البـــاب التـــاســـع

الفيتامينـــــــات

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

obeikandl.com

البـــــاب التاســـــــع
9. الفيتامينات *Vitamins*

1.9. مقدمـــــــة:

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

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

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

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

الشفاء من هذا المرض . وأصبحت الأمراض التى تنتج من نقص الفيتامينات فى الغذاء تسمى بأمراض نقص الفيتامينات ***Vitaminosis*** .

ونظرا لأن التركيب الكيميائى للفيتامينات كان مجهولا فى تلك الفترة فقد إتفق على تسميتها تبعا لترتيب فصلها بالحروف الهجائية مثل ***A*** ، ***B*** ، ***C*** ... إلخ . وأخيرا فبعد دراسة التركيب الكيميائى والصفات الطبيعية والكيميائية للعديد من الفيتامينات سميت بأسماء كميائية مختلفة . ويوضح جدول (1.9) قائمة بأهم هذه الفيتامينات وطرق تسميتها.

جـــــدول (1.9) : أهـــم الفيتاميـــنات وطـــــرق تسميتها

التسمـــــــــــــية		
بالحروف الهجائية	الكيمـــياتية (الدولية)	الفسيولوجية (بالنسبة للإنسان)
الفيتامينات الذائبة فى الدهون :		
أ A	الريتينول ***Retinol***	مانع للعشى الليلى ***Antinyctalopia***
د D	الكالسيفيرول ***Calciferol***	مانع للكساح ***Antirachitic***
هـ E	التوكوفيرول ***Tocopherol***	مانع للعقم ***Antisterility***
ك K	الفيلوكوينون ***Phyloquinone***	مانع للنزيف ***Antihemorrhagic***
الفيتامينات الذائبة فى الماء :		
ب1 B_1	الثيامين ***Thiamin***	مانع لإلتهاب الأعصاب ***Antiberiberi***
ب2 B_2	الريبوفلافين ***Riboflavin***	فيتامين النمو ***Growth vitamin***
ب3 B_3	حامض البنتوثينيك ***Pantothenic acid***	مانع للإلتهاب الجلدى ***Antidermatitis***
ب5 B_5	النياسين (حامض النيكوتينيك) ***Niacin***	مانع لمرض البلاجرا ***Antibellagra***
ب6 B_6	البيريدوكسين ***Pyridoxine***	مانع للإلتهاب الجلدى ***Antidermatitis***
ب12 B_{12}	السيانوكوبالامين ***Cyanocobalamin***	مانع للأنيميا ***Antianemia***
ج	حامض الأسكوربيك ***Ascorbic acid***	مانع لمرض الإسقربوط ***Antiscorbutic***
H	البيوتين ***Biotin***	مانع لمرض التدفق الدهنى ***Antiseborrhea***

وقد قسمت الفيتامينات تبعا لخاصية ذوبانها فى مذيبات الدهون وفى الماء إلى مجموعتين :

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

المجموعة الثانية : الفيتامينات الذائبة فى الماء : ومعظم هذه المجموعة من الفيتامينات تدخل فى التفاعلات الحيوية المرتبطة بإنطلاق الطاقة ، أى ذات وظيفة تتعلق بالطاقة ***energy function***

وقد إتفق على تقسيم الفيتامينات تبعا لتأثيرها الفسيولوجى على جسم الإنسان إلى مجاميع مختلفة كما هو موضح فى جدول (2.9) .

جدول (2.9): الخواص المتشابهة لبعض الفيتامينات فى تأثيرها الفسيولوجى.

التأثير الطبى الوقائى	الخواص الفيسيولوجية	أسماء الفيتامينات
الفيتامينات التى ترفع من الفعالية العامة للجسم	تقوم بتنظيم الحالة الوظيفية للجهاز العصبى المركزى ، والأيض ، وتغذية الأنسجة	B_1 , B_2 , A , C
فيتامينات مانعة للنزيف	تنظم عملية النفانية الطبيعية للدم ، كما تزيد من تجلط الدم	K , C
فيتامينات مانعة للأنيميا	تنظيم وتنشيط الدورة الدموية	C , B_{12}
فيتامينات مانعة للعدوى	ترفع من مقاومة الجسم للعدوى وتنشط إنتاج الأجسام المضادة ، وتقوى من الخواص الوقائية للطبقة الطلائية	A , C
فيتامينات منظمة للإبصار	تقوى حدة الإبصار ، وتوسع من مجال الإبصار	C , B_2 , A

وسوف نتكلم عن بعض فيتامينات كل مجموعة وطرق تحليلها المختلفة .

2.9. تحليل الفيتامينات *Analysis of Vitamins* :

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

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

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

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

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

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

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

3.9. طرق الإستخلاص : *Extraction methods* :

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

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

2.3.9. إستخلاص فيتامين B_1 ، B_2 : يتم إستخلاص كل من فيتامين B_1 ، B_2 بالمعاملة الحرارية (غليان أو بإستخدام الأوتوكلاف) فى وسط حامضى ومعاملة إنزيمية.

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

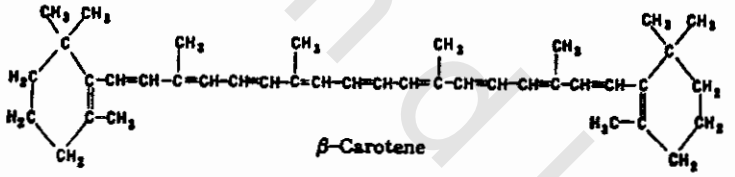
4.3.9. إستخلاص النياسين : يستخلص النياسين بالمعاملة الحرارية (فى الأوتوكلاف) فى وسط حامضى (فى منتجات غيرالحبوب) أو بالقلوى (فى منتجات الحبوب) .

4.9. طرق تقدير وتحليل الفيتامينات : هناك العديد من الطرق المختلفة فى تقدير الفيتامينات تختلف بإختلاف نوع الفيتامين والمادة المراد تحليل الفيتامين فيها ، وسوف نتكلم عن بعض الطرق الرسمية المستخدمة فى تحليل الفيتامينات كما يلى :

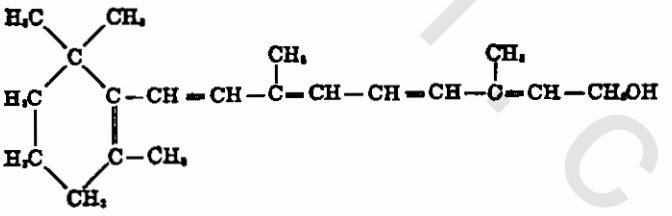
1.4.9. تقدير الفيتامينات الذائبة فى الدهن *Fat – soluble vitamins* :

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

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



β–Carotene



Vitamin A

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

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

وهناك عدة طرق لتقدير فيتامين أ نذكر منها مايلى :

أ- تقدير فيتامين أ (A) بإستخدام كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى *HPLC*:

تعتبر هذه الطريقة من أهم الطرق المقبولة فى تقدير فيتامين أ (A) فى الأغذية المختلفة ، وهى طريقة رسمية ***AOAC*** برقم 50.1.02 ، 992.04 . وتعتمد طريقة التقدير بهذه الطريقة على إستخلاص الدهن من العينة ثم إجراء عملية تصبن والذى يتبعه إستخلاص الفيتامين من الجزء الغير قابل للتصبن بالمذيبات العضوية ، ثم يركز المستخلص ويحقن فى الجهاز (***HPLC***) . وفيما يلى ملخص لتقدير فيتامين أ (A) فى اللبن وأغذية الأطفال :

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

* **حساب النتائج :**

تحسب النتائج من الـ ***peaks*** كما يلى :

- حساب كمية الفيتامين فى الصورة ترانس ***tranc*** من المعادلة الآتية :

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

حيث أن :

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

- حساب كمية الفيتامين فى الصورة سيس *Cis* كما يلى :

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

حيث أن :

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

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

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

ج- طريقة الجليسيرول داىكلوروهيدرين *Glycerol dichlorohydrin method*

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

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

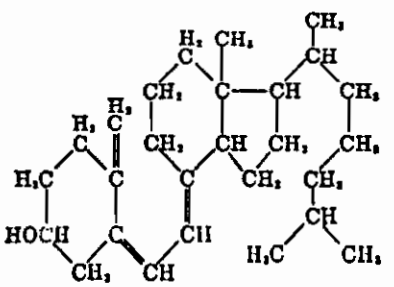
د- طريقة إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية *Ultraviolet absorption* :

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

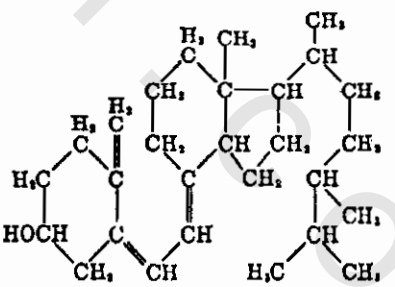
- زن 1 جم من العينة وضعها فى دورق معيارى سعة 100 مل .
- أذب العينة فى كحول أيزوبروبايل ، وأكمل الحجم حتى العلامة بالكحول.
- خفف التركيز بحيث يتراوح تركيز الفيتامين فى المحلول بين 5 – 15 وحدة/مل .
- إقرأ إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية على طول موجى 328 نانوميتربعد ضبط الجهاز بالبلانك .
- إحسب تركيز الفيتامين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

2.1.4.9. فيتامين " د " (المضاد للكساح) *Vitamin " D " (Antirachitic)* : تشتق مجموعة فيتامين " د " ($د_2$ ، $د_3$) من مولداتها الإستيرولية ، ومن أهم هذه الإستيرولات التى تعتبر من مولدات فيتامين " د " هى الإرجوستيرول ***ergosterol*** ، الكوليستيرول ***cholesterol*** فالإرجوستيرول من الإستيرولات النباتية وهو مولد لفيتامين " $د_2$ " ***D_2*** والذى يطلق عليه " أرجوكالسيفرول ***ergocalciferol***" وهو يوجد فى صورة متبللورة ودرجة ثباته منخفضة نظرا لتأثره بالضوء .

أما الكوليستيرول فهو من الإستيرولات الحيوانية وهو مولد لفيتامين ($د_3$ ***D_3***) والذى يطلق عليه كوليكالسيفيرول ***cholecalciferol*** حيث يتحول الكوليستيرول إلى مركب نشط بفعل أشعة الشمس وهو 7– ديهيدروكوليستيرول ، وهو يوجد فى صورة صلبة متبللورة . ويوضح الشكل التالى الرمز البنائى لكل من فيتامين $د_2$ ، $د_3$.



D3



D2

ويتولد فيتامين " د " فى الجسم من مولداته وهى الأرجوستيرول (مولد فيتامين د$_2$) ويوجد بكثرة فى النباتات وهو يكون حوالى 90 % من إستيرولات الخميرة ، والديهيدروكوليسيرول (مولد فيتامين د$_3$) ويوجد فى الحيوانات ويتكون فى الغشاء المخاطى للأمعاء من الكوليستيرول ثم ينشط إلى فيتامين د$_3$ بفعل الأشعة فوق البنفسجية. ويكثر فيتامين " د " فى زيت كبد الأسماك مثل سمك التونة .

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

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

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

- خذ 0.2 مل من محلول العينة (بعد تصبنها) المراد قياسها فى أنبوبة إختبار، وأضف عليها 4 مل من محلول ثلاثى كلوريد الأنتيمون المشبع فى الكلوروفورم .
- إقرأ الإمتصاص الضوئى للون المتكون بعد 10 –15 ق على طول موجى 500 نانوميتر ، ثم إحسب كمية الفيتامين عن طريق منحنيات قياسية لفيتامين " د " .

ب- طريقة الجليسيرول داىكلوروهيدرين *Glycerol dichlorohydrin method*

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

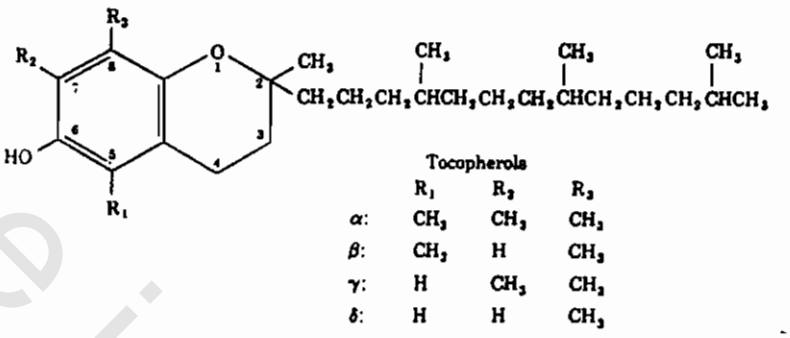
بالإضافة للطرق السابقة فإن هناك طرق رسمية *AOAC* حديثة إستحدثت لتقدير فيتامين " د" (*D*) فى الأغذية المختلفة بأرقام 979.24 ، 975.42 ، 980.26 ، 981.17 ، 982.29 ، 985.27 . وسوف نتكلم عن إحدى هذه الطرق بإيجاز كما يلى :

ج- الطريقة الرسمية *AOAC* رقم 975.42 لتقدير فيتامين " د " (D) :

- زن 1 جم من العينة وأضف عليه 10 مل (20 % أسكوربات الصوديوم) ، 25 مل كحول إيثايل + 20 مل بوتاسا كاوية 50 % .
- إجرى عملية تصبن للمخلوط السابق لمدة 30 دقيقة فى وجود مكثف عاكس .
- برد محتويات الدورق وإفصل المواد الغير قابلة للتصبن .
- جهز التخفيفات اللازمة وضع 2 مل من العينة بعد التخفيف فى أنبوبة القياس ، 5 مل من الجوهر الكشاف (ويتكون من محلولين (أ): إذابة 110جم من $SbCl_3$ فى 400 مل من CH_2ClCH_2Cl + 2 جم ألومينا لا مائية ، إخلط وأكمل الحجم إلى 500 مل بواسطة CH2ClCH2Cl .(ب): إخلط 100 مل AcCl مقطر + 400 مل من CH_2ClCH_2Cl وإحفظه فى مكان بارد . ويخلط 90 مل من المحلول (أ) مع 10 مل من المحلول (ب) فى زجاجة بنية اللون قبل الإستخدام ، ويكون هذا المخلوط صالح لمدة إسبوع) .
- سجل قراءة اللون الناتج بعد 45 ثانية على طول موجى 500 نانوميتر بعد ضبط الجهاز على البلانك (تولوين 20 % فى الأيزوأوكتان).
- إحسب تركيز الإنزيم فى العينة من المنحنى القياسى للفيتامين النقى.

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

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



Tocopherols

	R_1	R_2	R_3
α:	CH_3	CH_3	CH_3
β:	CH_3	H	CH_3
γ:	H	CH_3	CH_3
δ:	H	H	CH_3

التوكوفيرولات

وتعتبر الزيوت النباتية من أغنى مصادره وخاصة زيت جنين القمح وزيوت أجنة البذور الأخرى . وكذلك يوجد فى الخص والفول السودانى ، ويحتوى زيت الأرز والشعير وفول الصويا على نسبة أقل مما يتواجد فى زيت جنين القمح .

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

obeikandl.com

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

- صبن 1 جم زيت كما سبق ، ثم إستخلص المواد غير المتصبنة وجففها كما سبق.
- أضف على المواد غير المتصبنة المتحصل عليها 5 مل من البنزين وضعها فى عمود كروماتوجرافى يحتوى على ***Floridin XS*** لإزالة الكاروتينات (حيث يلاحظ أن مادة الإدمصاص تعطى لون أزرق مخضر فى وجود الكاروتينات ، لون أزرق فى وجود فيتامين " أ " .
- ضع العينة بعد تنقيتها فى دورق معيارى سعة 25 مل ، أضف عليها 1 مل من 0.2 % كلوريد حديديك فى الإيثانول وإخلط جيدا ، ثم أضف 1 مل 0.5 % (***α-á dipyridyl*** فى الإيثانول) وإخلط جيدا ثم أكمل الحجم إلى العلامة بواسطة كحول الإيثانول .
- أترك العينة لمدة 10 – 15 ق وقارن اللون الناتج على طول موجى 520 ناموميتر . ثم قدر محتوى العينة من الفيتامين بواسطة المنحنيات القياسية للفيتامين النقى .

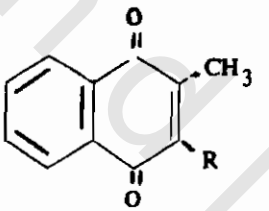
ب- تقدير فيتامين هـ (***E***) ***بإستخدام كروماتوجرافيا*** السائل ذات الأداء العالى ***HPLC***

وتعتمد هذه الطريقة على تصبن العينة وفصل المواد الغير قابلة للتصبن وبعد تنقية المستخلص تحقن العينة المستخلصة فى جهاز الـ ***HPLC*** . ويمكن إيجاز تلك الطريقة كما أوضحها ***Hashim*** وآخرون سنة 1993م فيما يلى :

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

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

4.1.4.9. فيتامين " ك " (مضاد للنزيف) ***Vitamin K (Antihemorrhagic)*** : وهو مضاد للنزيف وتم عزله من البرسيم الحجازى وبعض الأسماك المتحللة وله أهمية كبيرة فى عمليات التمثيل الغذائى . ويوجد منه نوعان ك$_1$ (K_1) ، ك$_2$ (K_2) . وفيتامين " ك " (K) يعتبر أحد مشتقات النافثوكوينون ***naphthoquinone*** ، كما لوحظ أن هناك بعض المركبات الأخرى لها خواص مشابهة لخواص فيتامين " ك " (K) أطلق عليها إسم ميناديون ***Menadion*** . ويوضح الشكل التالى التركيب البنائى لكل من فيتامين ك$_1$ (K_1)، ك$_2$ (K_2).



K_1: R= $-CH-CH=\underset{\underset{CH_3}{|}}{C}-CH_2\,[CH_2-CH_2-\underset{\underset{CH_3}{|}}{CH}-CH_2]_2-CH_2-CH_2-CH(CH_3)_2$

K_2: R= $-CH_2\,[CH=\underset{\underset{CH_3}{|}}{C}-CH-CH_2]_5-CH=C-(CH_3)_2$

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

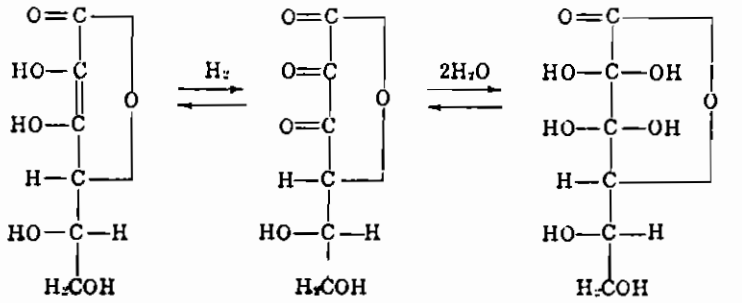
وتعتمد طريقة تقديره (***Menotti 1942***) على تفاعل مستخلص الفيتامين من العينة مع 4,2- ثنائى نيتروفينايل هيدرازين ***2,4-dinitrophynyl hydrazine*** فيتكون لون أزرق أو أزرق مخضر فى وجود أمونيا كحولية ، واللون الناتج يمكن قياسه ومقارنته مع المنحنيات القياسية للفيتامين النقى .

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

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

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

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



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

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

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

أ- طريقة المعايرة باليود ***Iodine titration method*** :

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

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

ويجب فى هذه الطريقة أن تتم المعايرة بسرعة حتى لاتدخل مركبات أخرى فى التفاعل مثل الجلوتاثيون والسستئين ، حيث أنها تتأكسد ببطء بواسطة محلول اليود ، لذا وجب هنا إجراء التقدير بسرعة حتى يمكن الحصول على نتائج صحيحة .

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

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

- رشح العينة ، وخذ منها حجم معلوم وضعه فى دورق مخروطى سعة 250 مل.
- عاير العينة بواسطة الصبغة (6,2- داى كلوروفينول إندوفينول) معلومة القوة حتى الحصول على اللون الوردى .
- أحسب كمية الفيتامين بالملليجرام /100 جم عينة كما يلى :

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

ويمكن حساب قوة الصبغة كما يلى :

• حضر محلول قياسى من حمض الأسكوربيك بحيث يحتوى الـ 5 مل منه على 1 ملليجرام من الفيتامين .

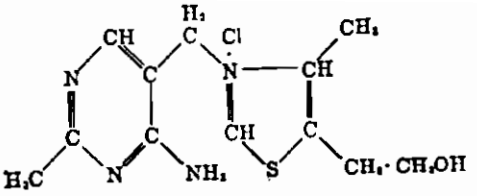
• عاير محلول الفيتامين بواسطة الصبغة حتى ظهور اللون الوردى وثباته لمدة 15 ثانية . وفى هذه الحالة فإن حجم الصبغة المستهلكة فى معايرة الـ 5 مل من محلول الفيتامين تكافئ 1 ملليجرام من الفيتامين .

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

قوة الصبغة = كمية الفيتامين المعايرة (1 ملليجرام)/ حجم الصبغة المستهلكة

2.2.4.9. مجموعة فيتامين ب المعقدة *Vitamin B complex* : وتشمل هذه المجموعة على العديد من الفيتامينات نذكر منها مايلى :

• **فيتامين ب$_1$ (الثيامين) *Vitamin B_1 (Thiamine)*** : يسمى هذا الفيتامين بالفيتامين المضاد للبرى‌برى ***anti-beriberi*** يعتبر هذا الفيتامين أول الفيتامينات التى أمكن الحصول عليها معمليا فى صورة بللورات ، وله إمتصاص ضوئى فى مجال الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجى 235 – 267 نانوميتر فى المحاليل المتعادلة والقلوية ، أما فى المحاليل الحامضية فيمتص الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجى 246 نانوميتر . ويحتوى تركيبه الكيميائى على حلقة بيريميدين ***pyrimidine*** وحلقة ثيازول ***thiazole*** كما هو موضح فى الشكل البنائى التالى :



Vitamin B_1

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

وينتشر هذا الفيتامين بكثرة فى المملكة النباتية ويوجد بأعلى تركيز فى البذور والأوراق والجذور والسيقان والثمار . كما يتواجد أيضا فى أجنة الحبوب ، البيض ، اللحوم والكبد ، والخميرة . وينشأ عن نقص هذا الفيتامين وقف النمو وإلتهاب الأعصاب المتعدد ***polynuritis*** والمعروف بالبرى برى ، وكذلك ضمور العضلات وفقدان الشهية.

ومن أهم طرق تقدير هذا الفيتامين مايلى :

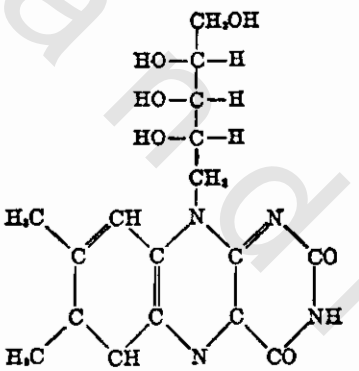
أ- طريقة الثيوكروم ***Thiochrom reaction method*** : تعتمد هذه الطريقة على قياس الوميض الناتج من الصورة المؤكسدة للثيامين ، وهى طريقة رسمية ***AOAC*** برقم 942.23.45.1.05 ويتم أكسدة الثيامين بواسطة حديدى سيانيد البوتاسيوم ***potassium ferricyanide*** منتجا الثيوكروم ذو اللون الأزرق الذى يمكن قياسه على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

ب- طريقة الدايازو ***Diazo method*** : تعتمد هذه الطريقة (***Prebluda and McCollum, 1936***) على تكوين مركب غير ذائب ناتج من تكثيف فيتامين B_1 ومركب الـ ***diazotized*** (الذى يتكون من تفاعل الـ ***p-aminoacetanilide***

مع حامض النيتريك) ويعطى لون إرجوانى محمر ثابت لا يذوب فى الماء يمكن قياسه .

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

• ***فيتامين ب٢ (الريبوفلافين)*** ***Vitamin B_2 (Riboflavin)*** : وهو عبارة عن مادة بللورية ذات لون برتقالى مصفر وله وميض أصفر مخضر ، ومحاليله أكثر ثباتا فى الأوساط الحامضية عنها فى الأوساط القلوية ، كما يتحلل بسرعة إذا تعرض للضوء . ويشتق أساسا من الأيزولوكسازين ***isolocsazine*** الذى يحتوى على حلقة بنزول ، بيرازين ، وبيريميدين ، كما هو موضح فى الشكل البنائى التالى :



Riboflavin (B_2)

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

ومن أهم طرق تقدير فيتامين ب$_2$ (B_2) الطريقة الفلورومترية ***fluorometric*** وهى طريقة رسمية ***AOAC*** برقم 970.65.45.1.08 . كما أن هناك أيضا **الطريقة الميكروبيولوجية *Microbiological method*** وهى طريقة رسمية ***AOAC*** تحت رقم 940.33 وتعتمد على إستخدام بكتريا حمض اللاكتيك ، والتى لاتستطيع أن تخلق الريبوفلافين ، ولذلك فهى تحتاجه دائما فى نموها وقد إتخذت هذه الخاصية أساسا لتقدير هذا الفيتامين ، حيث تتناسب كمية الريبوفلافين المضافة إلى الغذاء طرديا مع نمو البكتريا .

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

5.9. التحليل الكروماتوجرافى للفيتامينات
Chromatographic Analysis of Vitamins

يعتبر التحليل الكروماتوجرافى للفيتامينات من الطرق الحديثة والسريعة والتى عن طريقها الحصول على نتائج دقيقة لمحتوى الأغية من الفيتامينات المختلفة . وسوف نتكلم عن أهم الطرق الكروماتوجرافية المختلفة المستخدمة فى فصل وتقدير الفيتامينات من الأغذية المختلفة .

1.5.9. تقدير الفيتامينات بالعمود الكروماتوجرافى :

Determination of vitamins by column chromatography:

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

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

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

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

2.5.9. تقدير الفيتامينات بإستخدام الورق الكروماتوجرافى :

Determination of vitamins by paper chromatography:

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

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

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

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

3.5.9. تقدير الفيتامينات بالطبقة الرقيقة :

Determination of vitamins by thin layer chromatography(TLC):

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

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

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

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

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

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

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

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

4.5.9. تقدير الفيتامينات بإستخدام كروماتوجرافيا الغاز السائل :

Determination of vitamins by gas liquid chromatography:

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

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

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

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

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

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

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

5.5.9. تقدير الفيتامينات بواسطة كروماتوجرافياالسائل ذات الأداء العالى:

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

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

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

تختلف طريقة تقدير الفيتامينات الذائبة فى الدهن بإختلاف المادة الغذائية المراد تحليلها ، وكذلك طريقة تجهيز العينة للحقن ، فمثلا عند تقدير فيتامين ***A*** ، ***K*** فى أغذية الحيوانات (***feed***) ، يجرى إمرار المواد الغير قابلة للتصبن على عمود كروماتوجرافى يحتوى على مادة إدمصاص***(NH4)2CO3*** تعرف بالـ ***Spherisorb*** ، ويتم الفصل هنا بواسطة الميثانول 3 % ، ثم تقدر مباشرة فى الجهاز بدون أى عمليات تنقية أخرى . أما

فى حالة تقدير فيتامين *A* فى المارجرين ، فتتم عملية الفصل (سواء كانت العينة متصبنة أو غير متصبنة) أولا على ***reversed phase column*** .

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

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

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

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

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

6.9. أســـــــــئلة

1- تختلف طرق إستخلاص الفيتامينات بإختلاف نوع الفيتامين المراد تقديره وكذلك نوع المادة الغذائية . وضح ذلك .

2- أذكر أهم مولدات الفيتامينات ***provitamins*** الآتية :

• فيتامين أ (A) • فيتامين د (D) • فيتامين ه (E) • فيتامين ك (K)

3- لماذا سمى فيتامين ب1 (B1) بالثيامين ؟

4- أذكر الأساس العلمى فى تقدير الفيتامينات بالطرق المختلفة الآتية :

- فيتامين أ (A) بطريقة ثلاثى كلوريد الأنتيمون .
- فيتامين ج (C) بطريقة الصبغة (2،6- داى كلوروفينول إندوفينول) .
- فيتامين ه (E) بالطريقة الكيميائية .
- فيتامين أ (A) بواسطة الـ HPLC .

5- قارن بين كل من الـ HPLC ، HPTLC فى فصل الفيتامينات المختلفة .

6- ماهى الإحتياطات الواجب مراعاتها عند فصل وتقدير الفيتامينات بالطرق الكروماتوجرافية ؟

7- لماذا يطلق على فيتامين ج (C) إسم لاكتون ثنائى-كيتو-جلوكونيك ؟

8- ما هى الأمراض التى تنشأ نتيجة نقص الفيتامينات فى غذاء الإنسان ؟

obeikandl.com

7.9. المراجـــع REFERENCES

AOAC International . 1995. Official Methods of Analysis . 16th ed. AOAC International, Gaitherssburg, MD.

Chang, S.K.C. 1998. Protein Analysis chapter 18 in: Food Analysis 2nd ed. S.Suzanne Nielsen. An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.

Frutton, J. and Simmonds, S. 1953. General Biochemistry. Copyright by John Wiley & Sons, Inc. New York ,London Chapman & Hall, Limited

Hart, F.L. and Fisher, H. J. 1971. Modern Food Analysis . Springer-verlag. New York, Heidelberg Berlin.

Hashim, I.B., Koehler, P.E., Eitenmiller, R.R. and Kuien, C.K. 1993. Fatty acids composition and tocopherol content of drought stressed florunner peanuts. Peanut Science, 20: 21 – 24 .

Jacobs, M.B. 1962. The chemical analysis of food and food products. 3rd ed. D.Van Nastrand, Toronto, New York, London.

Sobel and Werlin .1947. Anal., Chem. 19 : 107.