

## الفصل السادس

### الفيتامينات

تتعدد طرق الفيتامينات ، وتتوقف دقتها على ظروف التقدير . وقد يكون التقدير بقياس نمو الحيوان ، أو استجابته للعلاج من أعراض نقص الفيتامين باختفاء المرض ، وذلك بتغذية مجموعتين من الحيوانات إحداها على عليقة ذات قدر معلوم من الفيتامين ، والأخرى على عليقة خالية الفيتامين ، وتسمى هذه الطريقة بالطريقة الحيوية (Animal or biological) assay method .

أو يجرى التقدير كما سبق لكن على أحياء دقيقة ( بدلاً من حيوانات التجارب ) ، أهمها بكتيريا *Lactobacillus arabinosus* ، بتتميتها في أنابيب بعضها يشمل مستخلصات مادة العلف ، والبعض الآخر يشمل تركيزات متدرجة من الفيتامين المدروس . فزيادة نمو البكتريا تقدر من زيادة إنتاجها لحمض اللاكتيك ( يقدر بالتنقيط ) ، وبالتالي لخفضها لرقم PH ، وتتمكر البيئة بزيادة نموها ، فيقدر إما الحموضة ، أو PH ، أو العكارة وكلها تتناسب طردياً مع مقدار الفيتامين في البيئة ، وتسمى هذه الطريقة بالطريقة الميكروبيولوجية . Microbiological Assay Method

أو يقدر بقياس امتصاص الضوء ، بتقدير أقصى امتصاص ، عند طول موجة يتناسب ولون مستخلص الفيتامين ، ويرسم لها منحنى امتصاص ، أو قد يقدر للفيتامين الوميض الفلوري Fluorescence إن كانت له هذه الخاصية ، وتسمى هذه الطريقة بالطريقة الطبيعية الكيماوية Physicochemical assay method ، وفيها يستخلص الفيتامين ، لتقدير لون المستخلص المعامل بدليل لوني ، لقياس اللون كهروضوئياً .

كذلك هناك طرق فسيولوجية Physiological Assay Methods بقياس المقرز من الفيتامين في البول ، بعد معرفة المستهلك أساساً لتقدير الاستفادة من الفيتامين availability والتقدير قد يكون طبيعياً كيماوياً أو ميكروبياً أو كيماوياً للفيتامين ، فهي طريقة مضاعفة . والطرق الكيماوية Chemical methods هي أكثر الطرق شيوعاً ، وفيها تستخدم تفاعلات نوعية متخصصة لكل فيتامين ، تمكن من التقدير الكمي سواء باستخدام Colorometer ، أو بالتنقيط باستخدام جواهر مؤكسدة ، أو بتحويل الفيتامين لمشتق آخر له فورمنس . وتلاشي أثر تداخلات الشوائب بالعينة ، يجرى عمل تجربة خالية blank ، أو قد يضاف قدر معلوم من الفيتامين للعينة ، ويعاد التقدير ، أو أن ينزع الفيتامين من العينة ويعاد التقدير

وعادة يفضل تقدير الفيتامين بأكثر من طريقة للتأكد من النتائج .

### فيتامين B<sub>1</sub> ( ثيامين Thiamin أو أنيورين Aneurine ) :

لمعرفة احتياجات الإنسان أو الحيوان من فيتامين B1 يحتاج الإنسان إلى تحليل الثيامين وقد تم تطوير طريقة لتقدير الثيامين روتينياً وبثبات في كافة المواد ، سواء أغذية أو أعلاف أو مواد بيولوجية ( كالأنسجة ، البول ، محتويات الأمعاء ، الروث ) .

وتتم التنقية الأولية على أكمل وجه باستخدام التبادل الكاتيوني ضعيف الحمضية (Amberlite CG50) ذي نواة من أكريل أميد Acrylamid ، وهو سهل الحصول عليه ، وفعال في أثره التنقي للمواد التي يتم تحليلها . وكما مادة مؤكسدة فقد استخدم Bromcyan أو Potassium Ferricyanid .

وفي عمل blank أو التقدير الخالي فإنه يستخدم كلوريد حامض السلفونيك - بنزول لإعاقة الثيامين ، أو يستخدم كلوي لتحطيم الثيامين ثم الأكسدة بالبروسيان Bromcyan .

### الأجهزة المستخدمة :

أوتوكلاف صغير ، أعمدة كروماتوجرافي 150×6 م بأنابيب شعرية 30×1 م واحتياطي 100×30 م ، فلوروميتر للقياس بانطفاء Extinction 378 نانومتر ، وانبعث Emission 430 نانومتر .

### الدلائل :

كلها نقية للتحليل ، مع عمل المحاليل بالماء المقطر .

### حفظ العينة :

تحفظ العينة في محاليل 0,8 ، أو 0,4 ، أو 0,2 عياري حامض كبريتيك ، ثم تخلط للجانس 20 ثانية ، ويقدر الحجم من الحامض ، أو الوزن من العينة بالقدر الذي يسمح بتحرير المحلول المتجانس وجعله سائلاً ، مع حفظ التركيز النهائي للحامض حوالي 0,2 عياري . وفيما يلي أمثلة لذلك :

90 جم عينة للتحليل + 30 جم حامض كبريتيك 0,8 عياري ( للشربة ، عصير ، لبن ، بول ) .

60 جم عينة للتحليل + 60 جم حامض كبريتيك 0,4 عياري ( للحم ، خضر ، فاكهة ) .

30 جم عينة للتحليل + 90 جم حامض كبريتيك 0,2 عياري ( خبز ، دقيق ، مواد علف ، روث ) .

ويمكن حفظ العينة المتجانسة بهذا الشكل حتى 3 شهور على -20 م .

## إجراء التحليل :

تستخرج العينة المحفوظة بالتجميد لحرارة الغرفة ، وتخلط للتجانس لفترات قصيرة عدة مرات ، ثم يؤخذ منها عينة مناسبة الوزن في دورق معياري سعة ١٠٠ مل ( تحتوي تركيزاً من الثيامين حوالي ٣-١٢ ميكروجرام / عينة ) ، وتكمل بحمض الكبريتيك ٠,٢ عياري حتى يصل الوزن الكلي للعينة ٤٠ جم ، ويضاف على كل عينة ٠,٢ مل زيت براهفين ، وذلك لتجنب الرغواوي بالمعاملة الحرارية . توضع العينات في الأوتوكلاف لمدة ١٥ دقيقة على ١٢٠ م ، 1 Kp / Cm<sup>2</sup> .

## التحليل الإنزيمي Enzymatic hydrolysis :

بعد برودة العينة إلى حوالي ٣٥-٤٠ م يضبط حموضتها PH ٤,٠ - ٤,٥ بالرج ، ويضاف حوالي ٥ مل محلول ٢ ، ٥ ن - خلات صوديوم ، ويضاف بالماصة ٥ مل معلق الإنزيم ١٠٪ (Clara - Diastase) ، وتخصن في ظلام على ٤٥ م لمدة ٢٠ دقيقة في حمام مائي . يرد إلى حرارة الغرفة ، وبالماء حتى ١٠٠ مل أكمل الدورق . اخلط العينة جيداً ، ثم رشحها على ورق ترشيح متوسط الصلابة ، ويسكب أول ١٠ مل من الراشح ( بالترشيح تزال الأجزاء الجرشة والدهون من المستخلص ) .

يمكن إجراء خطوة تنقية ثانية لإزالة البروتين والنشا باستخدام الكحول .

## التنقية المبدئية للمستخلص على المبادل الأيوني (Amberlite) :

قطر حبيباته ٠,٠٨ - ٠,١٥ م ، طول العمود ٧ سم وقطره الداخلي ٦ م ، سرعة مرور المذيب ١٥ - ٢٥ نقطة / دقيقة ، تنظم بضغط القطن في الأنبوبة الشعرية قبل ملء العمود بالمادة المالئة (Amberlite) ، ينشط المبادل الأيوني بـ ٥٠ مل حامض هيدروكلوريك عياري ثم يعادل بالماء . بالماصة يؤخذ ٢٠ مل من راشح العينة ، وينقل للعمود ، ثم يغسل العمود من الشوائب بمقدار ٢٥ مل ماء ( وتهمل هذه الكمية ) . يغسل الثيامين بحمض الهيدروكلوريك ٠,١٥ عياري ( مرة بـ ١٠ مل ثم مرة بـ ١٥ مل ) من العمود . للأكسدة بالبرومسيان يوضع الغسول في دورق معياري سعة ٢٥ مل ، وللأكسدة بحديدي سيانيد بوتاسيوم يوضع الغسول في دورق معياري سعة ٥٠ مل ، وفي كلا الحالتين يكمل بحمض الهيدروكلوريك ٠,١٥ عياري للعلامة .

الأكسدة والاستخلاص : للأكسدة بالبرومسيان Bromcyan يؤخذ من الغسول ٨ مل في ثلاثة أنابيب سعة ٤٠ مل للطرد المركزي ( منها اثنان كتقدير مزدوج والثالثة كعينة خاوية Blank ) ، وتخلط بالهز مع مراعاة الترتيب والزمن كالتالي :

العينة الخاوية	أكسدة الشوكروم	
٨ مل	٨ مل	العينة
٠,٥ مل	٠,٥ مل	٥,٢ ن - خلاص صوديوم
—	٣ مل وانتظر ١٠ ثوان	بروسيان (٣ جم/١٠٠ مل ماء)
٢ مل وانتظر ٣٠ ثانية	٢ مل وانتظر ١٠ ثوان	هيدروكسيد صوديوم (٥٠ جم/١٠٠ مل ماء)
٣ مل وانتظر ٣٠ ثانية	—	بروسيان (٣ جم/١٠٠ مل ماء)
٣ جم	٣ جم	كلوريد صوديوم
٦ مل	٦ مل	٢ - بيوتانول
٢ دقيقة	٢ دقيقة	رج شديد

وللمعادلة بحديدي سيانيد بوتاسيوم يقسم القسول ( ٥٠ مل ) إلى جزئين :

١ - للأكسدة بالشوكروم ( عينة عادية ) .

٢ - للعينة الخاوية يعاق الثيامين بنزول سلفونيك أسد كلوريد .

ولخلط طبقات المحاليل جيداً توضع في دوارق مخروطية بنية اللون سعة ١٠٠ مل

بغطاء، وتوضع على مقلبات مغناطيسية ، وتراعى الأزمنة كالتالي :

العينة الخاوية	أكسدة الشوكروم	
٢٥ مل	٢٥ مل	العينة
١٥ مل	١٥ مل	٢ - بيوتانول ( من سحاحة )
٣ مل وانتظر ١٥ ثانية	٣ مل وانتظر ١٥ ثانية	هيدروكسيد صوديوم (٥٠ جم/١٠٠ مل ماء)
٣ مل وانتظر ٤٥ ثانية	—	بنزول سلفونيك أسد كلوريد
٠,٦٥ مل وانتظر ٦٠ ثانية	٠,٦٥ مل وانتظر ٦٠ ثانية	محلول حديدي سيانيد بوتاسيوم (٥٠ جم/١٠٠ مل ماء)
٦ جم	٦ جم	كلوريد صوديوم
٦٠ ثانية	٦٠ ثانية	على أعلى سرعة للتقليب مع سد الغطاء

عقب عملية الأكسدة سواء بالبرومسيان ، أو الحديدية سيانيد بوتاسيوم يتم طرد العينة مركزيا ، وينقل من الطبقة العليا ٢ مل إلى خلية Cuvitte الفلوروميتر Fluorometer ، مع إضافة ٠,١ مل لإثانول ، والخلط ، والقياس فلورومتريا .

### القياس فلورومتريا Fluorometric Measurement :

بضبط الجهاز بكبريتات الشينين Chininsulfate ( ١ ميكروجرام / مل في ٠,١ عياري حمض كبريتيك ) على الانطفاء (ext) ٣٥٠ نانومتر ، والانبعاث ٤٣٠ نانومتر (emi) .

### المنحنى القياسي Standard curve :

يجرى الأداء كاملا على محلول قياسي من ثيامين كلوريد - هيدروكلوريد ( ٣ ميكروجرام / مل في ٠,٢ عياري حمض كبريتيك ) بأخذ ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ مل من هذا المحلول ( تعادل ٣ ، ٦ ، ٩ ، ١٢ ميكروجرام فيتامين B<sub>1</sub> / عينة ) .

تخصم القيمة المقاسة فلورستيا للعينة الخاوية من قيمة العينات القياسية ، ثم توقع نقط للعلاقة ما بين تركيز الفيتامين وقراءته فلورستيا ، ورسوم المنحنى القياسي من هذه النقط ويستخدم لتقييم العينات المحللة .

### ملاحظات :

يلاحظ في التحليل المائي بحمض الكبريتيك ٠,٢ عياري أن قيمة PH أقل من ٢ وأنه لفصل الفوسفات يستخدم مزيد من مستحضر الإنزيمات ، مخلوط الإنزيمات يحلل كذلك النشا وبذلك يسهل الترشيح . في عينات البول يمكن الاستغناء عن التحليل المائي لوجود الفيتامين في صورة حرة ، ولكن يلزم التنقية من الشوائب بالبيوتانول قبل الأكسدة ، وذلك على المبادل الأيوني . الأعمدة المستخدمة يفضل عدم إعادة تنشيطها ، بل تستخدم مرة واحدة . دقة هذه الطريقة في اكتشاف الفيتامين ما بين ٩٤ - ١٠٠٪ والنقص عن ذلك يرجع لنقص التنقية مما يعيق الأكسدة بالبرومسيان لإنتاج الثيوكروم فينخفض قيمة المكتشف من الفيتامين .

### ٢ - فيتامين B<sub>2</sub> ( الريبوفلافين ) :

١ - زن عينة ( ١٠ جم ) تطحن مع ١٠ جم كبريتات صوديوم لامائية ويتم استخلاصها بمقدار ٧٠ مل محلولاً منظماً من الخلات ٠,٥ مولر PH ١,٧ لمدة ساعتين على ٦٠م ، ثم أضف ٦٠ مل ماء + ١٠ مل حمض ثلاثي كلوروكليك وسخن ٢٠ دقيقة على حمام مائي حتى تتجمع البروتينات .

٢ - اطرد مركزيا واغسل بمقدار ٢٠ مل محلولاً منظماً ، واجمع المستخلصات ورشحها .

٣ - نقي المستخلص على عمود كروماتوجرافي من ٣ جم فلوريسيل مغسول بالماء الساخن والمحلول المنظم البارد ، وطور الريبوفلافين من العمود بغسيله بمقدار ٤٠ مل محلول بيريدين ، الذي يخفف بضعف حجمه من الماء لقياس الفلورسنت في مدى من طول الموجة ٤٠٠ - ٦٠٠ نانومتر .

٤ - يجرى ما سبق على محلول قياسي معلوم التركيز .

٥ - قس الكثافة الضوئية لمقارنة تحتوي ٥ مل غسولاً + ٢ مل محلولا ، ١ ، ٠ مولر ملح صوديوم EDTA + ١٠ مل ماء . بعد تشميع المحلول بضوء شديد ( ٢٠٠ وات ) على مسافة ٢٠ سم لمدة ٣٠ دقيقة .

٦ - يتم الحساب لتركيز الريبوفلافين في العينة بالميكروجرام لكل جرام عينة بمعلومية تركيز وقراءة المحلول القياسي ضد المقارنة .

### ٣ - فيتامين B<sub>6</sub> :

يتم تقدير فيتامينات ب<sub>٦</sub> ( بيريدوكسال ، بيريدوكسين ، بيريدوكسي أمين ) بواسطة الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء HPLC كالتالي :

١ - يذاب فيتامين ب<sub>٦</sub> في الماء ليحتوي المحلول القياسي على ٠,١ مجم ( ١٠٠ ميكروجرام ) لكل مل من كل مركب من الفيتامين على حدة ، ومحلول آخر يحتوي المركبات الفيتامينية الثلاثة بنسب ١/١/١ . ويحقن الجهاز بمقدار ٢٠ ميكروليتر من كل من المحاليل الأربعة السابقة .

٢ - تستخلص العينات بطحنها مع كمية مساوية وزناً من الإيثانول ٩٥٪ ، وينقل من المستخلص ٢٥ مل إلى دورق معياري بني اللون سعة ١٠٠ مل .

٣ - يجرى عمل مقارنة على ٢٥ مل من الماء .

٤ - يضاف على مستخلص العينات والمقارنة ٦٠ مل محلول حمض هيدروكلوريك ( ١,٠ عياري ) ، ويسخن على ( ٩٧م ) لمدة ساعة . برد وأضف ٥ مل محلول ٦٪ من كل من الدياستاز والببسين المذابين في خلات صوديوم ٢,٥ عياري ، واخلط ثم حضن ١٦ ساعة ( ليلة ) على ٣٧م ( أو لمدة ساعتين على ٤٧م ) برد وأكمل إلى علامة ١٠٠ مل ثم رشح .

٥ - قد تبقى العينات من الشوائب بتمرير مستخلصاتها على عمود كروماتوجرافي ملىء بالدويكس Dowex AG 50 w x 4 or AG 50 w x 8 ، بنقل ٢٥ مل من المستخلص المرشح إلى أعمدة الكروماتوجرافي المحتوية على ٧,٥ جم من المبادلات المذكورة ، ثم يفصل العمود بمقدار ٢٠٠ مل ماء مقطراً ، ويهمل الغسول ثم تغسل الفيتامينات بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم ٠,٠٥ عياري ، ويجمع من هذا الغسول أحجام كل منها ٢٥ مل ،

ويتم تخميض كل هذه الحجوم بواسطة حمض الفوسفوريك ٢ عياري إلى PH ٦ .

٦ - يحقن جهاز الكروماتوجرافي بمقدار ٢٠ ميكروليتر من كل من الحجوم الأخيرة في خطوة رقم (٥) . غالباً يتم الحصول على فيتامين ب٦ كاملاً من عمود الكروماتوجرافي في الثلاث حجوم الأولى ( ٢٥×٣ مل ) من غسول البوتاسا الكاوية .

٧ - يمكن التأكد من عدم تلوث عمود جهاز الكروماتوجرافي السائل بالفيتامين من قبل ، بحقنه بجرعة من فوسفات البوتاسيوم أحادي القاعدة PH ٤,٣٥ ، و عيارية ١,٠ ، وذلك قبل استخدامه بحوالي ٢٤ ساعة . وأفضل حرارة لعمود الجهاز أثناء التطوير هي ٤٠ م ، بمعدل مرور الطور المتحرك ( المذيب ) ٤٥ مل / ساعة ، ومحلول التطوير من فوسفات البوتاسيوم أحادية القاعدة ١,٠ عياري PH ٤,٣٥ . ويتم الامتصاص على طول موجة ٢١٠ نانومتر .

### تقدير مجموعة فيتامين ب٦ بالكروماتوجرافي رقيق الطبقات TLC :

استخدم الكروماتوجرافي رقيق الطبقات في تقدير مجموعة البيريدوكسين في المستحضرات الصيدلانية ، وذلك بتحويل البيريدوكسال غير الثابت إلى مركب ثابت من أسيتيل ميثيل ، بالفاليان في بيئة من الميثانول ، فيظهر الميثيل أسيتال كبقعة منفردة على الرقيقة ( سليكاجيل ) ، التي تطور في أسيتون ، ثم في مخلوط من أسيتون / ديوكسان / أمونيا ( ١/٤,٥/٤,٥ ) . ويظهر البيريدوكسال بفلورسنت أخضر مصفر ، وبالرش بمحلول ٠,٠٤ ٪ من دي كلورو كينون كلورو أميد في كحول ميثانول فيظهر البيريدوكسال والبيريدوكسامين كبقع شديدة الزرقة . وبعد الإظهار للبقع على طول موجة ٢٥٤ نانومتر يمكن كشط البقع وتطويعها ، أو استخلاصها بالأحماض المعدنية المخففة للتقدير الكمي على سبكترو فوتومتر على ٢٦١ نانومتر . وعادة تستخلص العينات بالميثانول في ماء .

### تقدير البيريدوكسول Pyridoxol :

١ - زن ٣ جم عينة في كأس ، واستخلصها بالداي إيثيل إيثير ( ٢٠ مل ) نصف ساعة مع استمرار التقليب . اطرده مركزياً ، واغسل الراسب بمقدار ٢٥ مل من الإيثير . اجمع المستخلصات وبخرها لحوالي ٢٠ مل تحت تفريغ . رشح وخفف إلى حجم معلوم .

٢ - خذ ٢ مل من المستخلص + ٨ مل ماء + ٣ مل محلول منظم فوسفات PH ٧ + ١ مل دليلا ( ٠,١ جم ن - ن دي إيثيل - بارا - فينيلين دي أمين كبريتات في ١٠٠ مل ماء ) + ١,٥ مل محلول ( ٠,١ جم حديدو سيانيد بوتاسيوم في ١٠ مل ماء ) في قمع فصل ، ورج ثم أضف ١٠ مل بنزين ، ورج ثانية لمدة دقيقة . خذ طبقة البنزين واطردها مركزياً .

٣ - أجر ما سبق على محلول قياسي ( ١٠ مجم بيريدوكسول هيدروكلوريد في ١٠٠ مل ماء ) وكذلك على مقارنة برج ٥ مل بنزين مع محلول حمض بوريك ٣٪ واطرد مركزيا للطبقة عديمة اللون تقريبا .

٤ - قدر الكثافة الضوئية على ٦٠٦ نانومتر ضد بنزين .

#### ٤ - فيتامين B<sub>12</sub> :

يتم تقديره باستخلاصه بمذيب عضوي ، وفصله بالتبادل الأيوني الكروماتوجرافي ، ثم تقديره على سيكتروفوتومتر كالتالي :

١ - زن عينة تحتوي تقريبا على ١٠٠-٣٠٠ ميكروجرام فيتامين ، ويضاف إليها خمسة أضعاف وزنها أسيتون (٨٥٪ في ١,٠ مولر حمض هيدروكلوريك ) وتترك ٢٠ دقيقة ، ثم ترشح ويعامل الراسب بحجم مساو من ميثانول ٥٠٪ + ٢ مل سيانيد بوتاسيوم واضبط PH بحمض السيتريك ( ٣٠ جم حمض سيتريك + ٦٥ جم سيترات صوديوم في اللتر ) إلى PH ٧,٥ .

٢ - سخن الخليط إلى ٥٠م على حمام مائي ، ثم اتركه ساعة ، ثم حمضه بحمض السيتريك السابق إلى PH ٤ في خزانة غازات للحد من حمض الهيدروسيلانيك ، وبعد الطرد المركزي يغسل الراسب بمحلول الاستخلاص ، واجمع المستخلصين المائتين .

٣ - بخر الميثانول تحت تفريغ ، ثم استخلص المتبقيات بمخلوط الفينول ( ٢٠ مل من محلول ٥٠ جم فينول في ١٠٠ مل رابع كلوريد كربون ) في قمع فصل . ويفصل المستخلص الفينولي من الطبقة المائية ، ثم يضاف ١٠ مل رابع كلوريد كربون + ٢٠ مل بيوتانول ، ويرج بشدة مع ٢٠ مل ماء .

٤ - ينتقل فيتامين ب١٢ إلى الطبقة المائية التي تطور على عمود كروماتوجرافي طول ١٠ سم مليء بالمبادل الأيوني Amberlite Xe 97 ( الذي يعلق في ماء عدة مرات ، ويصرف هذا الماء ، ثم يضاف ٣٠ مل صودا كاوية عيارية ، ويخلطها معا بالتقليب ، وبعد ٢٠ دقيقة تزال الصودا الكاوية ، ثم يغسل المبادل الأيوني بالماء حتى يتعادل ، ثم يدفع المبادل إلى العمود ، وينشط بغسيله في العمود بالسيتريك السابق ) . يحمض مستخلص العينة على العمود بالسيتريك السابق ، ويغسل بحمض الهيدروكلوريك ١,٠ عياري ثم بالأسيتون ٥٠ مل ( ٨٥٪ في هيدروكلوريك ١,٠ عياري ) ثم بالهيدروكلوريك ١,٠ عياري حتى تظهر منطقة وردية ( قرنفلية ) هي المدمصة للفيتامين وذلك في قمة العمود . يغسل الفيتامين برابع هيدروفيوران ( ٦٠٪ في حمض هيدروكلوريك ١,٠ عياري ) وتلاحظ حركة المنطقة القرنفلية .

٥ - يجمع حوالي ٢٠ مل من الغسول المحتوي على الفيتامين ، ويبخر رابع هيدروفيوران

تحت تفريغ ، ويطرد الباقي مركزياً إذا ظهرت عكارة ، وينقل المحلول إلى دورق معياري ١٠ مل .

٦ - قدر الكثافة الضوئية ضد ماء ، وتكون نسبة قراءة امتصاص الفيتامين عند ٣٦١ ، ٥٤٨ نانومتر حوالي ٣ - ٣,٥ فيكون تركيز الفيتامين بالميكروجرام =

$$\frac{\text{الامتصاص عند } 361 \text{ نانومتر} \times 100}{0,207}$$

حيث المقام (٠,٢٠٧) عبارة عن امتصاص ١٠٠ ميكروجرام فيتامين / ١٠ مل محلولاً قياسياً فيبقى فقط تعديل التركيز حسب وزن العينة ومحتوى العينة في الحجم المقدر ( ١٠ مل ) .

## ٥ - حمض الفوليك أو حمض بتيرويل جلوتاميك :

### Folic Acid (Pteroyl glutamic acid)

١ - تؤخذ وزنة عينة تحتوي ١٠٠ - ٢٠٠ ميكروجرام حمض فوليك ، وتستخلص بمحلول منظم فوسفات PH ٨ ( ٥ جم فوسفات صوديوم ثنائية القاعدة في ١٠٠ مل ماء ) ، ويطرد المستخلص مركزياً .

٢ - يؤخذ حجم من المستخلص يحتوي تقريباً ٥-١٠ ميكروجرام حمض فوليك ، ويضبط PH إلى ٤ بمحلول منظم خلات ٢,٥ مولر ( ٥٠٠ مل حمض خليك ٥ عياري + ١٠٠ مل هيدروكسيد صوديوم ٥ مولر ، وتخفف إلى لتر بالماء ) ويضاف بالتنقيط محلول برمنجنات بوتاسيوم ٤٪ حتى نقطة اختفاء اللون .

٣ - بعد ٥ دقائق تحطم الزيادة من البرمنجنات بإضافة ١,٠ مل فوق أكسيد هيدروجين ٣٪ ، وانقل المحلول إلى عمود فلوريسيل ( ٥٠٠ جم تخلط في لترين من محلول رابع بورات صوديوم ٤٪ ، واغل نصف ساعة ، ثم اهمل رابع بورات الصوديوم ، وكرر مرة أخرى ، ثم اغسل بالماء المقطر ، علق مرة ثانية في لترين من محلول منظم خلات ٥,٠ مولر ، واغل نصف ساعة ، ثم اغسل بمحلول منظم ٢,٥ مولر خلات ثم جفف هوائياً) . اغسل العمود مرتين ، في كل مرة بمقدار ١٠ مل محلول منظم خلات ٢,٥ مولر ، ثم طور ٤ مرات  $\times ٥$  مل محلول منظم رابع بورات . يضبط PH المستخلص بـحمض الهيدروكلوريك ٢ مولر إلى ٤ - ٤,٥ ، ثم خفف بالماء إلى ٢٥ مل .

٤ - قدر الكثافة الضوئية على ٤٧٠ نانومتر ، ثم أضف ١,٠ مل هيدروكسيد صوديوم ٤٠٪ لكل ١٠ مل ، وكرر القياس .

٥ - كرر ما سبق على محلول قياسي من حمض الفوليك ( ١,٠ ميكروجرام / مل ) ، وبهذه المقارنة مع ١٠ مل مستخلص محلول قياسي ( من العمود الكروماتوجرافي ) يمكن

حساب تركيز حمض الفوليك بالميكروجرام في ١٠ مل مستخلص =  $\frac{F_v}{F_s}$  حيث  $F_v$  كثافة فلورسنت العينة ،  $F_s$  كثافة فلورسنت المحلول القياسي .

## ٦ - كالسيوم بانتوثينات Calcium Pantothenate :

١ - عد عمود كروماتوجرافي من كل من المبادلات الأنيونية والكاتيونية ( ارتفاع كل منهما ٥ سم ، ويفصلهما سدادة من الصوف الزجاجي ) ، ويستخدم المبادل الكاتيوني مثل Dowex 50W - X4 ، كما يستخدم الفلوريسيل لعزل الريبوفلافين . يغسل العمود قبل استخدامه بحمض هيدروكلوريك ٠,١ مولر ( ١٠ مل ) ، ثم بالماء ( ١٠٠ مل ) .

٢ - تستخلص العينة بكحول بنزيل ، ويؤخذ من المستخلص ١٠ مل تحتوي تقريباً ١,٢ مجم كالسيوم بانتوثينات ، وتطرده مركزياً مع ١٣ مجم فوسفات صوديوم أحادية القاعدة . رج الأنبوبة ١٥ دقيقة ، ثم أضف ٢٠ مل كحول بنزيل ورج ١٥ دقيقة .

٣ - تعمل تجربة خاوية بأخذ ١٥ مل من المستخلص الكحولي البنزيلي + ١٠ مل تولوين + ١٢ مل ماء ، ورج بشدة ١٥ دقيقة واطرد مركزياً .

٤ - يؤخذ ١٠ مل من الطبقة المائية ( خطوتها رقم ٢ ، رقم ٣ ) ، وتوضع كل منها على عمود ، ويجمع الناتج من تطوير العمود في دوارق ١٠٠ مل ، يغسل العمود ٦ مرات × ٥ مل ماء .

٥ - أضف ٢٥ مل حمض بوريك ( ١٠٠ جم / ٢ لتر ) + ٨ مل هيدروكسيد صوديوم ٣,٥ مولر إلى الغسول ، وسخن على ١٠٠م لمدة ساعة للتحلل المائي . برد واضبط PH إلى ٨ بإضافة ٩ مل حمض هيدروكلوريك ٣ مولر ، ثم أضف ٤ مل محلول نافثوكينون ( ٢٥٠ مجم ١-٢-٤ - سلفونات / ٥٠ مل ماء ) ، واخلط وسخن على ١٠٠م ، ثم برد في ثلج .

٦ - أضف إلى كل دورق ٤ مل محلول ثيوكبريتات ( ٢,٥ جم / ١٠٠ مل ) + ٤ مل دليل فورمالدهيد ( ٣ أجزاء حمض هيدروكلوريك ٦ مولر + ٤ أجزاء حمض خليك ثلجي + ٤ أجزاء فورمالدهيد ٠,٦ مولر ) ، وخفف إلى ١٠٠ مل .

٧ - بعد ١٠ دقائق ، قدر الامتصاص على ٤٦٥ نانومتر ، مع المقارنة بمحلول قياسي ( ٢,٥ جم / ١٠٠ مل ) ، أجر عليه نفس الخطوات ، وضد مقارنة من ٤ مل ماء بدلاً من محلول النافثوكينون إلى مستخلص العينة ، واستنتج تركيز بانتوثينات الكالسيوم

بالمليجرام في ١٠ مل مستخلص =

$$\times \left( \frac{\text{امتصاص العينة - امتصاص المقارنة}}{\text{امتصاص المحلول القياسي}} \right)$$

كمية الفيتامين القياسي بالمليجرام

## ٧ - الكولين Choline :

- ١ - زن ٢ جم عينة ، واخلطها مع ٢٠ مل إيثير بترولي ، واسحب المحلول بعد ٢٠ دقيقة ، ثم أضف ١ مل حمض هيدروكلوريك ٢٠٪ ، واستخلص ٢٠ دقيقة بالإيثانول ٨٠٪ ( ٢٠ مل ) بالتقليب المستمر . اطرد مركزيا ، واغسل الراسب بمحلول الاستخلاص ( ٥ مل ) ، واجمع المستخلصات ، وقطر الزيادة من الإيثانول تحت تفريغ .
- ٢ - انقل المتبقيات إلى دورق معياري ٥٠ مل ، وأكمل بالماء إلى العلامة . وخذ ٨ مل من المستخلص + ٢ مل ماء + ٥ مل فوسفات ثلاثي صوديوم مشبعة وذلك للتقدير .
- ٣ - النقل إلى القلوي قد يعكر المحلول فيطرد مركزيا ، ويضاف إلى الرائق ٥ مل محلول رينيكات ( ٢٪ أمونيوم رينيكات Ammonium Reineckate في ميثانول ) واخلط . اتركه يستقر في تلاجة على ٥ مل لمدة ساعتين .
- ٤ - اطرد البلورات المترسبة مركزيا ، ثم اغسلها بمحلول رينيكات ( ٥ مل في ١٠٠ مل ماء ) ، واطرد مركزيا مرة أخرى . أذب الراسب في أسيتون ، ورشح خلال صوف زجاجي إلى دورق معياري ١٠ مل ، وخفف إلى العلامة بالأسيتون .
- ٥ - يجرى ما سبق على محلول قياسي من الكولين بيتارتات في أسيتون ، وكذلك على عينة خاوية كمقارنة من دقيق الصويا منزوع الدهن . ويجرى تقدير الكثافة الضوئية على ٥٢٦ نانومتر ضد أسيتون ، مع طرح قراءة المقارنة من كل من العينة والمحلول القياسي ، وعمل حساب التخفيف ووزن العينة لحساب تركيز الكولين بالمليجرام لكل جم عينة .

## ٨- فيتامين ج (حمض الأسكوربيك وحمض دي هيدرو أسكوربيك) :

- ١ - ضع وزنة من العينة بالضغط حوالي ١٠ جم في دورق ، ثم أضف ٣٠ مل كلوروفورم (٤م) + ٢٥ مل حمض ميتافوسفوريك ( ٢٠٠ جم حمض ميتافوسفوريك مطحونا ويذاب في ماء ، وتكمل إلى ٢ لتر بالماء وتحفظ على ٤م . هذا المحلول ثابت لمدة أسبوع ) . سد الدورق ، ورج ثم اتركه ١٠-١٥ دقيقة .
- ٢ - أضف ٢٥ مل ماء ، وسد ثم رج بشدة ١٠ ثوان ، ثم اتركها ١٠-١٥ دقيقة في حمام مائي على ٢٠ م .
- ٣ - اطرد مركزيا لفصل طبقتي الماء والكلوروفورم ، حيث تؤخذ الطبقة المائية للخطوات التالية .

- ٤ - يؤخذ حجم معلوم من المستخلص المائي ، ويوضع في دورق سعة ٥٠ مل ذي سداة ، وخففه إلى ٤٠ مل بمخلوط متساوي الحجم من محلول حمض ميتافوسفوريك والماء . أضف ٠,٥ - ١ مل من محلول الأكسدة الإندوفينول ( ٠,٥ جم صبغة ٢-٦-

دي كلوروفينول إندوفينول / ١٠٠ مل تخضر فوراً قبل الاستخدام ) ، واخلط جيداً ، فينشأ لون أحمر يستمر على الأقل ١٥ دقيقة .

٥ - أضف حوالي ٣٠٠ مجم مادة مساعدة للترشيح ، ورج ثم رشح ، ليس من الضروري أن يكون الراشح رائقاً .

٦ - يؤخذ بماصة ١٠ مل من الراشح إلى أنبوبة طرد مركزي + ٢ مل محلول الهيدرازين ( أذب ٢ جم من ٢-٤- دي نيتروفينيل هيدرازين في ١٠٠ مل حمض كبريتيك مخففاً ( ١ : ٤ ) ، ويحفظ بارداً لمدة لا تزيد عن أسبوع ) ، واخلط ومرر في الأنبوبة بسرعة تيار من النيتروجين ، أو ثاني أكسيد الكربون ، وسد الأنبوبة واغمسها في حمام مائي (٢٠م) ١٥ ساعة ( ليلة ) .

٧ - أضف ٣ مل ماء + ٢٠ مل مخلوط خللات لإثيل / حمض خليك ثلجي / أسيتون (٢/٢/٩٦) ، وحوالي ٨٠٠ مجم مساعدة ترشيح ، وسد ورج بشدة ٣٠ ثانية ، واطرد مركزيا .

٨ - انقل ١٥ مل من الرائق في دورق تقطير ، وبخر تحت تفريغ حتى تبقى طبقة زيتية . أذب هذه المتبقيات في ٤ مل حمض كبريتيك ( ١ : ١ ) ، ورج بشدة لإذابة المتبقيات تماماً ، ثم قس الامتصاص الضوئي على طول موجة ٥٠٩ نانومتر بعد ٢٠-٣٠ دقيقة من ذوبان المتبقيات في حمض الكبريتيك ، ضد مقارنة من حمض الكبريتيك المخفف ( ١ : ١ ) .

٩ - تجرى تجربة خاوية من العينة بنفس الخطوات السابقة .

١٠ - يجرى تقدير للكشافة الضوئية لمحلول قياسي ، تم عليه نفس الخطوات كما في العينة والتجربة الخاوية .

١١ - يعبر عن تركيز فيتامين (ج) في العينة بالجرام / كجم .

### ملحوظة :

يحضر المحلول القياسي من حمض الأسكوربيك بإذابة ٥٠ مجم ل - حمض أسكوربيك في ٢٠ مل محلول حمض ميتافوسفوريك ، ثم يكمل إلى ١٠٠ مل بالماء ، على أن يحضر طازجاً قبل الاستخدام مباشرة .

هذا وقد يقدر الفيتامين في مستخلص مائي للعينة يحتوي حمض أو كساليك ، أو حمض ميتافوسفوريك ، فيؤخذ ١ مل من مستخلص العينة ( وكذلك من محلول قياسي ) + ٥ مل دليل ( ١٪ ) في حمض هيدروكلوريك ٠,١ مولر ، ويخلط ويسخن لمدة ساعة على ٥٠م ، ثم يقدر الامتصاص الضوئي على ٣٩٥ نانومتر ضد مقارنة من ١ مل ماء بدلاً من مستخلص العينة .

ويقدر فيتامين ج كذلك بالمعايرة بوزن ١٠ جم عينة في كأس وتغطى بالكلوروفورم

(٣٠ مل) ، ويقلب ثم يترك يستقر نصف ساعة ، ثم يستبعد الكلوروفورم ، وتنقل العينة إلى دورق معياري ٢٥٠ مل ملىء بثاني أكسيد الكربون ، ويرج ٥ دقائق مع مخلوط الاستخلاص ( ١٠٠ مل ميثانول تحتوي حمض أوكساليك ١, ٢٠ ) + ٢٠ مل إثير بترولي + ٢ مل ماء تحتوي حمض أوكساليك ( ٢, ٠ ) ، ثم يترك يستقر ويرشح ، ويهمل أول ٣٠ مل من الراشح ، بينما يجمع ١٠٠ مل تالية في دورق معياري . يؤخذ منها ٢٠ مل في دورق + ٢٠ مل محلول حمض أوكساليك ١, ٠٪ مشبع بثاني أكسيد الكربون ، ويرج ثم يضاف ١, ٥ مل حمض أوكساليك ٥٪ + ٢ مل خلاص رصاص ١٠٪ في ماء ، ويرج ويترك ١٠ دقائق ، ثم يرشح ، ويفسل الراسب بمقدار ٢٠ مل ماء ، ويجمع المترشح ، ويضبط درجة حموضته PH إلى ٣, ٥ باستخدام خلاص الصوديوم ٥٪ في ماء ثم نقط المحلول بصبغة ٢-٦-دي كلورو فينول - إندوفينول -١٠-٤ مولر ( ١٥-٢٠ مجم ملح صوديوم دي كلورو فينول إندوفينول وزن جزئي ٠, ٠٩, ٢٩٠ تذاب في ٥٠٠ مل ماء مقطرًا ، ويضاف إليها ١٢ مجم بيكربونات صوديوم ، وينقط منه على حمض أسكوربيك نقي لتحديد عيارته ) حتى يظهر لون قرنفلي ثابت لمدة ٥ دقائق على الأقل ( ١ مل من هذا الدليل = ٠, ٠١٧٦ مجم حمض أسكوربيك ) .

ولمعايرة المحلول القياسي ( ٠, ٠١٪ في ماء يحتوي ١, ٢٠٪ حمض أوكساليك ويشبع بثاني أكسيد الكربون ، وهذا المحلول ثابت ليوم واحد ) يؤخذ منه ٢ مل وتخفف بحمض أوكساليك ١, ٢٠٪ إلى ٣٠ مل ، ويضبط PH إلى ٣, ٥ بإضافة خلاص الصوديوم ، والتنقيط بالصبغة ، ويستنتج تركيز الفيتامين بالمجم / كجم بمعلومية تركيز المحلول القياسي وحجم الصبغة المعايرة له وحجم الصبغة المعايرة للعينة .

وهذا التركيز غير مصحح للدهيدرو حمض أسكوربيك .

ولتقدير حمض الأسكوربيك في الدم يخلط حجم من البلازما حديثة الفصل عن الدم مع حجم من حمض ثلاثي كلورو خليك ، أو حمض ميتافوسفوريك . رشح أو اطرد مركزيا . اسحب ٠, ٢ مل صبغة مخففة ( ٤٠ مجم صبغة ٢-٦-دي كلورو فينول إندوفينول في ١٠٠ مل ماء ، ١ مل = ٠, ٢ مجم حمض أسكوربيك لا يستخدم بعد أسبوع من التحضير ، خفف ٥ مل إلى ٢٥ مل فيكون ١ مل = ٠, ٠٤ مجم حمض أسكوربيك ) إلى أنبوبة اختبار ، وعايها بالراشح للعينة حتى يختفي اللون الأحمر ، ٠, ٢ مل صبغة = ٠, ٠٠٨ مجم حمض أسكوربيك . تركيز حمض الأسكوربيك مجم /

$$0,008 \times 2 \times 100$$

$$100 \text{ مل بلازما} = \frac{\text{حجم الراشح للعينة المستهلك في المعايرة ( مل )}}{0,008 \times 2 \times 100}$$

إذا لم يقدر الفيتامين في الدم مباشرة عقب جمعه فتحفظ العينات بجمعها على نقطة

من سيانيد البوتاسيوم ٥٪ ، ونقطة من أوكسالات البوتاسيوم ٢٠٪ لكل ٥ مل دم .  
 ولتقدير فيتامين ج في البول يضاف ١٥ مل حمض خليك ثلجي إلى ١٥٠ مل بولاً  
 طازج الجمع . تملأ سحاحة بمقدار ٥ مل من البول المحمض ، عاير ١ مل محلول صبغة  
 ( ٢ : ٦ - دي كلوروفينول إندوفينول ) قياسي ( يعادل ٠,٠٢ مجم حمض إسكوربيك )  
 في أنبوبة اختبار مضافاً إليه نقطة حمض خليك ثلجي بالبول المحمض حتى يختفي لون  
 الصبغة البنفسجي . يجب ألا تتعدى عملية المعايرة عن دقيقتين . فيكون تركيز حمض  
 الأسكوربيك مجم / ١٠٠ مل بول =

$$100 \times 0.02$$

حجم البول المستخدم في المعايرة × ( حجم البول + حجم حمض الخليك الثلجي المضاف )

## ٩ - فيتامين أ Vitamin-A determination والكاروتين B-Carotin :

تتوقف طرق تقدير فيتامين أ ضوئياً ( سبكتروفوتومتري أو فلورومتري ) على قياس  
 الفورمنس الأخضر المصفر للفيتامين .

وينزع الماء بطريقة Anhydromethod ، وتقديره سبكتروفوتومترياً ، تعد هذه طريقة ممتازة؛  
 لأن الفيتامين المنزوع الماء لا ينافسه أي مركب آخر في ظهور منحناه عند نفس طول  
 الموجة ( ٣٩٩ نانومتر ) ، فلا يحدث بالتالي أي اختلاط للفيتامين مع الشوائب من العينة  
 ، إذ أن طرق القياس السبكتروفوتومتري تشترط نقاء الفيتامين أو مستحضراته .

كما قد يقدر الفيتامين كروماتوجرافياً TLC ، لكن يتحطم الفيتامين في ظرف دقائق  
 قليلة على الرقيقة الجافة للكروماتوجرافي ، مما لا يمكن من استخلاص الفيتامين من الرقيقة  
 للتقدير الكمي ، وإن كان يجري التقسيم الكمي بالتصوير للرقيقة وتقديرها ضوئياً . وفيما  
 يلي طريقة للتقدير الكمي لفيتامين أ والكاروتين سبكتروفوتومترياً Spectrophotometric :

### تقدير فيتامين أ في مواد العلف :

#### أساس الطريقة :

بطريقة نزع الماء يمكن الحصول على الفيتامين في صورة كحولية ، يزيد فيها رابطة  
 مزدوجة عن الفيتامين ، ويظهر أقصى امتصاص في محلول من البنزول عند ٣٩٩ نانومتر ،  
 ولحساب التركيز يستخدم المعامل ١٦,٤ من Specific Extinction (E) .

ويوجد الفيتامين في مواد العلف ككحول حر أو إستر . وقد يجري عملية تصبين لمادة  
 العلف قبل نزع الماء ، وذلك لتقدير الإستر والكحول الحر ، وإن كان التصبين يصحبه فقد  
 في الفيتامين ما بين ٣٥ إلى ٣٨٪ . ولا يتأثر الكاروتين بكل هذه العمليات ، فبالتالي  
 يمكن تقديره في المستخلص البنزولي .

ويقدر فيتامين أ سبكتروفوتومتريا على صورة Anhydrovitamin ، ويقدر الكاروتين كقيمة صفراء كلية باستخدام المعامل ٤,٣٧ .

المعامل	طول الموجة التي عندها أقصى امتصاص	في بنزول
١٦,٤	٣٩٩ نانومتر	انهيدروفيتامين أ
٤,٣٧	٤٦٥ نانومتر	كاروتين

### الكيمائيات والمحاليل :

إيشانول ٩٩٪ ، إثير بترولي ٦٠-٨٠م ، بنزول ، حمض هيدروكلوريك ( ١ : ٩ : حامض : إيشانول ٩٩٪ ( حجم / حجم )) ، ماء مقطر ، حمض أسكوربيك ( ٣٪ في إيشانول ٨٧٪ ، كبريتيد صوديوم ( ٢,٣٪ في إيشانول ٨٧٪ ) ، صودا كاوية ( ١,٥ عياري في ماء ) ، بوتاسا كاوية ( ٣,٢٪ في إيشانول ٨٧٪ ) ، هيدروكينون ( ٠,٥٪ في إيشانول ٩٦٪ ) ، كبريتات صوديوم جافة .

### تحضير العينة :

العينة الصلبة بعد طحنها تصب مباشرة ، ويفصل الفيتامين والكاروتين من مخلوط التصبن بواسطة الإثير البترولي . العينة السائلة يوسب بروتينها بالإيشانول ، ثم يستخلص الخليط عدة مرات بالإثير البترولي ، ثم يرج ويطرد مركزيا ، وتسحب طبقة الإثير البترولي لإجراء التصبن عليها ، وترج ٣ ساعات على الأقل . بعد فصل الطبقات ، تستخلص الطبقة المائية عدة مرات بالإثير البترولي ، وتجمع طبقات المذيب العضوي . في كلتا العينتين ( صلبة وسائلة ) يكون الفيتامين في صورة كحول حر .

### التصبن :

حجم العينة ( ١٠-٣٠ جم ) يتوقف على محتواها الفيتاميني ، ( الكبد والأعضاء يكفي ١ جم ) . توضع العينة في زجاجة بنية اللون ذات غطاء سعة ١٥٠-٢٠٠ مل مع ٣٠ مل إثير بترولي + ٢ مل ماء مقطراً + ١٠ مل محلول هيدروكينون + ٤ مل محلول سلفيد صوديوم + ١ مل محول حمض أسكوربيك + ١٠ مل محلول بوتاسا كاوية ، وترج الزجاج لمدّة ٨-١٠ ساعات . العينات السائلة يوضع مستخلصها الإثيري البترولي مع باقي محاليل التصبن الأخرى ، وترج ٤ ساعات .

### الاستخلاص :

أضف ٥٠ مل ماء مقطراً للزجاجة ، وأغلقها مباشرة ، ورج ساعة أخرى . افصل الطبقات في قمع فصل أو بالمص . يستخلص الجزء المائي عدة مرات في كل مرة ١٥ مل إثير بترولي ، ويجمع المستخلص ، ويغسل مرتين بالماء المقطر ويجفف بكبريتات الصوديوم .

## نزع الماء من الفيتامين :

بخر طبقة الإثير البترولي تحت تفريغ على حمام مائي في وجود النيتروجين على ٣٥م حتى الجفاف ، ثم أذب الراسب في ٧ مل بنزول . ٥ مل من البنزول + ٥ مل محلول هيدروكلوريك واخلط ١٥ دقيقة في ظلام . ضع المخلوط في قمع فصل ، واغسله على الترتيب مرة بالماء المقطر (٥ مل) ، ثم بالصودا الكاوية (٥ مل) ، ثم بالماء المقطر (٥ مل) . جفف الطبقة البنزولية على كبريتات صوديوم ، وانقلها للتقدير سبكتروفوتومتريا .

## التقدير لفيتامين أ :

يقاس كل من الجزء المنزوع الماء ضد الجزء البنزولي الأولى الباقي بدون نزع الماء على ٣٩٩ نانومتر ، فيكون تركيز فيتامين أ هو ناتج E (Extinction) مضروباً في المعامل ١٦,٤ معبراً عنه بالوحدات الدولية / مليلتر بنزول .

## تقدير الكاروتين :

الفرق في E بين الجزء المنزوع الماء والبنزول الصافي على ٤٦٥ نانومتر يعطي قيمة اللون الأصفر الكلي . البيتاكاروتين تحسب من E مضروبة في المعامل ٤,٣٧ معبراً عنها بالميكروجرام / مل بنزول .

وتجرى جميع الخطوات في معزل عن ضوء الشمس المباشر .

هذا وقد أمكن تقدير فيتامين أ حديثاً في مواد العلف باستخدام الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء HPLC . كما يمكن فصل الكاروتين وكذا الزانثوفيل على أعمدة الكروماتوجرافي وتقديرها كهروضوئياً.

## تقدير فيتامين (أ) ضوئياً بحمض ثالث فلوروكليك :

١ - عد محلولاً قياسياً متصبناً لفيتامين (أ) في كلوروفورم ، بتركيز يتراوح ما بين  $10 \times 10^{-3}$  مولر إلى  $1,2 \times 10^{-5}$  مولر . ضع ١,٥ مل منه في خلية الأسبكتروفوتومتر + حجم مساو من حمض ثلاثي فلورو خليك بمحقق ، بحيث تضع الحمض أسفل سطح الكلوروفورم ، وبعد ١٠ ثوان قس الكثافة الضوئية على ٦١٦ نانومتر .

٢ - استخدم نفس الخطوات على ١,٥ مل مستخلص عينة في كلوروفورم ، أي بعد تصبين العينة ، واستخلاص الدهن في إثير وتجفيفه ، ينقل تحت تيار نيتروجين أو هيليوم لإذابته في كلوروفورم .

٣ - يصلح هذا التكنيك لتقدير فيتامين (أ) والصور المتعددة لمشتقاته مثل الإستر ، والألدهيد ، والحمض .

## تقدير فيتامين (أ) فلورومتريا في اللبن :

١ - يصبن ١ مل من اللبن مع ٢ مل بيروجالول إيثانولي ١٪ + ٢ مل هيدروكسيد

بوتاسيوم ٣٧,٥٪ على ٦٠م لمدة نصف ساعة .

٢ - برد العينة ، ثم أضف ١٠ مل هكسان ، وهز على هزاز ١٠ دقائق ، ثم أضف ماء مقطرًا لرفع مستوى طبقة الهكسان ثم اطرد مركزياً ٥ دقائق .

٣ - انقل ٣ مل من المستخلص بمحقن إلى خلية الفلوروسبكتروفوتومتر ، وقدر الفلورسنت على ٤٧٥ نانومتر انبعاث Emission و ٣١٣ نانومتر تهيج Excitation .

٤ - أجر مقارنة بالماء المقطر ، واطرح قراءتها من قراءة العينات .

٥ - قدر كذلك قراءة محلول قياسي للفيتامين ( خللات ريتينول في هكسان ) ، واحسب تركيز الفيتامين في العينات كمكافئات ريتينول .

### ١٠ - الكاروتين والزانثوفيل :

١ - زن ٢ جم عينة مطحونة جافة هوائياً في دورق معياري ١٠٠ مل + ٣٠ مل مخلوط بنزين / أسيتون (٣/٧) + ٠,٥ مل ماء واتركه تحت نيتروجين ١٦ ساعة للاستخلاص في الظلام .

٢ - أكمل إلى العلامة بالبنزين ، ورج واتركها فترة ، ثم اسحب منها ٥ مل ، توضع على عمود كروماتوجرافي ملىء بأكسيد الماغنسيوم والسيليت ( ١ : ١ ) ، وتسحب بواسطة تفريغ من مضخة مائية لمدة ٣ دقائق .

٣ - ثم يغسل العمود بمقدار ٢٠-٢٥ مل مخلوط بنزين / أسيتون (١/٩) نقطة نقطة، وينتهي التطوير بالحصول على مخلوط البنزين / أسيتون ( محتوية على الكاروتين ) خلال العمود في دورق معياري ٢٥ مل .

٤ - أكمل الدورق المعياري إلى العلامة بنفس المخلوط ( بنزين / أسيتون ) ، وقس الكثافة الضوئية ضد مقارنة من مخلوط ( بنزين / أسيتون ) على ٤٥١ نانومتر .

$$٥ - \text{قدر الكاروتين ( مجم / كجم )} = \frac{\text{الكثافة الضوئية} \times ١٩,٩٢٠٣١٥ \times ١٠٠}{\text{وزن العينة ( جم )}}$$

علماً بأن المعامل ١٩,٩٢٠٣١٥ يصلح فقط للحجم النهائي ٢٥ مل .

٦ - اغسل العمود بمقدار ٢٠-٢٢ مل مخلوط بنزين / إيثانول (١/١) بالتقطيع ، واستقبل الغسول في دورق معياري ٢٥ مل ، وأكمله إلى العلامة بنفس المخلوط ( بنزين / إيثانول ) ، وقس الكثافة الضوئية على ٤٤٥ نانومتر .

$$٧ - \text{قدر الزانثوفيل ( مجم / كجم )} = \frac{\text{الكثافة الضوئية} \times ٢١,٦٤٥ \times ١٠٠}{\text{وزن العينة ( جم )}}$$

علماً بأن المعامل ٢١,٦٤٥ يصلح فقط في حالة الحجم النهائي ٢٥ مل .

## تقدير الكاروتين :

١ - تقطع عينة طازجة ، ويوزن منها ١٠ جم فوراً ، وتوضع في كأس ٢٥٠ مل ، وتغطى بالأسيتون ، وتترك على ٤٠ م لمدة ليلة في ظلام .

٢ - يرشح الأسيتون إلى قمع فصل ٢٥٠ مل .

٣ - تنقل باقي العينة من الكأس إلى خلاط ، ويضاف إليها كمية من الإثير البترولي ( ٤٠-٦٠ درجة غليان ) ، وضعف الكمية أسيتون ، على أن تغطى كمية المذيبات أسلحة الخلاط ، ويتأكد من وجود رغوة قبل تشغيل الخلاط ، وإلا يضاف بعض الماء ، لأن الرغوة تمنع فقد من العينة . يخلط ٥ دقائق .

٤ - يرشح المخلوط ، وتكرر عملية الخلط والترشيح ٣-٤ مرات ، وتجمع المستخلصات على قمع الفصل الذي يكون به طبقتان ، السفلى وبها الأسيتون التي تفصل ، ويؤخذ منها ٢٥ مل ويضاف إليها كحول ميثيل ، وترج بشدة في قمع فصل .

٥ - تزال الطبقة السفلى ، ويستمر تكرار العملية السابقة حتى تصبح هذه الطبقة عديمة اللون .

٦ - تجمع كل الطبقات العليا ، وتغسل بالماء ٣ مرات ، وترشح على كبريتات صوديوم إلى كأس ١٠٠ مل ، وتقرأ كثافتها الضوئية على ٤٤٠ نانوميتر .

٧ - يجرى تقدير الكثافة الضوئية لمحلول قياسي ( ٢ جم بيكرومات بوتاسيوم في لتر ماء ، يتشابه لونها مع اللون الناتج من إذابة ٣٥ مجم كاروتين / لتر ، أي ٣٥ جزءاً في المليون ) .

٨ - احسب تركيز الكاروتين مجم / ١٠٠ جم عينة =

$$\frac{\text{التركيز جزء في المليون}}{\text{وزن العينة} \times 100} = \frac{100 \times 100 \times \text{التركيز جزء في المليون}}{1000000 \times \text{وزن العينة}}$$

## ١١- فيتامين (د) ضوئياً بثلاثي كلوريد الأنتيمون :

١ - تصبن واستخلص العينة : زن وزنة من زيت كبد الأسماك مع بوتاسا كاوية كحولية ( ١ : ١٠ ) ، واغل أسفل مكثف عاكس لمدة ٤٥ دقيقة ، ثم أضف ٢٠ مل ماء ، واستخلص المخلوط بالإثير دي إيثيلي ( ٤٠ مل ثم ٣ مرات ٢٠ مل ) ، واجمع مستخلصات الإثير ، واغسلها بالماء ( ٥٠ مل ) ، واستمر في الغسيل حتى يصير الغسول متعادلاً للفينولفثالين . جفف المستخلص على كبريتات صوديوم لا مائية ، ثم جففه على حمام مائي بدون زيادة تسخين المتبقيات . انقل المتبقيات الجافة إلى دورق صغير بأقل

كمية من الإيثير البترولي . في حالة كبسولات فيتامين (د) ، ومخلوط الفيتامينات تفك عدة كبسولات وتزال محتوياتها بالغسيل بالإيثير الإيثيلي الذي يبخر ، وتصبن متبقياته الزيتية كما سبق ذكره عاليه . وقد تغلى الكبسولات مباشرة في البوتاسا الكاوية الكحولية كعاليه . وفي حالة المواد الصلبة فيتم طحنها في هاون ، وتغلى نصف ساعة تحت مكثف عاكس في البوتاسا الكاوية الكحولية ، ثم تزال المواد الصلبة بالطرد المركزي ، ويعاد تسخينها ثانية مع حجم جديد من هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولية ، ويعاد طردها مركزيا ، ويجمع المستخلصات السائلة ، وتستخلص في إيثير إيثيلي كما في الزيوت ، والجزء الصلب يغسل على قمع بخنر بالإيثير الإيثيلي الذي يضاف للمستخلص الإيثيري ، ويفسل المستخلص الإيثيري ويبخر للجفاف كما سبق .

٢ - الفصل الكروماتوجرافي : عمود كروماتوجرافي يسد طرفه السفلى بالقطن ، ويملاً بالسيليت Celite وأكسيد الماغنسيوم ( ١ : ١ ) ، مع السحب بواسطة التفريغ من أسفل حتى ارتفاع حوالي ٦ سم ، وتوضع عليه حوالي ١ سم ارتفاع كبريتات صوديوم لامائية . اغسل العمود بالإيثير البترولي ( ٥٠ مل ) ثم ضع محلول العينة للجزء غير المتصبن واغسل العمود بالإيثير البترولي . وإذا لوحظ العمود تحت الأشعة فوق البنفسجية قصيرة الموجة تظهر ٥ مناطق من القمة للمساعدة ، هي شريط ضيق ذو فلورسنت أزرق باهت ، شريط عريض فلورسنتي أصفر مخضر يحتوي الريتينول ، شريط ضيق رمادي فاتح الفلورسنت ، شريطان ضيقان حوالي ٢ م ذات فلورسنت أزرق ، شريط ضيق ذو فلورسنت أزرق رمادي . يمكن تطوير الثلاث مناطق السفلى فقط بالإيثير البترولي ، والتي تجمع في قابلة وتبخر حتى الجفاف ، وتنقل متبقياتها بالإيثير البترولي إلى دورق معياري .

٣ - تقدير الكالسيفيرول : ينقل ٠,٥ مل من المستخلص البترولي إلى أنبوبة ذات سداة سعة ١٠ مل + ٩,٥ مل محلول ثلاثي كلوريد الأنثيمون ( أذب ١٥ - ٢٢ جم ثلاثي كلوريد الأنثيمون  $SbCl_3$  في ١٠٠ مل دي كلورو إيثان ، دفيء إذا كان ضروريا ، رشح وأضف ٢ مل كلوريد الأسيتيل لكل ١٠٠ مل راشحا ) . رج الأنابيب بشدة ، وانقل المحلول إلى خلية سبكتروفوتومتر لقياس الكثافة الضوئية على ٥٠٠ نانومتر . أقصى قراءة يمكن الحصول عليها بعد دقيقة من إضافة الدليل إلى مستخلص العينة ، وتظل القراءة ثابتة لمدة ٥ - ١٠ دقائق .

٤ - يجرى عمل التقدير كذلك على محلول قياسي من فيتامين (د) لتعيين تركيز الفيتامين في العينات .

### تقدير فيتامين (د) بحمض ثلاثي فلوروخليك :

١ - تخلط العينة ( تحتوي ٥-١٥ ميكروجرام إرجو كالسيفيرول ) مع ٢ مل من محلول

هيدروكينون ١, ٠٪ ( أذب ٥٠ مجم بلورات هيدروكينون في ١ مل دي إيثيل إثير ،  
وخفف إلى ٥٠ مل بالكولورفورم . يحضر طازجاً يومياً ) .

٢ - بخر المخلوط تحت تفرغ على ٣٥ - ٤٠ م ، وأضف إلى المتبقيات ٠,٥ مل  
كلورفورم ، واخلط ثم أضف ٢ مل حمض ثلاثي فلورو خليك ، واخلط جيداً .

٣ - انقل المخلوط إلى خلية سيكتروفوتومتر في خلال ٥٠ ثانية ، وقدر أقصى امتصاص  
على ٤٩٠ نانومتر خلال ١-٣ دقائق من الخلط ، مع تفسير الجهاز باستخدام مقارنة من  
المذيبات ( كلورفورم / حمض ثلاثي فلورو خليك (٤+١) ) .

٤ - بعد القياس أضف ٢ نقطة من محلول فوق أكسيد الهيدروجين (٣٠٪) في خلية  
الجهاز ، واخلط وقدر الامتصاص ثانية بعد دقيقتين ± ثانيتين من إضافة فوق أكسيد  
الهيدروجين .

٥ - اطرح القراءة الأخيرة من الأولى ، واحسب كمية الإرجو كالسيفيرول بالمقارنة  
بمحلول قياسي معامل بالمثل .

## ١٢- فيتامين هـ ( الفـا - توكوفيرول في الحيوانات ، وألفا وبيتا وجاما توكوفيرولات في البذور الزيتية ) :

توضع وزنة مناسبة (١ جم) من الزيت في دورق ١٠٠ مل مثبت عليه مكثف عاكس ،  
ثم يضاف إليها ١٠ مل كحولاً مطلقاً + ٢٠ مل حمض كبريتيك كحولي عياري . لف  
المكثف والدورق بورق الألمونيوم لحجب الضوء ، واغل ٤٥ دقيقة . برد وأضف ٥٠ مل  
ماء ، وانقل إلى قمع فصل ( مغطى بورق الألمونيوم ) باستخدام ٥٠ مل ماء آخر .  
استخلص المادة غير المتصينة ٥ مرات  $\times ٣٠$  مل دي إيثيل إثير . اغسل المستخلصات  
الإثيرية ، وجفف على كبريتات صوديوم لامائية . بخر الإثير على درجة منخفضة ، وفي  
معزل عن الضوء . تنقل المتبقيات من المستخلص في تيار من النيتروجين ، وأذبها في ١٠  
مل كحولاً مطلقاً ، وانقلها وكذلك محلول قياسي ( ٠,٣ - ٣,٠ مجم فيتامين هـ ) إلى  
دوارق معيارية ٢٠ مل ، وأضف إلى كل منها ٥ مل كحولاً مطلقاً + ١ مل حمض  
نيتريك مركزاً ( تضاف بالتنقيط مع التقليب ) ضع الدوارق على حمام مائي (٩٠ م) لمدة  
٣ دقائق بالضبط من وقت غليان الكحول . برد بسرعة تحت ماء جار ، وأكمل الحجم  
إلى العلامة بالكحول . قدر الكثافة الضوئية على ٤٧٠ نانومتر ضد مقارنة ( من ٥ مل  
كحولاً مطلقاً + ١ مل حمض نيتريك مركزاً ، وتعامل كالعينة تماماً من غليان ،  
واستكمال الحجم ، وقراءة الكثافة الضوئية ) .

## ١٣- فيتامين ك<sub>٣</sub> ( ميناديون Menadione ) :

يجرى تقدير فيتامين ك<sub>٣</sub> بطريقة ضوئية بحساسية تبلغ ١ مجم / كجم ، بشرط إجراء

جميع الخطوات بعيداً عن ضوء الشمس المباشر ، وباستخدام زجاجيات مصنفة معتمدة ، خالية من المنظفات ؛ لذا تغسل جميعها بحمض هيدروكلوريك ( ١ : ١ ) ، ثم بالأستون وتجفف .

١ - زن عينة بالضبط حوالي ٥ جم ( مركزات فيتامين ) أو ٢٠ - ٣٠ جم ( مواد علف ) ، وانقلها إلى دورق مخروطي ٢٥٠ مل بسدادة . أضف ٩٦ مل إيثانول (٤٠٪) ، وهز ميكانيكياً ١٥ دقيقة على حرارة الغرفة .

٢ - أضف ٤ مل محلول تانين ( ١٠ جم / ١٠٠ مل ) ، واخلط وانقل إلى أنبوبة طرد مركزي للطرد المركزي ، للحصول على محلول رائق ، ينقل منه ٢٠ - ٤٠ مل في قمع فصل ٢٥٠ مل + ٥٠ مل دي كلورو إيثان ، واخلط ثم أضف ٢٠ مل محلول كربونات صوديوم لامائية (١٠٪) ، ورج بشدة ٣٠ ثانية ، ثم اجمع طبقة دي كلورو إيثان في قمع فصل آخر ١٠٠ مل .

٣ - أضف إليها ٢٠ مل ماء ، وهز ١٥ ثانية ، واسمح بفصل الطبقات ، ثم اجمع طبقة دي كلورو إيثان ، وبخرها حتى الجفاف تحت تفريغ في جو من النيتروجين على حمام مائي (٤٠م) .

٤ - بسرعة عامل المتبقيات بالداي كلورو إيثان للحصول على محلول يحتوي ٢-١٠ ميكروجرام ميناديون / مل ، وانقل منها ٢ مل إلى دورق ١٠ مل ، وأضف إليها ٣ مل دليل هيدرازين ( أذب ٠,٠٤ جم ٢-٤ - دي نيترو فينيل هيدرازين في ٤٠ مل إيثانول مطلق يغلي . برد وانقل إلى دورق ٥٠ مل ، وأضف ٠,٤ مل حمض هيدروكلوريك مركزاً ، وأكمل إلى حجم ٥٠ مل بالكحول المطلق ( إيثانول ) . ويحضر طازجاً قبل الاستخدام مباشرة ) ، سد وسخن ساعتين على حمام مائي (٧٠م) .

٥ - برد ثم أضف ٣ مل إيثانول أمونيومي ( حجم إيثانول مطلق مع حجم أمونيا (٣:١) ) ، اخلط وأكمل إلى ١٠ مل بالكحول المطلق ، واخلط ثانية ثم قدر الامتصاص الضوئي للمركب الأخضر المزرق على طول موجة ٦٣٥ نانومتر ضد مقارنة من ٢ مل دي كلورو إيثان + ٣ مل دليل هيدرازين ، والتسخين ساعتين على ٧٠م كما ذكر مع العينة ( خطوة رقم ٤ ) .

٦ - يجرى عمل منحنى قياسي بمعاملة ٢ مل محلول قياسي ( أذب ٢٠ مجم ميناديون في دي كلورو إيثان ، ويكمل إلى ٢٠٠ مل ، ويؤخذ منه أحجام مختلفة ، وتخفف بالدي كلورو إيثان ، لعمل محاليل قياسية تحتوي ٢-١٠ ميكروجرام / مل ، تحضر هذه المحاليل طازجة أولاً بأول ) كما أجرى على العينة في خطوة رقم ٤ ، وتوقع العلاقة بين التركيز والامتصاص في منحنى قياسي لتقدير تركيز الفيتامين في العينة مجم / كجم .

ويمكن الرجوع إلى المراجع التالية عند الحاجة :

- De Luca , H.F.& Blunt, J . W . ( 1971 ) In : Me Cormick , D.B & Wright , L . D .( ed.) Methods in Enzymology , vol .XV111 Vitamins and Coenzymes , part C , Academic Press , N . Y .
- Dugan , R.E. et al . ( 1964 ) Anal . Chem . , 36 : 114 .
- Egan , H.et al . ( 1981 ) Pearsonas Chemical Analysis of Foods , 8th Ed . Churchill , Edinburgh & London .
- Gharbo , S.A. & Gosser, L.A. ( 1967 ) the Vitamins . 2 nd Ed , Vol . VI. Academic Press , N.Y .
- Gorgy, P. & pearson, W. N. (1974) Analyst, 99 : 222 .
- Knobloch , E.& Cerna - Heyrovska, J. ( 1979 ) Fodder Biofactors . Academia, Praha .
- Lee S.R . ( 1975 ) Food Analysis . 3rd Ed ., Leonard Hill Books , London .
- Mc Cormick , D.B. & Wright , L.D. ( 1971 ) Methods in Enzymology , Vol. xv111 Vitamins and Coenzymes Part C,Academic Press,N.y.
- Merck,E. ( 1974 ) Klinisches Labor . 12. Auflage , Merck , Darmstadt - Onder scheka , k.( 1973 ) Supplements to Z. Tierphysiol., Tierernahrg ., u , Futtermittelkde ., Heft 3: 1 .
- Osadea , M . & De Ritter , E. ( 1963) Feed Stuffs , 35: 26 .
- Ranganna , S . ( 1979 ) Manual of analysis of fruit and vegetable Products , Tata Mc Graw - Hill , New Delhi .
- Rettenmaier, R. Et al, (1979) Z. Lebensm. Unters. Forsch, 168 :120.
- Senyk , G.F. et al . ( 1974 ) J. Dairy Sci., 58:558 .
- Soliman , M.K. & AbdElMoty , I. ( 1976 ) A modern approach to Veterinary clinical & laboratory diagnosis. The Scientific Book Centre, Cairo .
- Varley . H . ( 1978 ) Practical Clinical Biochemistry . 4 th Ed . Arnold - Heinemann , India .
- Wong , F. F ( 1978 ) J.Agric . Food Chem ., 26: 1444 .