# الفصل السادس

## الڤـيتامينـات

تتعدد طرق الڤيتامينات ، وتتوقف دقتها على ظروف التقدير . وقد يكون التقدير بقياس نمو الحيوان ، أو استجابته للعلاج من أعراض نقص الڤيتامين باختفاء المرض ، وذلك بتغذية مجموعتين من الحيوانات إحداها على عليقة ذات قدر معلوم من الڤيتامين ، والأخرى على عليقة خالية الڤيتامين ، 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 ، بتنميتها في أنابيب بعضها يشمل مستخلصات مادة العلف ، والبعض الآخر يشمل تركيزات متدرجة من الڤيتامين المدروس . فزيادة نمو البكتريا تقدر من زيادة إنتاجها لحمض اللاكتيك ( يقدر بالتنقيط ) ، وبالتالي لخفضها لرقم PH ، وتتعكر البيئة بزيادة نموها ، فيقدر إما الحموضة ، أو PH ، أو العكارة وكلها تتناسب طردياً مع مقدار الڤيتامين في البيئة ، وتسمى هذه الطريقة بالطريقة الميكروبيولوجية Microbiological Assay Method .

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

كذلك هناك طرق فسيولوجية Physiological Assay Methods بقياس المفرز من الڤيتامين في البول ، بعد معرفة المستهلك أساساً لتقدير الاستفادة من الڤيتامين availability والتقدير قد يكون طبيعيا كيماويا أو ميكروبيا أو كيماويا للڤيتامين ، فهي طريقة مضاعفة . والطرق الكيماوية Chemical methods هي أكثر الطرق شيوعاً ، وفيها تستخدم تفاعلات نوعية متخصصة لكل ڤيتامين ، تمكن من التقدير الكمي سواء باستخدام Colorometer ، أو بالتنقيط باستخدام جواهر مؤكسدة ، أو بتحويل الڤيتامين لمشتق آخر له فورسنس . ولتلاشي أثر تداخلات الشوائب بالعينة ، يجرى عمل تجربة خالية blank ، أو قد يضاف قدر معلوم من الڤيتامين للعينة ، ويعاد التقدير ، أو أن ينزع الڤيتامين من العينة ويعاد التقدير

وعادة يفضل تقدير الثيتامين بأكثر من طريقة للتأكد من النتائج .

## ثيتامين $B_1$ ( ثيامين Thiamin أو أنيورين Aneurine ) :

لمعرفة احتياجات الإنسان أو الحيوان من ثيتامين B1 يحتاج الإنسان إلى تحليل الثيامين وقد تم تطوير طريقة لتقدير الثيامين روتينيا 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 الحامضية (Amberlite CG50) ذي نواة من أكريل أميد Acrylamid ، وهو سهل الحصول عليه ، وفعّال في أثره التنقوي للمواد التي يتم تحليلها . وكمادة مؤكسدة فقد استخدم Bromcyan أو Potassium Ferricyanid .

وفي عمل blank أو التقدير الخالي فإنه يستخدم كلوريد حامض السلفونيك ـ بنزول لإعاقة الثيامين ، أو يستخدم قلوي لتحطيم الثيامين ثم الأكسدة بالبرومسيان Bromcyan .

## الأجهزة المستخدمة :

أوتوكلاف صغير ، أعمدة كروماتوجرافي ١٥٠×٦ م بأنابيب شعرية ٣٠×١م واحتياطي ١٠٠×٣٠م ، فلوروميتر للقياس بانطفاء Extincion ٣٧٨ نانومتر ، وانبعاث Emission ٤٣٠ نانومتر .

## الدلائل :

كلها نقية للتحليل ، مع عمل المحاليل بالماء المقطر .

## حفظ العينة :

تحفظ العينة في محاليل ٠,٨ أو ٠,٤ أو ٠,٢ عياري حامض كبريتيك، ثم تخلط للتجانس ٢٠ ثانية ، ويقدر الحجم من الحامض ، أو الوزن من العينة بالقدر الذي يسمح بتحرير المحلول المتجانس وجعله سائلاً ، مع حفظ التركيز النهائي للحامض حوالي ٠,٢ عياري . وفيما يلي أمثلة لذلك :

٩٠ جم عينة للتحليل + ٣٠ جم حامض كبريتيك ٠,٨ عياري ( للشربة ، عصير ، لبن ، بول ) .

٦٠ جم عينة للتحليل + ٦٠ جم حامض كبريتيك ٠,٤ عياري ( للحم ، خضر ، فاكهة ) .

٣٠ جم عينة للتحليل + ٩٠ جم حامض كبريتيك ٠,٢ عياري ( خبز ، دقيق ، مواد علف ، روث ) .

ويمكن حفظ العينة المتجانسة بهذا الشكل حتى ٣ شهور على −٢٠°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 ٣ـ١٢ ميكروجرام / عينة ) ، وتكمل بحمض الكبريتيك ٠,٢ عياري حتى يصل الوزن الكلي للعينة ٤٠ جم ، ويضاف على كل عينة ٠,٢ مل زيت براڤين ، وذلك لتجنب الرغاوي بالمعاملة الحرارية . توضع العينات في الأوتوكلاف لمدة ١٥ دقيقة على ١٢٠°م ، $1\ Kp/Cm^2$ .

### التحليل الإنزيمي Enzymatic hydrolysis :

بعد برودة العينة إلى حوالي ٣٥-٤٠°م يضبط حموضتها PH ٤,٠ – ٤,٥ بالـرج ، ويضاف حوالي ٥ مل محلول ٢ ، ٥ ن – خلات صوديوم ، ويضاف بالماصة ٥ مل معلق الإنزيم ١٠ ٪ (Clara - Diastase) ، وتحضن في ظلام على ٤٥°م لمدة ٢٠ دقيقة في حمام مائي . برّد 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 مم ، طول العمود ٧ سم وقطره الداخلي ٦ مم ، سرعةمرور 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 :

| | أكسدة الثيوكروم | العينة الخاوية |
|---|---|---|
| العينة | ٨ مل | ٨ مل |
| ٢،٥ ن – خلات صوديوم | ٠,٥ مل | ٠,٥ مل |
| برومسيان (٣ جم/١٠٠ مل ماء) | ٣ مل وانتظر ١٠ ثوان | ـــــ |
| هيدروكسيد صوديوم (٥٠جم/١٠٠مل ماء) | ٢ مل وانتظر ١٠ ثوان | ٢ مل وانتظر ٣٠ ثانية |
| برومسيان (٣ جم/١٠٠ مل ماء) | ـــــ | ٣ مل وانتظر ٣٠ ثانية |
| كلوريد صوديوم | ٣ جم | ٣ جم |
| ٢ ـ بيوتانول | ٦ مل | ٦ مل |
| رج شديد | ٢ دقيقة | ٢ دقيقة |

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

١ ـ للأكسدة بالثيوكروم ( عينة عادية ) .

٢ ـ للعينة الخاوية يعاق الثيامين ببنزول سلفونيك أسد كلوريد .

ولخلط طبقات المحاليل جيداً توضع في دوارق مخروطية بنية اللون سعة ١٠٠ مل بغطاء، وتوضع على مقلبات مغناطيسية ، وتراعى الأزمنة كالتالي :

| | أكسدة الثيوكروم | العينة الخاوية |
|---|---|---|
| العينة | ٢٥ مل | ٢٥ مل |
| ٢ – بيوتانول ( من سحاحة ) | ١٥ مل | ١٥ مل |
| هيدروكسيد صوديوم (٥٠جم/١٠٠مل ماء) | ٣ مل وانتظر ١٥ ثانية | ٣ مل وانتظر ١٥ ثانية |
| بنزول سلفونيك أسد كلوريد | ـــــ | ٣ مل وانتظر ٤٥ ثانية |
| محلول حديدي سيانيد بوتاسيوم (٥ جم/١٠٠ مل ماء) | ٠,٦٥ مل وانتظر ٦٠ ثانية | ٠,٦٥ مل وانتظر ٦٠ ثانية |
| كلوريد صوديوم | ٦ جم | ٦ جم |
| على أعلى سرعة للتقليب مع سد الغطاء | ٦٠ ثانية | ٦٠ ثانية |

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

**القياس فلورومتريا Fluorometric Measurement :**

يضبط 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 ثيتامين $B_1$ / عينة ) .

تخصم القيمة المقاسة فلورسنتيا للعينة الخاوية من قيمة العينات القياسية ، ثم توقع نقط للعلاقة ما بين تركيز الثيتامين وقراءته فلورسنتيا ، ويرسم 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 الثيتامين 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 الثيتامين ما بين ٩٤ – ١٠٠ ٪ والنقص عن ذلك يرجع لنقص التنقية مما يعيق الأكسدة بالبرومسيان لإنتاج الثيوكروم فينخفض قيمة المكتشف من الثيتامين .

**٢ ـ ثيتامين $B_2$ ( الريبوفلافين ) :**

١ ـ 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 كلوروخليك وسخن ٢٠ دقيقة على حمام مائي حتى تتجمع البروتينات .

٢ ـ اطرد مركزيا واغسل بمقدار ٢٠ مل محلولاً منظما ، واجمع المستخلصات ورشحها .

٣ ـ 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 ـ يجرى ما سبق على محلول قياسي معلوم التركيز .

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

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

## ٣ ـ ڤيتامين $B_6$ :

يتم تقدير ڤيتامينات ب٦ ( بيريدوكسال ، بيريدوكسين ، بيريدوكسي أمين ) بواسطة الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء HPLC كالتالي :

١ ـ يذاب ڤيتامين ب٦ في الماء ليحتوي المحلول القياسي على ٠,١ مجم ( ١٠٠ ميكروجرام ) لكل مل من كل مركب من الڤيتامين على حدة ، ومحلول آخر يحتوي المركبات الڤيتامينية الثلاثة بنسب ١/١/١ . ويحقن الجهاز بمقدار ٢٠ ميكروليتر من كل من المحاليل الأربعة السابقة .

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

٣ ـ يجرى عمل مقارنة على ٢٥ مل من الماء .

٤ ـ يضاف على مستخلص العينات والمقارنة ٦٠ مل محلول حمض هيدروكلوريك (٠,١ عياري ) ، ويسخن على (٩٧°م) 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 ٣٧°م ( أو لمدة ساعتين على ٤٧°م ) برد وأكمل إلى علامة ١٠٠ مل ثم رشح .

٥ ـ قد تنقى العينات من الشوائب بتمرير مستخلصاتها على عمود كروماتوجرافي مليء 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 يغسل العمود بمقدار ٢٠٠ مل ماء مقطراً ، ويهمل الغسول ثم تغسل الڤيتامينات بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم ٠,٠٥ عياري ، ويجمع من هذا الغسول أحجام كل منها ٢٥ مل ،

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

٦ ـ 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 ( ٣×٢٥ مل ) من غسول البوتاسا الكاوية .

٧ ـ يمكن التأكد من عدم تلوث عمود جهاز الكروماتوجرافي السائل بالفيتامين من قبل ، بحقنه بجرعة من فوسفات البوتاسيوم أحادي القاعدة PH ٤,٣٥ وعيارية ٠,١ 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 ٠,١ 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 ، بالغليان في بيئة من الميثانول ، فيظهر الميثيل أسيتال كبقعة منفردة على الرقيقة ( سليكاجيل ) ، التي تطور فى أسيتون ، ثم في مخلوط من أسيتون / ديوكسان / أمونيا (١/٤,٥/٤,٥) . ويظهر البيريدوكسال بفلورسنت أخضر مصفر ، وبالرش بمحلول ٠,٠٤٪ من دي كلوروكينون كلورو أيميد في كحول ميثانول فيظهر البيريدوكسال والبيريدوكسامين كبقع شديدة الزرقة . وبعد الإظهار للبقع على طول موجة ٢٥٤ نانومتر يمكن كشط البقع وتطويرها ، أو استخلاصها بالأحماض المعدنية المخففة للتقدير الكمي على سبكترو فوتومتر على ٢٦١ نانومتر . وعادة تستخلص العينات بالميثانول في ماء .

## تقدير البيريدوكسول Pyridoxol :

١ ـ زن ٣ جم عينة في كأس ، واستخلصها بالداي إيثيل إيثير ( ٢٠ مل ) نصف ساعة مع استمرار التقليب . اطرد مركزيا ، واغسل الراسب بمقدار ٢٥ مل من الإيثير . اجمع المستخلصات وبخرها لحوالي ٢٠ مل ٦٠°م تحت تفريغ . رشح وخفف إلى حجم معلوم .

٢ ـ خذ ٢ مل من المستخلص + ٨ مل ماء + ٣ مل محلول منظم فوسفات PH ٧ + ١ مل دليلا ( ٠,١ جم ن – ن دى 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 مركزيا .

٣ ـ 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 تقريباً .

٤ ـ قدر الكثافة الضوئية على ٦٠٦ نانومتر ضد بنزين .

## ٤ ـ ڤيتامين $B_{12}$ :

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

١ ـ زن عينة تحتوي تقريباً على ١٠٠–٣٠٠ ميكروجرام ڤيتامين ، ويضاف إليها خمسة أضعاف وزنها أسيتون (٨٥٪ في ٠,١ 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 ـ سخن الخليط إلى ٥٠°م على حمام مائي ، ثم اتركه ساعة ، ثم حمضه بحمض السيتريك السابق إلى PH ٤ في خزانة غازات للحذر من حمض الهيدروسيانيك ، وبعد الطرد المركزي يغسل الراسب بمحلول الاستخلاص ، واجمع المستخلصين المائيين .

٣ ـ 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 ـ ينتقل ڤيتامين 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 ، ويخلطا 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 ٠,١ عياري ثم بالأسيتون ٥٠ مل ( ٨٥٪ في هيدروكلوريك ٠,١ عياري ) ثم بالهيدروكلوريك ٠,١ عياري حتى تظهر منطقة وردية ( قرنفلية ) هي المدمصة للڤيتامين وذلك في قمة العمود . يغسل الڤيتامين برابع هيدروفيوران ( ٦٠٪ في حمض هيدروكلوريك ٠,١ عياري ) وتلاحظ حركة المنطقة القرنفلية .

٥ ـ يجمع حوالي ٢٠ مل من الغسول المحتوى على الڤيتامين ، ويبخر رابع هيدروفيوران

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

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

$$\frac{\text{الامتصاص عند ٣٦١ نانومتر} \times ١٠٠}{٠,٢٠٧}$$

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

## ٥ ـ حمض الفوليك أو حمض بتيرويل جلوتاميك :

**Folic Acid (Pteroyl glutamic acid)**

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

٢ ـ 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 ـ بعد ٥ دقائق تحطم الزيادة من البرمنجنات بإضافة ٠,١ مل فوق أكسيد هيدروچين 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 ٠,٥ مولر ، واغل نصف ساعة ، ثم اغسل بمحلول منظم ٠,٢٥ مولر خلات ثم جفف هوائيا) . اغسل العمود مرتين ، في كل مرة بمقدار ١٠ مل محلول منظم خلات ٢,٥ مولر ، ثم طور ٤ مرات × ٥ مل محلول منظم رابع بورات . يضبط PH المستخلص بحمض الهيدروكلوريك ٢ مولر إلى ٤ – ٤,٥ ، ثم خفف بالماء إلى ٢٥ مل .

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

٥ ـ كرر ما سبق على محلول قياسي من حمض الفوليك ( ٠,١ 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 ، Fs كثافة فلورسنت المحلول القياسي .

## ٦ ـ كالسيوم بانتوثينات Calcium Pantothenate :

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

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

٤ ـ يؤخذ ١٠ مل من الطبقة المائية ( خطوتا 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 ـ أضف ٢٥ مل حمض بوريك ( ١٠٠جم / ٢ لتر )+ ٨ مل هيدروكسيد صوديوم ٣,٥ مولر إلى الغسول ، وسخن على ١٠٠°م لمدة ساعة للتحلل المائي . برد واضبط PH إلى ٨ بإضافة ٩ مل حمض هيدروكلوريك ٣ مولر ، ثم أضف ٤مل محلول نافثوكينون ( ٢٥٠ مجم ١-٢- نافثوكينون -٤- سلفونات / ٥٠ مل ماء ) ، واخلط وسخن على ١٠٠°م ، ثم برد في ثلج .

٦ ـ أضف إلى كل دورق ٤ مل محلول ثيوكبريتات ( ٢,٥جم / ١٠٠مل ) + 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 ـ 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 =

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

## ٧ ـ الكولين Choline :

١ ـ 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 ـ 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 ـ 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 ثلاجة على ٥م لمدة ساعتين .

٤ ـ اطرد البلورات المترسبة مركزيا ،ثم اغسلها بمحلول رينيكات ( ٥ مل في ١٠٠ مل ماء ) ، واطرد مركزياً مرة أخرى . أذب الراسب في أسيتون ، ورشح خلال صوف زجاجي إلى دورق معياري ١٠ مل ، وخفف إلى العلامة بالأسيتون .

٥ ـ يجرى ما سبق على محلول قياسي من الكولين بيتارترات 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 .

## ٨ـ ڤيتامين ج(حمض الأسكوربيك وحمض دي هيدرو أسكوربيك):

١ ـ ضع وزنة من العينة بالضبط حوالي ١٠ جم في دورق ، ثم أضف ٣٠ مل كلوروفورم (٤م) + ٢٥ مل حمض ميتافوسفوريك ( ٢٠٠ جم حمض ميتافوسفوريك مطحوناً 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 ـ أضف ٢٥ مل ماء ، وسد ثم رج بشدة ١٠ ثوان ، ثم اتركها ١٠–١٥ دقيقة في حمام مائي على ٢٠م .

٣ ـ اطرد مركزياً لفصل طبقتي الماء والكلوروفورم ، حيث تؤخذ الطبقة المائية للخطوات التالية .

٤ ـ يؤخذ حجم معلوم من المستخلص المائي ، ويوضع في دورق سعة ٥٠ مل ذي سدادة ، وخففه إلى ٤٠ مل بمخلوط متساوي الحجوم 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 تحضر فوراً قبل الاستخدام ) ، واخلط جيداً ، فينشأ لون أحمر يستمر على الأقل ١٥ دقيقة .

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

٦ ـ 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 ـ أضف ٣ مل ماء + ٢٠ مل مخلوط خلات إيثيل / حمض خليك ثلجي / أسيتون (٢/٢/٩٦) ، وحوالي ٨٠٠ مجم مساعدة ترشيح ، وسد ورج بشدة ٣٠ ثانية ، واطرد مركزيا .

٨ ـ انقل ١٥ مل من الرائق في دورق تقطير ، وبخر تحت تفريغ حتى تتبقى 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 ـ تجرى تجربة خاوية من العينة بنفس الخطوات السابقة .

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

١١ـ يعبر عن تركيز ڤيتامين (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 الڤيتامين في مستخلص مائي للعينة يحتوي حمض أوكساليك ، 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 ڤيتامين 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 مليء بثاني أكسيد الكربون ، ويرج ٥ دقائق مع مخلوط الاستخلاص ( ١٠٠ مل ميثانول تحتوي حمض أوكساليك ٠,١ ٪) + ٢٠ مل إيثير بترولي + ٢ مل ماء تحتوي أوكساليك (٠,١ ٪) ) ، 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 ٠,١ ٪ مشبع بثاني أكسيد الكربون ، ويرج ثم يضاف ١,٥ مل حمض أوكساليك ٥ ٪ + ٢ مل خلات رصاص ١٠ ٪ في ماء ، ويرج ويترك ١٠ دقائق ، ثم يرشح ، ويغسل الراسب بمقدار ٢٠ مل ماء ، ويجمع المترشح، ويضبط درجة حموضته PH إلى ٣,٥ باستخدام خلات 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 جزيئي ٢٩٠,٠٩ تذاب في ٥٠٠ مل ماء مقطراً، ويضاف إليها ١٢ مجم بيكربونات صوديوم ، وينقط منه على حمض أسكوربيك نقي لتحديد عياريته ) 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 ٠,١ ٪ حمض أوكساليك ويشبع بثاني أكسيد الكربون ، وهذا المحلول ثابت ليوم واحد ) يؤخذ منه ٢ مل وتخفف بحمض أوكساليك ٠,١ ٪ إلى ٣٠ مل ، ويضبط PH إلى ٣,٥ بإضافة خلات 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 كلوروفينول 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 ، وعايرها بالراشح للعينة حتى يختفي اللون الأحمر ، ٠,٢ مل صبغة = ٠,٠٠٨ مجم حمض أسكوربيك . تركيز حمض الأسكوربيك مجم /

$$\text{١٠٠ مل بلازما} = \frac{\text{٠,٠٠٨} \times \text{٢} \times \text{١٠٠}}{\text{حجم الراشح للعينة المستهلك في المعايرة ( مل )}}$$

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 ڤيتامين 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 =

$$\frac{١٠٠ \times ٠,٠٢}{\text{حجم البول المستخدم في المعايرة} \times (\text{حجم البول} + \text{حجم حمض الخليك الثلجي المضاف})}$$

## ٩ ـ ڤيتامين أ Vitamin-A determination والكاروتين B-Carotin :

تتوقف طرق تقدير ڤيتامين أ ضوئيا ( سبكتروفوتومتري أو فلورومتري ) على قياس الفورسنس الأخضر المصفر للڤيتامين .

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

كما قد يقدر الڤيتامين كروماتوجرافيا TLC ، لكن يتحطم الڤيتامين في ظرف دقائق قليلة على الرقيقة الجافة للكروماتوجرافي، مما لا يمكن من استخلاص الڤيتامين من الرقيقة للتقدير الكمي ، وإن كان يجرى التقييم الكمي بالتصوير للرقيقة وتقديرها ضوئيا . وفيما يلي طريقة للتقدير الكمي لڤيتامين أ والكاروتين سبكتروفوتومتريا Spectrophotometric :

### تقدير ڤيتامين أ في مواد العلف :

### أساس الطريقة :

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

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

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

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

## الكيماويات والمحاليل :

إيثانول ٩٩٪ ، إثير بترولي ٦٠-٨٠م ، بنزول ، حمض هيدروكلوريك ( ١ : ٩ حامض: إيثانول ٩٩٪ ( حجم / حجم ))، ماء مقطر ، حمض أسكوربيك ( ٣٪ في إيثانول ٨٧٪، كبريتيد صوديوم ( ٢,٣٪ في إيثانول ٨٧٪ ) ، صودا كاوية ( ١,٥ عياري في ماء )، بوتاسا كاوية ( ٣٢٪ في إيثانول ٨٧٪ ) ، هيدروكينون ( ٠,٥٪ في إيثانول ٩٦٪ ) ، كبريتات صوديوم جافة .

## تحضير العينة :

العينة الصلبة بعد طحنها تصبن مباشرة ، ويفصل الڤيتامين والكاروتين من مخلوط التصبن بواسطة الإثير البترولي . العينة السائلة يرسب بروتينها بالإيثانول ، 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 الڤيتامين في صورة كحول حر .

## التصبن :

حجم العينة ( ١٠-٣٠ جم ) يتوقف على محتواها الڤيتاميني ، ( 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 هيدوركينون + ٤ مل محلول سلفيد صوديوم + ١ مل محول حمض أسكورييك + ١٠ مل محلول بوتاسا كاوية ، وترج الزجاجة لمدة 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 الڤيتامين :

بخر طبقة الإثير البترولي تحت تفريغ على حمام مائي في وجود النيتروجين على ٣٥°م 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 لڤيتامين أ :

يقاس كل من الجزء المنزوع الماء ضد الجزء البنزولي الأولى الباقي بدون نزع الماء على ٣٩٩ نانومتر ، فيكون تركيز ڤيتامين 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 الكلى . 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 ڤيتامين أ حديثاً في مواد العلف باستخدام الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء HPLC . كما يمكن فصل الكاروتين وكذا الزانثوفيل على أعمدة الكروماتوجرافي وتقديرها كهروضوئيا.

## تقدير ڤيتامين (أ) ضوئيا بحمض ثالث فلوروخليك :

١ ـ عد محلولا قياسيا متصبناً لڤيتامين (أ) في كلوروفورم ، بتركيز يتراوح ما بين ٣×١٠-٦ مولر إلى ١,٢ × ١٠-٥ مولر . ضع ١,٥ مل منه في خلية الأسبكتروفوتومتر + حجم مساو من حمض ثلاثي فلورو خليك بمحقن ، بحيث تضع الحمض أسفل سطح الكلوروفورم ، وبعد ١٠ ثوان قس الكثافة الضوئية على ٦١٦ نانومتر .

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

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

## تقدير ڤيتامين (أ) فلورمتريا في اللبن :

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

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

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

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

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

٥ ـ قدر كذلك قراءة محلول قياسي للڤيتامين ( خلات ريتينول في هكسان ) ، واحسب تركيز الڤيتامين في العينات كمكافئات ريتينول .

## ١٠ ـ الكاروتين والزانثوفيل :

١ ـ زن ٢ جم عينة مطحونة جافة هوائيا 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 ـ أكمل إلى العلامة بالبنزين ، ورج واتركها فترة ، ثم اسحب منها ٥ مل ، توضع على عمود كروماتوجرافى ملىء بأكسيد الماغنسيوم والسيليت (١ : ١) ، وتسحب بواسطة تفريغ من مضخة مائية لمدة ٣ دقائق .

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

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

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

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

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

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

**تقدير الكاروتين :**

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

٢ ـ يرشح الأسيتون إلى قمع فصل ٢٥٠ مل .

٣ ـ تنقل باقي العينة من الكأس إلى خلاط ، ويضاف إليها كمية من الإيثير 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 الفقد من العينة . يخلط ٥ دقائق .

٤ ـ 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 ـ تزال الطبقة السفلى ، ويستمر تكرار العملية السابقة حتى تصبح هذه الطبقة عديمة اللون .

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

٧ ـ 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 ـ احسب تركيز الكاروتين مجم / ١٠٠ جم عينة =

$$\frac{\text{التركيز جزء في المليون} \times ١٠٠ \times ١٠٠}{١٠٠٠٠٠٠ \times \text{وزن العينة}} = \frac{\text{التركيز جزء في المليون}}{\text{وزن العينة} \times ١٠٠}$$

## ١١ـ ڤيتامين (د) ضوئيا بثلاثي كلوريد الأنتيمون :

**١– تصبن واستخلاص 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 بالإيثير دي إيثيلي ( ٤٠ مل ثم ٣ مرات × ٢٠ مل ) ، واجمع مستخلصات الإيثير ، 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 ڤيتامين (د) ، ومخلوط الڤيتامينات 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 ، وتجمع المستخلصات السائلة ، وتستخلص في إيثير إيثيلي كما في الزيوت ، والجزء الصلب يغسل على قمع بخنر بالإيثير الإيثيلي الذي يضاف للمستخلص الإيثيري ، ويغسل المستخلص الإيثيري ويبخر للجفاف كما سبق .

٢ ـ **الفصل الكروماتوجرافي** : عمود كروماتوجرافي يسد طرفه السفلى بالقطن ، ويملأ 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 للقاعدة ، 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 ـ **تقدير الكالسيفيرول** : ينقل ٠,٥ مل من المستخلص البترولي إلى أنبوبة ذات سدادة سعة ١٠ مل + ٩,٥ مل محلول ثلاثي كلوريد الأنتيمون ( أذب ١٥ – ٢٢ جم ثلاثي كلوريد الأنتيمون $Sb\,Cl_3$ في ١٠٠ مل دي كلورو إيثان ، دفئ إذا كان ضرورياً ، رشح وأضف ٢ مل كلوريد الأسيتيل لكل ١٠٠ مل راشحاً ) . 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 ـ يجرى عمل التقدير كذلك على محلول قياسي من ڤيتامين (د) لتعيين تركيز الڤيتامين في العينات .

## تقدير ڤيتامين (د) بحمض ثلاثي فلوروخليك :

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

هيدروكينون ١,٠ ٪ ( أذب ٥٠ مجم بلورات هيدروكينون فى ١ مل دي إيثيل إيثير ، وخفف إلى ٥٠ مل بالكلوروفورم . يحضر طازجاً يوميا ) .

٢ ـ بخر المخلوط تحت تفريغ على ٣٥ – ٤٠°م ، وأضف إلى المتبقيات ٠,٥ مل كلوروفورم ، واخلط ثم أضف ٢ مل حمض ثلاثي فلورو خليك ، واخلط جيداً .

٣ ـ انقل المخلوط إلى خلية سبكتروفوتومتر في خلال ٥٠ ثانية ، وقدر أقصى امتصاص على ٤٩٠ نانومتر خلال ١–٣ دقائق من الخلط ، مع تصفير الجهاز باستخدام مقارنة من المذيبات ( كلوروفورم / حمض ثلاثي فلورو خليك (١+٤) ) .

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

## ١٢ـ ڤيتامين هـ ( الفا ـ توكوفيرول في الحيوانات ، وألفا وبيتا وجاما توكوفيرولات في البذور الزيتية ) :

توضع وزنة مناسبة (١جم) 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 المتصبنة ٥ مرات × ٣٠ مل دي إيثيل إيثير . اغسل المستخلصات الإيثيرية ، وجفف على كبريتات صوديوم لامائية . بخر الإيثير 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 ڤيتامين هـ ) إلى دوارق معيارية ٢٠ مل ، وأضف إلى كل منها ٥ مل كحولا 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 الحجوم 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 ) .

## ١٣ـ ڤيتامين ك ٣ $K_3$ ( مينانديون Menadione ) :

يجرى تقدير ڤيتامين ك٣ بطريقة ضوئية بحساسية تبلغ ١ مجم / كجم ، بشرط إجراء

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

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

٢ ـ 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 ـ 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 ـ بسرعة عامل المتبقيات بالداي كلور 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 ـ برد ثم أضف ٣ مل إيثانول أمونيومي ( حجم إيثانول مطلق مع حجم أمونيا (١ :٣)) ، 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 كلور إيثان + ٣ مل دليل هيدرازين ، والتسخين ساعتين على ٧٠م كما ذكر مع العينة ( خطوة رقم ٤ ) .

٦ ـ 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 الڤيتامين 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 .