث فى الخلايا عندما تحتوى الوجبات الغذائية على كميات صغيرة من فيتامين ج ، وخلايا الدم البيضاء فى آخر خلايا يظهر فيها هذا النقص ، وعلى ذلك فإن تقديره فى كرات الدم

البعضاء يستخدم كأفضل دلالة على النقص الحاد في هذا الفيتامين . ويتباين تركيز الاسكوريات تبايناً كبيراً باختلاف كمية ما يتناوله الشخص من الموالح ، فالأشخاص الذين يتناولون كميات كبيرة منها يزيد تركيز الاسكوريات في دمهم عن غيرهم من الناس الذين يتناولون طعاماً أقل في محتواه من حمض الاسكوربيك .

وتركيز حمض الاسكوربيك في البلازما يعتبر دليلاً كافياً موثقاً به للحالة الغذائية فيما يختص بفيتامين جـ (دلالة على حالته هل هي طبيعية أم هناك نقص) ولكن بعض الباحثين يفضل إجراء اختبار التشبع لتحديد هذه الحالة .

تقدير حمض الأسكوربيك في الأنسجة النباتية بطريقة DCPIP

(Schanderl , 1970)

تعتمد هذه الطريقة على تفاعل حمض الاسكوربيك مع صبغة DCPIP والتي تختزل إلى مركب غير ملون ، وهذا التفاعل يسير بنسبة مكافئة لمكافئة stoichimetric ، ويتم المعايرة في وسط حامضي لتلافى الأكسدة الهوائية (والتي تتم بمساعد الأيونات المعدنية) ، ولوقف نشاط الأنزيمات ولترسيب البروتينات وتحرير حمض الاسكوربيك المرتبط بالبروتين . وقد عدلت هذه الطريقة على أساس لوني حيث تضاف كمية زائدة من الصبغة ثم يقاس الجزء الغير متفاعل منها لونياً . ومن أهم مميزات الطريقة المعدلة هو استخلاص الصبغة الزائدة بالزيلين عند وجود صبغات نباتية أو عكارة في العينة تتداخل مع التقدير .

الجواهر الكشفية :-

١ - محلول حمض ميتافوسفوريك - خليك :- يذاب ١٥ جم حمض ميتا

فوسفوريك في مخلوط يحتوى على ٤٠ مل حمض خليك ثلجي و ٤٠ مل ماء ، ثم يرشح المحلول ويخزن في الثلاجة . يتلف هذا المحلول بعد ١٠ أيام .

٢ - محلول صبغة DCPIP قياسي :- يذاب ٤٢ ملجم بيكربونات صوديوم و

٥٢ ملجم صبغة DCPIP في ٥٠ مل ماء ، ثم يخفف إلى ٢٠٠ مل . ترشح وتخزن في الثلاجة لمدة لاتزيد عن ٣ أيام ، ولضبط قوتها يذاب ١٠٠ ملجم حمض أسكوربيك نقى في ١٠٠ مل محلول حمض ميتا فوسفوريك - خليك ، ويؤخذ ١٠ مل منه وتخفف بـ ٢٥ مل من حمض ميتافوسفوريك - خليك ، وتعاير بمحلول

الصبغة حتى اللون الوردي الخفيف pink الذى يثبت لمدة ٥ ثوان . تقدر من هذه المعايرة قوة محلول الصبغة ، ويعاد ضبط قوة الصبغة كل يوم بمحلول حمض أسكوربيك قياسى حديث التحضير .

الطريقة :-

- ١ - تجهز وزن معلوم من العينة النباتية بحيث يحتوى على ٥ - ٥٠ ملجم حمض أسكوربيك مع ١٥٠ مل من محلول حمض ميتافوسفوريك ، خليك فى خلاط ، ثم يخفف إلى ٢٠٠ مل بالضبط ويرشح .
- ٢ - يعاير حجم معلوم من الراشح الناتج (١٠ - ١٠٠ مل) مع محلول الصبغة القياسى حتى اللون الوردي الخفيف .

الحساب :-

عدد ملجرامات حمض الاسكوربيك لكل حجم عينة = $D \times S \times V$

حيث أن :-

V = عدد ملليترات الصبغة المستخدمة فى المعايرة .

S = تركيز الصبغة معبراً عنه بملجم حمض الاسكوربيك / مل .

D = عامل التخفيف .

تقدير حمض الاسكوربيك فى خلايا الدم البيضاء

(Gibson et al. , 1966)

حتى يمكن إجراء هذا التقدير لابد أولاً فصل كرات الدم البيضاء من الدم ، ثم يقدر بعد ذلك محتواها من الفيتامين . يخفف الدم مباشرة بعد أخذه بمحلول تخفيف فسيولوجى يتركب من كلوريد صوديوم ٠,٨ ٪ و EDTA كعامل مانع للتجلط و دكستران dextran الذى يعمل على تكوين غلاف حول كرات الدم الحمراء (يفلفها rouleaux) ، وهذا بدوره يؤدي إلى زيادة وزنها فترسب بسرعة عند تركها فترة فى القاع بتأثير الجاذبية الأرضية . أما كرات الدم البيضاء والصفائح الدموية فتبقى معلقة suspend فى البلازما والتي يمكن فصلها بسهولة عن طريق الطرد المركزى ، ثم يتم تقدير الأسكوريات فيها بالاستخلاص أولاً بمحلول

ثلاثي كلورو حمض الخليك TCA (يرسب كل البروتينات) ، ثم تقاس الأسكوريبات بطريقة
2,4 - dinitrophenylhydrazone (DNPH) .

الجواهر الكشفية :

١ - محلول التخفيف : - يخلط ٢٠٠ مل من محلول NaCl (٠.٨٥ ٪) و ٥٠ مل من
محلول دكستيران (٦٠ جم / لتر) و ٢٠ مل من محلول EDTA (ملح ثنائي
الصوديوم ، ١٠٠ جم / لتر) معاً جيداً ، ثم تؤخذ منها حجوم متساوية مقدارها
١٢,٥ مل فى أوعية خاصة بغطاء screw-cap ، وتعقم فى الأوتوكلاف على
ضغط 5 psi (35 Kpa) لمدة ١٥ ق .

٢ - محلول ثلاثي كلورو حمض الخليك TCA (٥٠ جم / لتر) .

٣ - جوهر اللون colour reagent : - تخط المحاليل التالية بهذه النسب ٢٠ : ١ : ١
كما يلى :

أ - محلول DNPH : - ٢٢ جم / لتر من حمض كبريتيك ١٠ mol / لتر .

ب - محلول ثيويوريا thiourea : - ٥٠ جم / لتر ماء .

ج - محلول كبريتات نحاس : - ٦ جم $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ / لتر ماء .

د - محلول حمض كبريتيك : - يضاف ٦٥٠ مل حمض كبريتيك مركز إلى ٢٥٠ مل
ماء مقطر .

هـ - محلول حمض أسكوريك قياسى : - ١٠ ملجم حمض أسكوريك نقى تذاب فى
لتر من الجوهر رقم ٢ .

التكنيك :

١ - تؤخذ عينة دم ويريدى مقدارها ٦ - ١٠ مل ثم تضاف بسرعة وفى الحال إلى وعاء
التخفيف المعقم السابق تحضيره .

٢ - تخط المحتويات جيداً وتترك فى وضع أفقى لمدة ٣٠ ق حتى ترسب كرات الدم
الحمراء قبل إزالة المحلول الرائق .

٣ - يؤخذ المحلول الرائق ثم يطرد مركزياً على ٣٠٠٠ rpm لمدة ١٥ ق ، ويهمل

الرائق ، ثم يسمح للأنبوبة بأن يخرج منها ما تبقى من محلول رائق لمدة ٢٠ ثانية. وبذلك نحصل على رواسب كرات الدم البيضاء والصفائح الدموية .

٤ - يضاف ١,٢ مل جوهر TCA ، ثم تخلط جيداً وتطرد مركزياً ، ويؤخذ من المحلول الرائق ١,٠ مل إلى أنبوبة اختبار صغيرة .

٥ - فى أنابيب اختبار أخرى يوضع ما يلى :-

أ - ١,٠ مل محلول TCA (بلانك) .

ب - ٠,٥ مل محلول TCA و ٠,٥ مل حمض أسكوربيك قياسى (S₁) .

ج - ١,٠ مل محلول حمض أسكوربيك قياسى (S₂) .

٦ - يضاف إلى كل الأنابيب ٠,٢ مل جوهر اللون ثم تحضن فى حمام مائى على ٢٧°م لمدة ٤ ساعات ، ثم تبرد فى ماء مثلج .

٧ - يضاف ٢,٠ مل محلول حمض كبريتيك ببطء لكل أنبوبة ، ثم تخلط المحتويات ويقاس امتصاص اللون على طول موجة ٥٢٠ nm ضد البلانك .

٨ - تعد كرات الدم البيضاء فى الباقي من معلق كرات الدم البيضاء الأصلية باستعمال تخفيف ١ إلى ٥٠ فى coulter counter مع مراعاة طرح ال background blank .

هذا، ومن المفضل إجراء التقديرات الكيميائية والسيتولوجية cytological مرتين duplicate .

الحساب :-

يمكن حساب محتوى الأسكورات فى المحلول الرائق من هذه المعادلة :

$$\text{Supernant ascorbate content (mg/l)} = \frac{\text{Read of unknown}}{\text{Read of standard}} \times 5 \text{ or } 10$$

وهذا العامل المستخدم يعتمد على حجم المحلول القياسى المستخدم ، وهو يساوى 5 فى

حالة (S₁) ويساوى 10 فى حالة (S₂)

لوزم الأمر يمكن إجراء منحنى خطى قياسى باستعمال حجوم أخرى ومختلفة من

المحلول القياسى وتكمل كل منها إلى ١,٠ مل بمحلول ال TCA .

ويمكن نسب هذا التقدير إلى عدد كرات الدم البيضاء بتطبيق هذه المعادلة :-

$$\text{Buffy layer (leucocyte + platlet) ascarbate } (\mu\text{g} / 10^8 \text{ leucocytes}) = \frac{\text{Supernatant as corbate (mg / l)} \times 1.3}{\text{Leucocyte Count} / \mu\text{l supernatant}}$$

التفسير :-

تركيز الأسكوريبات في كرات الدم البيضاء والصفائح الدموية يكون مماثلاً لما هو في الدم الطبيعي ، فلو كان الرقم في كلاهما غير طبيعي (شاذ) ، فالطريقة المتبعة تعطي تقديراً خادعاً لتركيز الأسكوريبات في خلايا الدم البيضاء ، ويمكن حساب هذا التركيز الصحيح من نتائج الـ buffy layer بالقسمة على ٢,٠ لو كان عدد كرات الدم البيضاء والصفائح الدموية طبيعى . وفي حالة thrombocytopenia مع عدد كرات دم بيضاء طبيعي، فإن العامل يقل ويصبح ١,٣ وهذا الرقم ربما يستخدم في حالة الـ relative thrombocytopenia ، عندما يزداد عدد كرات الدم البيضاء ولا يكون هناك تناسب بينها وبين الصفائح الدموية . وفي حالات الـ thrombocythaemic سواء المطلقة absolute أو النسبية relative فإن هذا العامل يصبح ٣,٠.

المدى الطبيعي والذي يرجع اليه الـ buffy layer هو ٢١ - ٧٥ ميكروجرام لكل ٨٠٠ خلية دم بيضاء وكرات الدم البيضاء فقط هو ١١ - ٢١ ميكروجرام لكل ٨٠٠ خلية دم بيضاء

تقدير فيتامين ج في المستحضرات الصيدلانية بطريقة

U.S. Pharmacopeia (1985)

في هذه المستحضرات يكون تركيز فيتامين ج كبيراً جداً . وتحت هذه الظروف يمكن تقديره بالمعايرة بمحلول يود قياسي في وجود دليل مناسب (دليل النشا) . حيث يتفاعل كل منهما مع الآخر فتفاعل أكسدة وأختزال ، فيقوم اليود باكسدة حمض الاسكوربيك إلى حمض ديهيدرو أسكوربيك ويختزل اليود إلى أيون يوديد مع مراعاة إجراء التفاعل في ظروف حامضية وخالية من غاز ثاني أكسيد الكربون .

الجواهر الكشفية :

١ - محلول يود في يوديد بوتاسيوم (١ ، ٠ N) .

٢ - محلول حمض كبريتيك (٢ N) .

٣ - محلول دليل النشا (١٪) .

التكنيك :

١ - يوزن حوالى ٤٠٠ ملجم مستحضر حمض الأسكوربيك بالضبط ثم يذاب فى مخلوط مكون من ١٠٠ ماء خالى من CO_2 و ٢٥ مل محلول حمض الكبريتيك (يمكن التقدير فى المستحضرات السائلة بتعديل الطريقة تعديلاً بسيطاً حتى يتلائم مع ظروف التقدير) .

٢ - يعاير المخلوط فى الحال بمحلول اليود القياسى حتى أول نقطة تعطى لون أصفر و يختفى بالتقليب .

٣ - يضاف ٢ مل محلول دليل النشا كدليل لتحديد نقطة النهاية ثم تكمل المعايرة حتى أول نقطة يتلون عندها المحلول باللون الأزرق ، ثم تؤخذ قراءة السحاحة .

الحساب :

يحسب تركيز حمض الأسكوربيك على أساس أن :

كل ١٠٠ مل محلول يود قياس قوته ١ ، ٠ N تكافى ٨ ، ٨٠٦ ملجم فيتامين ج .

تقدير حمض الأسكوربيك فى البلازما بطريقة DNPH

تستخدم هذه الطريقة بكثرة لتقدير حمض الأسكوربيك فى البلازما أو السوائل الحيوية الأخرى . وفى هذه الطريقة يتفاعل حمض الأسكوربيك مع DNPH بعد أكسده الفيتامين إلى dehydroascorbic acid (شكل ٣٥) . وهذه الطريقة لايمكنها التمييز بين الصورتين النشطتين حيويًا وبين المركب الغير نشط حيويًا وهو diketogulonic acid . وتتضمن الطريقة أكسده حمض الأسكوربيك الى dehydroascorbic acid إما بواسطة كبريتات نحاس أو بواسطة صبغة DCPIP .

الـ dehydroascorbic acid فى محلول الحمض القوي يتفاعل مع DNPH مكوناً

مشتق dinitrophenylhydrazone ، وهذا المشتق فى وجود محلول حمض الكبريتيك يعطى لوناً أحمرأً والذي يمكن قياسه على طول موجة ٥٢٠ nm فى وجود بلانك . وتضاف الثيوريوريا إلى جوهر DNPH لمنع أكسدة الجوهر (DNPH) عن طريق المواد المتداخلة . وحيث أن عينات الدم تحتوى على كميات صغيرة جداً من dehydroascorbic acid أو diketogulonic acid ، فإن كل من طريقة الـ DNPH وطريقة DCPIP يعطيا نفس النتائج .

الطريقة الأولى (Nino and Shaw ,1982)

الجواهر الكشافة :-

١ - محلول حمض ميتافوسفوريك metaphosphoric acid (٦٠ جم / لتر) :-
يذاب ٣٠,٠ جم من حمض metaphosphoric acid (HPO₃) فى ماء مقطر
ويكمل الحجم الى ٥٠٠ مل . يحضر هذا المحلول قبل الاستعمال مباشرة
(يستخدم حديث التحضير) .

٢ - محلول حمض كبريتيك (٤,٥ M) :- يضاف ببطء ٢٥٠ مل من حمض
الكبريتيك المركز (AR) إلى ٥٠٠ مل ماء مقطر بارد فى دورق لتر ، ثم يترك ليبرد
ويكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر .

تحذير :- حيث أن هناك كمية حرارة كبيرة تتكون عند تخفيف حمض الكبريتيك
المركز ، فلا بد من وضع الدورق فى حمام ثلجى ويضاف الحمض المركز ببطء
شديد مع مراعاة خلط المحلول باستمرار بعد كل إضافة .

٣ - محلول حمض كبريتيك (١٢ M) :- يضاف ٦٥٠ مل حمض كبريتيك مركز (AR)
إلى ٣٠٠ مل ماء مقطر ثم يكمل إلى لتر بالماء المقطر ، ويراعى تحضيره مثل
الجوهر رقم (٢) .

٤ - جوهر DNPH (٢٠ جم فى لتر حمض كبريتيك ٤,٥ M) :- يذاب ١٠ جم من
2,4-dinitrophenylhydrazine فى قليل من جوهر رقم (٢) ، ثم يكمل بنفس
المحلول إلى ٥٠٠ مل ، ثم يترك المحلول فى الثلاجة طوال الليل ، يرشح بعد ذلك .

٥ - محلول الثيوريوريا (٥٠ جم / لتر) :- يذاب ٥ جم من الثيوريوريا فى قليل من
ماء مقطر بجهاز تقطير زجاجى ، ثم يكمل المحلول إلى ١٠٠ مل بنفس الماء المقطر .

هذا المحلول ثابت لمدة شهر على ٤ ° م .

٦ - محلول كبريتات نحاس (٦ جم / لتر) :- يذاب ٠,٦ جم من كبريتات النحاس اللامائية فى ماء مقطر بجهاز تقطير زجاجى ، ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠ مل .

٧ - جوهر CuSO_4 - thiourea - DNPH (DTCS) :- يضاف ٥ مل من محلول الثيوبوريا و ٥ مل من محلول كبريتات النحاس إلى ١٠٠ مل من محلول DNPH ، ثم يخزن فى زجاجة على ٤ ° م لمدة أقصاها أسبوع واحد .

٨ - المحاليل القياسية :- جميع محاليل حمض الأسكوربيك القياسية لابد من تحضيرها طازجة يوم بيوم .

أ - Ascorbic acid stock standard (٥٠٠ ملجم / لتر) :- يذاب ٥ ملجم حمض أسكوربيك نقى فى قليل من جوهر رقم (١) ، ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠ مل .

ب - Intermediate ascorbic acid standard (٥٠ ملجم / لتر) :- يؤخذ ١٠,٠ مل من محلول رقم (٨ - أ) وتوضع فى بورق معيارى ١٠٠ مل ، ويكمل إلى العلامة بمحلول رقم (١) .

ج - Working standards :- فى عدة دوارق معيارية سعة ٢٥ مل ، توضع الحجوم التالية من محلول (٨ - ب) :- ٠,٥ و ٢,٠ و ٤,٠ و ٦,٠ و ١٠,٠ و ١٥,٠ و ٢٠,٠ مل ، ثم يكمل كل منها إلى العلامة (٢٥ مل) بواسطة الجوهر رقم (١) . وبذلك نحصل على محاليل قياسية بالتركيزات التالية :- ٠,١٠ و ٠,٤٠ و ٠,٨٠ و ١,٢٠ و ٢,٠٠ و ٣,٠٠ و ٤,٠٠ ملجم / ١٠٠ مل ، على التوالى .

التكنيك :-

١ - يضاف ٠,٥ مل من البلازما المعاملة بالهيبارين heparinized plasma إلى ٢,٠ مل من جوهر رقم (١) حديث التحضير فى أنبوبة اختبار ١٢ × ١٠٠ مم ، ثم تخلط جيداً باستعمال vortex mixer . يتم الطرد المركزى للمخلوط على ٢٥٠٠ rpm لمدة ١٠ ق ، ثم يؤخذ من المحلول الرائق حجم مقداره ١,٢ مل فى أنبوبة اختبار بغطاء حلزوى (١٢ × ١٠٠ مم) .

٢ - يؤخذ حجم مقداره ١,٢ مل من جميع المحاليل القياسية (٨ - ج) وتوضع فى سلسلة

من أنابيب اختبار بغطاء حلزوني (١٣ × ١٠٠ مم) ، مع مراعاة عمل duplicate من كل محلول ، كما يؤخذ ١,٢ مل من جوهر رقم (١) كبلانك .

٣ - يضاف ٠,٤ مل من جوهر DTCS إلى جميع الأنابيب ، وتقفل جيداً وتخلط محتوياتها ثم تحضن في حمام مائي على ٣٧°م لمدة ٣ ساعات .

٤ - تنقل الأنابيب من الحمام المائي وتبرد لمدة ١٠ ق في حمام ثلجي ، ويبطئ يضاف لكل أنبوبة ٢,٠ مل محلول حمض كبريتيك (١٢ M - جوهر رقم ٢) مع استمرار الخلط والتقليب ، ثم تقفل الأنابيب وترج جيداً باستعمال vortex mixer (يجب الاتزيد درجة حرارة الأنابيب عن درجة حرارة الغرفة) .

٥ - يضبط جهاز الأسبكتروفوتومتر على صفر امتصاص (A) باستعمال البلانك على طول موجة ٥٢٠ nm ، وتسجل قراءات امتصاص العينة والـ standards . يتم توقيع نقط تركيز الـ standards مع امتصاصها (A) على ورق رسم بياني ويرسم المنحنى القياسي standard curve

الحساب :-

يحسب تركيز حمض الأسكوربيك في العينة من المنحنى القياسي ويضرب الرقم الناتج في ٥ (تصحيح تخفيف البلازما بواسطة محلول حمض الميتا فوسفوريك) . وبهذا نحصل على تركيز حمض الأسكوربيك لكل ١٠٠ مل بلازما .

الطريقة الثانية (Wooton and King , 1969)

الأساس النظري في كلا الطريقتين واحد ولكن في هذه الطريقة يتم ترسيب بروتينات البلازما بواسطة حمض ثلاثي كلورو حمض الخليك TCA ، كما تتم أكسدة حمض الأسكوربيك إلى حمض ديهيدرو أسكوربيك عن طريق الرج مع الفحم النباتي النشط .

الجواهر الكشفية :-

١ - محلول TCA (٧٠ جم / لتر) .

٢ - الفحم النباتي المنشط Activated charcol :- يغلى ٥٠ جم فحم نباتي مع ٢٥٠ مل حمض هيدروكلوريك (١ N تقريباً) ثم يرشح المزيج باستعمال قمع بوخنز ، ويفسل الفحم بالماء المقطر عدة مرات حتى يصبح محلول الفسيل

الناتج(الراشح) لا يعطى نتيجة موجبه للكشف عن الكلوريد أو الحديد . وبعد
الغسيل يجفف الفحم على ١٠٥° م فى فرن هوائى ويخزن فى زجاجة واسعة
الفوهة .

٣ - محلول حمض كبريتيك (M ٥) : - يمزج ٢٧٠ مل حمض كبريتيك مركز (AR)
مع ٥٠٠ مل ماء مقطر بارد ويكمل إلى لتر (مع مراعاة تحضيره كما
سبق ذكره) .

٤ - جوهر DNPH : - يذاب جرام واحد من الـ DNPH فى ١٠٠ مل من محلول
حمض الكبريتيك (M ٥) ويحفظ فى الثلاجة .

٥ - محلول الثيويوريا : - يذاب ٢,٥ جم ثيويوريا فى مخلوط مكون من ٥٠ مل
إيثانول و ٥٠ مل ماء مقطر (يحضر هذا المحلول طازجاً كل شهر) .

٦ - محلول حمض الأسكوربيك القياسى : - يذاب ٥٠ ملجم حمض أسكوربيك فى ٥٠
مل ماء مقطر ، وتلك تعادل ١ ملجم / مل .

٧ - Working standard : - يؤخذ ٠,٢ مل من الجوهر رقم (٦) (الفيتامين
القياسى) وتنقل إلى ورق معيارى سعة ٥٠ مل ويكمل الحجم النهائى بواسطة
محلول TCA . وتركيزه يعادل ٠,٠٠٤ ملجم حمض أسكوربيك / مل .

التكنيك : -

١ - يؤخذ ١,٠ مل من البلازما وتوضع فى أنبوبة طرد مركزى ، ثم يضاف إليها ٤ مل
من محلول TCA ويمزج المحلول جيداً . وبعد ٥ ق يضاف ٠,١٥ جم فحم نباتى
منشط ، ويرج المزيج جيداً مرة أخرى . وبعد ١٠ ق أخرى يتم فصل الفحم
النباتى والبروتينات المترسبة بالطرد المركزى على ٢٥٠٠ rpm لمدة ١٠ ق ،
ويرشح السائل الرائق .

٢ - يؤخذ ٢,٠ مل من الراشح (تعادل ٠,٤ مل بلازما) فى أنبوبة معلمة عند حجم
٥,٠ مل ، ثم يضاف إليها ٠,١ جوهر ثيويوريا و ٠,٥ مل جوهر DNPH ،
وتغطى الأنبوب جيداً وتحضن على ٣٧° م لمدة ٢ ساعات . تنقل الأنابيب إلى
حمام ملجى ثم يضاف إليها ١,٠ مل حمض كبريتك مركز (AR) نقطة نقطة فى

زمن قدرة دقيقة واحدة مع استمرار الخلط والتقليب أثناء اضافة الحمض بقضيب زجاجى ، ثم يترك لمدة ٣٠ ق حتى يتكون اللون خلالها وتكمل بعد ذلك إلى حجم ٥ مل بالماء ، ويمزج المخلوط جيداً .

٣ - يؤخذ ١,٠ مل من محلول الـ working standard فى أنبوبة خاصة وتعامل نفس معاملة العينة بالضبط (الخطوتين ١ و٢) .

٤ - يقاس امتصاص الضوء بجهاز قياس الألوان على طول موجة ٥٤٠ nm فى وجود البلاتك .

٥ - يمكن عمل منحنى قياسى بتركيزات مختلفة من محلول حمض الاسكوربيك القياسى بنفس خطوات التقدير .

الحساب :-

فى حالة استخدام محلول حمض الاسكوربيك القياسى الذى يحتوى على ٠,٠٠٤ ملجم لكل مل يمكن تطبيق هذه المعادلة :-

$$\text{Plasma ascorbic acid (mg / 100 ml)} = \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Reading of standard}} \times 0.004 \times \frac{100}{0.4}$$

$$= \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Reading of standard}} \times 1$$

حيث أن: -

٠,٠٠٤ = تركيز المحلول القياسى .

٠,٤ = الحجم المقدر فيه الفيتامين .

١٠٠ = التركيز منسوب إلى ١٠٠ مل .

تقدير حمض الأسكوربيك فى الفواكه والخضر بطريقة سبكتروفوتومترية (Bajaj and Kaur, 1981)

الجواهر الكشافة : - يجب أن تكون جميع الكيمياويات نقيه جداً (AR).

- ١ - محلول موليبيدات أمونيوم Ammonium molybdate (٥٪ وزن / حجم) .
- ٢ - محلول حمض أكساليك (M ٠.٠٥) ويحتوى على EDTA (٠.٢ mM) حديث التحضير .

٣ - محلول حمض كبريتيك محفف (٥٪ وزن / وزن) .

٤ - محلول حمض ميتافوسفوريك - حمض خليك : - يذاب مع الرج ١٥ جم من كريات pellets حمض ميتافوسفوريك أو عصي sticks منه مسحوقة حديثاً فى ٤٠ مل حمض خليك ثلجى و ٢٠٠ مل ماء مقطر ثم تخفف إلى ٥٠٠ مل بالماء ويرشح (يمكن حفظه لمدة ثلاث أيام فى الثلجة) .

٥ - محلول حمض أسكوربيك قياسى (٠.١ ٪ وزن / حجم) فى محلول حمض أكساليك - EDTA (جوهر رقم ٢) ، ويستعمل حديث التحضير .

التكنيك : -

أ - المنحنى القياسى : -

١ - يؤخذ حجوم مختلفة من المحلول القياسى مقدارها ٠.١ و ٠.٢ و ٠.٣ و ٠.٤ و ٠.٥ و ٠.٦ مل ، ويوضع كل منها فى بورق معيارى سعة ٢٥ مل .

٢ - يضاف إلى كل منها كمية كافية من جوهر رقم (٢) بحيث تعطى حجم نهائى مقداره ٥ مل .

٣ - يضاف لكل بورق ٠.٥ مل جوهر ميتافوسفوريك - حمض خليك و ١.٠ مل محلول حمض كبريتيك (٥ ٪) ، وأخيراً ٢.٠ مل من محلول موليبيدات الأمونيوم .

٤ - يخفف المحلول كله للعلامة بالماء وبعد ١٥ اق يقاس الامتصاص على طول موجة ٧٦٠ nm ضد البلاك المحضر بنفس المحاليل ولكن بدون حمض أسكوربيك .

ب - تقدير محتوى حمض الأسكوربيك فى الفواكه والخضر : -

١ - توزن وزنة معلومة بالضغط من العينة وتستخلص بواسطة ١٠٠ مل من محلول

حمض الاكساليك - EDTA فى waring blender لمدة دقيقتين.

٢ - للفواكه التى تحتوى على أكثر من ٥٠ ملجم حمض أسكوربيك لكل ١٠٠ جم عينة،

يوصى بوزن ٥ جم عينة ، أما التى تحتوى على تركيزات قليلة فيوصى ب ١٠ جم عينة .

٣ - يرشح المستخلص خلال ورق ترشح مناسب ثم الطرد المركزى .

٤ - بالنسبة للفواكه أو الخضر التى تحتوى على عصير ، يرشح العصير خلال طبقة

مزوجة من الموسلين (شاش) muslin ، ثم خلال ورق ترشيح واتمان رقم (١) ،

ثم ينقل ٥٠ مل من الراشح إلى دورق معيارى سعته ٢٥ مل ، وتجرى نفس

الخطوات السابقة لإظهار اللون كما فى الخطوة (أ) .

٥ - فى حالة الفواكه التى تحتوى على عصير رائق ، تؤخذ كمية مناسبة من العصير

وتخلط مع ٥٠ مل محلول حمض أكساليك - EDTA ، وتكمل نفس الخطوات

لإظهار اللون ، وبعد ١٥ ق يرشح المحلول الأزرق مرة أخرى ثم يقاس اللون على

طول موجة ٧٦٠ nm فى وجود البلاك .

٦ - يحسب التركيز من المنحنى القياسى .

المحتوى الفيتاميني لبعض الأغذية الشائعة (Paul and Southgate, 1978)

مع مراعاة أن هذه القيم متوسطة لمدة تقديرات ، كما أنها تختلف باختلاف الصنف ، والنوع والمعالجة إلخ

بيوتين µg	مغن بالتيتيك mg	حمض فوليك		ب ١٢ mg	ب ٦ mg	هـ mg	جـ mg	مغن نيكوتينيك mg	ب ٢ mg	ب ١ mg	د µg	كاروتين µg	أ µg	الفيتامين الغذاء
		كل µg	حر µg											
—	٠,٥	٢٠	٩	٠	٠,٢٢	٠,٢	٠	٢,٥	٠,٠٥	٠,١٢	٠	٠	٠	الحبوب ومنتجات الحبوب
آثار	٠,٢	٣	آثار	٠	آثار	آثار	٠	٠,٩	آثار	آثار	٠	٠	٠	
١٤	٢,٤	٢٦٠	١٣٠	٠	١,٣٨	١,٦	٠	٢٩,٦	٠,٣٦	٠,٨٩	٠	٠	٠	
آثار	آثار	آثار	آثار	٠	آثار	٠	٠	آثار	آثار	آثار	٠	٠	٠	
٧	٠,٨	٥٧	٢٥	٠	٠,٥٥	١,٠	٠	٥,٦	٠,٠٨	٠,٤٦	٠	٠	٠	
٣	٠,٤	٥١	٢٣	٠	٠,٣٠	آثار	٠	٤,٢	٠,٠٦	٠,٤٢	٠	٠	٠	
١	٠,٣	٣١	١٤	٠	٠,١٥	آثار	٠	٢,٠	٠,٠٣	٠,٣١	٠	٠	٠	
١	٠,٣	١١	٤	٠	٠,٠٦	آثار	٠	٢,٠	٠,٠٦	٠,١٤	٠	٠	٠	
آثار	آثار	٢	آثار	٠	٠,٠١	آثار	٠	٠,٣	٠,٠١	٠,٠١	٠	٠	٠	
٢٠	١,٠	٦٠	١١	٠	٠,١٢	٠,٨	٠	١,٠	٠,١٠	٠,٥٠	٠	٠	٠	
٢	٠,٦	٢٩	١٥	٠	٠,٢٠	٠,٣	٠	١,٥	٠,٠٣	٠,٠٨	٠	٠	٠	طحين شوفان Oatmed (نسيء) أرز (مبيض ، نسيء) أرز مسلو
١	٠,٢	٦	٣	٠	٠,٠٥	٠,١	٠	٠,٣	٠,٠١	٠,٠١	٠	٠	٠	

(—) أي لم تقدر

المكونات الغذاء	١ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	مغنيسيوم mg	ج mg	أ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	مضغ فوريك		مضغ بالميكرونيد mg	بيريتين µg
											حر µg	كلى µg		
دقيق راي Ryeflour (١٠٠٪) سيمولينا Semolina (نية) دقيق صويا Soya flour (كامل الدمن) دقيق صويا (قليل الدمن) سباجيتي Spaghetti (نية) سباجيتي مسلوقة سباجيتي محلية مع مصلصة	•	•	•	٠.٤٠ ٠.١٠ ٠.٧٥ ٠.٩٠ ٠.١٤ ٠.٠١ •	٠.٢٢ ٠.٠٢ ٠.٣١ ٠.٣١ ٠.٦ ٠.٠١ •	١.٠ ٠.٧ ٢.٠ ٢.٤ ٢.٠ ٠.٣ •	•	٠.٨ اثر — — — — اثر	٠.٣٥ ٠.١٥ ٠.٥٧ ٠.٦٨ ٠.٠٦ ٠.٠١ •	•	٣١ ٢٠ — — ٤ اثر	٧٨ ٢٥ — — ١٣ ٢ ٢	١٠.٠ ٠.٣ ١.٨ ٢.١ ٠.٣ اثر اثر	٦ ١ — — ١ ١ ١
خبز دقيق استخلاص ١٠٠٪ خبز دقيق استخلاص ٨٥٪ بني خبز دقيق استخلاص ٧٢٪ أبيض خبز (البني محمر fried) خبز (توست toasted) ارغفة خبز Rolls (نية جافة) ارغفة خبز (نية طرية جافة) (soft) ارغفة خبز (بيضاء جافة) ارغفة خبز (بيضاء طرية)	•	•	•	٠.٢١ ٠.٢٤ ٠.١٨ — ٠.١٧ ٠.٣٣ ٠.٣٣ ٠.٣٣ ٠.٣٣ ٠.٢٥	٠.٠٨ ٠.٠٦ ٠.٠٣ — ٠.٠٤ ٠.١٢ ٠.١٥ ٠.٠٧ ٠.٠٨ •	٣.٩ ٢.٩ ١.٤ — ١.٨ ٢.٦ ٢.٧ ١.٥ ١.٤ •	•	٠.٢ اثر اثر — اثر اثر اثر اثر اثر	٠.١٤ ٠.٠٨ ٠.٠٤ — — ٠.١٥ ٠.١٤ ٠.٠٦ ٠.٠٦ •	•	٢٢ ٢١ ٦ — — ٢١ ٢١ ٢١ ٧ ٧	٢٩ ٣١ ٢٧ — — ٣٦ ٣٦ ٣٦ ٢٧	٠.٦ ٠.٣ ٠.٣ — — ٠.٣ ٠.٣ ٠.٣ ٠.٣ •	١ ٢ ١ ٢ ٢ ٢ ٢ ٢ ٢

(—) أي لم تقدر

الفيتامين الذئءاء	أ	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	ج mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك µg	بوتيرين µg	البيسكويات المصنوعة
ارغفة (قلية النشا starch reduced)	•	•	•	—	—	—	•	اآثار	—	—	—	—	
البيسكويات Biscuits	•	اآثار	•	٠,٠٣ mg	٠,١٣ mg	٠,٥ mg	•	١,٣ mg	٠,٠٤ mg	•	—	—	
بالغشكولاته Chocolate (مغلى بالكامل)	•	•	•	٠,١٤ mg	٠,١٣ mg	١,١ mg	•	٣,٤ mg	٠,٠٤ mg	•	—	—	
(ساندوتش sandwich)	•	•	•	٠,١٣ mg	٠,٠٨ mg	١,٥ mg	•	١,٤ mg	٠,٠٦ mg	•	—	—	
(نصف حلو semi-sweet)	•	•	•	٠,١٦ mg	٠,٠٤ mg	٠,٩ mg	•	١,٣ mg	٠,٠٥ mg	•	—	—	
(قليل الحلاوة short-sweet)	•	•	•	•	•	•	•	١,٩ mg	٠,٠٣ mg	•	—	—	
ويفر Wafers (محموة filled)	•	•	•	٠,٠٩ mg	٠,٠٨ mg	٠,٥ mg	•	—	•	اآثار	٤ µg	٠,٢ mg	٤ µg
الكعك Cakes	١٢٠ µg	١٠ µg	١,١٤ µg	٠,٠٨ mg	٠,٠٨ mg	٠,٥٥ mg	•	—	٠,١٣ mg	اآثار	٤ µg	٠,٢ mg	٤ µg
ككة فاكهة (غنية بالدهن rich)	٨٠ µg	٧ µg	٠,٧٧ µg	٠,١٢ mg	٠,١٣ mg	٠,٥ mg	اآثار	٢,٤ mg	٠,١٠ mg	اآثار	١٠ µg	٠,٢ mg	٢ µg
(فنية ومفجرة)													
اللبين ومنتجات اللبين	٣٥ µg	٢٢ µg	٠,٣٠ µg	٠,٠٤ mg	٠,١٩ mg	٠,٠٨ mg	١,٥ mg	١,١٠ mg	٠,٠٣ mg	٠,٣ mg	٥ µg	٠,٢٥ mg	٢,٠ µg
لبين بقرى طازج (فى الصيف)	٣١ µg	١٣ µg	٠,١٣ µg	٠,٠٤ mg	٠,١٩ mg	٠,٠٨ mg	١,٥ mg	٠,٧٧ mg	٠,٠٣ mg	٠,٣ mg	٣ µg	٠,٢٥ mg	٢,٠ µg
لبين بقرى طازج (فى الشتاء)	٣١ µg	١٨ µg	٠,٢٢ µg	٠,٠٣ mg	٠,١٩ mg	٠,٠٨ mg	٠,٨ mg	٠,٩٠ mg	٠,٠٣ mg	٠,٢ mg	٣ µg	٠,٢٥ mg	٢,٠ µg
لبين بقرى مبستر sterilised	٣١ µg	١٨ µg	٠,٢٢ µg	٠,٠٤ mg	٠,١٩ mg	٠,٠٨ mg	١,٥ mg	٠,٩٠ mg	٠,٠٣ mg	٠,٢ mg	٣ µg	٠,٢٥ mg	٢,٠ µg
طويل العمر long life (معامل بـ UHT)	اآثار µg	اآثار µg	اآثار µg	٠,٢٠ mg	٠,٢٠ mg	٠,٠٨ mg	١,٦ mg	اآثار mg	٠,٠٤ mg	٠,٣ mg	٤ µg	٠,٣٦ mg	٢,٠ µg
لبين فريز skimmed (طازج)				٠,٠٤ mg	٠,٢٠ mg	٠,٠٨ mg	١,٦ mg	اآثار mg	٠,٠٤ mg	٠,٣ mg	٤ µg	٠,٣٦ mg	٢,٠ µg
لبين مكفف sweetened condensed	٩٩ µg	٤٩ µg	٠,٨٨ µg	٠,٠٨ mg	٠,٤٨ mg	٠,٣٢ mg	٢,٠ mg	٠,٤٢ mg	٠,٠٢ mg	٠,٥ mg	٤ µg	٠,٨٥ mg	٢,٠ µg

(—) نى لم تقدر

الفيتامين الذائف	الكاروتين									
	أ	ب	ج	د	هـ	و	ز	ح	ث	ي
لين فريز مكفّ ومُحلى	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
لين جاف	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
لين فريز جاف	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
لين ماعز Goats	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
لين الإنسان	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
زبد مملح	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
كريمة صيف، single،	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
كريمة شتاء، single،	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
كريمة صيف، double،	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
كريمة شتاء، double،	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
كريمة مستقرة ومعلبة	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
<u>Cheese</u>	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
Cheddar	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
جبن كريمه Cream	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
جبن مطبوخة processed	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠
Danish Blue	٢٩.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠	٢٤.٠	١٧.٠

[illegible]

الفيتامين الغذاء	أ μg	كاروتين μg	د μg	ب ^١ mg	ب ^٢ mg	حمض بنكيتيك mg	ج mg	هـ mg	ب ^٦ mg	ب ^{١٢} mg	حمض فوليك		محتص بالميثيلين mg	بيوتين μg
											محتص حذر μg	كلي μg		
Margarine بكل أنواعه زيوت نباتية	٨٠٠ ١٠٠٠٠	٠	٧,٩٤	أثار	أثار	أثار	٠	٨,٠ تختلف على حسب النوع	أثار	أثار	أثار	أثار	أثار	أثار
<u>اللحوم ومنتجات اللحوم</u> <u>Beef خاموسي</u> لحم أحمر lean (نسي) دهن Fat نسي دهن مطهي لحم صدر brisket لحم + دهن (نسي) لحم صدر brisket مسلوق لحم مفروم mince (نسي) لحم stewed شرائح أرزاف نيئة (لحم بدون) شرائح أرزاف محمرة شرائح أرزاف محمرة (لحم فقط) Topside نسي (أحمر بدون) Topside مشوي (أحمر بدون)	أثار	أثار	أثار	أثار	أثار	أثار	٠	٠,١٥ ٠,٢٢	٢ أثار	٤	١٠	٠,٧	أثار	أثار
	—	—	—	—	—	—	٠	٠,١٩	١	٢	٨	٠,٥	أثار	أثار
	أثار	أثار	أثار	أثار	أثار	٤,٣	٠	٠,٢٥	٢	٤	١٣	٠,٧	أثار	أثار
	أثار	أثار	أثار	أثار	أثار	٤,٠	٠	٠,٢٧	٢	٢	٩	٠,٧	أثار	أثار
	أثار	أثار	أثار	أثار	أثار	٤,٤	٠	٠,٢١	٢	٢	١٦	٠,٨	أثار	أثار
	أثار	أثار	أثار	أثار	أثار	٤,٢	٠	٠,١٧	٢	٢	٩	٠,٦	أثار	أثار
	أثار	أثار	أثار	أثار	أثار	٥,٥	٠	٠,٢٣	٢	٢	١٥	٠,٨	أثار	أثار
	أثار	أثار	أثار	أثار	أثار	٦,٣	٠	٠,٢٩	٢	٢	١٧	٠,٩	أثار	أثار
	—	أثار	أثار	أثار	أثار	٤,٨	٠	٠,١٧	٢	٢	٩	٠,٦	أثار	أثار
	—	أثار	أثار	أثار	أثار	٥,٧	٠	٠,٢٢	٢	٢	١٥	٠,٨	أثار	أثار

(—) أي لم تقدر

الفيتامين الغذاء	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ^١ mg	ب ^٢ mg	فيتن mg	ج mg	أ mg	ب ^٦ mg	ب ^{١٢} mg	حمض فوليك		حمض بانتوثيك mg	بيوتين µg
											كل µg	حر µg		
لحم Topside مشوى (لحم فقط)	أثار	أثار	أثار	٠,٠٠٨	٠,٢٥	٦,٥	٠	٠,٢٩	٠,٢٣	٢	١٧	٠	٠,٩	أثار
لحم الـ lean (نسيء)	أثار	أثار	أثار	٠,١٤	٠,٢٨	٦,٠	٠	٠,١٠	٠,٢٥	٢	٥	أثار	٠,٧	٢
دهن (نسيء)	—	—	—	—	—	—	٠	٠,٢٠	—	أثار	—	أثار	—	أثار
دهن (مطهى)	—	—	—	—	—	—	٠	٠,١٨	٠,١٨	أثار	—	أثار	—	أثار
صدر breast لحم + دهن (مشوى)	أثار	أثار	أثار	٠,٠٠٨	٠,١٧	٢,٨	٠	٠,١٨	٠,١٥	١	٢	أثار	٠,٤	١
صدر breast لحم فقط (مشوى)	أثار	أثار	أثار	٠,٠٦	٠,١٧	٢,٤	٠	٠,١٣	٠,١٣	١	٢	أثار	٠,٧	٢
كسلاية Cutlets لحم +دهن (نسيء)	أثار	أثار	أثار	٠,١٠	٠,٢٩	٥,٦	٠	٠,١٠	٠,٢٢	٢	٤	أثار	٠,٤	١
كسلاية Cutlets لحم +دهن (مشوى)	أثار	أثار	أثار	٠,٠٩	٠,١٦	٢,٩	٠	٠,١٨	٠,١٥	١	٢	أثار	٠,٤	١
كسلاية لحم + دهن بالمطم (مشوى)	أثار	أثار	أثار	٠,١٠	٠,٢٠	٤,٨	٠	٠,١٣	٠,١٥	٢	٢	أثار	٠,٥	١
كسلاية لحم فقط بالمطم (مشوى)	أثار	أثار	أثار	٠,٠٧	٠,١٣	٢,٢	٠	٠,٠٩	٠,١٠	١	٢	أثار	٠,٢	١
رجل leg لحم + دهن (نسيء)	أثار	أثار	أثار	٠,١٥	٠,٢٠	٧,٢	٠	٠,١٠	٠,٢٢	٢	٤	أثار	٠,٧	٢
رجل leg لحم + دهن (مشوى)	أثار	أثار	أثار	٠,١٤	٠,٢٥	٥,٧	٠	٠,١٤	٠,٢٠	٢	٤	أثار	٠,٦	١
رجل leg لحم فقط (مشوى)	أثار	أثار	أثار	٠,١٢	٠,٣١	٥,٤	٠	٠,١١	٠,١٨	٢	٢	أثار	٠,٦	١
لحم رقبة Scrag لحم + دهن (نسيء)	أثار	أثار	أثار	٠,١٤	٠,٣٨	٦,٦	٠	٠,١٠	٠,٢٢	٢	٤	أثار	٠,٧	٢
لحم رقبة لحم + دهن (سليد sliced)	أثار	أثار	أثار	٠,٠٧	٠,١٧	٢,٤	٠	٠,١٦	٠,١٨	٢	٤	أثار	٠,٥	١
	أثار	أثار	أثار	٠,٠٤	٠,١٨	٢,٧	٠	٠,١١	٠,١٩	٢	٤	أثار	٠,٦	١

(—) أى لم تقدر

الفيتامين الذئاء	أ	كاروتين	د	ب ^١	ب ^٢	حمض نيكوتينيك	ب ^٦	ب ^{١٢}	حمض فوليك		حمض بالتونيك	بيوتين
	μg	μg	μg	mg	mg	mg	mg	mg	كل	حز	mg	μg
لحم رقيقة أحمر فقط (مسبك)	أثر	أثر	أثر	٠,٠٠٥	٢١	٢,٢	٠	٠,١٠	٢	أثر	٠,٢٢	٢
لحم رقيقة أحمر فقط بالملح (مسبك)	أثر	أثر	أثر	٠,٠٠٢	١١	١,٦	٠	٠,٠٠٥	١	أثر	٠,١١	١
<u>لحم العجل</u> Yeast Cutter Filler لحم مشوي	أثر	أثر	أثر	—	—	—	٠	—	١	أثر	—	أثر
الدوا	أثر	أثر	أثر	٠,٠٠٦	٢٧	٧,٠	٠	—	١	أثر	٠,٣٢	١
الدجاج ، لحم فقط (نيس)	أثر	أثر	أثر	٠,١٠	١٦	٧,٨	٠	٠,١٠	١٠	أثر	٠,٤٢	١٢
الدجاج ، لحم وجلد (نيس)	أثر	أثر	أثر	٠,٠٠٨	١٤	٦,٠	٠	—	٧	أثر	٠,٣٠	٨
الدجاج ، لحم فاتح (نيس)	أثر	أثر	أثر	٠,١٠	١٠	٩,٩	٠	٠,٠٠٨	٨	أثر	٠,٥٣	١٢
الدجاج ، لحم غامق (نيس)	أثر	أثر	أثر	٠,١١	٢٢	٥,٤	٠	٠,١٣	١٢	١	٠,٣٠	١٢
الدجاج ، لحم فقط مسلوق	أثر	أثر	أثر	٠,٠٠٦	١٩	٦,٧	٠	٠,٠٠٧	٥	أثر	٠,٣٥	٨
الدجاج ، لحم فاتح مسلوق	أثر	أثر	أثر	٠,٠٠٥	١٢	٨,٩	٠	—	٤	أثر	٠,٣٣	٤
الدجاج ، لحم غامق مسلوق	أثر	أثر	أثر	٠,٠٠٧	٢٨	٤,٣	٠	—	٧	١	٠,٣٧	١٣
الدجاج ، لحم فقط مشوي	أثر	أثر	أثر	٠,٠٠٨	١٩	٨,٢	٠	٠,١١	٨	أثر	٠,٢١	١٠
الدجاج ، لحم وجلد مشوي	أثر	أثر	أثر	—	—	—	٠	—	—	أثر	—	—
الدجاج ، لحم فاتح مشوي	أثر	أثر	أثر	٠,٠٠٨	١٤	١٠,٣	٠	٠,٠٠٨	٧	١	٠,٢٥	١٠

(—) أي لم تقدر

الفيتامين الغذاء	أ ^١ μg	كاروتين μg	د ^٢ μg	ب ^١ mg	ب ^٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	ج ^٣ mg	هـ ^٤ mg	ب ^٦ mg	ب ^{١٢} mg	حمض فوليك		مضى بالتوتيفيك mg	بيوتين μg
											حصر μg	كلي μg		
النجاح ، لحم غامق مشوى	اثر	اثر	اثر	٠,٠٩	٠,٢٤	٦,١	٠	٠,١٥	٠,١٦	١	١٠	١٢	١,٢	٢
البيط ، لحم فقط (نبي)	—	—	—	٠,٢٦	٠,٤٥	٥,٢	٠	—	٠,٢٤	٢	٧	٢٥	١,٦	٦
البيط ، لحم وجك ودهن (نبي)	—	—	—	—	—	—	٠	—	—	—	—	—	—	—
البيط ، لحم فقط مشوى	—	—	—	٠,٢٦	٠,٤٦	٥,١	٠	٠,٠٢	٠,٢٥	٢	٧	١٠	١,٥	٤
البيط ، لحم وجك ودهن مشوى	—	—	—	—	—	—	٠	—	—	—	—	—	—	—
أوز Goose مشوى	—	—	—	—	—	—	٠	—	٠,٤٢	—	—	—	—	—
حمام Pigeon مشوى	—	—	—	—	—	٨,٩	٠	اثر	—	—	—	—	—	—
حمام مشوى بالمطام	—	—	—	—	—	٢,٩	٠	اثر	—	—	—	—	—	—
رومي ، Turkey ، لحم فقط (نبي)	اثر	اثر	اثر	٠,٠٩	٠,١٦	٧,٩	٠	اثر	٠,٤٦	٢	١١	١٥	٠,٨	٢
رومي ، لحم وجك (نبي)	—	—	—	—	—	—	٠	—	—	—	—	—	—	—
رومي ، لحم فاتح (نبي)	اثر	اثر	اثر	٠,٠٨	١١	٩,٩	٠	اثر	٠,٥٩	١	٧	٨	٠,٠٨	١
رومي ، لحم غامق (نبي)	اثر	اثر	اثر	٠,١٠	٠,٢٢	٥,٢	٠	اثر	٠,٢٠	٢	١٧	٢٥	٠,٩	٢
رومي ، لحم فقط مشوى	اثر	اثر	اثر	٠,٠٧	٠,٢١	٨,٥	٠	اثر	٠,٢٢	٢	١٢	١٥	٠,٨	٢
رومي ، لحم وجك مشوى	—	اثر	اثر	—	—	—	٠	—	—	—	—	—	—	—
رومي ، لحم فاتح مشوى	اثر	اثر	اثر	٠,٠٧	٠,١٤	١٠,٠	٠	٠,٠٢	٠,٢١	١	٩	١٢	٠,٧	١
رومي ، لحم غامق مشوى	اثر	اثر	اثر	٠,٠٧	٠,٢٩	٦,٧	٠	اثر	٠,٢٢	٢	١٦	١٧	٠,٩	٢
أرانب (نبي)	—	—	—	٠,١٠	٠,١٩	٨,٤	٠	٠,١٢	٠,٥٠	١٠	٤	٥	٠,٨	١

(—) أي لم تقدر

المنتجات	البيتا مين	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض شكاريك mg	ج mg	د mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك		حمض بانثوثيك mg	بيوتين µg
											كل µg	حر µg		
كبد لحاج (محم)	١١١٠٠	٠	—	٠,٣٧	١,٧	١٠,٥	١٢	٠,٣٤	٠,٤٥	٤٩	١٦٠	٥٠٠	٥,٥	١٧٠
كبد خروف (نينة)	١٨١٠٠	٦٠	٠,٥٠	٠,٢٧	٣,٣	١٤,٢	١٠	٠,٤٦	٠,٤٢	٨٤	١٥٠	٢٢٠	٨,٢	٤١
كبد خروف (محم)	٢٠٦٠٠	٦٠	٠,٥٠	٠,٢٦	٤,٤	١٥,٢	١٢	٠,٣٢	٠,٤٩	٨١	١٤٠	٢٤٠	٧,٦	٤١
كبد ثور (نينة)	١٦٥٠٠	١٥٤٠	١,١٣	٠,٢٢	٣,١	١٣,٤	٢٢	٠,٤٢	٠,٨٣	١١٠	٢٢٠	٣٢٠	٨,١	٣٣
الأسماك ومنتجاتها														
الأسماك البيضاء														
حوت Cod طليت طازج (نينة)	اثر	اثر	اثر	٠,٠٨	٠,٠٧	١,٧	اثر	٠,٤٤	٠,٣٢	٢	٨	١٢	٠,٢٠	٢
حوت معبأ backed	اثر	اثر	اثر	٠,٠٧	٠,٠٧	١,٧	اثر	٠,٥٩	٠,٣٨	٢	٧	١٢	٠,٢٠	٣
حوت محمر في زبد	اثر	اثر	اثر	—	—	—	اثر	—	—	—	—	—	—	—
Haddock طازج (نينة)	اثر	اثر	اثر	٠,٠٧	٠,١٠	٤,٠	اثر	—	٠,٢٠	١	—	١٢	٠,٢٠	٥
Haddock محمر	اثر	اثر	اثر	—	—	—	اثر	—	—	—	—	—	—	—
smoked Haddock مدخن	اثر	اثر	اثر	٠,١٠	٠,١١	١,٧	اثر	—	٠,٢٥	٢	٢	٥	٠,٢٠	٢
السمك الدهني Fatty fish														
شبان السمك Eel (نينة)	١٢٠٠	اثر	—	٠,٢٠	٠,٢٥	٢,٥	اثر	—	٠,٢	١	—	—	٠,١٥	—
رنجة Herring (نينة)	٤٥	اثر	٢٢,٥	اثر	٠,١٨	٤,١	اثر	٠,٢١	٠,٤٥	٦	٢	٢	١,٠	١٠
رنجة محمرة Herring	٤٩	اثر	٢٥,٠	اثر	٠,١٨	٤,٠	اثر	٠,٢٠	٠,٥٧	١١	٢	٢	٠,٨٨	١٠
ماكريل Mackerel (نينة)	٤٥	اثر	١٧,٥	٠,٠٩	٠,٢٥	٨,٠	اثر	—	٠,٧٠	١٠	—	—	١,٠	٧

(—) أى لم تقدر

الفيتامين الغذاء	ا	كاروتين μg	د μg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	ج mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك		حمض بانثوثينيك mg	بيوتين μg
											كل μg	حر μg		
ماكريل Mackerel (محم)	٥٢	أثار	٢١,١	٠,٠٩	٠,٢٨	٨,٧	أثار	—	٠,٨٤	١٢	—	—	٠,٩٦	٨
بيشارد Pichards مطب في صلصة صلح	أثار	أثار	٨	٠,٠٢	٠,٢٩	٧,٦	أثار	٠,٧٠	—	١٢	—	—	—	—
سلمون Salmon (نبي)	أثار	أثار	أثار	٠,٢٠	٠,١٥	٧,٠	أثار	—	٠,٧٥	٥	٢١	٤	٢,٠	٥
ساردين Sardines مطب في زيت	أثار	أثار	٧,٥	٠,٠٤	٠,٣٦	٨,٢	أثار	٠,٢٠	٠,٤٨	٢٨	٨	٢	٠,٥٠	٥
تونة Tuna مطبة في زيت	—	أثار	٥,٨	٠,٠٤	٠,١١	١٢,٩	أثار	٦,٢	٠,٤٤	٥	١٥	٧	٠,٤٢	٢
كابوريا Crab مسلوقة	أثار	أثار	أثار	٠,١٠	٠,١٥	٢,٥	أثار	—	٠,٢٥	أثار	٢٠	٢	٠,٦٠	أثار
جيمري Shrimps مسلق	أثار	أثار	أثار	٠,٢	٠,٢	٢,٠	أثار	—	٠,١٠	١	—	—	٠,٢٠	١
الخفضدروات														
خرشوف Artichokes مسلق	٠	٩٠	٠	٠,٠٧	٠,٠٢	٠,٩	٨	—	٠,٠٧	٠	٢٠	—	٠,٢١	٤,١
أسبراجس Asparagus مسلق	٠	٥٠٠	٠	٠,١٠	٠,٠٨	٠,٨	٢٠	٢,٥	٠,٠٤	٠	٢٠	٥	٠,١٣	٠,٤
فول بلدي Broad bean مسلق	٠	٢٥٠	٠	٠,١٠	٠,٠٤	٢,٠	١٥	أثار	—	٠	—	—	٢,٨	٢,١
فاصوليا حمراء red kidney bean (نبي)	٠	أثار	٠	٠,٥٤	٠,١٨	٢,٠	أثار	—	٠,٤٤	٠	١٢٠	٢٤	٠,٥٠	—
كرنب Cabbage لبيش (نبي)	٠	أثار	٠	٠,٦	٠,٠٥	٠,٢	٤٠	٠,٢	٠,١٦	٠	٢٦	١٩	٠,٢١	٠,١
كرنب شتوي (نبي)	٠	٢٠٠	٠	٠,٦	٠,٠٥	٠,٢	٥٥	٠,٢	٠,١٦	٠	٩٠	٦٠	٠,٢١	٠,١
كرنب شتوي مسلق	٠	٢٠٠	٠	٠,٢	٠,٠٣	٠,٢	٢٠	٠,٢	٠,١٠	٠	٢٥	٢	٠,١٥	أثار
جند كبير Old (نبي)	٠	١٢٠٠٠	٠	٠,٦	٠,٠٥	٠,٦	٦	٠,٥	٠,١٥	٠	١٥	١٢	٠,٢٥	٠,٦
جند كبير Old (مسلق)	٠	١٢٠٠٠	٠	٠,٥	٠,٠٤	٠,٤	٤	٠,٥	٠,٠٩	٠	٨	١	٠,١٨	٠,٤

(—) أي لم تقدر

الفيتامين الغذاء	ا μg	كاروتين μg	د μg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	ج mg	هـ mg	ب ١ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك		حمض بانتوثينيك mg	بيوتين μg
											كلية μg	حر μg		
جزر صفير (مسلوق)	•	١٠٠٠	•	٠,٠٠٥	٠,٠٠٤	٠,٤	٤	٠,٥	٠,٠٠٩	•	٨	١	٠,١٨	٠,٤
قرنيط (نثي)	•	٢٠	•	٠,١٠	٠,١٠	٠,٦	٦٠	٠,٢	٠,٢٠	•	٢٩	٢٠	٠,٦٠	١,٥
قرنيط (مسلوق)	•	٢٠	•	٠,٠٦	٠,٠٦	٠,٤	٢٠	٠,١	٠,١٢	•	٤٩	٢	٠,٤٢	١,٠
كرفس (نثي)	•	آثار	•	٠,٠٣	٠,٠٣	٠,٢	٧	٠,٢	٠,١٠	•	١٢	٦	٠,٤٠	٠,١
كرفس مسلوق	•	آثار	•	٠,٠٢	٠,٠٢	٠,٢	٥	٠,٢	٠,٠٦	•	٦	١	٠,٢٨	٠,٤
خيار (نثي)	•	آثار	•	٠,٠٤	٠,٠٤	٠,٢	٨	آثار	٠,٠٤	•	١٦	١٤	٠,٢٠	٠,٤
فجل Horseradish (نثي)	•	•	•	٠,٠٥	٠,٠٢	٠,٥	١٢٠	—	٠,١٥	•	—	—	—	—
كرات Leeks (نثي)	•	٤٠	•	٠,١٠	٠,٠٥	٠,٦	١٨	٠,٨	٠,٢٥	•	—	—	٠,١٢	١,٤
كرات Leeks (مسلوق)	•	٤٠	•	٠,٠٧	٠,٠٣	٠,٤	١٥	٠,٨	٠,١٥	•	—	٧	٠,١٠	١,٠
عس Lentils (مسلوق)	•	٢٠	•	٠,١١	٠,٠٤	٠,٤	آثار	—	٠,١١	•	٥	١	٠,٣١	—
خس Lettuce (نثي)	•	١٠٠٠	•	٠,٠٧	٠,٠٨	٠,٢	١٥	٠,٥	٠,٠٧	•	٢٤	١٩	٠,٢٠	٠,٧
الكوسة Matrow (نثي)	•	٢٠	•	آثار	آثار	٠,٢	٥	آثار	٠,٠٦	•	١٣	١٣	٠,١٠	٠,٤
الكوسة مسلوقة	•	٢٠	•	آثار	آثار	٠,٢	٢	آثار	٠,٠٣	•	٦	١	٠,٠٧	—
مشروم Mushroom (نثي)	•	•	•	٠,١٠	٠,٤٠	٤,٠	٢	آثار	٠,١٠	•	٢٣	٢٠	٢,٠	—
مشروم Mushroom محمر	•	•	•	٠,٠٧	٠,٢٥	٢,٥	١	آثار	٠,٠٦	•	٢٠	١٧	١,٤	—
يامية Okra (نثي)	•	٩٠	•	٠,١٠	٠,١٠	١,٠	٢٥	—	٠,٠٨	•	١٠٠	٢٥	٠,٢٦	—
بصل Onions (نثي)	•	•	•	٠,٠٢	٠,٠٥	٠,٢	١٠	آثار	٠,١٠	•	١٦	١٥	٠,١٤	٠,٩

(—) أي لم تقدر

الفيتامين الذئءاء	ا	كاروتين μg	د μg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	ج mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك		مغنسيوم mg	بيوتين μg
											كلل μg	حمر μg		
بصل Onions مسلوقة	•	•	•	•	•	•	٦	اآثر	•	•	٨	اآثر	•	•
بصل Onions محمر	•	•	•	•	•	•	—	—	•	•	—	—	•	•
بقونس Parsley (نينة)	•	٧٠٠٠	•	•	•	١,٠	١٥٠	١,٤	•	•	—	—	•	•
بازلاء Peas هازجة (نينة)	•	٢٠٠	•	•	•	٢,٥	٢٥	اآثر	•	•	—	—	•	•
بازلاء هازجة مسلوقة	•	٢٠٠	•	•	•	١,٥	١٥	اآثر	•	•	—	—	•	•
بازلاء جاة (نينة)	•	٢٥٠	•	•	•	٢,٠	اآثر	اآثر	•	•	٢٢	٢١	•	•
بازلاء جاة مسلوقة	•	٨٠	•	•	•	١,٠	اآثر	اآثر	•	•	—	اآثر	•	•
فلفل أخضر Peppers (نينة)	•	٢٠٠	•	•	•	•	١٠٠	•	•	•	١١	٥	•	•
فلفل أخضر مسلوقة	•	٢٠٠	•	•	•	•	٦٠	•	•	•	١١	١	•	•
بعلطس كبيرة (نينة)	•	اآثر	•	•	•	١,٢	٢٠-٨	•	•	•	١٤	١٠	•	•
بعلطس كبيرة مسلوقة	•	اآثر	•	•	•	•	١٤-٤	•	•	•	•	•	•	•
بعلطس كبيرة رقانق Chips	•	اآثر	•	•	•	•	١٦-٥	•	•	•	•	•	•	•
سبانخ Spinach مسلوقة	•	٦٠٠٠	•	•	•	•	٢٥	•	•	•	•	•	•	•
نرة سكرية على القوالع (نينة)	•	٢٤٠	•	•	•	•	١٢	•	•	•	•	•	•	•
نرة سكرية على القوالع مسلوقة	•	٢٤٠	•	•	•	•	٩	•	•	•	•	•	•	•
بعلط Sweet potatoes (نينة)	•	٤٠٠٠	•	•	•	•	٢٥	•	•	•	•	•	•	•
بعلط مسلوقة	•	٤٠٠٠	•	•	•	•	١٥	•	•	•	•	•	•	•

(—) اى لم تقدر

الفيتامين الغذاء	ا μg	كاروتين μg	د μg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	ج mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك		مغنسيوم بانتوثيك mg	بيوتين μg
											حر μg	كلي μg		
طماطم (بنية) Tomatoes	•	٦٠٠	•	٠,٠٦	٠,٠٤	٠,٧	٢٠	١,٢	٠,١١	•	١٥	٢٨	٠,٣٣	١,٥
طماطم ملية Tomatoes ملية	•	٥٠٠	•	٠,٠٦	٠,٠٣	٠,٧	١٨	١,٢	٠,١١	•	١١	٢٥	٠,٢٠	١,٥
لفت Turnips (بنية)	•	•	•	٠,٠٤	٠,٠٥	٠,٦	٢٥	•	٠,١١	•	١٧	٢٠	٠,٢٠	٠,١
الفواكه														
تفاح الجزء المأكول Apples الجزء المأكول	•	٢٠	•	٠,٠٤	٠,٠٢	٠,١	٢	٠,٢	٠,٠٣	•	٢	٥	٠,١٠	٠,٢
تفاح بالقرش والقلب	•	٢٣	•	٠,٠٣	٠,٠٢	٠,١	٢	٠,٢	٠,٠٢	•	٢	٤	٠,٠٨	٠,٢
مشمش Apricots طازج (بنية)	•	١٥٠٠	•	٠,٠٤	٠,٠٥	٠,٦	٧	—	٠,٠٧	•	٤	٥	٠,٢٠	—
مشمش Avocado طازج جاف	•	٣٦٠٠	•	•	٠,٢٠	٣,٠	أثار	—	٠,١٧	•	١٠	١٤	٠,٧٠	—
انوكانو pears	•	١٠٠	•	٠,١٠	٠,١٠	١,٠	١٥	٣,٢	٠,٤٢	•	٥٥	٦٦	١,٠٧	٣,٢
مسند (بنية)	•	٢٠٠	•	٠,٠٤	٠,٠٧	٠,٦	١٠	٠,٢	٠,٥١	•	١٤	٢٢	٠,٢٦	—
كريز Cherries الجزء المأكول	•	١٢٠	•	٠,٠٥	٠,٠٧	٠,٣	٥	٠,١	٠,٠٥	•	٦	٨	٠,٢٦	٠,٤
بلح جاف Dates	•	٥٠	•	٠,٠٧	٠,٠٤	٢,٠	•	—	٠,١٥	•	١٤	٢١	٠,٨٠	—
بن Figs green (بنية)	•	٥٠٠	•	٠,٠٦	٠,٠٥	٠,٤	٢	—	٠,١١	•	—	—	٠,٢٠	—
بن Figs green جاف	•	٥٠	•	٠,١٠	٠,٠٨	١,٧	•	—	٠,١٨	•	٢	٩	٠,٤٤	—
سلطة فواكه Fruit salad ملية	•	٣٠٠	•	٠,٠٢	٠,٠١	٠,٣	٣	—	٠,٠١	•	١	٤	٠,٠٤	٠,١
عنب اسود Grapes, black (بنية)	•	أثار	•	٠,٠٤	٠,٠٢	٠,٣	٤	—	٠,١٠	•	٢	٦	٠,٠٥	٠,٢
عنب أبيض (بنية)	•	أثار	•	٠,٠٤	٠,٠٢	٠,٣	٤	—	٠,١٠	•	٢	٦	٠,٠٥	٠,٢

(—) أي لم تقدر

الفيتامين الفلذاء	ا µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	مغنيسيوم mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك		مغنيسيوم mg	مغنيسيوم µg	مغنيسيوم µg	بيريتين µg
											كلية µg	حجر µg				
جريب فريوت (نبية)	•	آثار	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	٤٠	•,•,•,•	•,•,•,•	•	١٢	٩	•	•,•,•,•	•,•,•,•	١,٠
جريب فريوت مغلي	•	آثار	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	٢٠	•,•,•,•	•,•,•,•	•	٤	٢	•	•,•,•,•	•,•,•,•	١,٠
برقوق أخضر (نبية)	•	—	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	٢	•,•,•,•	•,•,•,•	•	٢	١	•	•,•,•,•	•,•,•,•	آثار
جوافة مغلية	•	١٠٠	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	١٨٠	•,•,•,•	•,•,•,•	•	—	—	•	•,•,•,•	•,•,•,•	—
ليمون كل الثمرة	•	آثار	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	٨٠	•,•,•,•	•,•,•,•	•	—	—	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•
ليمون ، عصير طازج	•	آثار	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	٥٠	•,•,•,•	•,•,•,•	•	٧	٧	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•
الليمونى Mandarin oranges مغلي	•	٥٠	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	١٤	•,•,•,•	•,•,•,•	•	٨	٥	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•
مانجو (نبية)	•	١٢٠٠	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	٢٠	•,•,•,•	•,•,•,•	•	—	—	•	•,•,•,•	•,•,•,•	—
مانجو مغلية	•	٢٠٠٠	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	٢٥	•,•,•,•	•,•,•,•	•	٢٠	٢٠	•	•,•,•,•	•,•,•,•	—
الكانتالوب (نبية)	•	١٠٠	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	٢٥	•,•,•,•	•,•,•,•	•	٢٠	٢٠	•	•,•,•,•	•,•,•,•	—
شمام Yellowmelons (نبية)	•	٢٠	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	٥	•,•,•,•	•,•,•,•	•	٢	٢	•	•,•,•,•	•,•,•,•	—
بلنج Watermelon (نبية)	•	آثار	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	١٠	•,•,•,•	•,•,•,•	•	٥	٥	•	•,•,•,•	•,•,•,•	—
توت Mulberries	•	١٨٠	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•	—	—	•	•,•,•,•	•,•,•,•	آثار
زيتون ملح Olives in brine	•	٥٠	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	٥٠	•,•,•,•	•,•,•,•	•	٢٧	٢٠	•	•,•,•,•	•,•,•,•	١,٠
برتقال نبي	•	•	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	٢٨	•,•,•,•	•,•,•,•	•	٢٨	٢٣	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•
برتقال ، كل الثمرة نبي	•	٢٨	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	٢٨	•,•,•,•	•,•,•,•	•	٢٨	٢٣	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•
برتقال ، عصير طازج	•	٥٠	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•,•,•	٥٠	•,•,•,•	•,•,•,•	•	٢٧	٢٠	•	•,•,•,•	•,•,•,•	•,•

(—) أى لم تقدر

الفيتامين الذئاء	أ	كاروتين	د	ب ١	ب ٢	مغنيسيوم mg	جـ	هـ	ب ٦	ب ١٢	حمض فوليك		مغنيسوم بالميلليجرام mg	بيوتين μg
											كل	حر		
خوخ Peaches طازج	•	٥٠٠	•	٠,٠٢	٠,٠٥	١,٠	٨	—	٠,٠٢	•	٢	٢	٠,١٥	٠,٢
خوخ Peaches جاف	•	٢٠٠٠	•	آثار	٠,١٩	٥,٢	آثار	—	٠,١٠	•	١٤	١٠	٠,٢٠	—
خوخ Peaches معلب	•	٢٥٠	•	٠,٠١	٠,٠٢	٠,٦	٤	—	٠,٠٢	•	٢	٢	٠,٠٥	٠,٢
كشوى Pears الجزء المتكول	•	١٠	•	٠,٠٢	٠,٠٣	٠,٢	٢	آثار	٠,٠٢	•	٤	٤	٠,٠٧	٠,١
كشوى كل الشرة	•	٧	•	٠,٠٢	٠,٠٢	٠,١	٢	آثار	٠,٠١	•	٨	٢	٠,٠٥	٠,١
أناناس Pineapple طازج	•	٦٠	•	٠,٠٨	٠,٠٢	٠,٢	٢٥	—	٠,٠٩	•	١١	٩	٠,١٦	آثار
أناناس Pineapple معلب	•	٤٠	•	٠,٠٥	٠,٠٢	٠,٢	١٢	—	٠,٠٧	•	—	٢	٠,١٠	آثار
الرومان Pomegranate عصير	•	—	•	٠,٠٢	٠,٠٣	٠,٢	٨	—	—	•	—	—	—	—
سفرجل Quince (نينة)	•	آثار	•	٠,٠٢	٠,٠٢	٠,٢	١٥	—	—	•	—	—	—	—
زبيب Raisins جاف	•	٢٠	•	٠,١٠	٠,٠٨	٠,٥	•	—	٠,٢٠	•	٤	٤	٠,١٠	—
الرومان Rhubarb	•	٦٠	•	٠,٠١	٠,٠٢	٠,٢	١٠	٠,٢	٠,٢	•	٨	٨	٠,٠٨	—
فراولة Strawberries (نينة)	•	٢٠	•	٠,٠٢	٠,٠٣	٠,٤	٦٠	٠,٢	٠,٠٦	•	٢٠	١٥	٠,٢٤	١,١
فراولة Strawberries معلبة	•	آثار	•	٠,٠١	٠,٠٢	٠,٣	٢١	—	٠,٠٣	•	٨	٨	٠,٢١	٠,١
الكشميش Sultanas جافة	•	٢٠	•	٠,١٠	٠,٠٨	٠,٥	•	٠,٧	٠,٢٠	•	٤	٤	٠,١٠	—
Tangerine نوع من الليمون (نينة)	•	١٠٠	•	٠,٠٧	٠,٠٢	٠,٢	٢٠	—	٠,٠٧	•	٢١	٩	٠,٢٠	—
اللوز Nuts	•	•	•	٠,٠٣	٠,٠٢	٠,٢	٢	٠,٧	٠,٠٤	•	٢٦	٩	٠,٢٠	—
جوز هند Coconut طازج														

(—) أى لم تقدر

الفيتامين الفسدء	أ	كاروتين	د	ب _١	ب _٢	ب _٦	ب _{١٢}	ب _{١٢}	حمض فوليك		حمض بانتوثيك mg	بيروتين μg
									حبر	كلى		
جوز هند Coconut بن فول سورياني Peanut حارنج فول سورياني محمص وملح زبدة الفول السوداني Almonds الوزن	•	•	•	•	•	•	•	•	—	—	٠,٠٥	—
	•	•	•	•	•	•	•	•	٢٨	١١٠	٢,٧	—
	•	•	•	•	•	•	•	•	—	—	٢,١	—
	•	•	•	•	•	•	•	•	١٦	٥٢	٢,١	—
	•	•	•	•	•	•	•	•	٢٢	٩٦	٠,٤٧	٠,٤

(—) أى لم تقدر

المراجع

- 1 - A.O.A.C. (1975) , Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists , 12th ed., Washington , DC . (US A) .
- 2 - A.O.A.C. (1990) , Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists , 15th ed., Arlington, Virginia (US A) .
- 3 - Bajaj, K.L. and Kaur, G. (1981), Analyst 106 , 117
- 4 - Baker, H. and Frank, O. (1968) , Clinical Vitaminalogy , p. 172. New York : Wiley .
- 5 - Beadle , M. and Zscheile , A. (1942), J.Bioli. Chem .144,21.
- 6 - Bradley, D.W. and Hornbeck, C.L. (1973). Biochem. Med, 7 : 78.
- 7 - Campbell, J.A. (1961), Methodology of protein evaluation . RAG Nutr . Document R. 101 add . 37, June meeting , New York.
- 8- De Leemheer , A.P. and De Ruyter, M.G.M. (1975) (eds) , Modern Chromatographic Analysis of The Vitamins; vol.30 of Chromatographic Science Series , Marcel Dekker , INC , New York and Basel .
- 9 - Dickes, G.J. (1966), J. of the Association of Pubblc Analysts , 4, 50
- 10 - Emmerie, A. and Engel, C. (1939) , Recueil des travaux chiniques des Pays - Pas et de la Belgique , 58 , 283 .
- 11 - Fetuga, B.L. ; Babatunde, G.M. and Oyenuga, V.A (1973), J. Sci . Fd. Agric., 24, 1515
- 12 - Friedrich, W. (1988), Vitamins, de Gruyter (eds), Berlin , New York.
- 13 - Gibson, S.L.M., Moore, F.M.L. and Goldberg, A. (1966) , Brit. Med. J., 1 : 1152 .
- 14 - Gloster, J.A. and Harris, P. (1962) , Clin . Chim . Acta; 7 ; 206 .
- 15 - Groenendijk, G.W.T. ; Jansen, P.A.A. ; Bonting , S.L. and Daemeu , F.J.M. (1980), Meth. Enzymol., 67f , 203 .
- 16 - Gyory, P. and Rubin, S.H. (1950) , "Chemical methods of vitamin assay" in "Vitamin Methods" , Gyorgy, P. (eds) , Academic press Inc.,

- publishers , New York, PP 147 .
- 17 - Harkness, J.E. and Wagner, J.E. (1989), The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents . 3rd ed . Lea and Febiger (eds) , Philadelphia , London .
- 18 - Harris , L. J. and Ray, S. N. (1935), Lancet; 1: 71, 462
- 19 - Hawk, P.B.; Oser, B.L. and Summerson, W.H.(1954), Practical Physiological Chemistry , 13th ed., McGrawhill Book Co., INC., New York , Toranto and London .
- 20 - Hegsted , D.M. ; Mills , R.C.; Elvehjem, G.A. and Hart, E.B. (1941) Choline in the nutriton of chicks . J. Biol. Chem. ; 138 , 459 .
- 21 - Huff, J.W. and Perlzweig , W.A. (1947), J. Biol. Chem . ; 167 , 157.
- 22 - Kutsky, R.J. (1973) , Handbook of Vitamins and Hormones, Van Nostrand Reinhold Co ., New York, Toranto , London and Melbourne .
- 23 - Lin , H.J. and Kirsch , J.F. (1977) , Anal. Biochem., 81, 442 .
- 24 - Marks, J. (1975), Aguide to the vitamins , Medical and technical publishing Co. Ltd . England .
- 25 - Meyskens, F.L.; Moon, T.E. ; Alberts, D.S. and Ritenbaugh, C. (1984), N. Engl. J. Med., 311, 121
- 26 - Neeld , J.B. and Pearson, W.N. (1963) , J.Nutr., 79 , 454
- 27 - Nino, H.V. and Shaw, W. (1982), "Vitamins" in "Fundamentals of Clinical Chemistry", 2nd ed. (W.B. Saunders Company , eds) USA, PP. 542
- 28 - Paul, A. A. and Southgate, D. A. T. (1978), The composition of foods, 4th ed., HER MAJESTY'S STATIONERY OFFICE, London, England.
- 29 - Pearson, D. (1976), The Chemical Analysis of Foods, 7th ed., Churchill Livingstone , London and New York .
- 30 - Price, J.M.; Brown, R.R. and Yess, N. (1965), In Advances in Metabalic Disorders , Vol.2. (Levine, R. and Luft, R., eds) PP. 159 .

- New York , London : Academic press .
- 31 - Satoh, K. and Price, J.M. (1958) . J.Biol. Chem ., 230 : 781 .
- 32 - Sauberlich , H. E. et al. (1972), Amer. J. Clin. Nutr .; 25 : 756
- 33 - Schanderl, S.H. (1970), "Vitamin Assay" , in "Methods in food analysis" . 2nd ed., Joslyn , M.A. (eds) . Academic press , New York, London, pp 754
- 34 - Slater, E.C. and Morell, D.B. (1946), Biochem . J., 40 : 644, 652.
- 35 - Stroev, E.A. and Makarova (1989) Laboratory Manual in Biochemistry , Mis publishers - Moscow .
- 36 - Varley , H.; Gowenlock , A.H. and Bell, M. (1976) , 5th ed., Vol. 2, William Heinemann Medical Books Ltd., London , pp.215 .
- 37 - Varley , H. (1988), In "Practical Clinical Biochem" 6th ed. (Gowenlock, A.H.; McMurray , J.R. and Mclauchlan, D.M., eds) PP.894. Heinemann Medical Books , London .
- 38 - Wooton, L.O.P. and King , E.J. (1959) Micro - analysis in Medical Biochemistry , 3rd ed., London , Toronto .
- 39 - The United States of Pharmacopeia . Official form January 1, 1985 , 21 revision , 16th ed., U.S. pharmacopeial convetion , Inc., Twinbrook parkway .

ترجمہ اللہ

رقم الإيداع

٩٩/٧٨١٧

مطابع الدار الهندسية

ISBN: 977-281-099-9