مقدمــــــــــة

راودتنى فكرة تأليف كتاب فى كيمياء وتحليل الأغذية منذ زمن طويل يربو على عشرين عاما ، فعزمت على البدء فى تأليف كتاب لتحليل الأغذية وبدأت فى تجميع المادة العلمية وإستغرقت فترة إعداد للمسودة الأولى لهذا الكتاب ثلاث سنوات ، إلا أننى لم أجد التمويل المناسب حينذاك لإظهاره إلى حيز الوجود . وظلت تراودنى هذه الفكرة طوال الأعوام السابقة خاصة عندما يقترب الفصل الدراسى الأول من كل عام وأبدأ فى إعداد أو تحديث المادة العلمية لمقررات تحليل الأغذية . فعزمت هذا العام بعد أن توكلت على الله ، أن أصدر الجزء الأول من هذا الكتاب ليضاف إلى المكتبة العربية التى تعانى من قصور شديد فى هذه النوعية من المؤلفات .

لإجراء أى بحث أو دراسة فى مجال علوم وتكنولوجيا الأغذية سواء لقطاع التصنيع الغذائى أو للسلطات الصحية الحكومية أو كجزء أساسى من نشاط الجامعات يستلزم الأمر تقدير تركيب الغذاء ودراسة مختلف صفاته ويجابه علماء التغذية تحديا كبيرا فى ضرورة التحديد الدقيق لتركيب المادة الغذائية فى مختلف مراحل إنتاجها بدءا من المواد الخام ، وأثناء تصنيعها ، وصولا إلى المنتج النهائى . وبمعرفة تركيب المادة الغذائية يمكن تقدير القيمة الغذائية ، والتعرف على الصفات الوظيفية ، وضمان السلامة الصحية للمنتجات الغذائية ، وعادة ما تملى طبيعة المادة الغذائية على القائم بعملية التحليل إختياره لطريقة التحليل المناسبة حيث نجد أن نفس المكون تتغير طريقة تحليله وتتبدل تبعا لطبيعة المادة الغذائية المراد تحليلها .ويعتمد نجاح أى تحليل لأى مكون من مكونات المادة الغذائية على الإختيار المناسب لطريقة التحليل بحيث تتوائم مع طبيعة المنتج ثم إعداد العينة بالطريقة الصحيحة ، وإجراء التحليل بعناية بالغة بواسطة متخصصين يدركون أهمية وأسباب إجراء كل خطوة من خطوات التحليل ، وفى النهاية تتم عملية حساب النتائج ومن ثم تفسيرها بالصورة المنطقية المناسبة .

ولتحليل الأغذية دورا رئيسيا فى تحقيق رغبات المستهلك فى الحصول على السلع الغذائية التى يصبو إليها ، فالمستهلك الواعى يعلم علم اليقين علاقة الغذاء بالصحة ، ولذلك فهو لا يتناول الغذاء إلا إذا توفرت لديه معلومات كافية عن تركيبه العام ، ومحتواه من الفيتامينات والعناصر المعدنية ومقدار سعراته الحرارية ، ولذلك أصبحت

بطاقة المنتج بها تلك المعلومات (البطاقة الغذائية) ،وبطبيعة الحال فإن تلك المعلومات لن تتوفر إلا بالتحليل الكيميائى الدقيق للغذاء .

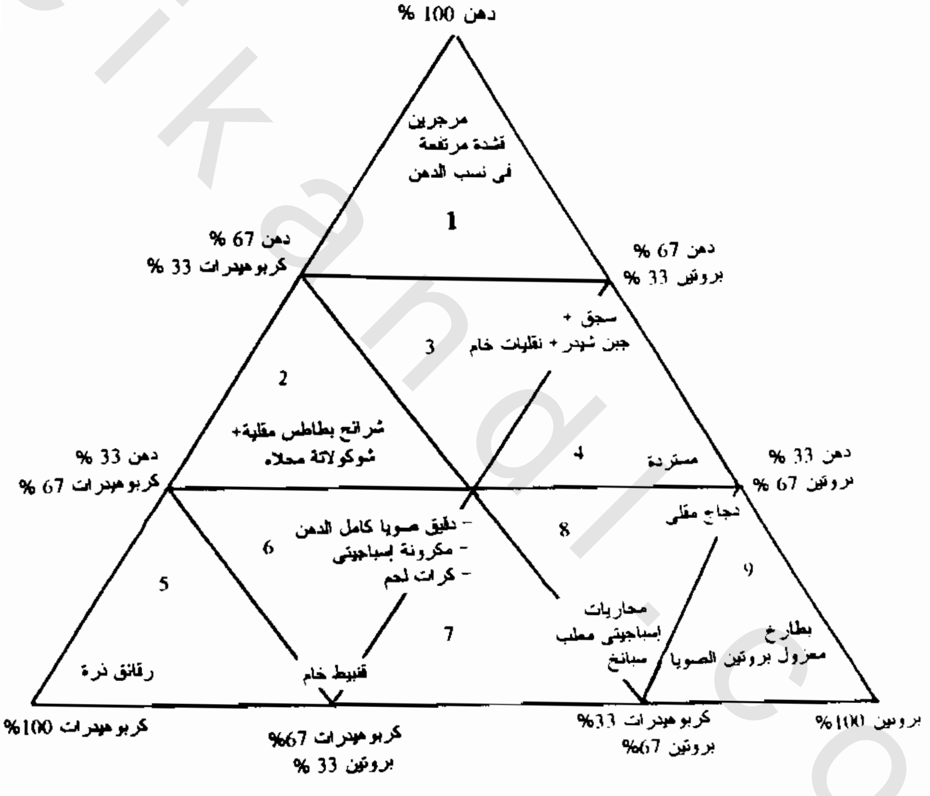
ولكى تستطيع شركات إنتاج الأغذية المنافسة فى الأسواق يجب أن تفى منتجاتها بمتطلبات المستهلكين . ولتحقيق ذلك يجب أن يسود مفهوم توكيد الجودة وعندئذ تخضع سلسلة إنتاج الغذاء بدءا من المادة الخام ، وخطوات الإنتاج ، وحتى الوصول للمنتج النهائى لتحليل دقيق للتأكد من سلامة كل خطوة من خطوات الإنتاج .

ويتولى الرقابة على الغذاء فى الدولة هيئات حكومية تضع نصب أعينها محاور الرقابة الثلاث من إعداد تشريعات ومواصفات قياسية ، ثم سبل تحليل الأغذية فى المختبرات الغذائية المتخصصة ، مع إجراء عمليات التفتيش الفعالة على مصادر إنتاج الغذاء بغية تحقيق الهدف المنشود من توفير غذاء آمن وصحى للمستهلكين بكافة أنماطهم ومستوياتهم المعيشية .

وعادة ما يتأثر إختيار الطريقة المناسبة لتحليل غذاء ما على تركيبه الكيميائى . فعلى سبيل المثال ، يمكن أن تحدث أثناء تحليل الأغذية المرتفعة فى نسبة الدهن أو السكر تداخلات تؤثر على النتائج النهائية للتقييم ، ونتيجة لتأثير نتيجة التحليل بالتغير فى تركيب الأغذية المختلفة أصبحت هناك طرق مختلفة لتقدير نفس المكون بحيث تتوائم الطريقة مع تركيب الغذاء .

وقد إقترحت الهيئة الرسمية للمحللين الكيميائيين ***AOAC*** نظام يعرف بنظام " الزوايا الثلاث" ***Triangle*** والذى يقسم فيه الغذاء إلى مجموعات والأغذية التى تقع تحت نفس المجموعة يمكن تحليل مكوناتها بنفس طريقة التحليل . وفى هذه الطريقة يفترض أن كل زاوية من زوايا المثلث الثلاث تمثل مجموعة الأغذية التى يقترب تركيبها من 100 % دهن أو 100 % كربوهيدرات أو 100 % بروتين ، وتقسم الأغذية إلى ثلاث أقسام " مرتفعة " ، " منخفضة " ، " متوسطة " إعتمادا على مستوى أى مكون من مكوناتها الرئيسية وهى الدهون والكربوهيدرات والبروتين . وتوضع الأغذية فى ترتيب ثلاثى الشكل يعطى 9 إحتمالات للمستوى العالى والمتوسط والمنخفض للدهون والكربوهيدرات والبروتينات بحيث يكون مجموع مكونات المادة الغذائية من تلك العناصر الثلاث دائما 100 (كما هو موضح فى الشكل التخطيطى).

ومن الأمثلة على إستخدامات تلك الطريقة يتضح أنه يمكن تطبيق طريقة تحليل واحدة لمكون ما على شرائح البطاطس والشوكولاتة المحلاه لأنهما منخفضان فى مستوى البروتين متوسطان فى مستواهما من الكربوهيدرات والدهون . أما عندما تكون المادة الغذائية كاللبن المجفف منزوع الدهن والمرتفع فى البروتين والكربوهيدرات والمنخفض فى نسبة الدهن فإنه تطبق عليه طرق تحليلية أخرى تختلف عن تلك المستخدمة فى شرائح البطاطس والشوكولاتة المحلاة .



رسم تخطيطى لمكونات الغذائية إعتمادا على محتواها من البروتين والدهون والكربوهيدرات بعد إستبعاد الرطوبة والرماد

obeikandl.com

وتجدر الإشارة إلى أن هناك عوامل عديدة تؤثر على قيمة النتائج المتحصل عليها عند تقدير مكون ما من المادة الغذائية بطريقة تحليل معينة .

فهناك إعتبارات خاصة بكل طريقة تحليل مثل درجة تخصصها ، ودقتها ، وحساسيتها ، بالإضافة لدرجة التأكد من صحة النتائج . ولتكون نتائج التحليل الكيميائى مناسبة يجب أن تتم معايرة جهاز التحليل وإستخدامه وتشغيله بالطريقة الصحيحة . وللتيقن من صحة نتائج طريقة التحليل يتم دائما إستخدام عينة تحليل مرجعية معلومة التركيب يطلق عليها العينة المرجعية القياسية ***Standard reference materials*** . وهناك منظمات أو هيئات خاصة فى دول عديدة توفر هذه العينات المرجعية لمختبرات التحليل من أمثلتها المعهد القومى للمواصفات والتكنولوجيا فى الولايات المتحدة الأمريكية ، ومكتب المجتمع للعينات المرجعية ببلجيكا ، وكذلك تقدم الجمعية الأمريكية لكيميائيى الحبوب ***American Association of Cereal Chemistry*** العينات المرجعية أو تتولى بنفسها إجراء دراسة مع المختبرات الغذائية التى ترغب فى التأكد من صحة تقديراتها .

وتصدر الطرق الرسمية لتحليل المنتجات الغذائية هيئات معروفة عالميا مثل هيئة المحللين الكيميائيين الرسمية ***AOAC*** ، والهيئة الأمريكية لكيميائيى الحبوب ***AACC*** ، والهيئة الأمريكية لكيميائيى الزيوت ***AOCS*** . وتقدم هذه الهيئات وغيرها المراجع والمجلات العلمية التى تنشر فيها هذه الطرق التحليلية بالإضافة لتقديمها خدمات أخرى كالتدريب والمؤتمرات العلمية ونشر أبحاث العلماء من مختلف أنحاء دول العالم .

المؤلف

openkamal.com

قائمـــــة ببعض الإختصارات

الإسم الإنجليزى	الإسم العربى	الإختصار
American Assocition of cereal	الهيئة الأمريكية لكيميائى الحبوب	*AACC*
atomic absorption spectroscopy	قياس طيف الإمتصاص الذرى	*AAS*
alternating current	تيار متغير	*AC*
adinosine-5-diphosphate	أدينوزين 5- ثنائى الفوسفات	*ADP*
atomic emission spectroscopy	قياس طيف الإنبعاث الذرى	*AES*
Association of Official Analytical Chemists	الهيئة الرسمية للمحللين الكيميائيين	*AOAC*
American Oil Chemists'Society	الهيئة الأمريكية لكيميائي الزيوت	*AOCS*
American Public HealthAssociation	الهيئة الأمريكية للصحة العامة	*APHA*
adinosine-5-triphosphate	أدينوزين 5- ثلاثى الفوسفات	*ATP*
bovine gamma globulin	جاما جلوبيولين بقرى	*BGG*
butylated hydroxyanisole	بيوتيلاتيد هيدروكسى أنيسول	*BHA*
butylated hydroxytoluene	بيتيلاتيد هيدروكسى تولوين	*BHT*
chemical ionization	التأين الكيميائى	*CI*
confidence interval	مستوى الثقة	*CI*
coefficient of variance	معامل التباين	*CV*
direct current	تيار مستمر	*DC*
degree of estrification	درجة الأسترة	*DE*
Electron capture detector	كشاف مسك الأيونات	*ECD*
enzyme immunoassay	التحليل المناعى الإنزيمى	*EIA*
enzyme linled immunosorbent assay	التحليل بربط الإنزيم بالإمتصاص المناعى	*ELISA*
electromotive force	القوة الدافعة الكهربية	*EMF*
equilibrium relative humidity	الرطوبة النسبية المتزنة	*ERH*
fatty acid methyl ester	إسترات ميثيل الأحماض الدهنية	*FAME*
Food and Agriculture Organization	منظمة الأغذية والزراعة	*FAO*
Food and Drug Adminstration	هيئة الأغذية والأدوية	*FDA*
free fatty acid	الحامض الدهنى الحر	*FFA*
flame ionization detector	كشاف التأين باللهب	*FID*
Food Safety and Inspection Service	خدمة سلامة وفحص الأغذية	*FSIS*
Fourier transform	محول فورير	*FT*
gas chromatography	كروماتوجرافيا الغاز	*GC*
gas chromatography – mass spectroscopy	كروماتوجرافيا الغاز- مقياس مطياف الكتلة	*GC-MS*
gas liquid chromatography	كروماتوجرافيا السائل- غاز	*GLC*
Good Manufacturing Practice	الممارسة العملية السليمة	*GMP*
Hazard Analysis Critical Control Point	تحليل مخاطر نقط التحكم الحرجة	*HACCP*
high performance liquid chromatography	كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى	*HPLC*

obeikandi.com

Immunoassay	التحليلات المناعية	***IAs***
Institute of Food Technology	معهد تكنولوجى الأغذية	***IFT***
Infrared	أشعة تحت حمراء	***IR***
ionic strength adjustor	ضابط القوة الأيونية	***ISA***
ion- selective electrode	إلكترود إختيارى للأيونات	***ISE***
International Standardization Organization	المنظمة الدولية للتقييس	***ISO***
Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives	لجنة الخبراء المشتركة بين منظمة الأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية للمضافات الغذائية.	***JECFA***
Karl Fischer Reagent	دليل كارل فيشر	***KFR***
potassium acid phthalate	فثالات بوتاسيوم حامضية	***KHP***
Milliequivalent	ملليمكافئات	***mEq***
mega hertz	ميجاهرتز	***MHz***
mass spectrometry	مقياس مطياف الكتلة	***MS***
moleculer weight	الوزن الجزيئ	***MW***
nuclear magnetic resonance	التأرجح النووى المغناطيسى	***NMR***
oil stability index	معامل ثبات الزيت	***OSI***
polacrylamide gel electrophoresis	إلكتروفوريسيس جيل البولى أكريلاميد	***PAGE***
isoelectric point	نقطة التعادل الكهربى	***pI***
parts per billion	جزء فى البليون	***ppb***
parts per million	جزء فى المليون	***ppm***
parts per trillion	جزء فى التريليون	***ppt***
refractive index	معامل الإنكسار	***RI***
radioimmunoassay	التحليل المناعى الإشعاعى	***RIA***
standard deviation	الإنحراف المعيارى	***SD***
sodium dodecyl sulfate	كبريتات دوديسيل الصوديوم	***SDS***
standard error	الخطأ القياسى	***SE***
size exclusion chromatography	كروماتوجرافيا الإقصاء الحجمى	***SEC***
solids-not fat	المواد الصلبة اللادهنية	***SNF***
thiobarbituric acid	حامض الثيوباربيتيوريك	***TBA***
TBA reactive substances	المواد المتفاعلة مع حامض الثيوباربيتيوريك	***TBARs***
thin-layer chromatography	كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة	***TLC***
Trimethylsilyl	ثلاثى ميثيل السيليل	***TMS***
total solids	المواد الصلبة الكلية	***TS***
total soluble solids	المواد الصلبة الذائبة الكلية	***TSS***
United State Department of Agriculture	قسم الزراعة بالولايات المتحدة	***USDA***
Ultraviolet	الأشعة فوق البنفسجية	***UV***
Visible	الأشعة المرئية	***Vis***
Wet weight basis	على أساس الوزن الرطب	***wwb***

obeikandl.com

البـــــاب الأول

العينـــــات *Samples*

أ.د/ رمضان محمد محمود
أستاذ علوم وتكنولوجيا الأغذية
كلية الزراعة جامعة عين شمس

obeikandl.com

البـــــاب الأول

1- العـــينات *Samples*

1.1. مقدمـــــة :

يعتبر تقدير تركيب الأغذية أساسيا للبحوث النظرية والتطبيقية فى علوم وتكنولوجيا الأغذية وأحيانا كأساس لتقدير القيمة الغذائية والقابلية من وجهة نظر المستهلك بصفة عامة قد يشمل التحليل تحديد كمية مكون أو عدة مكونات من التركيب الكلى ***Overall composition*** وقد تكون المكونات التى يجرى تقديرها فى تحليل الأغذية عبارة عن عنصر ***element*** أو مجموعة متصلة ***radical*** أو مجموعات وظيفية ***functional groups*** أو مجموعة من المركبات معا أو أوجه ***phases*** .

وغالبا ما يكون محلل الأغذية ملما بالخواص الكيميائية والطبيعية والفيزيوكيميائية والطرق المستعملة فى تحليلها ومثل هذه المعلومات لازمة لإختيار وتطوير طرق التحليل للوصول للإحتياجات المطلوبة من السرعة والدقة ، وعادة ما يكون محلل الأغذية على معرفة مسبقة للتركيب الوصفى ***qualitative composition*** للعينة المراد تحليلها وأحيانا يكون ملما أيضا بالمدى التقريبى للمكونات تحت التقدير وفى مثل هذه الحالة ليس من الضرورى إجراء التقدير الوصفى ***qualitative analysis*** ، وفى حالات نادرة قد يطلب من محلل الأغذية تحليل عينة غير معروفة التركيب تماما أو مدى محتوياتها غير معروف وفى مثل هذه الحالات يكون من الضرورى إجراء الإختبارات الوصفية .

عند تقدير التركيب الكيماوى العام لعينة غذائية أو محتواها من مركب معين فهناك أربعة خطوات : **الخطوة الأولى** : هى الحصول على العينة ، **الخطوة الثانية** : تحويل المركب أو المركبات إلى الصورة المناسبة للتقدير ، **والخطوة الثالثة** : التقدير ***assay*** ، **والخطوة الرابعة** : الحسابات وتفسير النتائج ***interpretation*** .

2.1. أخذ العينات *Sampling* :

تعتمد صلاحية الإستنتاجات المتحصل عليها من تحليل الأغذية بين أشياء أخرى على طريقة التحليل ومدى تمثيل العينة فأخذ العينة والخطوات التى تليها قد تمثل مصدرا كبيرا

للخطأ فى تحليل الأغذية. والعينة المثالية ***ideal sample*** تكون مماثلة فى جميع خواصها للمادة الأم ***bulk*** التى أخذت منها وعمليا تعتبر العينة مرضية إذا كانت الخواص تحت الدراسة مشابهة لتلك الموجودة فى المادة الأساسية .

1.2.1. العـينات *Samples* :

يجب أن تكون كمية العينة كافية لجميع التقديرات وبصفة عامة فإن 250 جم (مل) من العينات المتجانسة تعتبر كافية . وقد تكون العينة محددة لـ 100 جم فى عينات التوابل ***spices*** أو تزيد إلى واحد كيلو جرام فى حالة الخضر والفاكهة ويجب أن تعبأ العينات وتخزن بحيث لا يحدث لها تغيرات معنوية من لحظة أخذ العينة حتى إجراء التحليل . والعينة الرسمية ***Official*** والقانونية ***legal*** يجب أن تكون مبرشمة ***sealed*** . وهناك عدة مصطلحات يجب الإلمام بها وهى :

1.1.2.1. العـــينة *Sample* : هى جزء من مادة أخذت بطريقة تضمن إحتواءها على الخواص المميزة للمادة الأم ***bulk*** .

2.2.1. طريقة أخذ العينة *Sampling procedure* : تتبع الخطوات اللازم إتباعها لضمان شمول العينة على جميع الخواص المميزة للمادة الأم .

3.2.1. وحدة أخذ العينة *Sampling unit* : أقل حجم للعبوة ***minimum – sized packages*** التى قد تشملها العينة .

4.2.1. *Increment* : كمية معلومة من المادة والتى تؤخذ من وحدة العينة ***sampling unit*** .

5.2.1. العينة الشاملة *Gross sample* : وهى العينة المجهزة من خلط الـ ***increment*** .

6.2.1. *Subsample* : وهى عينة أصغر تنتج عن تجزأة العينة الكلية أو العينة الشاملة ولها نفس الخواص المميزة للعينة الشاملة .

obeikandl.com

7.2.1. عينة التحليل ***Analysis sample*** : وهى كمية العينة المعملية ***laboratory sample*** والتى تؤخذ بواسطة الشخص الذى يجرى التحليل وهذه العينة يجب أن تكون متجانسة وتشمل جميع الخواص المميزة للمادة الأساسية ***bulk*** التى تمثله .

وعادة ما تتوقف العوامل المحددة لإختيار طريقة أخذ العينة على ما يلى :

- الغرض من التحليل : قبول ***acceptance*** أو رفض ***rejection*** أو متوسط الجودة ***average quality*** .
- طبيعة الشحنة ***Nature of lot*** : الحجم ، التقسيم إلى ***sublots*** والتحميل ***loading*** .
- طبيعة المادة المختبرة ***nature of test material*** ، ومدى تجانسها وحجم الوحدة منها ***unit size*** .
- طبيعة الإختبار ***Nature of test procedure*** .

وفى حالة المواد المتجانسة مثل السوائل أو المساحيق يجب أن تخلط جيدا مثل أخذ العينات مباشرة ***subsamples*** ويمكن خلط الكميات المحددة من المساحيق أو المحاليل بالرج مع الدوران ***rotating and shaking*** فى إناء محكم القفل حجمه على الأقل ضعف حجم العينة أو عن طريق صبه لعدة مرات من إناء إلى آخر . والعينة المعملية يمكن أخذها من المسحوق أو المجروش عادة عن طريق تجزأتها إلى أربعة أجزاء وإبعاد الربعين المتقابلين وإعادة خلط المادة المتبقية . وتكرار هذه العملية حتى نصل إلى الحجم المطلوب .

وهناك معدات يمكنها إجراء هذه العملية ***sample divider*** تستطيع بطريقة ميكانيكية خلط وتقسيم المسحوق أو المجروش ، ومن أمثلتها ***Boerner sampler*** ويستعمل فى حالة الحبوب وفيه توضع العينة فيما يشبه القمع وتترك لتمر إلى أسفل على جوانب المخروط ودخول قاعد المخروط الذى يوجد به ثلاث جيوب أو فتحات ، فالحبوب أو العينات الساقطة إلى أسفل جوانب المخروط تجزأ ***cut*** إلى 36 مسار تتجمع فى مسارين

obeikandi.com

يفرغا فى إنائين . وهناك عدة أدوات لأخذ العينات المختلفة لا مجال هنا لذكرها بالتفصيل.

3.1. تجهيز العينات *Preparation of samples :*

الغرض من تجهيز العينة هو خلط العينة فى المعمل وإختزال العينة المتجانسة فى الحجم والكمية تمهيدا لعملية التحليل وتستخدم عادة طاحونات ***mills*** لإختزال حجم المواد الجافة ومن أمثلة هذه الطاحونات ***Wily mills , hammer mills chopper .***

أما بالنسبة للمواد الرطبة ***wet materials*** فيستخدم ***food chopper, blender , high-speed mixers*** ، والمشكلة التى تواجه المحلل فى تجهيز العينات غالبا ما تكون ممثلة فى الفقد فى المادة والتغيرات الإنزيمية خلال التحليل والتغيرات فى التركيب خلال الجرش ***grinding*** والتلوث بالمعادن خلال الجرش والتغير فى المركبات (الكلوروفيل ، الأحماض الدهنية غير المشبعة) .

ويجب الأخذ فى الإعتبار كلا من طبيعة المادة الغذائية وطريقة التحليل عند إختيار المعدات المستعملة فى الجرش ، وعمليا توجد عدة معدات متوفرة يمكن إستخدامها لتجهيز العينات .

وعند تقدير الرطوبة والبروتين والمعادن فإنه عادة يجرى جرش المادة الجافة لتمر خلال منخل ***20-mesh*** (فتحة/بوصة طولية) ، وفى حالة التحليل الذى يشمل على إستخلاص ***extraction*** (الليبيدات والكربوهيدرات وبعض الفيتامينات) فإنه يجب طحن العينات لتمر خلال منخل ***40-mesh .***

1.3.1. المعاملات الكيميائية والإنزيمية *Enzymic and chemical treatments:*

بالإضافة إلى الطرق الميكانيكية لتجزأة المادة فإنه يمكن إستعمال طرق كيميائية أو إنزيمية . حيث يستخدم السليلوز النقى فى إختبار المواد النباتية الأصل ، وتستخدم إنزيمات الــ ***carbohydrases , proteases*** فى إذابة مكونات المادة الغذائية ذات الوزن الجزيئ العالى . .

كما أمكن إستخدام ***Dimethylformamide , urea , pyridine , phenol ,*** ***dimethyl sulfoxide , reducing agents*** فى كسر الرابطة الببتيدية كمثال للمواد الكيميائية التى يمكن أن تستخدم بنجاح فى إنتشار وذوبان مادة غذائية أو مكوناتها للتحليل.

2.3.1. تثبيط الإنزيمات *Enzyme inactivation* :

ومن المشاكل التى تواجه محلل الأغذية التغيرات الإنزيمية التى تلى أخذ العينات أو خلال تجهيز العينات للتحليل وبصفة عامة فإنه فى حالة تقدير المحتوى الكلى لمكون معين (مثل المعادن ، الكربوهيدرات ، البروتين) فإن تثبيط الإنزيمات غير ضروريا ، ولكن فى حالة تقدير عدة صور لمركب (السكريات ، الصورة المرتبطة والمنفردة للدهون ، مجاميع البروتين) فإنه يجب تثبيط الإنزيمات بطريقة ما .

وللمحافظة على الصورة الأصلية للمكونات فى الأنسجة الحية فإن هناك عدة طرق لتثبيط الإنزيمات يمكن إستخدامها ، ومدى المعاملة المطلوبة لتثبيط الإنزيمات يتوقف على حجم الغذاء وتركيبه والإنزيمات الموجودة به والتقديرات المطلوبة . وإنزيمات الأميليز الفطرية ***fungal amylases*** بصفة عامة حساسة للحرارة ***heat labile*** ويمكن تثبيطها عند درجة حرارة منخفضة نسبيا ، بينما بعض الأميليز البكتيرية ***bacterial amylases*** تكون على درجة عالية من المقاومة للحرارة فتتحمل درجات حرارة الخبيز ، وكذلك الحال عند إستخلاص حامض الكلوروجينيك ***chlorogenic acid*** من البذور أو الأنسجة الجافة فإنه يحتاج إلى التسخين إلى 90 – 100°م لمدة ساعة لتثبيط إنزيمات الـــ ***polyphenolase*** .

ويجب أن تجفف العينات بسرعة عند درجات حرارة منخفضة بقدر الإمكان وبصفة عامة فإنه ينصح بتجفيفها عند درجة حرارة 60°م تحت تفريغ ، ولكن إذا ما كانت العينة خالية من المركبات الحساسة للحرارة أو الطيارة فإنه ينصح بالتسخين إلى 70 – 80°م لبضع دقائق . ومثل هذا التسخين يعمل على تثبيط معظم الإنزيمات ويساعد على سرعة تجفيف العينة . وخلال التجفيف فإن بعض المركبات تتهدم (الإنزيمات ، الفيتامينات) ، وبعضها يحدث له تغيير (البروتينات والدهون) وبعض مركبات النكهة تتطاير. وإذا ما

أجريت عملية التجفيف بدون عناية فقد يحدث كرملة للسكر وعملية تحول ***inversion*** فى الأغذية الحامضية .

ومن الصعوبات التى تواجه عملية تجفيف العينات النباتية هو الفقد فى البيريدوكسال ***pyridoxal*** وحامض البانتوثينيك ***pantothenic*** . و بعض المواد النباتية يمكن تخزينها عند – 20 إلى – 30°م ، وعلى الرغم من ذلك فإن إنزيم الـــ ***phosphatase*** يظل يعمل عند – 28°م على الحالة المجمدة . وفى 40 % من كحول ميثيلى ومعظم الأغذية يمكن حفظها بالتجميد ولكن التجميد بمفرده على حدة لا يوقف نشاط الإنزيمات .

ومعظم الإنزيمات يمكن تثبيطها بمركبات غير عضوية أو بواسطة التغير فى الـــ pH ، ومعظم الطرق المستخدمة لتثبيط الإنزيمات هى المعاملة بواسطة 80 % كحول ميثانول أو إيثانول أو مخلوط من الميثانول والكلوروفورم ، وحامض الفورميك بنسبة 15 :5 : 3 .

وفى بعض الأحيان يجرى طحن العينات فى وجود عوامل مختزلة (***bisulfite , dithiothreitol***) للحد من الأكسدة ، ولإستخلاص حامض الأسكوربيك ينصح بإستخدام 2 % من حامض ميتافوسفوريك أو مخلوط من حامض الخليك 10 % ، حامض أكساليك 5 %.

3.3.1. تقليل التغيرات فى الدهون *Minimizing lipid changes* :

الطرق الشائعة لتجهيز العينات قد تؤثر على تركيب الدهون . ولذا يجب تبريد العينات بسرعة قبل الإستخلاص أو تجميدها . وقد يترك الإستخلاص الغير تام للدهون كمية أكبر من الليبيدات القطبية ***polar lipids*** عن الغير قطبية ***nonpolar*** ويؤدى تخزين الدهون وخاصة المحتوية على أحماض دهنية غير مشبعة لعدة مشاكل وتتوقف عملية الأكسدة للأحماض الدهنية غير المشبعة على درجة عدم التشبع والمعدل الأقصى لأكسدة الـــ ***linoleate*** الذى يعادل تقريبا عشرين مرة لتلك التى تحدث فى الـــ ***oleate***، وكل رابطة زوجية زيادة فى جزئ الحامض الدهنى الغير مشبع يصاحبها زيادة فى معدل أكسدة العينة .

obeikandi.com

وعينة الدهن الجافة يجب تخزينها فى جو من النيتروجين حيث أن إذابتها فى الإيثير البترولى ***petroleum ether*** وتخزينها فى الإيثير غير مرغوب لأنه يميل إلى تكوين ***oxidative peroxides*** ومعدل الأكسدة يتوقف على الحرارة ***temperature-dependant*** ، فعند − 20°م فإن معدل الأكسدة يمثل حوالى 16/1 من معدلها على درجة حرارة الغرفة . وإضافة مضادات الأكسدة ***antioxidants*** (مثل ***propylgalate*** بنسبة 0.01 إلى 0.05 %) له تأثير فعال إذا لم يتداخل ***interfere*** مع التقدير نفسه . كما أن الضوء خاصة الـــ ***fluorescent light*** ينشط الأكسدة كما أن الأحماض الدهنية الغير مشبعة تكون أقل تأثيرا عند تخزينها فى صورة مجمدة (− 20°م) فى الأنسجة السليمة عما هو فى مستخلص الأنسجة .

4.3.1. التحكم فى الإصابة الميكروبية *Controlling microbial attacke :*

لتقليل أو إستبعاد الإصابة الميكروبية هناك عدة طرق يمكن إستخدامها وتشمل التجميد والتجفيف وإستعمال المواد الحافظة . ويتوقف إختيار طريقة الحفظ المناسبة على طبيعة المادة الغذائية والتلوث المتوقع ***expected contamination*** ، ومدة التخزين وظروفه والتحليلات التى ستجرى على العينات .

4.1. تدوين النتائج ومدى الإعتماد على التحليل :

Reporting results and reliability of analysis:

تؤدى عملية التحليل أساسا لتقدير وزن ***weight*** مكون ما فى العينة والنتائج الرقمية تحسب على هيئة نسبة مئوية ***percentage*** أو فى صورة أخرى فى الحقيقة تكون مكافئة ***equivalent*** للوزن أو الكتلة . وكتلة أو وزن مكون ما فى عينة غذائية ***food sample*** تحسب من تقدير مقياس ***parameter*** أو صفة فى الحقيقة هى ناتجة عن وزن هذا المكون فى العينة .

وتعتمد بعض الخواص مباشرة على الكتلة ***mass-dependant*** ، فإمتصاص ***absorption*** الضوء أو مصادر أخرى من الطاقة هى فى الواقع نتيجة لتأثير عدد جزيئات وذرات أو الأيونات فى المادة ، وللتقدير الكمى تجرى عملية التقدير أو القياس فى محلول ذا عمق معين يحتوى على تركيز معين من المواد الذائبة ، ومن جهة أخرى

obeikandi.com

فإن بعض الخواص الأخرى مثل الكثافة النوعية ***specific gravity*** ومعامل الإنكسار ***refractive index*** تعتبر فى الحقيقة غير معتمدة على الكتلة ***not-mass dependant*** ولكن يمكن إستخدامها بطريقة غير مباشرة لتقدير الكتلة أو الوزن لمكون معين ، فتقدير تركيز الكحول في المحلول المائى يجرى عادة بتقدير الكثافة ***density*** وعلى الرغم من ذلك فإن معامل الإنكسار ***refractive index*** يستخدم بصفة روتينية لتقدير الذوائب (أساسا السكريات) في الشراب والمربات .

وبعض الخواص التى تعتمد على الكتلة تستخدم لتقدير معين مثل إمتصاص الضوء ***light absorption*** والإستقطاب ***polarization*** والإشعاع ***radioactivity*** وبعض الخصائص التى لها كلا من العمومية ***magnitude*** والتخصص ***specifity*** (***nuclear magnetic resonance , infrared, spectroscopy***) ، ومثل هذه الخصائص لها قيمة عظيمة تمثل أساسا لتقدير العديد من المواد .

وفى هذا الجزء سنضيف الطرق المستخدمة للتعبير عن النتائج المتحصل عليها من التحليل كما يلى :

1.4.1. تدوين النتائج *Repoting results* :

عند تدوين نتائج التحليل يجب أن يؤخذ فى الإعتبار كلا من المرجع *reference* والوحدة المستخدمة للتعبير عن النتائج وقد تدون النتائج على أساس الوزن الأساسى للمادة *as-is basis* أو على أساس الوزن الجاف فى الهواء *air- dry basis* أو على أساس الوزن الجاف *dry matter basis* أو على نسبة معينة من الرطوبة (مثل 14 % فى الحبوب) .ولتحويل المكونات (%) لمكون *Y* من نسبة على أساس *oven dry* لنسبة فى المادة الأصلية *as-received basis* تستخدم المعادلة الآتية :

$$\% Y_{OD} = \frac{\% Y_{AR} \times 100}{(100 - \%_{OD}Loss)}$$

$$\% Y_{AR} = \frac{\% Y_{OD} (100 - \%_{OD}LOSS)}{100}$$

حيث أن :

as received = AR ،   Oven dry = OD

وإذا أريد التعبير على أساس نسبة معينة من الرطوبة ***arbitary moisture*** (مثل 14 % فى الحبوب) نستخدم المعادلة الآتية :

$$\% Y = \frac{\% Y_{AR} (100 - \text{arbitary moisture})}{100 - \text{AR Moisture } \%}$$

ولإيجاد وزن العينة على أساس رطوبة معينة نستخدم المعادلة الاتية :

$$\text{Sample weight} = \frac{\% \text{ dry matter AM}}{\% \text{ dry matter AR}} \text{ X required sample weight}$$

حيث أن : Arbitary moisture basis = AM

وللحصول على النسبة المئوية للمادة الجافة (***% dry matter***) تطرح النسبة المئوية للرطوبة من 100 . وعند تقدير الرطوبة على مرحلتين ***two stages*** (تجفف فى الهواء ثم تجفف فى الفرن) فإن نسبة الرطوبة الكلية فى العينة كالآتى :

$$TM = A + \frac{(100 - A) \times B}{100}$$

حيث أن : TM = % المئوية للرطوبة الكلية .

A = % للرطوبة بعد التجفيف الهوائى .

B = % للرطوبة بعد التجفيف فى أفران التجفيف .

وقد يتوفر هناك الآلات الحاسبة أو المنحنيات أو جداول خاصة لتبسيط العمليات الحسابية للتعبير عن النتائج على أساس معين ***given basis*** أو لوزن العينات على أساس رطوبة ثابتة ***fixed moisture*** (مثل 14 % فى الدقيق ، 20 % فى الفواكه المجففة ***dry fruits***) . ونظرا للإختلاف الشائع فى رطوبة المواد الغذائية المختلفة فإن نتائج

obeikandl.com

التحليل ***analytical results*** تكون أحيانا عديمة المعنى ما لم يعرف أساس التعبير عن النتائج .

والتعبير عن النتائج فى صورة ***as-is basis*** يلاقى العديد من الإعتراضات حيث يكون هناك من الصعب تلاشى أو إستبعاد التعبير فى الأغذية النباتية الطازجة ***fresh plant materials*** . ويتغير المحتوى الرطوبى لقصرة الخبز ***crust*** ولبابته ***crumb*** من لحظة خروجه من الفرن كنتيجة لهجرة الرطوبة وتبخيرها . كما أن إمتصاص الرطوبة فى بعض الأغذية شائع أيضا .

ويعبر عادة عن المكونات الأساسية على أساس النسبة المئوية بالوزن أو الحجم فى الأغذية السائلة والمشروبات قد يعبر عنها بالجم /100 مل ، أما المكونات الصغرى ***minor components*** فيعبر عنها فى صورة مجم /كجم أو لتر (***mg/Kg or liter***) . أما الفيتامينات فيعبر عنها بـــ ***µg*** أو بالوحدة الدولية ***IU*** لكل 100 جم أو 100 مل . أما آثار المبيدات فى الأغذية فيعبر عنها بالجزء فى المليون ***ppm*** .

عند حساب كمية البروتين فى الغذية فإنه يفترض دائما أن البروتين يحوى على 16 % نيتروجين ، وبالتالى لتحويل النيتروجين العضوى المقدر بواسطة كلداهل أو أى طريقة أخرى إلى بروتين يستخدم العامل 6.25 = 100/16 . ولكن فى بعض الأغذية الخاصة المعروفة بإحتواءها على تركيز مختلف من النيتروجين فى بروتينها فإن هناك عوامل أخرى للتحويل تستعمل (كالعامل 5.7 فى الحبوب ، 6.38 فى اللبن) .

وفى الأغذية التى تحتوى على مخلوط من الكربوهيدرات فإن السكريات والنشا يعبر عنها فى صورة دكستروز ***dextrose*** .

أما فى حالة تحليل الليبيدات ***lipid analysis*** (الأحماض الدهنية الحرة أو الليبيدات الكلية) فإن الحسابات تعتمد على إفتراض أن الــ ***oleic acid*** هو الحامض الدهنى الغالب ***predominant F.A*** . أما الأحماض العضوية فتحسب على أساس أحماض الستريك أو الماليك أو اللاكتيك أو الأسيتيك طبقا للحامض السائد فى المادة المحللة .

أما فى حالة تقدير المعادن فإنها تحسب على أساس النسبة المئوية للوزن الجاف أو الرطب أو كنسبة مئوية للرماد . وفى أى الأحوال يمكن أن تحسب على أساس المعدن نفسه ***element*** أو فى صورة الأكسيد ***oxide form*** .

ويعبر عن الأحماض الأمينية ***amino acid composition*** فى عدة صور :

Gm amino acid / 100 g sample.

Gm amino acid / 100 g protein.

Gm amino acid / 100 g amino acid.

5.1. مدى الإعتماد على التحليل

Reliability of Analysis

عند قياس أى خاصية لا بد أن يكون هناك خطأ محتمل فى قياسها ويمكن تقليص هذا الخطأ إلى حد معقول ولكن لا يمكن تلافيه تماما ، وسوف نناقش أنواع هذه الأخطاء والطرق المتبعة للتعرف على مقدارها وسنبدأ بإعطاء بعض التعاريف ذات العلاقة فى هذا المجال .

1.5.1. المتوسط *Mean (Average)* : عند تكرار تجربة ما لتقدير نفس الكمية من عنصر ما فإن نتائج التحليل بطبيعة الحال لن تكون متساوية نظرا لوجود أخطاء غير ثابتة ، لذا نلجأ لحساب المتوسط بجمع نتائج التجارب وقسمتها على عددها .

2.5.1. الـدقـــــة *Precision* : وهو تعبير يستخدم لوصف تكرارية النتائج أو لوصف مدى تضارب النتائج المكررة مع بعضها البعض ويمكن التعبير عن دقة النتائج بعدة طرق منها ما يسمى بالحيود عن المتوسط ($x_1 - \bar{x}$) حيث أن :

المتوسط = $\varepsilon\, x_1/n$ ، ومعدل الحيود أو متوسط الحيود = $\varepsilon\,(x_1 - \bar{x})/n$

حيث أن x_1 = مجموع المكررات ، $\bar{x}$ = متوسط النتائج ، n = عدد المكررات

obeikandi.com

ومعدل الحيود أو متوسط الحيود يعبر عن مدى تقارب النتائج المكررة .

ويمكن وصف الدقة عن طريق حساب إنتشار ***spread*** النتائج أو مداها ***range*** وذلك بطرح أصغر نتيجة من أكبر نتيجة . وكلما صغر الإنتشار كلما كانت النتائج أكثر دقة ويمكن التعبير عن الدقة بشكل أفضل مما سبق بإستخدام الإنحراف المعيارى أو التعبير ***variances*** :

$$S = \sqrt{\frac{\varepsilon\,(x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\varepsilon\,(x - \mu)^2}{n}}$$

حيث أن :

μ = تمثل القيمة الحقيقية ، S = الإنحراف المعيارى ***Standard deviation***

σ = الحيود القياسى والإنحراف

فكلما إقتربت قيمة S من قيمة σ كلما زاد عدد النتائج ، ويمكن التعبير عن الدقة ***precision*** كنسبة مئوية

$$C.V. = \frac{S \times 100}{\text{Amount present}}$$

3.5.1. ***Specificity*** : تتأثر أساسا بوجود مواد غريبة ***interfering substances*** تعطى قياس مشابه للعينة المختبرة ، وفى كثير من الحالات فإن تأثير المواد الغريبة قد يوخذ فى الإعتبار .

4.5.1. المصداقية ***Accuracy*** : دقة طريقة التحليل تعرف على أنها الدرجة التى عندها يمثل المتوسط ***mean*** التقدير الحقيقى للمادة المحللة . ولتقدير دقة التحليل فإنه من المهم

obeikandl.com

تقدير إنحراف ***deviation*** الطريقة المستخدمة عن الحالة المثلى ***ideal one*** وهذا الإنحراف قد يعود إلى عدم دقة موروثة فى الطريقة ***inaccuracy inherent in the procedure*** أو إلى تأثير المواد خلاف المادة تحت التحليل فى المادة الغذائية وكذا إلى التغيرات فى المادة المحللة خلال عملية التحليل ، وتقدر دقة طريقة التحليل بطريقتان :

* **الطريقة الأولى *Absolute method*:** وفيها يستخدم عينة تحتوى على كمية معلومة ***known amounts*** للمكونات المراد تحليلها .

الطريقة الثانية *Comparative method : وفيها تقارن النتائج بالنتائج المتحصل عليها بالطرق الأخرى التى قد ثبت دقتها .

والطريقة الأولى صعبة أو عمليا مستحيل تطبيقها وخصوصا للأغذية المنتشرة طبيعيا ، ولكن فى بعض الحالات حينما تجهز الأغذية بعمليات خلط مجموعة من المركبات ، فإذا شابه المخلوط تماما تركيب المنتج الطبيعى فإن المعلومات المتحصل عليها ستكون ذات قيمة .

وهناك عدة طرق غير مباشرة ***indirect methods*** لتقدير الدقة ***accuracy*** فى التحليل ، وهو التحليل الكامل لعينة فإذا كان المجموع قريب من الــ 100 يمكن الدلالة على درجة الدقة مع ملاحظة إن مثل هذه الحالة فإن الخطأ السالب فى التقدير سوف يتلاشى مع الموجب فى مركب آخر وعليه فإنه بالرغم من أن مجموع نسب المكونات لمادة معينة قد يكون قريب لــ 100 % ، لكن قد يكون الدقة فى كل مكون محدودة للغاية.

وفى طريقة الــ ***recovery*** فإن كمية معينة معروفة من المادة النقية تضاف إلى مجموعة من العينات من المادة المحللة وتجرى عملية التقدير لهذه العينات وتحسب الــ ***recovery*** للمكون المضاف فى هذه الحالة .

5.5.1. الأرقام المعنوية *Significant numbers*: فى التعبير عن النتائج فإن عدد الأرقام المعطاة يجب أن يكتب بحيث يكون الرقم التالى للرقم الأخير مؤكد ***certain*** والرقم الأخير على درجة إحتمال عالية ***highly probable*** ولكن غير مؤكد ***not***

certain وعليه فإن 10 % ، 10.00 % تمثل إختلاف فى الـــ *precision* ، والمثال التالى يوضح كيفية كتابة أرقام النتائج المتحصل عليها :

إفترض أن نسبة الرطوبة فى السكر قدرت بثلاث مكررات *triplicates* وهى : 1.032 % ، 1.046 % ، 1.036 % ، والمتوسط 1.038 % ولكن الفرق بين 1.032 ، 1.046 أكبر من 0.010 وبالتالى فإنه يجب ألا يعبر عن النتائج بأكثر من رقمين بعد العلامة العشرية وعليه فإن 1.04 % يدل على أن الرقم الأول بعد العلامة مؤكد *certain* والرقم التالى محتمل *probable* ولكنه غير مؤكد *not certain* .

6.5.1. الحساسية *Sensitivity* : وهى طريقة تستخدم لتقدير كمية مكون معين ، وتعرف على أنها النسبة بين مضاعفات إستجابة الجهاز *magnitude instrumental response* وكمية المادة . ويمكن زيادة الحساسية بطريقتين:

- **الطريقة الأولى** : زيادة الإستجابة *response* لكل وحدة من المادة المحللة (فى الطريقة *colorimetric* بإستخدام *color reagent* له إمتصاص نوعى عالى)
- **الطريقة الثانية** :بواسطة تحسين القوة التفريقية للجهاز *discrimination power* .

مثال لبعض التطبيقات الإحصائية :

عند تقدير المحتوى الرطوبى لعينة هامبورجر غير مطبوخة وكانت النتائج المتحصل عليها كالتالى : 64.53 ، 64.45 ، 65.10 ، 64.78 % فعندئذ تكون قيمة المتوسط الحسابى لهذه النتائج :

$$\bar{X} = X1 + X2 + X3 + ... + Xn / n$$

$$= 64.53 + 64.45 + 65.10 + 64.78 / 4 = 64.72\ \%$$

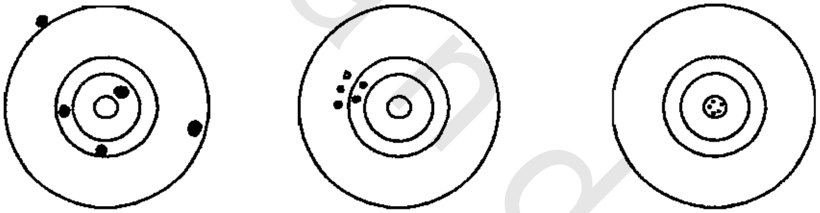
وتعتبر هذه النتيجة (64.72 %) أحسن تعبير عن المحتوى الرطوبى ، ولكنها لا تدل على مدى دقة أو صحة النتائج .

ومن أكثر المصطلحات التى نود أن نوضحها للطالب هما مصطلحى المصداقية *accuracy* : ويشير إلى أى مدى تقترب القيمة المقدرة فى التحليل الكيميائى من القيمة

obeikandl.com

الحقيقية . فعندما تم تحليل الرطوبة للهامبورجر غير المطبوخ كان المتوسط الحسابى للمكررات 64.72 % ... وإذا إفترضنا أن القيمة الحقيقية للرطوبة كانت بالفعل 65.05 ... فبمقارنة النتيجتين يمكننا التخمين بأن النتيجة التى حصلنا عليها (64.72 %) كانت مصداقيتها ***accurate*** عالية لأنها قريبة لحد كبير من القيمة الحقيقية .

أما تعبير الدقة ***precision*** فهو أسهل فى الفهم والتناول حيث يعبر عن مدى قرب نتائج المكررات ***replicates*** من بعضها البعض . فإذا ما كانت نتائج المكررات الفردية متشابهة أو متساوية لحد كبير فإن ذلك يعنى أن دقة ***precision*** الإختبار جيدة . ويمكن من شكل (1.1) التمييز بين مصطلحى المصداقية ***accuracy*** ، الدقة ***precision*** ... فبفرض أنه تم التصويب بمسدس تجاه هدف يتكون من دوائر متداخلة فعندما تكون كل الطلقات قد أصابت الدائرة الداخلية فى منتصف الهدف فإن ذلك يعنى أن كلا من الـــ ***accuracy*** ، الـــ ***precision*** فى صورة جيدة ، وبطبيعة الحال تمثل مناطق الإصابة فى الهدف المكررات التحليلية المتبعة (شكل 1.1. أ) . أما فى الشكل (1.1.ب) فعندما



ج ب أ

تقترب مناطق الإصابة من بعضها البعض ولكنها تبتعد عن منتصف الهدف فإن ذلك يعنى أن المصداقية ***accuracy*** ضعيفة أما الدقة ***precision*** فهى جيدة (لأن المكررات التحليلية متشابهة فى قيمتها) . ويوضح الشكل (ج) أن كلا من الدقة ، المصداقية ضعيفتان ... أى أن المكررات بعيدة عن المتوسط وكذلك مختلفة لحد ما عن بعضها البعض .

وإذا عدنا للمثال السابق عن تقدير المحتوى الرطوبى فى عينات الهامبورجر الخام ، سنبين كيف يمكن تقدير قيمتى الإنحراف المعيارى ومعامل التباين .

جدول (1.1) : حساب قيمة الإنحراف المعيارى للنسبة المئوية للرطوبة فى عينات الهامبورجر .

$(X_i - \bar{X})^2$	الإنحراف عن المتوسط	% للرطوبة	المكررات
0.0361	-0.19	64.53	1
0.0729	-0.27	64.45	2
0.1444	+0.38	65.10	3
0.0036	+0.06	64.78	4
$0.257 = \Sigma(x_i - \bar{x})^2$		$258.86 = \Sigma x_i$	
$64.72 = 4/258.86 = \bar{X}$			

$$0.293 = 0.2927 = \sqrt{\frac{0.257}{3}} = \sqrt{\frac{\Sigma(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = SD$$

وتعنى قيمة معامل التباين أن قيمة الإنحراف المعيارى تمثل فقط 0.453 % من قيمة المتوسط الحسابى . وتؤكد القيمة السابقة (0.453 %) أن النتائج المتحصل عليها من طريقة التحليل المتبعة تدل على أن الدقة ***precision*** لطريقة التحليل عالية . وبوجه عام فإنه عندما تكون قيمة معامل التباين أقل من 5 % فإن ذلك يعنى أن نتائج التحليل ومكرراته مقبولة .

كذلك يمكن بمراجعة مقرر الإحصاء معرفة كيفية حساب حدود الثقة ***Confidence limit (or interval)*** والتى تساوى = $\bar{X} \pm Z \times$ الإنحراف المعيارى / $\sqrt{n}$

كما يمكن معرفة كيفية حساب الخطأ القياسى للمتوسط الحسابى للنتائج ويساوى $\frac{SD}{\sqrt{n}}$

6.1. أســــــئلة

1- إذا كانت هناك طريقتان لتقدير مركب معين وصفت الأولى بأنها كانت أكبر ***specific*** ، ***accurate*** عن الطريقة الثانية . فماذا يعنى ذلك ؟

2- إذا كنت بصدد تقييم طريقة تحليل جديدة لقياس المحتوى الرطوبى لمنتجات الحبوب فى المعمل . كيف يمكن تقدير الـــ ***precision*** لهذه الطريقة لمقارنتها بالطريقة القديمة ؟

3- قارن بين المصطلحات الإحصائية التالية : ***Standard deviation*** ، ***Coefficient of variation*** .

4- بين أهم العوامل المحددة لطريقة أخذ العينات .

5- وضح بمثال كيف يمكن كتابة أرقام النتائج المتحصل عليها ، ولماذا يكتفى فى بعض الأحيان برقمين عشريين فقط ؟

1 . 7 . المراجـــــع REFERENCES

Suzanne Nielson, S. 1998. Food Analysis . 2nd ed. An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, USA.

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

obeikandl.com

البـــــاب الثانـــــى

تحـــليل الرطـــــــوبة

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

obeikandl.com

البـــاب الثـــــانـــــى

2. تحليل الرطوبة والمواد الصلبة

يوجد الماء على سطح الكرة الأرضية فى ثلاث صور طبيعية متباينة ، الصورة **السائلة الشائعة** (فى البحار ، والأنهار ، والأمطار) ، والصورة **الصلبة النقية** ، والصورة **المختلطة** بين الجليد والثلج . ويعتبر الماء أساس الحياة ، وصدق الله العظيم "***وجعلنا من الماء كل شئ حى***" . والماء هو **المكون** الرئيسى فى أغلب أنواع المواد الغذائية والتى تتميز كل منها بمحتوى رطوبى مميز لها . ويحمل الماء **العناصر الغذائية** الأخرى ويساهم فى تخليقها ، كما يحمل **المخلفات** ، ويعتبر وسط **للتفاعلات البيوكيميائية** فى الأنسجة الحيوية ، **وكمثبت للبوليمرات الحيوية** ، وكمقدر لنشاط **البروتين** ، ولوظائف أخرى لم يحدد كنهها بعد . ويوضح جدول (1.2) المحتوى الرطوبى (% للماء) فى مختلف أنواع الأغذية . وتتناسب نسبة المواد الصلبة الكلية تناسبا عكسيا مع المحتوى الرطوبى فى الأغذية .

جـــدول (1.2) : المحتــــوى الرطـــوبى فـــى مختلف أنواع الأغـــــذية

نوع المادة الغذائية	المحتوى الرطوبى %	نوع المادة الغذائية	المحتوى الرطوبى %
اللحـــــوم Meat :		***منتجـــــات الحبوب :***	
• لحم الخنزير ، لحم الخظزير الخام ، بعض قطع لحم الخنزير الحمراء .	60–55	• الحبوب الكاملة الجافة ، منتجات الحبوب المطحونة	13 -10
• لحم بقرى ، لحم بقرى خام ، قطع لحم بقرى	70 -50	• منتجات حبوب الإفطار ، البسكويت الهش ، البسكويت الصلب المملح ، المكرونة .	9 – 4
• الدواجن ، كل أنواعها (دجاج ، بط ، رومى...إلخ) ، لحم خام بدون طبقة جلد .	74	• الفطائر المغلفة ، الخبز الطرى بأنواعه .	53 -35
• السمك ، بروتينات العضلات	81 -65	***منتجـــــات الحلوى :***	
الفواكـــــــه Fruits		• السكر ، الحلوى الصلبة ، الحلوى المغلية ، الشوكولاتة السادة .	1 أو أقل
• التوت ، الكريز ، الكمثرى	85 -80	• المربى ، والجيلى ، والمرملاد	35 -30
• التفاح ، البرتقال ، البرقوق ، الجريب فروت .	90 -85	• أنواع شراب السكريات المختلفة	40 -20
• الفراولة ، الطماطم ، التوت الجبلى	95 -90	***المنتـــــجات اللبنـــــية :***	
الخضروات Vegetables:		• منتجات اللبن السائل (لبن كامل ، لبن منزوع الدسم ، لبن نصف دسم).	91 -87
• الموز ، البسلة الخضراء	80 -74	• منتجات اللبن المجفف .	5 – 3
• البنجر ، الجزر ، البطاطس	90 -80	• أنواع الجبن المختلفة .	75 -40
• الأسبراجس ، الفاصوليا الخضراء ، الكرنب ، القنبيط ، الخس ، الخيار	95 -90	• الزبـــــــدة	16 -15
		• القشدة والمثلوجات اللبنية .	70 -60

1.2. الثوابت الطبيعية للماء والثلج *Physical constant of water and ice* :

من الأهمية بماكان التعرف على بعض **الصفات الطبيعية للماء** ، فبمقارنة الصفات الطبيعية للماء بمركبات كيميائية أخرى يقترب وزنها الجزيئ من مثيله للماء (مثل CH_4 ، NH_3 ، HF ، H_2S ، H_2Se) نجد أن هناك إختلافا **كبيرا** فى الصفات بينهم . فللماء **قيم** لنقطة الإنصهار ، ونقطة الغليان ، والجذب السطحى ، وثابت ثنائى القطبية ، والسعة الحرارية ، **حرارات** الإنصهار ، التبخر والتسامى أعلى بكثير من المواد الأخرى المشار إليها بين القوسين . كما أن للماء كثافة غير عادية عند درجة حرارة 3.98°م . كذلك فإن **التوصيل الحرارى** للماء يكون كبيرا عند مقارنته **بالسوائل** الأخرى ، كما يكون التوصيل الحرارى للثلج كبيرا أيضا بمقارنته بالمواد الصلبة اللافلزية. ويبلغ التوصيل الحرارى للثلج على صفر°م 4 مرات تقريبا قدر التوصيل الحرارى للماء عند نفس درجة الحرارة ، ناهيك عن أن الثلج موصل **جيد** للطاقة الحرارية وبمعدل أسرع كثيرا من الماء السائل (كما فى الأنسجة) ،كما يبلغ الإنتشار الحرارى ***Thermal diffusivity*** للثلج 9 مرات تقريبا قدر **الإنتشار الحرارى للماء** . ويفسر هذا الفرق فى التوصيل الحرارى بين الثلج والماء ، لماذا **يتجمد الماء** فى الأنسجة بدرجة أسرع كثيرا من إنصهار الثلج عند نفس الفرق فى درجات الحرارة .ويبين جدول (2.2) بعض الثوابت الطبيعية للماء والثلج .

جـــــدول (2.2) : بعــــض الثـــوابت الطبيـــــعية للمـــاء والثلـــج .

الوزن الجزيئ	18.01534
صفات إنتقال الأطوار ***Phase transition properties:***	
• نقطة الإنصهار على 1 ضغط جوى (°م)	0.000
• نقطة الغليان على 1 ضغط جوى (°م)	100.000
• درجة الحرارة الحرجة (°م) ***Critical temperature***	374.15
• الضغط الحرج (ضغط جوى)	218.6
• النقطة الثلاثية ***Triple point*** (°م)	0.0099
•حرارة الإنصهار ***heat of fusion*** على صفر°م	1.436 كيلوكالورى/مول ; 79.71 كالورى/جم
• حرارة التبخر ***Heat of vaporization*** على 100°م	9.705 كيلوكالورى/مول ; 538.7 كالورى/جم
• حرارة التسامي ***Heat of sublimation*** على صفر°م	12.16 كيلوكالورى/مول ; 674.98 كالورى/جم

تابع جدول (2.2)

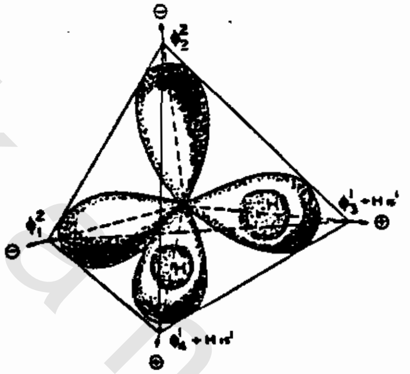
	على 20°م	0°م	0°م (ثلج)	-20°م (ثلج)
الكثافة (جم /سم3)	0.998203	0.999841	0.9168	0.9193
اللزوجة (سنتيبواز)	1.002	1.787	–	–
الجذب السطحى (مقابل الهواء) بالداين/سم	72.75	75.60	–	–
الضغط البخارى (مم زئبق)	17.535	4.579	4.579	**0.776**
السعة الحرارية (كالورى/جم°م)	0.99883	1.00738	0.5018 (-2.2°)	0.4668 (-20.8°)
التوصيل الحرارى [كالورى/(ثانية)(سم2)(م°/سم)]	1.429	1.384	5.35	**5.81**
الإنتشار الحرارى (سم2/ث)	0.0014	0.001	0.011~	0.011~
ثابت ثنائى القطبية :				
• فى حالة السكون ***Static***	80.36	88.00	91	**98**
• 3 x 10^9 هرتز Hz	76.7 (25°م)	80.5 (1.5°م)	–	**3.2 (-12°)**

2.2. جـــــزئ الماء *Water molecule*

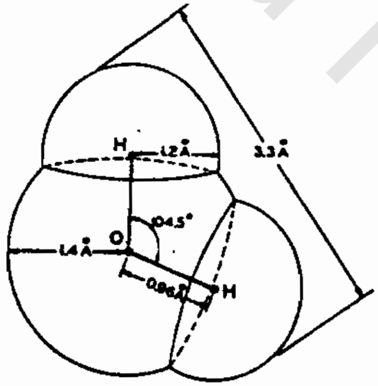
تدل الصفات غير العادية للماء على وجود **قوى جذب** كبيرة بين جزيئاته ويمكن تفسير أسباب ذلك بدراسة تركيب جزئ ماء منفرد ، ثم مجموعة **الجزيئات** المرتبطة مع بعضها وتوضيح أسباب ذلك . فلكى يتكون جزئ ماء **تقترب ذرتى هيدروجين** من مدارى الإرتباط SP^3 للأكسجين ($\acute{\O}_3$ ، $\acute{\O}_4$) وتتكون **رابطتان إشتراكيتان** بين ذرتى الهيدروجين والأكسجين من نوع الرابطة σ (والتى تشكل الصفات الأيونية فيها 40 %) ويكون لكل رابطة من الرابطتين السابقتين طاقة **إنقسام** تساوى 110.2 كيلوكالورى/مول . وتظل المدارات الجزيئية موجهة فى موضعها بشكل **متماثل** حول محاور المدارات الأصلية مما يكون تركيبا ، **تقريبا** ، **بشكل الهرم الرباعى** .

obeikandi.com

ويوضح شكل (1.2) نظام مدارات جزئ الماء ، أما شكل (2.2) فيوضح قوى فاندرفالس *Van der waals* . وتبلغ زاوية الرابطة في جزئ الماء الفردى (كما هو الحال في الحالة البخارية) 104.5° وتكون هذه القيمة قريبة من قيمة زاوية الشكل الرباعى الهرمى لجزئ الماء والتى تبلغ 109.28° . وتبلغ المسافة بين نواتى ذرة الأكسجين وذرة الهيدروجين فى جزئ الماء (*intermolecular distance* O–H) 0.96 أنجستروم وتصل بين قوى فاندرفالس القطرية للأكسجين والهيدروجين 1.4 ، 1.2 أنجستروم على التوالى .



شكل (1.2): شكل تخطيطى لجزئ HOH فردى والوضع النسبى للذرات فى جزئ SP^3



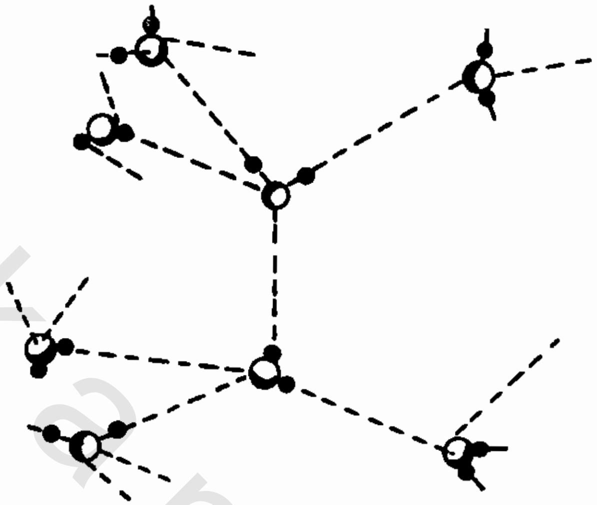
شكل (2.2): أقطار قوى فاندرفالس لجزئ HOH فى الحالة البخارية

3.2. إرتباط جزيئات الماء *Association of Water Molecules* :

يؤدى شكل جزئ الماء (على شكل حرف V) والطبيعة القطبية له لتوزيع الشحنات عليه بشكل غير متماثل وتكون صورته البخارية ثنائية القطبية ويبلغ ثابتها 1.84 (للماء النقى) . وتؤدى القطبية بهذه الصورة لحدوث قوى جذب داخلية فى الجزئ ولذلك ترتبط جزيئات الماء بشكل متماسك " *tenacity* ". ويمكن شرح قوى التجاذب الجزيئية الداخلية للجزيئات على أساس قدرتها على ربط عديد من الروابط الهيدروجينية يهيئها الشكل الفراغى لجزئ الماء ثلاثى الأبعاد . وبمقارنة الروابط الإشتراكية (التى تبلغ طاقة قوة رابطتها 80 كيلوكالورى/مول) مع الروابط الهيدروجينية التى تعتبر ضعيفة نسبيا (تكون أقل من 10 كيلوكالورى/مول) وتكون أطوال الروابط الهيدروجينية أكبر وأكثر تباينا ، كما تبلغ طاقة تفكك الروابط الهيدروجينية من 3 – 6 كيلوكالورى/مول . وتساهم القوى الإلكتروستاتيكية بالقدر الأعظم فى طاقة الروابط الهيدروجينية .

وتؤدى الكهروسالبية العالية لجزئ الأكسجين لقدرته على سحب إلكترونين من ذرتى هيدروجين كل على حدى ، مما يبعد هذين الإلكترونين عن نواتيهما فتكتسب ذرة الهيدروجين فى تلك الحالة شحنة موجبة خفيفة ويكون مدار الإلكترون عندئذ أقل ما يمكن *minimal electron shield* . ويعنى ذلك أن كل ذرة من ذرتى الهيدروجين المرتبطتين فى جزئ الماء تصبحا كأنهما بروتونان منفصلان *bare proton* . وطالما أن مدارات رابطة O-H توجد على محورين تخيليين فى الشكل الهرمى الرباعى ، حينئذ يمكن التفكير بأن هذين المحورين يمثلان خطوطا موجبة القوة تعرف بجانب روابط الهيدروجين المعطية *hydrogen-bond donor* ويمكن تصوير زوجى مدارى الأكسجين بأنهما محوران تخيليان يمثلا خطوطا سالبة القوة تعرف بجانب روابط الهيدروجين المستقبلة *hydrogen-bond acceptor sites* . وبالتأكيد فإن الخطوط الوهمية لهذه القوى الأربعة تعنى أن لكل جزئ ماء القدرة على أن يرتبط بروابط هيدروجينية مع أربعة جزيئات ماء أخرى . ويبين ما سبق شرحه الشكل الهرمى الرباعى فى شكل (3.2). ويتميز جزئ الماء بعدد متساوى من جانبى الروابط الهيدروجينية (المعطية والمستقبلة) والتى تترتب لتسمح بتكوين التركيب ثلاثى الإتجاهات للروابط الهيدروجينية . هذا وقد تبين أن قوى الجذب بين جزيئات الماء كبيرة بصورة غير عادية

خاصة إذا ما قورنت بقوى الجذب فى جزيئات أخرى (قريبة الوزن الجزيئ) ترتبط مع بعضها البعض بروابط هيدروجينية مثل NH_3 ، فلوريد الهيدروجين إلا أنها تكون روابط هيدروجينية فى إتجاهين فقط خلافا لما هو الحال فى جزيئات الماء التى تكون روابط هيدروجينية فى ثلاث إتجاهات . هذا وتعطى قدرة جزيئات الماء على تكوين روابط



شكل (3.2) : الروابط الهيدروجينية (تمثلها الخطوط المتقطعة) فى جزيئات الماء بشكلها الهرمى الرباعى

هيدروجينية فى ثلاث إتجاهات تفسيرا منطقيا لعديد من الصفات غير العادية للماء مثل القيمة العالية *" لسعة الماء الحرارية " ، ونقطة إنصهاره " ، " ونقطة غليانه " ، " وجذبه السطحى "، " وحرارة إنتشاره " ، " وتبخيره " ، وتساميه "* والتى يرتبط إرتفاع قيمها بالطاقة اللازمة لكسر الروابط الهيدروجينية الداخلية فى جزئ الماء .

4.2. تحليل الرطوبة فى المواد الغذائية :

يعتبر تحليل الرطوبة أحد أهم التحليلات التى تجرى على المنتجات الغذائية وتتأتى صعوبته من صعوبة وضرورة حصول القائم بتحليل الأغذية على نتائج دقيقة ومؤكدة لتقدير الرطوبة . وسنتناول فى هذا الجزء من الكتاب الطرق المختلفة لتحليل الرطوبة من

obeikandi.com

حيث الأساس العلمى ، والطرق المختلفة ، وتطبيقاتها ، وأهم الإحتياطات الواجب مراعاتها ، فلسفة إختيار الطريقة المطلوبة ، والصعوبات التى تواجه القائم بالتحليل .

5.2. أهمية تقدير الرطوبة :

توضح المعادلة التالية : المادة الغذائية = المحتوى من المواد الصلبة الكلية + المحتوى الرطوبى أهمية تحليل الرطوبة كتحليلا أساسيا فى كيمياء تحليل الأغذية وفيما يلى بعض الأمثلة على أهمية تحليل الرطوبة :

1- تعتبر الرطوبة أحد أهم عوامل جودة وحفظ بعض المنتجات الغذائية كما تؤثر فى درجة ثباتها ، وذلك على سبيل المثال لاالحصر مثل : أ- الفواكه والخضروات المجففة . ب- الألبان المجففة . ج- مسحوق البيض المجفف . د- التوابل والأعشاب المنكهة .

2- تستخدم الرطوبة كمقياس لعوامل الجودة فى : أ- المربى والجيلى والمرملاد.

ب- شراب السكر .

ج- منتجات الحبوب المجهزة .

3- يعتبر إنخفاض المحتوى الرطوبى ميزة نسبية فى المنتجات المعبأة وأثناء نقلها وتداولها مثل : أ- اللبن المكثف .

ب- شراب سكر القصب السائل (67 % مواد صلبة) وشراب الذرة (80 % مواد صلبة) .

ج- المواد الغذائية المجففة والتى تصعب عملية تعبئتها إذا ما زاد المحتوى الرطوبى لها عن حد معين كما أنها قد تتكتل

4- يعتبر المحتوى الرطوبى أو % للمواد الصلبة أحد أهم مواصفات ومقاييس جودة بعض الأغذية ، فعلى سبيل المثال :

أ- الجبن الشيدر : يجب ألا يزيد محتواها الرطوبى عن 39 %.

ب- الدقيق المدعم : يجب ألا يزيد محتواه الرطوبى عن 15 % .

ج- عصير الأناناس : يجب ألا تزيد المواد الصلبة الذائبة فيه عن 10.5 بركس .

د- شراب الجلوكوز: يجب ألا تقل المواد الصلبة فيه عن 70 %.

هـ- غالبا ما تحدد فى المواصفات القياسية لمنتجات اللحوم المصنعة (كاللانشون والسجق) نسبة الماء المسموح بإضافته أثناء التصنيع .

5- عند الرغبة فى حساب القيمة الغذائية يجب معرفة المحتوى الرطوبى بدقة .

6- تستخدم قيم المحتوى الرطوبى عندما يكون مطلوبا حساب % لأى من مكونات الغذاء الأخرى على أساس الوزن الجاف ***on dry weight basis*** .

6.2. صور الماء فى الأغذية *Forms of Water in Foods* :

تعتمد سهولة إزالة الماء من المادة الغذائية أثناء تقدير الرطوبة على الصور التى يوجد بها الماء فى الغذاء والتى قد تكون إحدى هذه الصور :

1- الماء الحر ***Free water*** : وهو الماء الذى يحتفظ بصفاته الطبيعية ويعمل كمادة إنتشار للغرويات ومذيبا للأملاح .

2- الماء المدمص ***Adsorbed water*** : حيث يكون هذا الماء مرتبطا ويحتجز فى جدر الخلايا أو البرتوبلازم وقد يرتبط بشدة بالبروتين .

3- ماء التأدرت ***Water of hydration*** : وهو نوع من الماء المرتبط كيميائيا مثل صورته فى اللاكتوز أحادى التأدرت أو فى الأملاح ككبريتات الصوديوم المائية $Na_2SO_4.10H_2O$.

وطبقا للصورة التى يتواجد عليها الماء فى الغذاء تتأثر النتيجة المتحصل عليها عند قياس المحتوى الرطوبى فقد تؤدى طريقة القياس للحصول على نتائج لقيم أقل أو أكبر من المحتوى الرطوبى الحقيقى . لذلك كانت هناك طرق عديدة لتقدير المحتوى الرطوبى تعتمد كل منها على طبيعة ونوع الغذاء وصور الماء فيه .

obeikandi.com

7.2. جمع وتداول العينات لتقدير محتواها الرطوبة:

Sample Collection and Handling :

تعتبر طريقة جمع وتداول العينات لتقدير محتواها الرطوبى فى غاية الأهمية لأنها المصدر الرئيسى لإحتمالات حدوث أخطاء تجريبية . ويجب إتخاذ كافة الإحتياطات لتجنب حدوث فقد أو إكتساب للرطوبة أثناء خطوات إعداد العينات للتحليل . وفيما يلى بعض الإعتبارات الواجب مراعاتها أثناء جمع وتداول العينات لتقدير محتواها الرطوبى :

1- يجب أن تكون فرصة تعرض العينات للجو أقل ما يمكن حتى لا يحدث فقد أو إكتساب رطوبة .

2- يؤدى طحن العينات أثناء إعدادها للتحليل لإنتاج حرارة نتيجة الإحتكاك فتؤثر على المحتوى الرطوبى للعينة ويجب تجنب ذلك قدر الإمكان .

3- يجب أن يكون الفراغ القمى فى أوعية حفظ العينات أقل حجم ممكن حتى لا يحدث فقد للرطوبة داخل الوعاء نفسه .

4- يجب توخى الدقة والحذر أثناء وزن العينات حيث يعتمد إحتمال فقد أو إكتساب رطوبة على الرطوبة النسبية فى الجو أثناء عملية الوزن .

8.2. طرق تقدير الرطوبة بإستخدام أفران التجفيف *Oven drying methods :*

تعتمد طرق التجفيف فى أفران على تسخين العينات تحت ظروف خاصة ، وبحساب الفقد فى وزن العينة بعد إزالة الرطوبة منها يمكن تقدير المحتوى الرطوبى . وتعتمد قيمة المحتوى الرطوبى على نوع الفرن المستخدم ، وزمن ودرجة حرارة التجفيف . وفيما يلى بعض أهم الإعتبارات الواجب مراعاتها أثناء تقدير المحتوى الرطوبى للمواد الغذائية

1.8.2. إزالة الرطوبة *Removal of moisture :*

تصل نقطة غليان الماء النقى عند سطح البحر إلى حوالى 100°م . ويعتبر الماء الحر من أسهل صور الماء الثلاث التى تزال بالحرارة . وبإذابة 1 مول من مادة مذابة فى لتر من الماء ترتفع نقطة غليان الماء بمقدار 0.512°م . ويعنى ذلك أن معدل الإرتفاع فى نقطة غليان الماء يستمر أثناء عملية إزالة الماء بسبب كيز المواد الذائبة كلما

تبخر جزءا من الماء. ويؤثر على كفاءة ومعدل إزالة الماء أثناء التجفيف بالأفران لتقدير الرطوبة عوامل عديدة أهمها حجم جزيئات المادة الغذائية ، وتوزيعها ، وحجم العينة ، ومساحة سطح العينة أثناء التجفيف .

2.8.2. تحلل مكونات الغذاء الأخرى *Decomposition of other constituents* :

تعتبر عملية **إزالة** الماء من عينة المادة الغذائية أثناء **التجفيف** دالة للزمن ودرجة الحرارة . هذا وقد يحدث **تحلل أو تطاير** لبعض مكونات الغذاء إذا ما **إمتد زمن** التحليل أو ما إرتفعت **درجة** الحرارة . وتجدر الإشارة فى هذا الصدد أنه يجب إزالة الماء من المادة الغذائية أثناء تقدير **الرطوبة** دون تحلل لمكونات أخرى من الغذاء قد تنطلق منها ماء . فعلى سبيل المثال تتحلل المواد الكربوهيدراتية على 100°م طبقا لما يوضحه التفاعل التالى :

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 6C + 6H_2O$$

وهذا الماء المتولد نتيجة تحلل الكربوهيدرات ليس هو الماء الذى نحن بصدد تقديره. وهناك أيضا المكونات الطيارة فى المواد الغذائية مثل أحماض **الخليك والبروبيونيك والبيوتيريك ، والكحولات ، والإسترات ، والألدهيدات ومكونات النكهة** الأخرى والتى يؤدى تطايرها أثناء تقدير الرطوبة إلى خطأ معنوى فى تقدير الرطوبة ، فيزداد المحتوى الرطوبى للغذاء عن المحتوى الرطوبى الحقيقى ، أما الدهون **غير المشبعة** فقد يزداد وزنها نتيجة أكسدتها فيقل المحتوى الرطوبى المقدر للغذاء عن المحتوى الرطوبى الحقيقى.

3.8.2. التحكم فى درجة الحرارة *Temperature control* :

يجب أن يتم ضبط درجات حرارة وأزمنة تقدير الرطوبة بعناية بالغة بغية الحصول على نتائج صحيحة . وبوجه عام تستخدم ثلاث أنواع من الأفران لتقدير الرطوبة :

أ- الأفران العادية *Convection ovens* التى تعمل تحت ضغط جوى عادى ، ولا يفضل عادة إستخدامها فى حالة الرغبة فى الحصول على نتائج دقيقة ومؤكدة .

ب- أفران الهواء المدفوع ***Forced draft ovens*** : وتتميز هذه الأفران بفرق طفيف في درجات الحرارة بين العينات ودرجة حرارة الفرن (عادة لاتتجاوز 1°م). وعادة ما يكون إتجاه الهواء فى تلك الأفران أفقيا ولا يؤثر درجة إمتلاء الفرن بالعينات على دقة النتائج عكس الحال فى الأفران العادية .

ج- أفران تعمل تحت تفريغ ***Vacuum ovens*** وتستخدم فيتقدير رطوبة المواد الغذائية التى لا تتحمل درجات الحرارة العالية .

9.2. أنواع أطباق تقدير الرطوبة :

تتباين أطباق تقدير الرطوبة فى شكلها وقد يكون لها أو لا يكون لها غطاء . ويبلغ قطر طبق تقدير الرطوبة حوالى 5.5 سم ، ولا يجب مسك الأطباق باليد بل تستخدم مواسك خاصة لذلك . وتجفف الأطباق جيدا قبل وضع العينات فيها حيث تسخن لمدة 3 ساعات على 100°م فى أفران تحت تفريغ أو قد تسخن لمدة تصل إلى 15 ساعة على 100°م إذا كانت الأفران عادية .وبعد تجفيف الأطباق توضع فى مجففات ***Dessicators***.

10.2. تجنب تكوين قشرة صلبة فى بعض الأغذية:

Control of surface crust formation:

تميل بعض أنواع الأغذية لتكوين قشرة صلبة منفذة نسبيا أو قد تلتصق جزيئاتها ببعضها البعض فتمنع خروج الرطوبة ، مما يؤدى لأخطاء فى عملية القياس . ولتجنب تكوين هذه القشرة الصلبة تستخدم طريقة إضافة الرمل . حيث توضع فى أطباق تقدير الرطوبة كمية من الرمل النظيف الجاف مع قضيب زجاجى ***موزون*** لتفتيت المادة الغذائية مما يمنع تكوين القشرة الصلبة كما تزداد مساحة سطح العينة بخلطها مع الرمل بحيث يسهل خروج الرطوبة منها . وعادة ما تضاف كمية من الرمل فى حدود 20 – 30 جم من الرمل (لكل 3 جم من العينة) لتعمل على نشر وتوزيع العينة وتمنع إحتجاز الرطوبة .

***طريقة حساب المحتوى الرطوبى:**

$$\text{\% للرطوبة (و/و)} = \frac{\text{وزن الماء فى العينة} \times 100}{\text{الوزن الرطب للعينة}}$$

obeikandi.com

$$\text{\% للرطوبة (و/و)} = \frac{\text{الوزن الرطب للعينة} - \text{وزن العينة الجافة}}{\text{الوزن الرطب للعينة}} \times 100$$

$$\text{\% للمواد الصلبة الكلية (و/و)} = \frac{\text{وزن العينة الجافة}}{\text{الوزن الرطب للعينة}} \times 100$$

وفيما يلي بعض أهم الإعتبارات الواجب مراعاتها عند تقدير الرطوبة بطرق الأفران :

- يفضل عند تقدير الرطوبة إستمرار عملية التجفيف فى الأفران على درجة حرارة معينة (دون تحديد زمن مسبق لعملية التقدير) حتى ثبات الوزن لوزنتين متتاليتين يكون الفرق الزمنى بينهما 30 دقيقة على الأقل . وعادة ما يتراوح زمن تقدير الرطوبة ما بين 3 إلى 24 ساعة على 105°م فى الأفران العادية . هذا وقد تتراوح درجات حرارة تقدير الرطوبة طبقا لنوع الغذاء ما بين 70 إلى 155°م.

- عند إستخدام أفران الهواء المدفوع ، توزن العينة بسرعة فى أطباق تقدير الرطوبة لتجنب إكتساب أو فقد رطوبة أثناء الوزن ، وتتراوح فترة التجفيف بين 0.75 إلى 24 ساعة .

- قد يجرى تجفيف مبدئى لبعض عينات الأغذية السائلة فى حمام مائى على 100°م لتجنب حدوث طرطشة ***spattering*** إذا ما وضعت تلك العينات السائلة فى الأفران مباشرة ، وفى تلك الحالة يقل زمن التجفيف فى المرحلة التالية بالأفران ليصبح من 0.75 إلى 3 ساعات .

- يجب أن يؤخذ فى الإعتبار أن حدوث تلون باللون البنى أثناء تقدير الرطوبة بالأفران يعتبر دليلا على حدوث هدم لمكونات أخرى فى الغذاء وإحتمالات تطايرها مع الرطوبة مما يسبب أخطاء فى التقدير .

- عند تجفيف العينات مرتفعة المحتوى من السكريات كالفواكه والمنتجات الغذائية المرتفعة فى نسب السكريات ، تجفف عادة فى الأفران تحت تفريغ بحيث لا تزيد درجة الحرارة عن 70°م .

- عند تجفيف عينات المواد الغذائية تحت تفريغ لتقدير رطوبتها يتراوح الضغط بين 25 – 100 مم زئبق على درجة حرارة تتراوح بين 98 – 102°م لفترة تتراوح بين 3 – 6 ساعات . ويجب ألا تزيد درجة حرارة الأفران عن 70°م عند تقدير المحتوى الرطوبى للأغذية المرتفعة فى نسبة السكريات خاصة سكر الفركتوز الحساس للحرارة العالية .

- إذا كان المنتج الذى يتم تقدير رطوبته به نسبة مرتفعة من المواد الطيارة ***volatiles*** يجب إستخدام معامل تصحيح لتعويض هذا الفقد فى الوزن .

- تؤدى عملية أكسدة الليبيدات غير المشبعة فى المواد الغذائية لزيادة فى وزن العينة وذلك لتشبع الروابط الزوجية بالأكسجين ، وتحدث هذه الظاهرة خاصة فى أفران الهواء المدفوع .

- يجب أن يعلم القائم بالتحليل أنه فى حالة تجفيف العينات الغذائية فى أفران تحت التفريغ لا يحدث توصيل جيد للحرارة لذلك يجب أن توضع أطباق العينات على الرفوف المعدنية مباشرة لتحسين التوصيل الحرارى .

- تعتبر عملية تبخر الرطوبة من المواد الغذائية عملية إمتصاص حرارى ***Endothermic*** لذلك قد يحدث تبريد للمواد الغذائية أثناء تصاعد الرطوبة منها خلال عملية التجفيف ، ولا يفضل رفع درجة الحرارة لتعويض هذا التأثير التبريدى وإلا فستتعرض عينات المواد الغذائية أثناء مراحل التجفيف الأخيرة لحرارة زائدة .

- يعتمد الزمن اللازم لإتمام عملية التجفيف على طبيعة الغذاء ، مساحة السطح لكل وحدة وزن ، هل إستخدم الرمل لتوزيع الحرارة وتفتيت العينة ، التركيز النسبى للسكريات ، تركيز المواد القادرة على الإحتفاظ بالرطوبة ، أو التحلل ، أو التطاير .

11.2. تقدير المحتوى الرطوبى بأفران الميكروويف *Microwave oven* :

تعتبر طريقة تقدير المحتوى الرطوبى بإستخدام أفران الميكروويف من الطرق القيمة والسريعة . وتتميز طريقة التجفيف بأفران الميكروويف بالدقة الكافية لإستخدامها كطريقة

روتينية وسريعة لتقدير المحتوى الرطوبى للأغذية . هذا وقد إعتبرت هذه الطريقة من طرق التحليل الرسمية ونشرت فى الـــ *AOAC* . ومن طرق تقدير الرطوبة طريقة إستخدام أفران الميكروويف من نوع الـــ *CEM* وتتلخص فى الخطوات التالية:

1- يضبط خروج الميكروويف بوضع جهاز التحكم فى التشغيل عند أقصى قوة .

2- يعادل وزن الميزان الداخلى فى الفرن بواسطة وضع وسادتين من الصوف الزجاجى على الميزان ثم يضبط مؤشر الميزان على الصفر .

3- توضع عينة المادة الغذائية بأسرع ما يمكن فى منتصف وسادتى الصوف الزجاجى وتوزن فينتج وزن المادة الغذائية الرطبة فقط .

4- يضبط زمن التحليل بإستخدام جهاز حاسب آلى ، ويكون فى حدود 10 دقائق.

5- بعد مرور زمن التحليل تسجل على شاشة الحاسب الآلى % للرطوبة فى العينة مباشرة .

ويجب عند إستخدام تلك الطريقة فى تقدير المحتوى الرطوبى للأغذية أن توضع عينة المادة الغذائية فى مركز وسادة الصوف الزجاجى تماما كما يجب توزيعها بتجانس فى دائرة حتى لا يحدث إحتراق لبعض أجزاء العينة أولا تجف أجزاء أخرى من العينة . وإذا لم يتم وضع الوزن المناسب من العينة بين الوسادتين بسرعة كبيرة فإن ذلك يؤدى لفقد كمية كبيرة من الرطوبة قبل وزن العينة .

وهناك أنواع من أفران الميكروويف التى تستخدم فى تقدير الرطوبة تعمل تحت تفريغ ، ويكافئ وضع عينات المواد الغذائية فى تلك الأفران مدة 10 دقائق فقط زمنا قدره 5 ساعات على 100°م فى لأفران التجفيف تحت تفريغ حيث تزال فى كلتا الحالتين نفس كمية الرطوبة من المادة الغذائية .

12.2. تقدير المحتوى الرطوبى بالأشعة تحت الحمراء *Infrared Drying* :

عند تقدير المحتوى الرطوبى بإستخدام الأشعة تحت الحمراء تتخلل الحرارة العينة المراد تجفيفها فتبخر الرطوبة منها بالكامل فى زمن قصير يتراوح بين 10 إلى 25 دقيقة. ويكون المصدر الحرارى عبارة عن لمبة أشعة تحت حمراء تصل درجة حرارة خيطها

obeikandi.com

الحرارى إلى 2000 – 2500 كالفن . ومن أهم العوامل التى يجب التحكم فيها أثناء تقدير المحتوى الرطوبى بالأشعة تحت الحمراء ، **المسافة** بين مصدر الأشعة تحت الحمراء والمادة التى يتم تجفيفها ، **سمك العينة** . ويجب أن يتيقن القائم بالتحليل من أن العينات لن تحترق أو يحدث لها جفاف سطحى ***Case harden*** أثناء التجفيف . وقد تزود أجهزة التجفيف بالأشعة تحت الحمراء بدورة هواء مدفوع لإزالة الهواء الرطب ، وميزان تحليلى لقراءة المحتوى الرطوبى مباشرة . هذا ولم تصدر موافقة أو إعتماد من هيئة المحللين الكيميائيين الرسمية ***AOAC*** لتقدير الرطوبة بهذه الطريقة حتى الآن . ولسرعة تقدير الرطوبة بهذه الطريقة يمكن إستخدامها فى التحليل الوصفى السريع لمكونات المنتج الغذائى أثناء مراحل تصنيعه .

ويمكن كذلك تقدير المحتوى الرطوبى للأغذية بإستخدام الأشعة تحت الحمراء إعتمادا على قياس **صفات** إمتصاص الأطوال الموجية للتردد الجزيئ فى الماء . ومن أطوال الموجات الضوئية المستخدمة لتحقيق هذا الغرض تلك التى تتراوح بين 3.0 ، 6.1 ميكروميتر (وهو التردد الأساسى لجزئ الماء) ، 1.93 ميكروميتر (وهى منطقة الإمتصاص المختلطة) ، 1.45 ميكروميتر (التردد الأولى لرابطة O-H فى حالة الإمتطاط ***stretching***) . وتتميز هذه الطريقة **بالحساسية** العالية والتى تصل دقتها لبضعة أجزاء فى المليون . وعادة ما تستخدم لمبة تجستن ***Tungston*** وكشاف ***detector*** من سلفيد الرصاص مع دائرة إلكترونية مصممة بعناية وتفصل مناطق الأطوال الموجية عن بعضها البعض بإستخدام مرشحات لمنع تداخل الموجات وعادة تستخدم مناطق إمتصاص على أطوال موجية 1.45 ، 1.91 ، 2.83 ميكروميتر لتحليل الماء بحساسيات تتراوح بين 1 – 5 أجزاء فى المليون حتى عدة مئات فى المليون .

13.2. تكنولوجيا الطرق السريعة لتقدير الرطوبة :

Rapid moisture analyzer technology:

أصبحت هناك عدة طرق سريعة لتقدير الرطوبة و/أو المواد الصلبة ويتم إستخدامها فى الصناعة . فبالإضافة للطرق التى تعتمد على الأشعة تحت الحمراء أو الميكروويف ، والتى سبق تناولها ، فهناك أجهزة متكاملة تعتمد على إستخدام درجات الحرارة العالية

(من 25 – 275°م) ومزودة بميزان حساس رقمى ليعطى مباشرة % للرطوبة أو المواد الصلبة فى العينة الغذائية . ويستغرق تقدير الرطوبة بهذه الطريقة **عدة دقائق** حيث توضع العينة المختبرة فى طبق ألومينيوم أو على ورقة ترشيح ثم ترفع درجة الحرارة تدريجيا من 25 إلى 275°م بمعدل تقريبى حوالى 25°م/دقيقة ، ونتيجة لذلك تنبعث الرطوبة من العينة المختبرة ويزن الميزان العينة المختبرة أثناء مراحل جفافها أوتوماتيكيا ويعطى قراءات مباشرة للنسبة المئوية للرطوبة أو النسبة المئوية للمواد الصلبة .

14.2. تقدير الرطوبة بطرق التقطير *Distillation Procedures* :

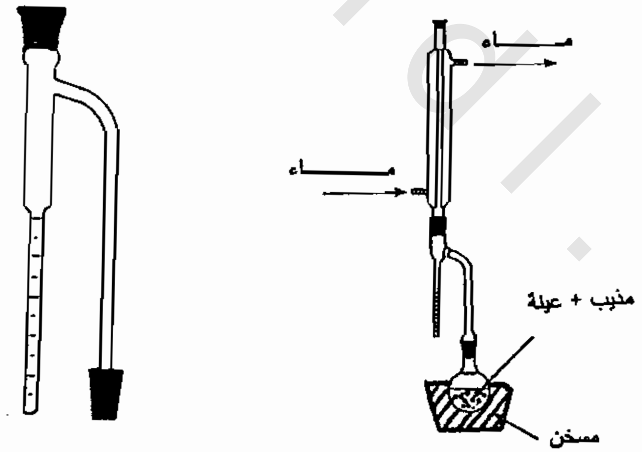
تعتمد طرق تقدير الرطوبة بعملية التقطير على **خلط** عينة المادة الغذائية مع مذيب لا يختلط بالماء ونقطة غليانه **أعلى** من الماء وتجرى عليهما عملية تقطير **مشترك** للمذيب والماء بالمادة الغذائية ويجمع مخلوط الماء والمذيب المتقطران فى أنبوبة مدرجة فيقاس حجم الماء بعد إنفصاله عن المذيب ليعبر عن % للرطوبة . وهناك طريقتان تستخدمان عادة فى التقطير ألا وهما الطريقة المباشرة ، وطريقة التقطير العاكس ***Reflux distillation*** ويمكن إستخدام أنواع عديدة من المذيبات ففى طريقة التقطير المباشر تخلط العينة مع مذيب لا يختلط بالماء وله نقطة غليان أعلى من الماء ، تسخن العينة فى وسط تسخين من زيت معدنى أو سائل له درجة حرارة غليان **أعلى** من نقطة غليان **الماء** . ويمكن كذلك إستخدام أنواع أخرى من السوائل التى لاتختلط بالماء وتكون نقطة غليانها أعلى قليلا من مثيلتها للماء مثل **التولوين** ، **والزيلين** ، **والبنزين** . ويعتبر **التولوين** أكثرها **شيوعا** وإستخداما فى تقدير الرطوبة . هذا وقد إعتمدت هيئة المحللين الكيميائيين الرسمية *AOAC* طريقة التقطير كطريقة رسمية لتقدير المحتوى الرطوبى فى ***التوابل*** (طريقة *AOAC* برقم 986.21) ، وفى الجبن (طريقة *AOAC* برقم 969.19) ، للعلائق الحيوانية (طريقة *AOAC* برقم 925.04) . ويمكن كذلك إستخدام هذه الطريقة فى تقدير المحتوى الرطوبى فى ***النقليات والزيوت والصابون والشموع*** . وتتميز طرق التقطير بأنها تعطى نتائج دقيقة ومؤكدة ، كما أن درجة التحلل الحرارى لعينات الأغذية أثناء عملية التقطير تكون أقل من طرق إستخدام الأفران . هذا ويمكن خفض معدل التفاعلات غير المرغوبة بإستخدام مذيبات ذات نقطة غليان أقل ، إلا أن ذلك بدوره يزيد من زمن التقطير . وفى طرق التقطير بوجه عام يقاس حجم الماء مباشرة ليعبر عن

النسبة المئوية للرطوبة بدلا من تقدير الفقد فى وزن العينة كما فى الطرق السابق تناولها ، إلا أن قراءة حجم الماء فى أنبوبة الإستقبال قد يكون أقل دقة عما هو الحال عند تقدير الفقد فى الوزن.

1.14.2. تقدير المحتوى الرطوبى بإستخدام التقطير العاكس ومذيب لا يختلط بالماء:
Reflux distillation with immiscible solvent:

قد يستخدم فى التقطير العاكس ، إما مذيب **أقل كثافة** من الماء مثل التولوين (نقطة غليانه 110.6°م) أو الزيلين (وتتراوح نقطة غليانه بين 137 – 140°م) أو مذيب كثافته أعلى من الماء مثل التتراكلوروإثيلين (نقطة غليانه 121°م) ، ويتميز المذيب الأخير (تتراكلوروايثيلين) بأن المادة الغذائية يتم تجفيفها وهى طافية فوق سطح المذيب لذلك فلايخشى عليها من التفحم ***char*** أو الإحتراق ***burn*** ، وبالإضافة لذلك فلا يخشى من مخاطر حدوث حرائق من المذيب .

وهناك وحدة فى جهاز تقدير الرطوبة تعمل كمصيدة للرطوبة ***trap*** تعرف بإسم ***Bidwell-Sterling*** تستخدم مع مذيب أقل كثافة من الماء . ويمكن شرح خطوات هذه الطريقة فى الشكل التخطيطى رقم (4.2) .حيث أنه بمجرد بدء التولوين فى الغليان ، يلاحظ



شكل (4.2):مصيدة ***Bidwell-Sterling*** وتستخدم لتقدير الرطوبة بطريقة التقطير

القائم بالتحليل سحبا ضبابية ترتفع فى دورق التقطير عبارة عن خليط بخار المذيب والماء المنبعث معه من العينة ، وعندما ترتفع الأبخرة ويسخن الدورق ، ثم مصيدة -***Bidwell Sterling*** ، فقاع المكثف ، يبدء حدوث التكثيف كا يكتسب السطح البارد للمكثف شكل الضباب وتبدء نقاط الماء أن تصبح مرئية ، وتبدأ فى الإنفصال عن التولوين ويزداد معدل هذا الإنفصال بالتبريد . وبوجه عام هناك ثلاثة مصادر أساسية للأخطاء يجب تجنبها عند تقدير الرطوبة بهذه الطريقة نوجزها فيما يلى :

1- يتكون **شبه مستحلب** بين التولوين والماء المتكثف ويمكن تجنب ذلك بتبريد الجهاز وأنبوبة الإستقبال (المصيدة) بصفة خاصة قبل قراءة كمية الرطوبة .

2- **إلتصاق قطرات من الماء بالجهاز** عندما يكون غير نظيفا ، لذلك يجب أن تكون كل الأجهزة الزجاجية نظيفة تماما ، ولو أن هناك إحتمال بإلتصاق قطرات طفيفة من الماء مع أجزاء جهاز التقطير حتى لو كان نظيفا . هذا ويفضل إستخدام فرشاة سحاجة بنهاية مسطحة بحيث تمرر من خلال المكثف لإزاحة قطرات الماء المتكثفة على جداره .

3- **تحلل مكونات الغذاء وإنتاج ماء** كنتائج للتحلل يتداخل مع نتيجة التقدير، ويحدث ذلك بصفة أساسية أثناء تحلل الكربوهيدرات ($C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 6C + 6H_2O$) وفى تلك الحالة يفضل إستخدام طريقة بديلة لتقدير الرطوبة .

يوضح الشكل التخطيطى رقم (5.2) خطوات التقطير العاكس بالتولوين بإستخدام مصيدة ***Bidwell-Sterling*** موضحا بها كيفية التخلص من قطرات الماء المكثفة على أجزاء الجهاز .

التقطير العاكس *Reflux Distillation*

▼

- ضع العينة فى دورق التقطير وغطها تماما بالمذيب

▼

- إملأ أنبوبة الإستقبال (مصيدة *Bidwell-Sterling*) بالمذيب بصبه فيها من خلال قمة المكثف

▼

- سخن الدورق حتى يغلى المذيب ويتقطر ببطئ أولا ثم زد معدل التسخين فيزداد معدل التقطير

▼

- بعد حوالى ساعة من بدء التقطير إستخدم فرشاة سحاحة لمنع إلتصاق الماء على المكثف والأجزاء العلوية من مصيدة *Bidwell-Sterling*

▼

- إدفع قطرات الماء المتكثفة فى الجزء العلوى من المكثف فوق منطقة تكثيف البخار

▼

- إغمس الفرشاة والسلك فى كمية ضئيلة من التولوين لمنع إلتصاق الماء على جدر المكثف

▼

- إذا ما تكثف الماء على جدر الأنبوبة المدرجة ، إستخدم سلك مستقيم لإزاحة هذا الماء حتى يتجمع فى قاع الأنبوبة

▼

- أعد السلك إلى نقطة فوق مناطق التكثيف وإغمسه فى كمية قليلة من التولوين

▼

- بعد ما يتوقف تقطير الماء من العينة وتزال رطوبتها تماما ، أعد إستخدام الفرشاة والسلك لإزالة قطرات الماء المتكثفة

▼

- إغمس الفرشاة والسلك فى طبقة التولوين قبل إزالة المكثف

▼

- إترك الجهاز يبرد حتى درجات حرارة الغرفة قبل قياس حجم الماء فى المصيدة

▼

- % للرطوبة = حجم الماء X 2 (لعينة وزنها 50 جم)

شكل (5.2): طريقة التقطير العاكس بالتولوين عند إستخدام مصيدة *Bidwell-Sterling* موضحا بها خطوات إزالة قطرات الماء المتكثف على وحدات الجهاز.

obeikandi.com

15.2. أهم الطرق الكيميائية لتقدير الرطوبة – المعايرة بطريقة كارل فيشر:

Karl Fischer Titration:

هناك بعض منتجات الأغذية التي يؤدى تقدير الرطوبة فيها بطرق التسخين سواء تحت الضغط الجوى العادى أو تحت تفريغ إلى الحصول على نتائج غير دقيقة ، وعندئذ يفضل تقدير رطوبة هذه المنتجات الغذائية بالمعايرة بما يعرف بطريقة كارل فيشر . وعادة تستخدم هذه الطريقة فى تقدير المحتوى الرطوبى للأغذية منخفضة الرطوبة مثل الفواكه والخضروات المجففة (طريقة *AOAC* برقم 977.19EG) ، والحلوى والشوكولاتة (طريقة *AOAC* برقم 977.10) ، والبن المحمص والزيوت والدهون (طريقة *AOAC* برقم 984.20) ، ويمكن كذلك إستخدامها فى أى منتجات غذائية منخفضة المحتوى الرطوبى ومرتفعة فى نسب أى من الكربوهيدرات أو البروتين . وتتميز هذه الطريقة بالسرعة ، والحساسية ، والدقة كما لاتستخدم فيها أى معاملة حرارية. ويعتمد الأساس العلمى لهذه الطريقة على تفاعل أساسى وصفه العالم ***Bunsen*** منذ زمن طويل (1853م) ، حيث يختزل اليود بواسطة ثانى أكسيد الكبريت (SO_2) فى وجود الماء كما هو موضح فى المعادلة التالية:

$$2H_2O + SO_2 + I_2 \longrightarrow H_2SO_4 + 2HI \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots(1)$$

هذا وقد تم تعديل هذه الطريقة لزيادة الدقة والحساسية بإستخدام الميثانول والبيريدين لإذابة اليود وثانى أكسيد الكبريت أى فى نظام من 4 مكونات كالتالى :

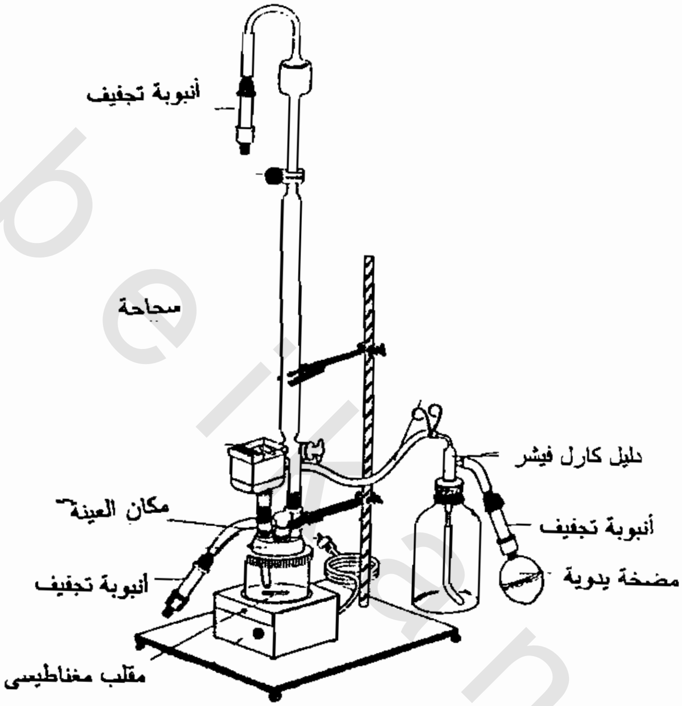
$$C_5H_5N.I_2 + C_5H_5N.SO_2 + C_5H_5N + H_2O \longrightarrow 2C_5H_5N.HI + C_5H_5NSO_2 \ldots(2)$$

$$C_5H_5N.SO_3 + CH_3OH \longrightarrow C_5H_5N(H)SO_4.CH_3 \ldots\ldots\ldots(3)$$

ويستخدم فى إتمام التفاعل السابق كل من المكونات الآتية : 1 مول ماء ، 1 مول يود ، 1 مول ثانى أكسيد الكبريت ، 3 مول بيريدين ، 1 مول ميثانول . وعادة يحتوى محلول الميثانول على اليود ، ثانى أكسيد الكبريت والبيريدين بنسب 1 : 3 : 10 على التوالى ، وبتركيز يجعل كل 3.5 مجم من الماء = I مل من هذا الجوهر الكشاف .

obeikandl.com

ويوضح شكل (6.2) جهاز كارل فيشر لمعايرة الماء .



شكل (6.2) : وحدة كارل فيشر للمعايرة

وفيما يلى بعض أهم الإعتبارات الواجب مراعتها عند تقدير المحتوى الرطوبى للأغذية بطريقة كارل فيشر :

1- عند إجراء تقديرا للرطوبة بطريقة كارل فيشر بطريقة المعايرة الحجمية (شكل 6.2) يضاف اليود وثانى أكسيد الكبريت (بالصورة المناسبة) للعينة فى غرفة مقفلة حتى لا تؤثر رطوبة الهواء الجوى على دقه التقييم .

2- يمكن تقدير نقطة الإنتهاء بمجرد النظر حيث تتميز بلون بنى- محمر غامق *Dark-red-brown* حيث تعطى النقطة الزائدة من اليود والتى لاتستطيع التفاعل مع الماء بعد إنتهائه هذا اللون .

obeikandi.com

3- يمكن تقدير نقطة الإنتهاء ***End point*** بقياس فرق الجهد إلكترونيا وبذلك تزداد حساسية طريقة التقدير .

4- تناسب طريقة المعايرة الحجمية السابق وصفها (شكل 6.2) العينات ذات المحتوى الرطوبى الأعلى من 0.03 %. أما طرق المعايرة الكهربائية فتصلح بدرجة كبيرة للمنتجات ذات المحتوى الرطوبى الأقل من 0.03 % . وفى هذه الطريقة يتم توليد اليود إلكتروليتيا لمعادلة الماء ، وتقدر كمية اليود اللازمة لمعادلة الماء بالتيار اللازم لتوليد اليود .

5- يضاف دليل كارل فيشر " ***KFR*** " مباشرة كمادة معايرة فى طريقة المعايرة الحجمية إذا كان الماء فى عينة المادة الغذائية سهل المنال . أما إذا ما كان الماء صعب الحصول عليه فى عينة غذائية صلبة فإنه يفضل فى تلك الحالة إستخلاص الماء بمذيب مناسب مثل " الميثانول " . وبطبيعة الحال يؤثر حجم جزيئات العينة تأثيرا مباشرا على كفاءة الإستخلاص وبعد الإستخلاص يعاير مستخلص الميثانول بواسطة دليل كارل فيشر ***KFR*** .

6- تؤدى الرائحة الكريهة والنفاذة للبيريدين وما يمثله من خطورة على الصحة العامة لعزوف الباحثين عن إستخدامه ولذلك إتجهت الأبحاث لإستخدام مركبات بديلة قادرة على إذابة اليود وثانى أكسيد الكبريت . ومن أهم هذه المركبات البديلة الأمينات الأليفاتية وبعض المركبات الحلقية حيث وجد أنها تؤدى نفس وظيفة البيريدين . وقد يكون الدليل المستخدم فى هذه الطريقة مكونا من كل مكون على حدى (كلا من المذيب ، مادة المعايرة منفصلان) أو قد يكون مكونا واحدا (المذيب ومادة المعايرة سويا) . وعادة ما يكون الدليل المختلط أسهل فى الإستخدام ، أما الدليل الذى يكون كل مكون فيه على حدى فيكون ثباته التخزينى أعلى .

7- قبل تقدير كمية الماء الموجودة بالغذاء يجب تقدير مكافئ دليل كارل فيشر ***Karl Fischer Reagent equivalence*** (***KFReq***) والذى يمثل الكمية من الماء والتى تتفاعل مع 1 مل من دليل كارل فيشر ***KFR*** . هذا ويجب معايرة الدليل دائما قبل إستخدامه لعدم ثباته التخزينى .

8- يمكن تقدير مكافئ دليل كارل فيشر ***KFReq*** إما بالماء النقى ، أو بمحلول قياسى من الماء والميثانول ، أو بطرطرات الصوديوم ثنائى الهيدرات ***Sodium tartarate dihydrate*** . ويصعب إستخدام الماء النقى بسبب عدم الدقة فى قياس الكميات الصغيرة المطلوبة من الماء أما المحلول القياسى للماء فى الميثانول فيعيبه إحتمال تغير تركيبه بطول فترة التخزين لإمتصاصه رطوبة من الهواء الجوى . لذلك يفضل فى أغلب الأحيان إستخدام مادة طرطرات الصوديوم ثنائى الهيدرات ($Na_2C_4H_4O_6.2H_2O$) فى تقدير مكافئ دليل كارل فيشر نظرا لثباتها التخزينى.

ويمكن حساب مكافئ دليل كارل فيشر ***KFReq.*** عند إستخدام طرطرات الصوديوم كما يلى :

$$\text{KFReq (مجم ماء/مل)} = \frac{\text{36 جم ماء/مول طرطرات الصوديوم ثنائى الهيدرات} \times S \times 1000}{\text{230.08 جم/مول} \times A}$$

حيث KFReq = مكافئ الماء لدليل كارل فيشر .

S = وزن طرطرات الصوديوم ثنائى التأدرت (جم) .

A = عدد ملليلترات دليل كارل فيشر اللازمة لمعادلة طرطرات الصوديوم ثنائية التأدرت .

وطالما تمت معرفة مكافئ دليل كارل فيشر يمكن حساب المحتوى الرطوبى فى العينة حيث يساوى :

$$\text{\% للمحتوى الرطوبى} = \frac{100 \times Ks \times KFReq}{S}$$

حيث KFReq = المكافئ المائى لدليل كارل فيشر .

Ks = عدد ملليلترات دليل كارل فيشر اللازمة لمعايرة العينة.

S = وزن العينة .

ومن أهم صعوبات التحليل ومصادر الخطأ فى طريقة كارل فيشر لتقدير المحتوى الرطوبى ما يلى :

1- **الإستخلاص غير الكامل للماء من العينة** : لذلك يجب طحن وتفتيت العينة لجزيئات غاية فى الدقة .

2- **رطوبة الهواء الجوى** : يجب ألا يسمح ، على وجه الإطلاق ، بنفاذ الهواء الجوى الرطب لداخل غرفة التفاعل .

3- **وجود آثار رطوبة على الجدر الداخلية لوحدة التفاعل** : لذلك يجب دائما تجفيف كل الأجزاء الزجاجية والأدوات التى تستخدم فى التقدير بعناية بالغة .

4- **قد يحدث تداخل لبعض مكونات الغذاء فى التفاعل مما يؤثر فى النتائج المتحصل عليها** : وذلك مثل : حامض الأسكوربيك (فيتامين C) والذى يتحول بواسطة دليل كارل فيشر ***KFR*** إلى حمض الديهيدروالأسكوربيك وبذلك تكون النتيجة أعلى من الحقيقة ، كذلك تتفاعل مركبات الكربونيل مع الميثانول فتتكون أسيتالات وينتج ماء ، وهكذا تصبح النتيجة النهائية للتقدير أعلى من الحقيقة ، وعلى نفس المنوال يمكن أن يتفاعل اليود مع الأحماض الدهنية غير المشبعة فتستهلك فى التفاعل كمية أكبر من اليود مما يعطى تقديرا للمحتوى الرطوبى فى العينة أعلى من التقدير الحقيقى .

16.2. بعض الطرق الكيميائية الأخرى لتقدير الرطوبة :

1.16.2. عند خلط المادة الغذائية بمسحوق كربيد الكالسيوم يتفاعل مع الماء الموجود فى المادة الغذائية منتجا غاز الأسيتيلين . ويمكن بقياس كمية غاز الأسيتيلين سواء بحساب الفقد فى وزن المخلوط ، أو بتقدير ضغط وحجم الغاز الناتج فى نظام مقفل، **وتقدير المحتوى الرطوبى** . وتعتمد دقة التقدير بهذه الطريقة **على درجة نعومة** الجزيئات المختلفة للمادة الغذائية بعد طحنها .

2.16.2. ينتج عن خلط حامض الكبريتيك المركز مع المادة الغذائية المطلوب تقدير الرطوبة فيها ، كمية من الحرارة ، وتتناسب الزيادة فى درجة الحرارة طرديا مع المحتوى الرطوبى للمادة الغذائية .

3.16.2. يمكن أيضا تقدير الرطوبة ، خاصة فى المواد غير العضوية غير السائلة ، بأكسدتها بمحلول ثنائى الكرومات ***dichromate solution*** فى حامض الكبريتيك ويقاس المحتوى الرطوبى بالفرق فى الوزن . وتتميز تلك الطريقة بسرعة الإجراء وبساطتها النسبية ، ويعيبها إستخدام مواد تسبب تأكل ***corrosive*** مما قد يسبب خطورة على القائم بالتحليل .

17.2. إلقاء الضوء على بعض الطرق الطبيعية *Physical methods* لتقدير الرطوبة

1.17.2. الطرق الكهربية *Electrical Methods* :

1.1.17.2. طريقة ثابت الداى إلكتريك *Dielectric constant* :

يقدر المحتوى الرطوبى لبعض الأغذية بقياس مقدار التغير فى **السعة الكهربية** ، أو بمقدار **مقاومة** مرور التيار الكهربائى خلال العينة . وللحصول على نتائج دقيقة بإستخدام أجهزة قياس ثابت الداى إلكتريك يجب معايرة هذه الأجهزة بعينات غذائية **معلومة** المحتوى الرطوبى (سبق تقدير محتواها الرطوبى بإستخدام طرق قياسية) . ويؤثر على دقة وصحة نتائج هذا الإختبار كثافة العينات موضع التحليل ودرجة حرارتها . وتكمن أهمية هذه الطريقة من طرق تقدير الرطوبة فى سرعة الحصول على النتائج وبذلك يمكن إستخدامها فى رقابة عملية الإنتاج المستمر دون الحاجة لأى توقف لخطوات الإنتاج لتقدير الرطوبة . ولا يفضل إستخدام هذه الطريقة عندما يقل المحتوى الرطوبى للمواد الغذائية عن 30 – 35 % .

ويعتمد **الأساس العلمى** لأجهزة قياس ثابت الداى إلكتريك على حقيقة أن ثابت الداى إلكتريك للماء يساوى 80.37 على 20°م وهو بذلك **أعلى** من مثيله لمعظم المذيبات . هذا وقد **نجح** إستخدام هذا الإختبار بكثرة فى منتجات الحبوب وذلك لأن ثابت الداى إلكتريك للماء ، كما سبق ذكره 80.37 ، بينما للنشا والبروتين فى الحبوب فإنه يكون 10 فقط . وبالتقدير الدقيق على نوع معين من الحبوب فإنه يمكن بجهاز قياس ثابت الداى إلكتريك

حساب % للرطوبة مباشرة وذلك بعد بناء منحنيات قياسية فى الحاسب الآلى المتصل بالجهاز لنوع معين من منتجات الحبوب يوضح العلاقة بين ثابت الداى إلكتريك ، % للرطوبة فى هذا المنتج .

2.1.17.2. طرق التوصيل الكهربى *Conductivity Methods* :

تعتمد طرق التوصيل الكهربى على الحقيقة العلمية بأن قدرة عينة المادة الغذائية على توصيل التيار الكهربى يزداد مع زيادة محتواها الرطوبى . ويتميز هذا الإختبار بالدقة وسرعة الإجراء خاصة عند قياس المقاومة *resistance* حيث ينص قانون أوم *Ohm's law* على أن شدة التيار الكهربى تساوى القوة الدافعة الكهربية مقسومة على المقاومة . فعلى سبيل المثال تبلغ المقاومة الكهربية لقمح محتواه الرطوبى 13 % سبع مرات ، خمسين مرة قدر المقاومة الكهربية لقمح محتواه الرطوبى 14% ، 15 % ، على التوالى. ويجب المحافظة على درجة الحرارة ثابتة أثناء هذا التقدير وأن يستغرق إجراء التقدير دقيقة كاملة .

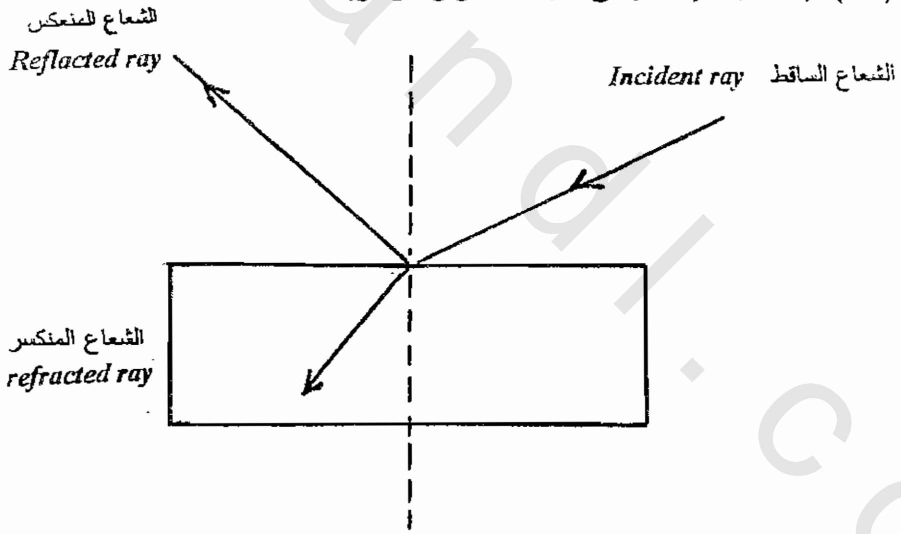
2.17.2. التقديرات الهيدرومترية *Hydrometry* :

تعتبر القياسات الهيدرومترية علم قياس الوزن النوعي أو الكثافة ويمكن إجراء هذه القياسات بإستخدام مبادئ علمية وأجهزة عديدة . وبرغم إعتبار القياسات الهيدرومترية من القياسات القديمة فى كثير من المراجع العلمية إلا أنها لا زالت تستخدم كثيرا فى التقديرات الروتينية فبإجراءها بطريقة صحيحة تعطى نتائج دقيقة ومؤكدة . وتعتبر قياسات الوزن النوعى بالبيكنوميتر *Pycnometer* ، والهيدرومترات ، وميزان وستفال من القياسات شائعة الإستخدام لقياس الرطوبة أو المواد الصلبة لعديد من المواد الغذائية السائلة مثل المشروبات الغازية ، والمحاليل الملحية ، والمحاليل السكرية . هذا وقد سبق شرح هذه الأجهزة بالتفصيل وطرق إستخدامها فى مقررى أساسيات علوم الأغذية وأسس حفظ الأغذية . ونود أن نضيف فى هذا الصدد أن بعض طرق التقديرات الهيدرومترية ، برغم بساطتها تعتبر طرقا رسمية ، فعلى سبيل المثال يستخدم البيكنومتر فى تقدير محتوى المشروبات الكحولية من الكحول (طريقة *AOAC* برقم 930.17) ،

وتقدير المواد الصلبة فى اللبن (طريقة *AOAC* برقم 925.22) . كما يستخدم الهيدرومتر فى قياس % للكحول فى الكحول المتقطر (طريقة *AOAC* برقم 957.03) .

3.17.2. القياسات الرفراكتومترية *Refractometry* :

يمكن تقدير الرطوبة فى منتجات المحاليل السكرية المختلفة ، واللبن المكثف بإستخدام هيدرومتر البوميه *Baume* (لتقدير المواد الصلبة) ، هيدرومتر البركس *Brix* (لتقدير % للسكريات) ، ووسائل الوزن النوعى *gravimetric* أو بإستخدام الرفراكتومترات *Refractometers* . وإذا ما أجرى القياس الرفراكتومترى بطريقة سليمة ، ولم تكن هناك أى رواسب صلبة على المنشور الزجاجى فإن هذه الطريقة تعطى نتائج سريعة وبدرجة دقة مذهلة (طريقة *AOAC* برقم 932.14C –لتقدير المواد الصلبة فى المشروبات). كما يمكن تقدير المواد الصلبة الذائبة فى الفواكه ومنتجاتها بإستخدام الرفراكتوميتر (طرق *AOAC* بأرقام 932.12 ، 976.20 ، 983.17) .ويبين شكل (7.2) الإنعكاس والإنكسار فى القياسات الرفراكتومترية .



شكل (7.2): الإنعكاس والإنكسار فى القياسات الرفراكتومترية

هذا وننصح بمراجعة القياسات الرفراكتومترية فى مقررى أساسيات علوم الأغذية ، أسس حفظ الأغذية .

4.17.2. قياس نقطة التجمد *Freezing point measurement* :

عند إضافة الماء لأى منتج غذائى تتغير عديد من صفاته الطبيعية . وتعتمد بعض صفات المحاليل على عدد جزيئات المذاب فيها سواء أيونات أو جزيئات . ومن أهم تلك الصفات **الضغط البخارى** ، **نقطة التجمد** ، **نقطة الغليان** ، **الضغط الإسموزى** . ويمكن بقياس أى من تلك الصفات السابقة تقدير تركيز المواد المذابة فى المحلول إلا أن أكثر هذه الصفات إستخداما هو قياس نقطة التجمد . حيث تتراوح **نقطة تجمد اللبن** ، على سبيل المثال ، بين – 0.525 إلى – 0.565 H* °. وتعتبر نقطة تجمد اللبن أكثر صفاته الطبيعية ثباتا ، ففى عملية إفراز اللبن من الغدد اللبنية ، يجب أن يحدث دائما إتزان فى الضغط الإسموزى بين اللبن والدم . ولذلك ففى حالة حدوث أى نقص فى تخليق سكر اللاكتوز ، لأى سبب من الأسباب ، يحدث تعويض لذلك بزيادة تركيز أيونات الصوديوم Na^+ ، الكلوريد Cl^- . وبالتالى يكون التباين فى نقطة تجمد اللبن ضئيلا جدا وتكون قيمة نقطة التجمد له شبه ثابتة.

هذا ويستخدم تقدير نقطة تجمد اللبن ، لكشف غشه بالماء ، ويمكن حساب % للماء المضاف من المعادلة الآتية :

$$\text{\% للماء المضاف} = \frac{100 \times (T - 0.540)}{0.540}$$

حيث 0.540 = نقطة تجمد عينة اللبن الممثلة لكل اللبن الداخل للمصنع بمقياس °H .

T = نقطة تجمد عينة اللبن المراد إختبارها بمقياس °H .

هذا وتجدر الإشارة إلى إحتمال تأثير نقطة تجمد اللبن بإصابة الحيوان بمرض إلتهاب الضرع ***mastitis*** ، أو الظروف البيئية والتغذوية أو مرحلة الحليب ـــو ظروف التشغيل .ونظرا لحساسية هذا الإختبار يتميز الجزء الحساس ، فى جهاز قياس نقطة التجمد ، للتغير فى درجة الحرارة ***Thermister*** بقدرته على قياس أى تغير فى درجة حرارة حتى 0.001°م .

---

* H ° هى درجة الحرارة مقاسة بالهورتفت *Hortvet* ويمكن تحويلها إلى درجة حرارة مئوية ، والعكس ، بالمعادلة الآتية : C = 0.9623 °H - 0.0024 ، °H = 1.03916 °C - 0.0025

obeikandl.com

5.17.2. النشاط المائى *Water activity* :

لايعتبر المحتوى الرطوبى بمفرده مقياسا حقيقيا لدرجة ثبات الغذاء حيث لوحظ أن الأغذية ذات نفس المحتوى الرطوبى قد تختلف فى درجة ثباتها التخزينى وسرعة فسادها. ويعزى ذلك إلى الإختلافات فى طرق ودرجة إرتباط الماء بالمكونات الأخرى فى الغذاء . فالماء المرتبط بمكونات أخرى فى الغذاء ، كالبروتين ، والكربوهيدرات ، يكون أقل إتاحة للنمو الميكروبى وكذلك التفاعلات الكيميائية التى تؤدى لتحلل وتدهور الغذاء . ولذلك فإن النشاط المائى *Water activity* يعتبر أحسن دليلا للتعبير عن درجة ثبات الغذاء ومدى سرعة تعرضه للفساد . كذلك تؤثر درجة النشاط المائى على الصفات الحسية للغذاء كالصلابة/ الطراوة ، الطحن بالأسنان ، والقابلية للمضغ. ويعرف النشاط المائى كما يلى:

$$a_w = P/P_o$$

$$a_w = ERH/100$$

حيث a_w = النشاط المائى ، P = الضغط الجزئى للماء فوق سطح العينة ،

P_o = الضغط البخارى للماء النقى عند نفس درجة الحرارة .

ERH = الرطوبة النسبية المتزنة المحيطة بالمنتج .

وهناك طرق عديدة لقياس درجة النشاط المائى " a_w " . ومن أكثر هذه الطرق شيوعا ، الطريقة التى تعتمد على قياس **كمية الرطوبة فى الفراغ القمى المتزن** فوق عينة المادة الغذائية ، والتى ترتبط إرتباطا وثيقا ومباشرا بالنشاط المائى . ويتم التقدير بوضع عينة المادة الغذائية فى غرفة مقفلة عند درجة حرارة ثابتة ، ويستخدم جهاز حساس لقياس الرطوبة النسبية المتزنة فى جو العينة بعد الإتزان . ومن الطرق البسيطة الحساسة والدقيقة لإجراء هذا الإختبار ، **طريقة المرآة المبردة** ، وفى تلك الطريقة يتكثف بخار الماء فوق سطح العينة فى الفراغ القمى على سطح مرآة تبرد بطريقة منتظمة ودقيقة . وتقدر نقطة الندى ***dew point*** عند درجة الحرارة التى يحدث عندها تكثيف للرطوبة ، وهذا بدوره يقدر الرطوبة النسبية فى الفراغ القمى . وهناك أيضا طريقتان لتقدير النشاط المائى وهما :

odeikandl.com

الطريقة الأولى : إستخدام الإنخفاض فى نقطة تجمد العينة ومحتواها الرطوبى لحساب النشاط المائى " a_w " .

الطريقة الثانية : إجراء إتزان للعينة فى غرفة رطوبتها النسبية ثابتة (مثل المحلول المشبع) ثم يستخدم المحتوى الرطوبى للعينة فى حساب النشاط المائى " a_w " .

18.2. بعض الأسئلة المختارة

1- ناقش خمسة أسباب يجب أخذها بعين الإعتبار عند إختيار طريقة معينة لتحليل الرطوبة .

2- لماذا يجب إستخدام الطرق القياسية فى تقدير المحتوى الرطوبى للأغذية ؟

3- ما هى أهم المزايا التى يحققها إستخدام طرق التجفيف فى الأفران تحت التفريغ عن إستخدام أفران الهواء المدفوع ؟

4- وضح فى أى من الحالات التالية ، تكون قيمة المحتوى الرطوبى المقدر أعلى أو أقل من الحقيقة ؟ علل إجابتك .

1.4. تقدير الرطوبة بإستخدام أفران الهواء الساخن .

- حجم جزيئات العينة كبير .
- وجود نسب عالية من مكونات النكهة الطيارة فى العينة .
- حدوث أكسدة لليبيدات .
- عينة هيجروسكوبية .
- حدوث تحلل للكربوهيدرات .
- تحلل السكروز
- حدوث طرطشة ***spattering*** للعينة أثناء التقدير .
- المجفف الذى وضعت به العينة قبل وزنها لم يحكم قفله .

2.4. تقدير الرطوبة بالتولوين .

- تكوين مستحلب لا ينفصل بين الماء والمذيب .
- إلتصاق الماء بجدر المكثف .

obeikandi.com

3.4. تقدير الرطوبة بطريقة كارل فيشر :

- وزن العينات تم فى يوم رطب جدا .
- الوحدات الزجاجية غير جافة .
- العينة المطحونة خشنة .
- غذاء مرتفع فى فيتامين C .
- غذاء مرتفع فى محتواه من الأحماض الدهنية غير المشبعة .

5- إستقبلت فى معملك جهاز جديد لتقدير الرطوبة بالأشعة تحت الحمراء صف الطريقة التى تستخدمها فى معايرة هذا الجهاز للحصول على نتائج دقيقة .

6- تشرف على فنى " تقدير رطوبة " لعينات مواد غذائية بطريقة كارل فيشر . وسألك الفنى ماذا يعنى مصطلح ***KFReq*** المستخدم فى معادلة حساب % للرطوبة فى العينة ، وما هى أهميته ؟ وكيف يمكنك تقديره ؟ فما هى إجابتك ؟

7- إستلمت عملك فى مختبر كان متوفر به كل أجهزة تقدير الرطوبة سواء بالطرق الرسمية ، أو طرق التقدير السريعة . وضح فى المنتجات الغذائية التالية : الطريقة التى ستستخدمها ، الأساس العلمى لتلك الطريقة ، كيفية تصحيح نتائج الطريقة المستخدمة ، أهم المعايير التى تتبعها لحصولك على نتائج دقيقة . وكانت المنتجات:

- مخلوط أيس كريم (سائل) .
- شوكولاتة باللبن .
- تـــــوابل.
- شراب خوخ معلب .
- دقيق شعير .
- عينة خبز .
- عينة سجق .
- مسحوق سمك .
- مربى تفاح .

obeikandl.com

REFERENCES المراجـــــع .19.2

AOAC . 1995. Official Methods of Analysis, 16^{th} ed . AOAC International , Gaithersburg, MD.

Bernetti, R., Kochan, S.J. and Pienkowski, J.J. (1984). Karl Fischer determination of water in oils and fats: International Collaborative Study. J. AOAC 67, 299 – 301 .

Czuchajowska, Z., Pomeranz, Y. and Jeffers, H.C. 1989. water activity and moisture content in dough and bread . Cereal Chem. 66 : 128 – 132 .

Fennema, O.R. 1995. Water and Ice . Ch.2 , in Food Chemistry , 3^{rd} ed. O.R. Fernnema (Ed), Marcell Dekker, Inc., USA.

Giese, J. 1993. In-line sensors for food processing . Food Technology 47 (5): 87 – 95 .

Nelson, S.O. 1991. Dielectric properties of agricultural products ; measurements and applications . IEEE Trans. Electr. Insulat. 26: 845 – 869.

Nieson, S.S. 1988. Food Analysis. 2^{nd} ed. An Aspen Publication . Aspen Publishers . Inc. , Gaithersburg , Maryland.

Pomeranz, Y. and Melon , C. 1994 . Food Analysis : Theory and Practice , 3^{rd} ed . Champan & Hall , New York .

Wilson, R.H. and Kemsley, E.K. 1992. On – line process monitoring using infrared techniques. In Food Processing Automation II. Processing of the American Society of Agriculture Engineers, Lexington, KY.

obeikandl.com

البـــــاب الثــــالث

تحــــليل الأحماض الغذائيـــــة

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

obeikandl.com

3. تحليل الأحماض الغذائية

تتميز الأحماض العضوية بتأثيرها الفعال على **نكهة** وجودة الأغذية . ولا تنقسم الأحماض العضوية إنقساما كاملا فى محاليلها كالأحماض القوية ، بل تتأين تأينا **جزئيا** فقط . وتتأثر بعض صفات الأغذية بالجزء المتأين فقط من الأحماض العضوية ، بينما تتأثر صفات أخرى بمحتوى الغذاء الكلى من الجزيئات الكاملة للأحماض العضوية . وعند تحليل الأغذية توجد طريقتان للتعبير عن حموضتها ألا وهما رقم الـــ pH ، والحموضة المعايرة ***titratable acidity*** . فالحموضة المعايرة تتعامل مع التركيز الكلى للحامض فى الغذاء ويتم تقديرها بواسطة معايرتها بمحلول قياسي من القلوى ***Standard base*** . ويمكن بمعايرة الحموضة التنبؤ بدرجة أكبر عن تأثير تلك الأحماض على نكهة الأغذية عما هو الحال عند تقدير رقم الـــ pH . وتوجد الأحماض العضوية فى الأغذية فى وسط منظم ***Buffering*** وكذلك فهى لا تتأين كلية . وحتى فى غياب التأثير المنظم لمكونات الغذاء الأخرى على تأين الأحماض العضوية فإن أقل من 3 % فقط من أحماض الأغذية العضوية هى التى تتأين إلى أيونات هيدروجين " H^+ " والشق الأنيونى لباقى جزئ الحامض العضوى ويعرف بالقاعدة المرافقة ***Conjugate base*** (A^-) . وتقل نسبة إنقسام الأحماض العضوية (والتى تبلغ فى حدود 3 %) بالتأثير المنظم لباقى مكونات الغذاء . وفى المحاليل المائية ترتبط أيونات الهيدروجين (H^+) مع الماء لتكوين أيونات الهيدرونيوم [H_3O^+] . ولأيونات الهيدرونيوم التأثير الفعال على نشاط ونمو الميكروبات فى بيئة ما عما هو الحال بالنسبة للحموضة المعايرة . وينتج عن تركيز أيونات الهيدرونيوم فى وسط ما حدودا لرقم الـــ pH تتراوح ما بين 1.0 إلى 14.0 .

وقبل أن نتحدث عن الـــ pH نتعرف فى الجدول (1.3) على بعض الوحدات والتعاريف التى تستخدم فى تحليل الأغذية ولها دور عند تحليل الأحماض الغذائية بصفة خاصة . ونتعرف فى جدول (2.3) على الأوزان الجزيئية والمكافئة لبعض الأحماض العضوية الشائعة فى الأغذية .

جـــــــــدول (1.3) : بعـــض مصطلـــحات التعـــبير عـــن التركـــيز .

الوحدة Unite	الرمز Symble	التعريف	العلاقة
المولر *Molarity*	M	عدد مولات المذاب في كل لتر من المحلول	M= عدد المولات
العيارية *Normality*	N (ع)	عدد مكافئات المذاب في كل لتر من المحلول	N= عدد المكافئات /لتر
% الوزنية (جزء في المائة)	% wt (و%) %volح/wt و	نسبة وزن المذاب/وزن المذاب + وزن المذيب x 100 نسبة وزن المذاب/الحجم الكلي للمحلول x 100	و wt = وزن المذابx 100 / الوزن الكلي للمذاب والمذيب و wt = وزن المذاب x 100 / الحجم الكلي
% الحجمية	% vol ح	نسبة حجم المذاب/الحجم الكلي للمحلول x 100	ح vol %= حجم المذاب x 100 / الحجم الكلي
عدد الأجزاء في المليون	ppm	نسبة وزن المذاب (و او ح) / الوزن الكلي أو الحجم الكلي x 1000,000	ppm = مجم مذاب / الحجم الكلي أو ppm = نونا جم مذاب / حجم محلول أو ppm = مجم مذاب / لتر محلول أو ppm = نونا جم مذاب / ملليلتر محلول

obeikandl.com

جـدول (2.3) : الأوزان الجزيئـيـة والمكافـئة لبعــض الأحماض الشائعة فى الأغذية .

الحامض	الرمز الكيميائى	الوزن الجزيئ	المكافئات للمول	الوزن المكافئ
حامض ستريك لا مائى *Citric (anhydrous)*	"H_3" $C_6H_5O_7$	192.12	3	64.04
حامض ستريك مائى *Citric (hydrous)*	"H_3"$C_6H_5O_7.H_2O$	210.14	3	70.05
حامض خليك ***Acetic***	"H"$C_2H_3O_2$	60.06	1	60.06
حامض لاكتيك ***Lactic***	"H"$C_3H_5O_3$	90.08	1	90.08
حمض ماليك ***Malic***	"H_2"$C_4H_4O_5$	134.09	2	67.05
حمض أكساليك ***Oxalic***	"H_2"C_2O_4	90.04	2	45.02
حمض طرطريك ***Tartaric***	"H_2"$C_4H_4O_6$	150.09	2	75.05
حمض أسكوربيك ***Ascorbic***	"H_2"$C_6H_6O_6$	176.12	2	88.06
حمض الفوسفوريك (يضاف للمياه الغازية) ***Phosphoric***	"H_3"PO_4	98.10	3	32.67

1.3.معادلة التعادل والتخفيف *Equation for neutralization and dilution*

عند التعادل الكامل بين مادتين فإن عدد ملليمكافئات أحد المادتين المتفاعلتين يتساوى مع عدد ملليمكافئات المادة الأخرى ، ويعبر عن ذلك رياضيا بالمعادلة الآتية :

ح$_1$ x ع$_1$ (للمادة x) = ح$_2$ x ع$_2$ (للمادة y) ....(1)

ويمكن أيضا من المعادلة السابقة حل مسائل التخفيف حيث تمثل المادة x_1 المحلول المركز وتمثل المادة y المحلول بعد تخفيفه .

obeikandl.com

2.3. إتزان الحامض والقلوى : *Acid – base Equilibria*

يعرف الحامض بأنه المادة التى لها القدرة على إعطاء ***donating*** بروتونات وفى النظم الغذائية تكون أيونات الهيدروجين فقط هى التى لها هذه القدرة .

أما ***القلوى*** فهو المادة التى تستقبل هذه البروتونات .

ويكون التعادل هو التفاعل بين الحامض والقلوى لتكوين ملح كما فى المعادلة التالية:

(2)................. $HCL + NaOH \rightleftharpoons NaCl + H_2O$

وفى المحاليل المائية تكون الأحماض ***أيونات هيدرونيوم*** (H_3O^+) وتكون القواعد أيونات هيدروكسيد (OH^-) .

(3)........................ $H_3O \;\; +OH \rightleftharpoons 2H_2O$

وعند أى درجة حرارة يكون ناتج تفاعل التركيز المولر لأيونات الهيدرونيوم (H_3O^+) وأيونات الهيدروكسيل (OH^-) ثابتا ، ويعرف بثابت الناتج الأيونى للماء (K_W) ويساوى :

(4)..................................... $[H_3O^+]\,[OH^-] = K_W$

وتتباين قيمة ثابت الناتج الأيونى للماء بإختلاف درجة الحرارة فعند 25°م يساوى 1.04×10^{-14} أما عند درجة 100°م فيساوى 58.2×10^{-14} . وهنا يبزغ سؤالا عن ماهية تركيز كل من أيونات $[H_3O^+]$ ، أيونات $[OH^-]$ فى الماء النقى . وتكون الإجابة أن التجارب أثبتت أن تركيزهما يكون 1.0×10^{-14} على 25°م . ولأنهما متساويا التركيز ، يطلق على الماء النقى لفظ متعادل ***Neutral*** . وبإفتراض إضافة نقطة من الحامض إلى الماء النقى يزداد تركيز أيونات الهيدرونيوم وعكس الحال لو أضيفت نقطة من القلوى إلى الماء النقى يزداد تركيز أيونات الهيدروكسيد ولكن ستظل دائما قيمة K_W عند 25°م مساوية 1×10^{-14} .

ومن هنا سنوضح كيف إشتق مصطلح الــ pH من المعطيات السابق ذكرها وللإجابة على هذا التساؤل فلنلقى أولا نظرة على تركيز أيونات الهيدرونيوم H_3O^+ ، وأيونات الهيدروكسيد OH^- فى بعض أنواع الأغذية بجدول (3.3) .

جدول (3.3): تركيز أيونات الهيدرونيوم $[H_3O^+]^1$ وأيونات الهيدروكسيد $[OH^-]^1$ فى أغذية مختلفة على 25°م .

K_w	$[OH^-]^1$	$[H_3O^+]^1$	نوع الغذاء
10^{-14} x 1	10^{-12} x 4.66	10^{-3} x 2.24	كــــــولا *Cola*
10^{-14} x 1	10^{-11} x 1.78	10^{-4} x 5.62	عصــــير عنب *Grape juice*
10^{-14} x 1	10^{-11} x 2.82	10^{-4} x 3.55	ســــــفن أب *Seven up*
10^{-14} x 1	10^{-10} x 1.26	10^{-5} x 7.95	بـــــــيرة *Beer*
10^{-14} x 1	10^{-7} x 1.00	10^{-7} x 1.00	مـــــاء نقـــى *Pure water*
10^{-14} x 1	10^{-6} x 2.09	10^{-9} x 4.78	مـــــاء صنـــبور *Tap water*
10^{-14} x 1	10^{-4} x 1.26	10^{-11} x 7.94	محلول هيدروكسيد مغنيسيوم مضاد للحموضة *Milk of magnesium*

كيفية حساب رقم pH الكولا من النتائج الموضحة بجدول (3) :

الخطوة الأولى : إستبدال الــ $[H^+]$ فى معادلة الـ pH : $pH = - \log [H^+]$

$\therefore pH = - \log (2.24 \times 10^{-3})$

الخطوة الثانية : إفصل الرقم 2.24×10^{-3} إلى جزئين وقدر لوغاريتم كل جزء منفردا

$-3 = \log 10^{-3}$ ، $0.35 = \log 2.24$

الخطوة الثالثة : إجمع كلا من اللوغاريتمين حيث أن حاصل جمعهما يساوى حاصل ضرب الرقمين

$-2.65 = [-3] + 0.35$

الخطوة الرابعة : ضع القيمة الناتجة فى معادلة الـ pH $\therefore pH = -(-2.65)$

$\therefore pH = 2.65$

ويمكن بعكس ما سبق حساب تركيز أيونات الهيدرونيوم لمشروب بيرة غير كحولية رقم الـ pH لها 4.3

1- إستبدل بالأرقام فى معادلة الـ pH $pH = - \log [H^+]$

$4.3 = - \log [H^+]$ $\therefore -4.3 = \log [H^+]$

2- قسم – 4.3 إلى قسمين أحدهما رقم صحيح والاخر عشرى

$-4.3 = -5.0 + 0.7$

3- إحسب مقابل لوغاريتم 0.7 antilog فنجد أنه يساوى 5 ، أما مقابل لوغاريتم 5- فيساوى 10^{-5}

4- وعندئذ فإن تركيز أيونات الهيدرونيوم (H_3O^+) يساوى حاصل ضرب مقابل لوغاريتم 0.7 x مقابل لوغاريتم 5 – أى 5×10^{-5} $\therefore [H^+] = 5 \times 10^{-5}$

obeikandl.com

فإذا ما كان تركيز أيونات الهيدرونيوم $[H_3O^+]$ 1.0×10^{-6} فإن قيمة الـــ pH تصبح 6 وعندئذ تكون قيمة الـــ pOH = 14 – 6 = 8 .

ويجدر بنا فى هذا الصدد أيضا أن نقارن بين الـــ pH ، الحموضة المعايرة ***titratable acidity*** حيث ان هذان التعبيران مختلفان . فالأحماض القوية ***strong acids*** مثل الهيدروكلوريك والكبريتيك والنيتريك تنقسم إنقساما كليا ***fully dissociated*** عند pH = 1 . فينقسم حامض الهيدروكلوريك إنقساما كليا ويصبح الـــ pH له مساويا 1.02 عند درجة حرارة 25°م . وعلى النقيض من ذلك تنقسم نسبة بسيطة فقط من أحماض الأغذية (كالستريك ، والماليك ، والطرطريك ، والخليك) ، فعلى سبيل المثال يتأين فقط 1 % من حامض الخليك (CH_3- COOH) عند 25°م ويكون رقم الـــ pH للمحلول 0.1 ع منه 2.89 .

3.3. جهاز قياس اللوغاريتم السالب لتركيز أيونات الهيدروجين ***pH Meter*** :

1.3.3. النشاط مقابل التركيز ***Activity Versus Concentration*** :

يعبر مصطلح النشاط ***activity*** عن مقياس لدرجة الفعالية الكيميائية ***chemical reactivity*** أما التركيز ***concentration*** فهو مقياس لكل صور الأيونات (سواء الحرة أو المرتبطة) فى المحلول . وكنتيجة لتفاعل الأيونات مع بعضها البعض أو مع المذيب فإن التركيز الفعال أو مايطلق عليه بالنشاط ***activity*** يكون ، بوجه عام ، أقل بالطبع من التركيز ***concentration*** ، وتميل قيمتى كلا من النشاط والتركيز للتساوى لحد كبير عند التخفيفات المتناهية ***infinite dilution*** فى الصفر . ويمكن ربط النشاط ، بالتركيز بالمعادلة الآتية :

$$C\gamma = A \qquad \text{(5)}$$

حيث A = النشاط ، γ = معامل النشاط ***activity coefficient*** ، C = التركيز

obeikandi.com

ويعنى ذلك أن يكون معامل النشاط دالة للقوة الأيونية ، وتكون القوة الأيونية دالة للتركيز ، وللشحنات على كل الأيونات فى المحلول .

ويعتبر جهاز قياس الـــ pH من أجهزة قياس فرق الجهد ***potentiometer*** (وهو جهاز يقيس الفولت عندما يكون سريان التيار متناهيا فى الصغر) . ويتم قياس فرق الجهد بإستخدام خلية إلكتروليتية تتكون من إلكترودين مغمورين فى محلول إختبار فيتولد جهد ***voltage*** مرتبط بتركيز أيونات المحلول . ولأن مرور التيار فى المحلول قد يؤدى لتغير تركيز الأيونات المجاورة أو ينتج عنه تفاعلات عكسية لذلك يقاس هذا الجهد (بالفولت) تحت ظروف تأثير تيار متناهى فى الصغر (10^{-12} أمبير أو أقل) .

ويحتاج نظام قياس الـــ pH لأربعة أجزاء رئيسية :

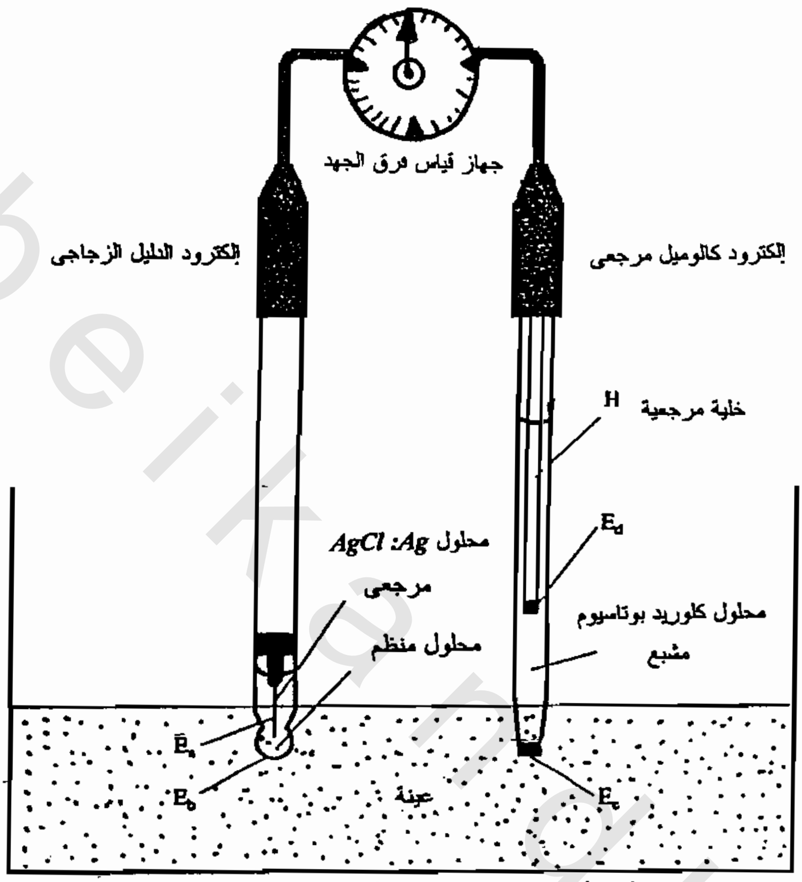
1- إلكترود مرجعى ***Reference electrode***

2- إلكترود دليل ***Indicator electrode*** (حساس للـــ pH) .

3- جهاز قياس الفولت ، أو جهاز تكبير قادر على قياس الفروق الطفيفة فى دائرة كهربية لها مقاومة عالية جدا .

4- العينة المراد تحليلها .

ويوضح شكل " 1.3 " جهاز قياس الـــ pH بأجزائه المختلفة . حيث يساهم إلكترودان فى عملية قياس الـــ pH ، كل منهما مصمم بعناية لإنتاج جهد ثابت ويعطيان نفس القراءة ***reproduciple*** عند إعادة القياس . ولهذا ففى غياب أيونات أخرى يكون فرق الجهد بين الإلكترودين ثابتا ويمكن حسابه بسهولة . وتساهم أيونات الهيدرونيوم " H_3O^+ " فى المحلول بفرق جهد جديد عبر الغشاء الزجاجى الإختيارى للأيونات"***ion selective glass electrode***" الموجود بتركيب إلكترود الدليل ***Indicating electrode*** .



شكل (1.3): دائرة قياس فرق الجهد لجهاز قياس الـــ pH

E_a: جهد التلامس بين إلكترود AgCl : Ag والسائل الداخلى. ويكون الـــE_a مستقلا عن pH محلول الإختبار ويعتمد على درجة الحرارة .

E_b: جهد متولد عند الغشاء الزجاجى الحساس لتغير الـــ pH. وتتباين قيمة الـــ E_b مع pH محلول الإختبار وكذلك أيضا مع درجة الحرارة. وبالإضافة لهذا الجهد يولد الإلكترود الزجاجى جهد غير متماثل Asymmetry potential يعتمد على تركيب وشكل الغشاء الزجاجى ويؤثر على عمر وفترة صلاحية الإلكترود.

E_c : جهد الإنتشار بين محلول كلوريد البوتاسيوم المشبع والعينة المختبرة . وهو مستقل بصفة أساسية عن المحلول المختبر.

E_d : جهد التلامس contact potential بين جزء الكالوميل من الإلكترود وقنطرة كلوريد البوتاسيوم الملحية. ولا يتأثر الـــ E_d بمحلول الإختبار ويعتمد على درجة الحرارة .

ويؤدى ذلك لتغير **فرق الجهد** بين الإلكترودين فيتناسب **طرديا** مع تركيز أيونات **الهيدرونيوم**. ويعتبر هذا الفرق فى الجهد محصلة لكل أنواع الجهد الفردية ويطلق عليه جهد الإلكترود ويسهل تحويله لقراءات pH_s .

ويقدر تركيز أيونات الهيدروجين (وبتعبير ادق نشاطها) بالجهد الذى ينشأ بين الإلكترودين. وتربط معادلة ***Nerst*** ما بين إستجابة الإلكترود ودرجة النشاط حيث :

$$\text{Log A} \cdot (NF / RT)\ 2.303 + E^{o} = E$$

E = يقيس جهد الإلكترود .

E^{o} = جهد الإلكترود القياسى ، وهو رقم ثابت يمثل مجموع فروق الجهد الفردية فى النظام عند ظروف قياسية من درجة الحرارة ، وتركيز الأيونات ، وتركيب الإلكترودات.

R = الثابت العام للغازات ويساوى 8.313 جول/درجة/جم مول وزنيا .

F = ثابت فاراداى ويساوى 490, 96 كولومبو/جم مكافئ وزنيا .

T = درجة الحرارة المطلقة بالكالفين .

N = عدد الشحنات على الأيون .

A = نشاط الأيون موضع القياس .

ويمكن حساب قيمة 2.303 NF/RT للأيونات أحادية التكافؤ (كأيون الهيدرونيوم) عند 25°م كما يلى :

$$(7)\ldots\ldots\ldots\ 0.0594 = \frac{298 \ \text{x}\ 8.316 \ \text{x}}{96\,,490}\ 2.303 = \frac{RT}{NF}\ 2.303$$

ويكون الجهد الناتج بنظام الإلكترود دالة خطية للــ pH . حيث يكون جهد الإلكترود + 59 مللى فولت (0.059 فولت) لكل تغير مقداره وحدة واحدة من وحدات الــ **pH . وعند نقطة التعادل *Neutrality* (pH =7) يكون جهد الإلكترود مساويا للصفر . وعند pH = 6 يكون جهد الإلكترود +60 مللى فولت أما عندما يبلغ رقم الــ pH 4 فإن**

obeikandl.com

جهد الإلكترود يساوى 180مللى فولت. وعلى العكس من ذلك يبلغ مقدار جهد الإلكترود – 60 فولت عندما يكون رقم الـــ pH = 8 . وتلك العلاقات والقيم تكون كما بيننا عندما تكون درجة الحرارة 25°م فقط . أما حدوث أى تغير فى درجة الحرارة فيعقبه بالطبع تغير فى قراءة الـــ pH . فعلى سبيل المثال يكون جهد الإلكترود عند صفر° م 54 مللى فولت ، أما عند 100°م فتصل قراءة الإلكترود إلى 70 مللى فولت . وتزود أجهزة قياس الـــ pH الحديثة بمخفف (موهن) لتأثير درجة الحرارة ***temperature attenuator*** على قراءة الـــ pH .

2.3.3. الإلكترود المرجعى *Reference Electrode* :

يعمل الإلكترود المرجعى على إستكمال الدائرة الكهربية فى نظام قياس الـــ pH . وتعزى معظم المشاكل التى تؤدى لأخطاء فى أجهزة قياس الـــ pH لهذا الإلكترود . وسنتناول فى هذا المرجع فقط أحدً أهم وأكثر أنواع الإلكترودات شيوعا وهو إلكترود الكالوميل المشبع ***Saturated calomel electrode*** والذى يعتمد عمله على التفاعل العكسى التالى :

$$(8) \quad \ldots\ldots \; Hg_2Cl_2 + 2e' \rightleftharpoons 2Hg + 2Cl^-$$

وتكون قيمة $E_{0,25}$ لمحلول كلوريد البوتاسيوم المشبع – 0.2444 مقابل لإلكترود الهيدروجين القياسى ، وتكون معادلة ***Nerst*** للتفاعل كما يلى :

$$(9) \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots E = E_o - 0.059 / 2 \log [Cl^-]^2$$

ويعتمد الجهد على تركيز أيون الكلوريد والذى يمكن تنظيم تركيزه بسهولة لوجود محلول كلوريد البوتاسيوم المشبع فى الإلكترود .

ويتكون إلكترود الكالوميل المرجعى من ثلاثة أجزاء رئيسية وهى :

1– سلك بلاتين مغطى بمخلوط الكالوميل (Hg_2Cl_2) .

2– محلول ملأ وهو محلول كلوريد البوتاسيوم المشبع .

3- وصلة منفذة يهاجر من خلالها محلول الملأ ببطئ للعينة المراد قياسها . وتصنع هذه الوصلة من الخزف ***ceramic*** أو مواد ليفية ، وتميل هذه الوصلات لإعاقة النفاذية مما يسبب بطئ وعدم ثبات الإستجابة ونتائج غير دقيقة.

3.3.3. الإلكترود الدليل *Indicator Electrode* :

من إلكترودات الدليل شائعة الإستخدام هذه الأيام الإلكترودات الزجاجية ***glass electrode*** ، وقبل تطوير هذا النوع من الإلكترودات إستخدم إلكترود الهيدروجين أو إلكترود الكوينوهيدرون *quinhydrone* . فعندما يوضع على جانبى غشاء رقيق من الزجاج محلولى سائلين يتكون جهد كهربى حساس للتغيرات فى الحموضة ، هذا وقد وجد أن هذا التفاعل يعتمد على تركيزأيونات الهيدروجين. ويتكون الإلكترود الزجاجى من ثلاثة أجزاء رئيسية :

1- إلكترود فضة-كلوريد فضة ***silver-silver chloride electrode*** مع وصلة زئبق تؤدى لجهاز قياس فرق الجهد ***potentiometer*** .

2- محلول منظم يتكون من حامض هيدروكلوريك 0.01 ع ، كلوريد بوتاسيوم 0.09 ع ، محلول خلات منظم للمحافظة على pH ثابت (E_a) .

3- غشاء زجاجى حساس للتغير فى الــ pH حيث يتغير الجهد (E_a) مع تغير pH محلول الإختبار .

وعندما إستخدام إلكترود زجاجى كإلكترود دليل فى قياس الــ pH فإن الجهد المقاس (المقابل لإلكترود الكالوميل) يتناسب طرديا مع الــ pH طبقا للمعادلة الآتية:

$$E = E_o + 0.059\ pH$$

والإلكترودات الزجاجية التقليدية تكون مناسبة لقياس الــ pH فى مدى يتراوح بين 1.0 إلى 9.0 ، وعادة ماتكون هذه الإلكترودات حساسة عندما يكون الــ pH أعلى من ذلك خاصة فى وجود أيونات الصوديوم . ولهذا طور مصنعى هذه الأجهزة إلكترود زجاجى حديث يصلح للإستخدام فى نطاق واسع من أرقام الــ pH يتراوح من 0.0 إلى

14.0 ولا يتعدى الخطأ التجريبى بسبب وجود أيونات الصوديوم 0.01 وحدة pH على درجة حرارة 25°م .

4.3.3. الإلكترودات المختلطة *Combination Electrodes* :

تستخدم معظم معامل تحليل الأغذية فى الآونة الأخيرة الإلكترودات المختلطة حيث يشترك كل من إلكترود الـ pH والإلكترود المرجعى مع وحدة حساسة للتغير فى درجة الحرارة فى وحدة واحدة أو جهاز حساس ***single unit or probe*** . وتوجد هذه الإلكترودات بأحجام وأشكال مختلفة فهناك الإلكترودات الصغيرة جدا والإلكترودات الكبيرة وقد تصنع من زجاج أو بلاستيك ، وقد تكون مكشوفة الأطراف أو مغطاة بحلقة بلاستيكية لمنع حدوث كسر للطرف الزجاجي . وتستخدم الإلكترودات الصغيرة لقياس pH النظم الدقيقة كالنظم الخلوية أو تتبع مسار تفاعلات بيوكيميائية على شرائح زجاجية . وتتباين كذلك إستخدامات الإلكترودات المسطحة ***flat surface electrode*** فقد تستخدم لقياس pH المواد شبه الصلبة أو ذات اللزوجة العالية ، كاللحوم ، والجبن ، وأطباق الآجار أو تستخدم لقياس pH سوائل بأحجام صغيرة جدا تصل أحجامها إلى 10 ميكروليتر .

4.3. بعض أهم الإعتبارات الواجب مراعاتها عند قياس الـpH بإستخدام جهازpH *Meter* :

من الأهمية بماكان إستخدام وتشغيل وصيانة أجهزة قياس الـ pH بطريقة سليمة وصحيحة وفيمايلى بعض أهم هذه الإرشادات :

1- للحصول على نتائج دقيقة عند تقدير الـ pH يجب معايرة جهاز قياس الـ pH بإستخدام محلولين منظمين .

2- يفضل إختيار محلولين منظمين الفرق بين رقمى الـ pH لهما 3 وحدات pH بحيث تكون العينة المرغوب قياس الـ pH تقع بين الرقمين . ومن أغلب أنواع المحاليل المنظمة المستخدمة فى مختبرات الأغذية تلك التى تكون أرقام الـ pH لها فى حدود 4 ، 7 ، 9 على 25°م . وتوضع هذه المحاليل المنظمة

فى المعامل بجوار أجهزة قياس الـ pH وتكون ذات ألوان قرنفلية ، صفراء ، زرقاء تميزها عن بعضها البعض .

3- يغمر الإلكترود بعناية فى ماء مقطر ثم يغمر الإلكترود فى المحلول المنظم الثانى وتجرى المعايرة بضبط مؤشر جهاز قياس الـ pH على نفس pH المحلول المنظم وتعاد هذه الخطوة مرة ثانية للتأكد من دقة تكرارية *reproducibility* النتائج .

4- يجب أن يظل دائما جهاز قياس الـ pH فى حالة عمل مما يطيل فترة صلاحيته.

5- فى حالة إستخدام إلكترود كالوميل مرجعى يجب أن يكون مستوى محلول تخزين الإلكترود دائما أقل بحوالى 2 سم من محلول كلوريد البوتاسيوم المشبع لتجنب سريان محلول التخزين لداخل الإلكترود (أنظر شكل 2.3) .

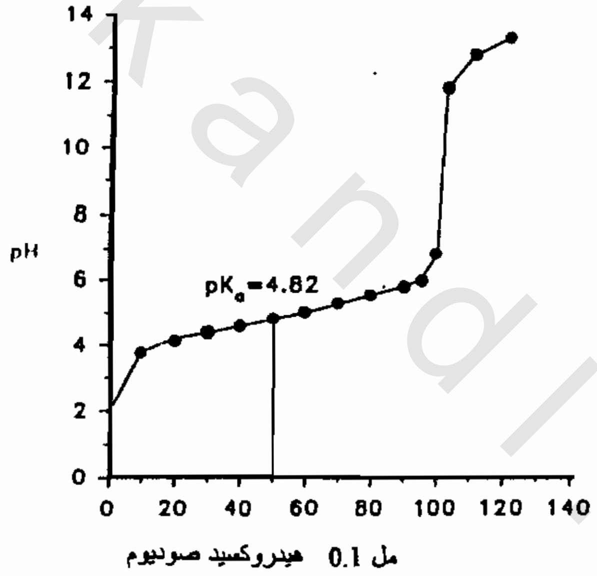
شكل (2.3): الوضع الصحيح وغير الصحيح لإلكترود الكالوميل فى محلول التخزين

5.3. الحموضة القابلة للمعايرة *Titrarable acidity* :

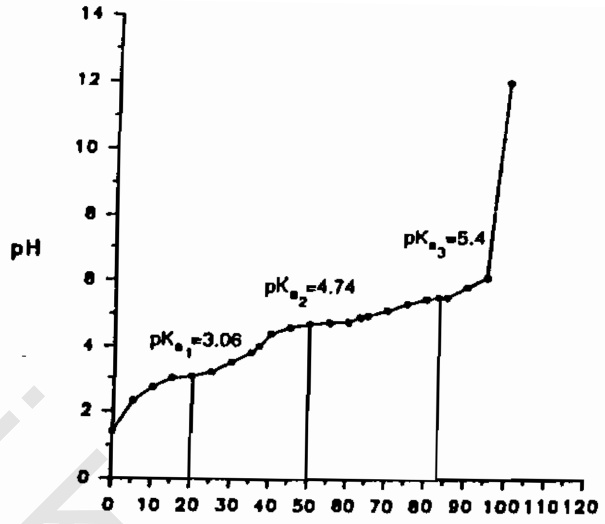
سبق أن بيننا أن الـ pH يستخدم لتقدير نقطة الإنتهاء للتعادل بين الحامض والقلوى. ويمكن إجراء تلك الخطوة مباشرة بإستخدام جهاز قياس الـ pH إلا أنه من الشائع أن يستخدم دليل ملون لتحقيق ذلك . وسنتناول فيمايلى موضوع الحموضة المعايرة لنتبين ما يعنيه ونقارن بين هذا التقدير وتقدير رقم الـ pH .

6.3. القدرة التنظيمية *Buffering* :

تتميز كل أحماض الأغذية بأنها أحماض ضعيفة عادة ما يتأين **أقل** من 3 % من أيونات هيدروجينها القابل للتأين من الحامض **الضعيف** . وعند حدوث **تعادل** بقلوى لأيونات الهيدروجين **المنفصلة** عن الحامض ، تظهر أيونات هيدروجين أخرى بإنقسام جزيئات أحماض جديدة لم تكن قد إنقسمت بعد . وتعرف خاصية **مقاومة** المحلول للتغير فى رقم الـ pH بالقدرة التنظيمية ***Buffering*** . وتحدث هذه الخاصية فى الأغذية عندما يوجد فى مكوناتها حامض **ضعيف وأملاحه** فى نفس الوسط . ونتيجة **للقدرة التنظيمية** فى سوائل الأغذية فإن شكل منحنى الـ pH أثناء التعادل يكون أكثر تعقيدا فى حالة الأحماض الضعيفة (شكلى 3.3 ، 4.3) عما هو الحال فى الأحماض القوية .



شكل (3.3): منحنى معايرة حامض الخليك مع قاعدة قوية ، وتكون القدرة التنظيمية عند قيمة $pK_a = 4.82$.



شكل (4.3): منحنى معايرة حامض الستريك ثلاثى الكربوكسيل مع قاعدة قوية ويتضح من الشكل قيم الـ pK_a التى تبين القدرة التنظيمية عند قيم pK_a مختلفة.

ويمكن التنبؤ بالعلاقة بين pH ، pK_a أو تركيز الحامض غير المنقسم أو أحد أملاحه بمعادلة ***Henderson-Hasselbalch*** كالتالى :

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

وتمثل [HA] تركيز الحامض غير المنقسم ، وتمثل $[A^-]$ أملاحه وتعرف أيضا بالقاعدة الرفيقة ***conjugated base*** ويتساوى تركيز القاعدة الرفيقة مع رفيق الحامض (H_3O^+) . وتكون الـ pK_a هى قيمة الـ pH عندما يتساوى كميات الحامض غير المنقسم والقاعدة الرفيقة ، وتدل المعادلة أن أقصى قوة تنظيمية تحدث عند تساوى قيمة الـ pH مع الـ pK_a . ويوضح جدول (4.3) قيم pK_a لبعض الأحماض الهامة فى تحليل الأغذية .

جـــــدول (4.3): قيم الـــ pK_a لبعــــض الأحـــماض الهامـــة فـــى تحليل الأغذية .

PK_a3	PK_a2	pK_a1	الحامض
–	–	4.76	حامض خليك *Acetic*
–	–	3.86	حامض لاكتيك *Lactic*
–	–	5.40	فثالات بوتاسيوم حامضية *Potassium acid phthalate*
–	4.21	1.19	حامض أكساليك *Oxalic*
–	10.25	6.10	حامض كربونيك *Carbonic*
–	4.54	3.02	حامض طرطريك *Tartaric*
–	5.05	3.40	حمض ماليك *Malic*
–	11.79	4.10	حمض أسكوربيك *Ascorbic*
12.30	7.21	2.12	حمض فوسفوريك *Phosphoric*
5.40	4.74	3.06	حمض ستريك *Citric*

7.3. التعادل بقياس فرق الجهد *Potentiometric titration*

عند إجراء عملية تعادل بين محلولى حامض وقلوى فعند نقطة التكافؤ *equivalence point* تتساوى تماما عدد مكافئات الحامض مع عدد مكافئات القلوى وحينئذ يتم تعادل كل الأحماض فى المحلول . وبعد الوصول لنقطة التكافؤ فإن قيمة المقام [HA] فى معادلة *Henderson Hasselbalch* تكون صغيرة جدا ويزداد المعامل $[HA/A^-]$ بصورة أسية ، ونتيجة لذلك يزداد رقم pH المحلول بسرعة ويصل بسرعة إلى pH مادة التعادل ، وتكون نقطة التعادل عند منتصف خط ميل منحنى الزيادة الفجائية فى رقم الـــ pH . ويمكن أيضا إستخدام جهاز قياس الـــ pH فى تحديد نقطة النهاية *Endpoint* لتعادل الحامض والقلوى ويطلق على تلك الطريقة ، طريقة قياس فرق الجهد *Potentiometric method* لتقدير الحموضة المعايرة *titratable acidity* . ومن أهم مزايا هذه الطريقة فى التقدير هى التحديد الدقيق لنقطة التكافؤ *equivalence point* .

obeikandi.com

8.3. الأدلـــــــة *Indicators* :

يستخدم غالبا محلول دليل لتحديد نقطة التكافؤ خاصة فى التقديرات الروتينية . وفى هذه الحالة يفضل إستخدام مصطلحى نقطة الإنتهاء ***endpoint*** أو نقطة الإنتهاء اللونية ***colorimeteric endpoint*** بدلا من تعبير نقطة التكافؤ . وبطبيعة الحال فإن النتائج المتحصل عليها تكون تقريبية وتعتمد درجة دقتها على نوع الدليل المستخدم . ومن أشهر أنواع الدلائل المستخدمة فى معايرة أحماض الأغذية دليل الفينولفثالين والذى يتغير لونه من عديم اللون إلى اللون الأحمر فى نطاق pH يبلغ من 8.0 إلى 9.6 ، وعادة يبدأ التغير المعنوى فى اللون عند pH = 8.2 . ويعرف هذا الرقم من الـ pH بنقطة الإنتهاء للفينولفثالين ***phenolphthalein endpoint*** . وعند مراجعة قيم الـ pK_a فى جدول (4) نجد أن أحماض الأغذية الطبيعية لاتعمل كمنظم فى منطقة نقطة الإنتهاء للفينولفثالين ، أما حامضى الفوسفوريك والكربونيك المستخدمان فى صناعة المشروبات الغازية فيعملان كمنظمان فى هذا النطاق من قيم الـ pH . ولذلك فالإنتقال بالمحلول أثناء المعايرة من نقطة التكافؤ الحقيقية إلى نقطة الإنتهاء تستهلك كمية أكبر من محلول القلوى لتعادل هذه الأحماض ويعنى ذلك عدم إمكانية تحديد نقطة الإنتهاء بدقة ، ولذلك يفضل فى تلك الحالة قياس نقطة الإنتهاء بطريقة قياس فرق الجهد ***potentiometric*** ، ويمكن كذلك تجنب حدوث تداخل من ثانى أكسيد الكربون الذائب فى المشروبات الغازية بغليان محلول العينة قبل تقدير حموضتها.

وتجدر الإشارة فى هذا الصدد ، أن محاليل العصائر والأغذية بوجه عام ذات اللون الكثيف (مثل عصائر ومركزات الطماطم والبرقوق والشليك ، ......إلخ) يصعب فيها تحديد نقطة الإنتهاء للدليل عند تقدير حموضتها لتداخل لونها مع لون الدليل . وعندما يكون تركيز الأحماض فى مستخلص الغذاء (كمستخلص الخضروات) قليلا يفضل إستخدام محاليل مخففة من القلويات القياسية لمعايرة الحموضة حتى نصل لرقم pH = 8.2 . ويمكن إستخدام دليل ***Bromothymol blue*** فى بعض الأحيان عند معايرة محاليل الأحماض المخففة ، حيث يتغير لونه من الأصفر إلى الأزرق فى نطاق قيم pH تتراوح بين 6.0 إلى 7.6 ، ويحدد نقطة الإنتهاء بوضوح اللون الأخضر .

وعادة ما تكون محاليل الأدلة ، إما حامض ضعيف أو قلوى ضعيف لذلك يفضل إضافة

أقل كمية ممكنة منها حتى لاتؤثر على دقة النتائج (فى حدود نقطتين إلى ثلاث نقط تضاف أثناء المعايرة) .

وفى حالة الرغبة فى معرفة كمية الأحماض الطيارة كحامض الخليك والتى نتجت أثناء عملية التخمر وذلك بالنسبة لأنواع الأحماض الأخرى الثابتة ***Fixed acidity*** يجرى فى البداية تقدير الأحماض الكلية ***total acidity*** ثم يغلى المحلول وبعد ذلك تقدر الأحماض الثابتة ***fixed acidity*** ويكون الفرق بين قيمتى الحموضة الكلية – الحموضة الثابتة هو قيمة الحموضة الطيارة ***Volatile acidity*** .

9.3. تحليل العينة الغذائية لتقدير الأحماض الكلية *Sample Analysis* :

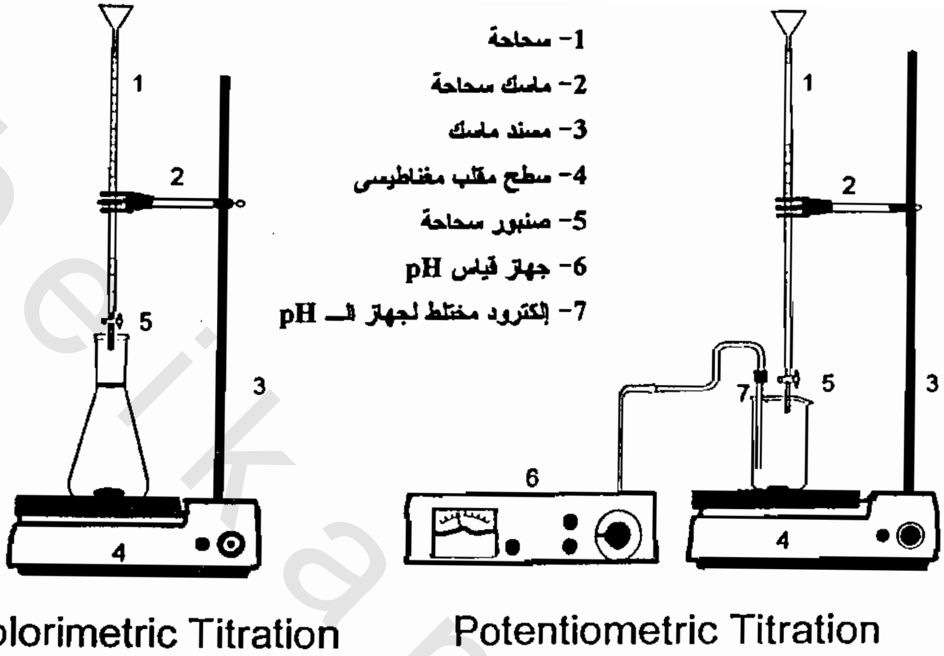
هناك عدة طرق رسمية لتقدير الحموضة المعايرة فى الأغذية المختلفة أقرتها الهيئة الأمريكية للمحللين الكيميائيين الرسمية *AOAC* والتى تصدر كل حوالى خمسة سنوات مرجعا يشمل كافة طرق التحليل الرسمية . وعلى أية حال ، فإن تقديرات الحموضة المختلفة تعتبر من التقديرات السهلة والبسيطة الروتينية والتى تتشابه فيها معظم خطوات التقدير .

وعادة ما يتم تحضير محلول سائل من العينة الغذائية (حوالى 10 مل) وتتم معايرته بإستخدام محلول قياسى (غالبا 0.1 ع محلول هيدروكسيد صوديوم) حتى نقطة الإنتهاء لدليل كالفينولفيثالين . هذا وقد يستخدم تقدير فرق الجهد عندما تكون صبغات الأغذية الطبيعية كثيفة (كصلصة الطماطم ، عصير الفراولة .... إلخ) وتتداخل فى تحديد نقطة الإنتهاء .

ويوضح الشكل (5.3) جهاز المعايرة بإحدى طريقتى تحديد نقطة الإنتهاء سواء طريقة فرق الجهد أو الطريقة اللونية .

وتجدر الإشارة فى هذا الصدد لحدوث بعض المشاكل عند تقدير حموضة المركزات أو المواد الجيلية أو المواد الغذائية الصلبة مما يمنع الإنتشار السريع للقلوى أثناء التقدير مما يبطئ ويصعب من الوصول لنقطة الإنتهاء بدقة . كما يفضل تكسير رغوة المواد الغذائية ذات الرغوة سواء بإضافة مواد مانعة للرغوة *Antifoam* أو بإحداث تفريغ . أما المواد الغذائية الصلبة المعلقة فى محلول فتتباين جزيئاتها أو قطعها فى حموضتها ولذلك يجب طحنها جيدا فى محاليل تعبئتها بعناية فى خلاط قبل المعايرة .

openkanar.com



شكل (5.3): جهاز تقدير الحموضة المعايرة ***Titratable acidity***

10.3. محتوى الأغذية من الأحماض ***Acid Content in Food***

تتصف الأغذية بتعقيد تركيبها الكيميائى ففى حالة الأحماض التى نحن بصدد الحديث عنها تحتوى الأغذية على أحماض دورة كربس (ومشتقاتها) ، وأحماض دهنية ، وأحماض أمينية ، ومن الناحية النظرية تساهم هذه الأحماض فى عملية المعايرة . ولا يمكن التمييز بين أنواع الأحماض المختلفة بالمعايرة الروتينية ولذلك قد يطلق على الحموضة المعايرة تعبير آخر هو الحموضة السائدة ***predominant acidity*** . وفى أغلب أنواع الأغذية يكون تركيبها من

الأحماض غير غامض ، ففى بعض أنواع الأغذية يوجد فقط حامضين سائدين بتركيزات عالية ، هذا وقد يتغير نوع الحامض السائد مع مرحلة النضج ***maturity*** . فعلى سبيل المثال ، يسود حمض الماليك فى العنب قبل النضج بينما يسود حمض الطرطريك فى ثمار العنب الناضجة . وتحدث نفس تلك الظاهرة فى الكمثرى حيث يسود أولا حمض الماليك قبل النضج ثم حمض الستريك بعد النضج . ولحسن الحظ يتشابه تقريبا الوزن المكافئ للأحماض الشائعة فى الأغذية ولذلك لاتتأثر كثيرا % للحموضة القابلة للمعايرة بالأحماض السائدة أو حتى بالإختيار الخاطئ للحامض السائد .

وتتميز الأغذية بالمدى الواسع من تركيزات الأحماض ، فقد يصل تركيز الأحماض إلى أقل من حدود الكشف فى أنواع الأغذية أو قد يكون موجودة بتركيزات عالية محسوسة فى أنواع أخرى من الأغذية . وللأحماض فى الأغذية دور كبير فى تحديد نكهتها وجودتها وتكسب الأغذية طعما حامضيا لاذعا . ويقل الإحساس بالطعم اللاذع مع زيادة تركيز السكريات . وتقل نسبة الأحماض مع تقدم درجة نضج الفواكه ويزداد فى نفس الوقت تركيز السكريات . ويوضح جدول (5.3) أنواع الأحماض ونسبة السكريات فى بعض أنواع ثمار الفاكهة عند نضجها . ومن أهم الأحماض الغذائية وأكثرها شيوعا فى الفواكه والخضروات حامضى الستريك والماليك ، وتتميز الخضروات الورقية بإحتوائها على نسبة عالية من حامض الأكساليك . أما المنتجات اللبنية فيعتبر حامض اللاكتيك أهم أحماضها الغذائية . وتساهم الأحماض العضوية فى القراءة الرفراكتومترية للمواد الصلبة الذائبة حيث يضاف مقابل كل 1 % أحماض عضوية مقدرة كحامض ستريك 0.2 % مواد صلبة ذائبة .

وهناك طرق أخرى حديثة تستخدم لتقدير الأحماض العضوية فى الأغذية منها كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى ***HPLC*** وكذلك كهروكيميائيا وبأجهزة الإحساس الحيوية ***Biosensors*** ، وعندئذ تكون نسبة الأحماض المقدرة بتلك الطرق أعلى بنسبة حوالى 50 % عما لو قدرت بطريقة المعايرة .

جـــدول (5.3): الأحماض والنسبة المئوية للمواد الصلبة الذائبة فى بعض الفواكه .

نوع الفاكهة	الحامض الرئيسى	% للحامض	% للمواد الصلبة الذائبة
تفاح *Apples*	ماليك	1.02 – 0.27	13.50 – 9.12
موز *Bananas*	ماليك /ستريك (1:3)	0.25	19.50 – 16.50
كريز *Cherries*	ماليك	1.86 – 0.47	18.00 – 13.40
توت *Carnberries*	ستريك ماليك	1.36 – 0.90 0.98 – 0.70	14.20 – 12.90
جريب فروت *Grape fruit*	ستريك	2.10 – 0.64	– 7.00
عنب *Grapes*	طرطريك/ماليك (2:3)	1.16 – 0.84	14.40 – 13.30
ليمون *Lemons*	ستريك	8.33 – 4.20	11.90 – 7.10
ليمون حامض *Limes*	ستريك	8.30 – 4.90	14.10 – 8.30
برتقال *Oranges*	ستريك	1.20 – 0.68	14.00 – 9.00
برقوق *Plums*	ستريك	2.00 – 1.00	12.30 – 11.80
كمثرى *Pears*	ماليك/ستريك	0.45 – 0.34	12.30 – 11.00
أناناس *Pineapples*	ستريك	0.84 – 0.78	16.80 – 12.30
فراولة *Strawberries*	ستريك	1.18 – 0.95	10.10 – 8.00
طماطم *Tomatoes*	ستريك	0.60 – 0.20	4.00

obeikandl.com

11.3. بعض الأسئلة المختارة

1- إشرح نظرية عمل أجهزة قياس الجهد ، ومعادلة ***Nerst*** ، وبين علاقتهما بإستخدام أجهزة قياس الـــ pH فى قياس تركيز أيونات الهيدروجين .

2- وضح الفرق بين إلكترود الكالوميل المشبع ، وإلكترود الفضة-كلوريد الفضة ثم صف تركيب الإلكترود الزجاجى والإلكترود المختلط .

3- عندما عدت من أجازة لمدة إسبوعين ، سألت فنى المعمل عن عينة عصير التفاح التى أعطيتها له قبل قيامك بالأجازة ، فقام الفنى بمعايرة جهاز الـــ pH ***Meter*** بمحلول منظم واحد ، ثم قرأ pH عينة عصير التفاح غير المبستر بعد إزالته من الفريزر وكانت درجة حرارة العصير 40°ف . إشرح لماذا تؤدى طريقة القياس التى إتبعها الفنى لنتائج غير دقيقة .

4- بين أنواع الأحماض العضوية التى تستخدم فى التعبير عن الحموضة المعايرة فى المنتجات الغذائية التالية : أ- عصير برتقال ، ب- يوجهورت ، ج- عصير تفاح ، د- عصير عنب ، هـ- سجق متخمر .

5- لماذا تستخدم العلاقة بين البركس / نسبة الحامض كدليل على جودة نكهة بعض المواد الغذائية ، ولماذا يكون إستخدام أى منهما (البركس أو الحامض) على حدى غير كاف ؟

6- ما هى الطريقة التى توصى بها لتقدير نقطة الإنتهاء عند معايرة عصير الطماطم لتقدير الحموضة المعايرة ***titratable acidity*** ؟ ، ولماذا ؟

7- أجرى تقديرا للحموضة المعايرة لمشروب مياه غازية سبق غليه أو لم يسبق غليه حتى نقطة الإنتهاء لدليل الفينولفثالين . ماهى العينة التى تتوقع فيها زيادة الحموضة المعايرة عن الأخرى ؟ ، ولماذا ؟

8 - بماذا يفيد تقدير الحموضة الطيارة كدليل على جودة ناتجات التخمر الخليكى ، وكيف يتم تقديرها ؟

9- ما هو سبب إختيار مركب فثالات البوتاسيوم الحامضى عند معايرة محلول الصودا الكاوية

obeikandi.com

القياسى لتقدير الحموضة المعايرة ؟

10- هل يمكن لعينة قدرت نسبة الحموضة فيها بـــ 1.5 % حامض خليك أن توصف بأنها تحتوى على 1.5 % حامض ستريك ؟ علل إجابتك .

11- عندما كان " المعيد " يصحح التقرير العملى للطلبة ، كتب أحد الطلبة فى تقريره أن % للحموضة المعايرة لعصير العنب كانت 7.6 % حامض ستريك . أذكر سببان لماذا كانت هذه الإجابة خطأ ؟ وماهى الإجابة الصحيحة ؟

مســـــــــــائل

1- كيف يمكنك تحضير 500 مل محلول 0.1 مولر من فوسفات الصوديوم NaH_2PO_4 ؟

2- إذا بدأت بحامض كبريتيك مركز نقى (36 عيارى) كيف يمكنك تحضير 1 لتر من محلول حامض كبريتيك 2 مولر ؟ وكم مل من محلول 10 ع صودا كاوية تلزم لمعادلة هذا الحامض ؟

3- كيف يمكنك تحضير 250 مل حامض هيدروكلوريك 2 ع من زجاجة محلول حامض هيدروكلوريك مركز (12 ع) ؟

4- كيف يمكنك تحضير 150 مل محلول صودا كاوية 10 % ؟

5- كيف يمكنك تحضير 1 لتر من محلول حامض خليك 0.04 مولر من حامض خليك ثلجى (17 ع) ؟

6- إذا كان حوالى 8.7 مل من محلول الصودا الكاوية المشبعة تلزم لتحضير 1 لتر صودا كاوية 0.1 ع ، فكيف يمكنك تحضير 100 مل صودا كاوية 1.0 ع ؟

7- ما هى عيارية (1+3) حامض هيدروكلوريك ؟

8- هل محلول حامض الخليك 1.0 % هو نفسه محلول حامض الخليك 0.1 مولر ؟

9- ما هى عيارية محلول صودا كاوية 40 % ؟

10- ما هو رقم الـــ pH لمحلول حامض الهيدروكلوريك 0.057 مولر ؟

obeikandl.com

11 – ما هو رقم الـ pH لمحلول هيدروكسيد الصوديوم 0.025 ع ؟

12- إذا كان تركيز أيونات الهيدروجين H^+ في الخل 1.77×10^{-4} مولر. فما هو رقم الـ pH له ؟ وماهو الحامض الرئيسى فى الخل ؟ وما هو تركيبه الكيميائى ؟

13- إذا كان تركيز أيونات الهيدروجين H^+ في عصير البرتقال 2.09×10^{-4} .إحسب رقم الـ pH ، وما هو الحامض الرئيسى فى عصير البرتقال ؟ وضح تركيبه .

14- إذا كان رقم الـ pH ليوجهورت بالفانيليا = 3.59 ، فما هو تركيز أيونات الهيدروجين؟ وما هو الحامض الرئيسى الموجود فى اليوجهورت ؟ ، بين تركيبه .

15- إذا كان رقم الـ pH لجيلى التفاح = 3.30 ، فما هو تركيز أيونات الهيدروجين ؟ وما هو الحامض الرئيسى فى التفاح ؟ ، وما هو تركيبه ؟

16- كيف يمكن تحضير 100 مل من محلول فثالات البوتاسيوم الحامضية (KHP) 0.1 ع؟

17- كيف يمكنك تحضير 100 مل محلول سترات منظم 0.1 ع من حامض ستريك (لامائى) وسترات بوتاسيوم (الوزن الجزيئ 230.22) ؟

حـــل المســـائل

1 – الوزن الجزيئ لملح الفوسفات أحادى الصوديوم 120

وبإستخدام المعادلة رقم 1 وهى (500 مل فوسفات الصوديوم) (التركيز المولر لفوسفات الصوديوم) = مللى مولات فوسفات الصوديوم

= (500 مل) (0.1 مولر) (120 جم/مول)/1000 مل/لتر

= 6 جرام "NaH_2PO_4"

2- المطلوب : تحضير 1000 مل محلول 2 مولر حامض كبريتيك مركز 36 ع (أى 18 مولر) .

obeikandl.com

∴ (18 مولر) (x مل) = (2 مولر) (1000 مل)

X مل = 111.1 مل حامض كبريتيك مركز تخفف إلى 1000 مل لإعداد محلول 2 مولر حامض كبريتيك .

ولحساب كم مل من محلول 10 ع NaOH تلزم لمعادلة هذا الحامض ، تطبيق المعادلة التالية :

(1000مل H_2SO_4)(2مولر H_2SO_4)(2ع/1 مولر) = (x مل NaOH)(10 ع NaOH)

= 400 مل NaOH

3- (250 مل) (2 ع HCl) = (x مل) (12 ع HCl)

X مل = 41.67 مل حامض هيدروكلوريك مركز تخفف فى دورق معيارى إلى 250 مل.

4- محلول 10% صودا كاوية أى 10 جم NaOH/100 مل من المحلول . لذلك فلنحضر 150 مل من محلول 10% صودا كاوية ، يذاب 15 جم صودا كاوية فى ماء ويكمل جحم المحلول إلى 150 مل .

5- بإستخدام المعادلة : (0.04 مولر HOAc) (1 لتر) (1000 مل/لتر)

= (x مل) (17 مولر HOAc)

∴ x مل = 2.35 مل حامض خليك مركز تخفف فى دورق معيارى إلى 1 لتر

6- ا لتر من محلول الصودا الكاوية 1.0 عيارى يحتوى على 100 ملليمكافئ ن 100 مل محلول الصودا الكاوية 1.0 ع يحتوىأيضا على 100 ملليمكافئ ∴ نفس حجم محلول الصودا الكاوية المشبعة (8.7 مل) يستخدم لتحضير أى من المحلولين السابقين .

7- يعنى (1+3) حامض هيدروكلوريك أن 1 جزء من حامض الهيدروكلوريك المركز يخفف بواسطة 3 أجزاء ماء أو كنسبة 1 إلى 4 أجزاء من المحلول النهائى فإذا كان تركيز حامض الهيدروكلوريك المركز 12 ع ... التركيز بعد التخفيف = 4/1 x12 = 3 ع.

obeikandl.com

8 –1 % محلول حامض خليك = 1 جم حامض خليك /100 مل

أما 0.1 مولر حامض خليك = 0.1 مول حامض خليك /لتر x 60.05 جرام/مول

= 6.005 جرام حامض خليك/لتر = 0.60 جرام/100 مل

= 0.60 % حامض خليك .

لذا فإن محلولى حامض الخليك مختلفان فى التركيز .

9 – 40% محلول صودا كاوية = 40 جرام NaOH /100 مل = 400 جرام NaOH /لتر

= 10 مول / لتر = 10 ع

10 – حيث أن حامض الهيدروكلوريك يعتبر حامضا قويا لذلك فهو ينقسم إنقساما كليا . لذلك فإن التركيز المولر لحامض الهيدروكلوريك هو نفسه التركيز المولر لأيونات الهيدروجين H^+ ، وأيونات الكلوريد Cl^- .

(H^+) = 5.7 x 10^{-2} مولر

PH = – لو 5.7 x 10^{-2} مولر

= (0.76 – 2)

= – (– 1.24)

= 1.24

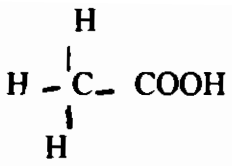
11– (OH^-) = 0.025 مولر = 2.5 x 10^{-2} مولر

pOH = – لو 2.5 x 10^{-2}

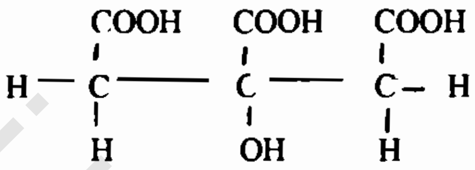
= – (– 2 + 0.4)

∴ pH = 14 – 1.6 = 12.4

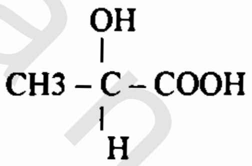
12– الـ pH = 2.75 (إستخدم المعادلة pH = – لو [H^+] فى حل المسألة .



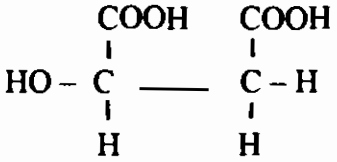
13- pH عصير البرتقال = 3.68 ، الحامض الرئيسى فى عصير البرتقال هو حامض الستريك وتركيبه كالتالى :



14- تركيز أيونات الهيدروجين فى اليوجهورت = 1.1×10^{-4} مولر ، الحامض الرئيسى فى اليوجهورت هو حامض اللاكتيك ، وتركيبه كالتالى :



15- تركيز أيونات الهيدروجين فى جيلى التفاح = 5.0×10^{-4} ، الحامض الرئيسى فى التفاح هو حامض الماليك ، تركيبه كالتالى :



16- الوزن المكافئ لفثالات البوتاسيوم الحامضية 204.22 جم/ مكافئ .

∴ لإعداد 100 مل 0.1 ع يذاب 2.0422 جم من فثالات البوتاسيوم فى الماء ويكمل الحجم فى دورق معيارى إلى 100 مل .

obeikandl.com

17- الوزن المكافئ لحامض الستريك اللامائى = 64.04 جم/مكافئ ، ولذلك فإن وزن حامض الستريك (CA) سيكون كالتالى :

$$\text{وزن الـ CA} = \frac{\text{100مل} \times 64.04 \text{ جم/مكافئ} \times 0.1 \text{ مكافئ/لتر}}{1000 \text{ مل/لتر}} = 0.6404 \text{ جرام}$$

أما سترات البوتاسيوم فهى عبارة عن حامض ستريك أزيل منه أيون هيدروجين من أيوناته الثلاثة . لذلك فإنه يكون له مكافئ واحد أقل فى المول منه عما هو الحال وفى حامض الستريك . والوزن المكافئ لسترات البوتاسيوم يساوى :

[وزنه الجزيئ (230.22) مقسوما على 2 (أيونى الهيدروجين بالجزئ)] أى 115.11 .

ولهذا فإن وزن سترات البوتاسيوم سيساوى :

$$\text{وزن سترات البوتاسيوم} = \frac{100 \text{ مل} \times 115.11 \text{ جم/مكافئ} \times 0.1 \text{ مكافئ/لتر}}{1000 \text{ مل}}$$

= 1.511 جرام

obeikandl.com

REFERENCES المراجـــع .12.3

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

Beckman Instruments. 1995. The Beckman Handbook of Applied Electrochemistry. Bulletin No. BR. 7793B. Fullerton, CA.

Harris, D.C. 1995. Quantitative Chemical Analysis, 4th ed. W.Freeman, New York.

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

Sadler, G. D. and Murphy, P.A. 1998. Food Analysis 2nd ed. Edited by S. Suzanne Nielsen, Aspen Pub. Gaitheburg, Maryland.

obeikandl.com

الباب الرابع

تحليل الرماد

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

obeikandl.com

البـــــاب الرابـــــــع

4. تحليل الرمـــــــاد *Ash Analysis*

1.4. مقدمـــــــــة :

الرماد ***Ash*** هو الجزء غير العضوى المتبقى بعد الحرق أوالأكسدة الكاملة للمواد العضوية فى المادة الغذائية . وبرغم بساطة وسهولة تقدير الرماد إلا أنه للحصول على نتائج دقيقة ومؤكدة لنسبته فى المواد الغذائية يجب أن يكون الشخص القائم بالتحليل على دراية كاملة بالطرق المختلفة لتقدير الرماد ، وأسباب إستخدام طريقة تقدير معينة دون الأخرى ، وكذلك أنواع أجهزة التحليل المختلفة ، وأسلوب الممارسة العملية السليمة أثناء التقدير. وهناك ثلاث طرق أساسية مختلفة لتقدير الرماد فى المواد الغذائية ، فالطريقة الجافة ***dry ashing*** يصلح إستخدامها فى أغلب أنواع العينات الغذائية لتعطى نتائج تقريبية ، ويفضل إستخدام الطريقة الرطبة ***wet ashing*** فى المواد الغذائية ذات المحتوى المرتفع من الدهون (كاللحوم ومنتجاتها) ، أما طريقة البلازما لإنتاج الرماد على درجات حرارة منخفضة فتستخدم أساسا فى عينات المواد الغذائية التى تحتوى على عناصر معدنية سريعة التطاير نسبيا . وهناك أيضا طرقا حديثة لتقدير الرماد مثل طريقة أفران الموجات القصيرة (الميكروويف ***microwave***) .

وبالنسبة لإعداد العينات لتقدير الرماد فيها فلا تحتاج العينات الجافة (كالحبوب والخضروات الجافة) لأى إعداد قبل حرقها ، أما الأغذية المرتفعة فى نسبة الدهون فيفضل أن تجفف مبدئيا ويستخلص منها الدهون قبل حرقها . وعادة يقدر فى الفواكه والخضروات ومنتجاتهم صور الرماد المختلفة سواء القابل للذوبان فى الماء أو الأحماض ، كما يفضل حساب درجة قلويته . وقد يتم التعبير عن نسبة الرماد فى المواد الغذائية على أساس الوزن الرطب أو الجاف . وبالإضافة للتقييم التغذوى لنسب الرماد والعناصر المعدنية فى المواد الغذائية ، يمكن الإستفادة من تقدير الرماد فى حساب نسب الفاكهة فى المنتجات مع السكر (المربى ، الجيلى ، المرملاد والفواكه المسكرة) وكذلك كمقياس للمكونات ، وللكشف عن غش الأغذية بمواد أخرى تتباين معها فى نسب المعادن ، وكذلك قد تكون الـــ % للرماد بندا إلزاميا فى مواصفات بعض المواد الغذائية .

2.4. تعـــــــاريف *Definitions* :

1.2.4. تقدير الرماد بالحرق الجاف *Dry ashing* : حيث يتم حرق العينات فى فرن إحتراق *muffle furnace* على درجات حرارة تتراوح بين 500 إلى 600°م ، فيتبخر الماء والمواد الطيارة وتحترق المواد العضوية فى وجود الأكسجين مكونة غازات ثانى أكسيد الكربون وأكاسيد نيتروجينية متطايرة . وتتحول معظم المعادن إلى أكاسيدها ، وكبريتاتها ، وكلوريداتها ، وسليكاتها . هذا وقد تتطاير ، عند إستخدام هذه الطريقة ، بعض المعادن ، جزئيا ، كالحديد ***Fe*** ، السلينيوم ***Se*** ، الرصاص ***Pb*** ، الزئبق ***Hg*** ، ولذلك قد تستخدم طرقا أخرى لإنتاج الرماد إذا ماكانت عملية إنتاج الرماد خطوة إبتدائية للتقدير الكمى للعناصر المعدنية .

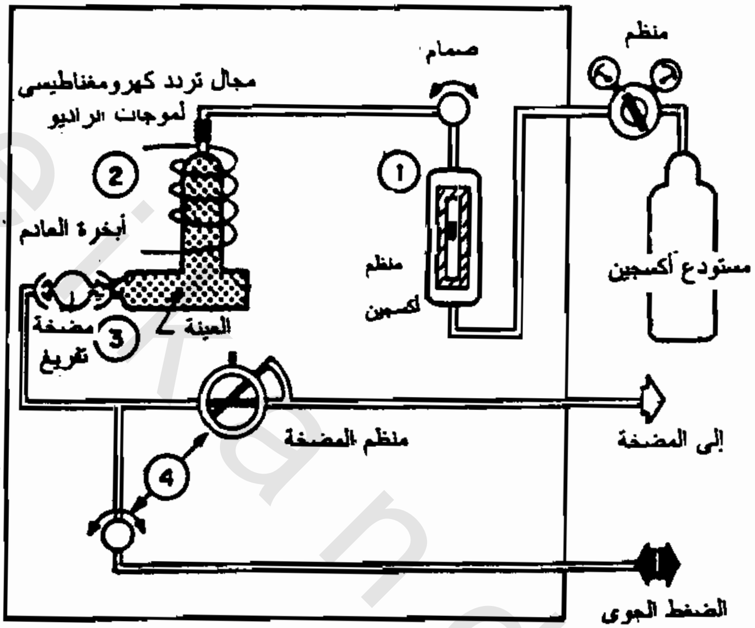
2.2.4. تقدير الرماد بالطريقة الرطبة *Wet ashing* : وهى طريقة لأكسدة المواد العضوية بإستخدام الأحماض والمواد المؤكسدة أو مخلوط منهما فتذوب المعادن فى تلك الأحماض دون حدوث تطاير لها . ودائما ما يفضل إنتاج الرماد بالطريقة الرطبة عند الرغبة فى تحليل العناصر المعدنية فى المواد الغذائية . ويفضل عادة إستخدام حامضى النيتريك والبيركلوريك وعندئذ يجب أن تجرى تلك العملية تحت خزانة محكمة تمنع نفاذ الغازات ، كما يجب توخى الحذر عند إستخدام هذه الطريقة فى الأغذية الدهنية نظرا للفوران المحتمل حدوثه للمخلوط .

3.2.4. طريقة البلازما لتقدير الرماد على درجة حرارة منخفضة *Low temperature plasma ashing* : وهى طريقة خاصة من طرق تقدير الرماد بالحرق الجاف ولكن على درجة حرارة منخفضة نسبيا ، وفى تلك الطريقة تؤكسد المادة الغذائية المزمع تقدير الرماد فيها تحت تفريغ جزئى ولكن فى وجود الأكسجين حديث التوليد ***Nascent oxygen*** يتكون فى مجال كهرومغناطيسى . وتتميز هذه الطريقة بتجنب حدوث تطاير لأغلب المعادن التى تتطاير بالحرق الجاف كما تظل التركيبات البللورية لتلك المعادن على حالتها دون تغير يذكر .

ويبين شكل (1.4) رسم تخطيطى لجهاز تقدير الرماد على درجة حرارة منخفضة . حيث يسمح بدخول الأكسجين من وحدة تحدد سرعة سريانه (1) ويمـــر خـــلال مجـــال

obeikandl.com

كهرومغناطيسى (2) فينتج أكسجين نشط *excited* يهاجم العينة موضع التقدير فى غرفة الأكسدة (3) ثم تزال الأبخرة الناجمة عن الأكسدة بواسطة مضخة تفريغ يتم التحكم فيها بصمامات معينة (4) .



شكل (1.4): شكل تخطيطى لجهاز تقدير الرماد على درجة حرارة منخفضة

4.2.4. الرماد غير القابل للذوبان فى الحامض *Acid insoluble ash* : وهى عادة معادن غير ذائبة تأتى من ملوثات الأغذية مثل معادن التربة (كالسليكات) وتذوب تلك المعادن فى بروميد الهيدروجين أو فلوريد الهيدروجين فقط .

5.2.4. قلوية الرمـــــاد *Alkalinity of ash* : وهو مقياس يفيد فى تقدير الإتزان بين الحامض- القلوى فى الأغذية ، وكذلك للكشف عن غش الأغذية بمواد معدنية (أو بمواد أخرى تركيبها المعدنى مختلف) .

3.4. أهمية الرماد فى تحليل الأغذية *Importance of Ash in Food Analysis:*

يمثل الرماد مجموع ما يحتويه الغذاء من مختلف العناصر المعدنية ، وتتلخص أهمية تقدير الرماد فى الأغذية فى الأسباب التالية :

1.3.4. يعتبر الرماد جزءا من مكونات الغذاء وله أيضا قيمته الغذائية .

2.3.4. يمثل تقدير الرماد الكلى خطوة أولى عند إعداد عينات المواد الغذائية لتحليل العناصر المعدنية .

3.3.4. هناك بعض الأغذية المرتفعة فى تركيز بعض العناصر المعدنية بصفة خاصة (كالفوسفور والكالسيوم فى اللبن ، الحديد فى اللحوم ومنتجاتها) لذلك يعتبر محتوى تلك الأغذية من الرماد فى غاية الأهمية .

4.3.4. عادة يكون محتوى المنتجات الحيوانية من العناصر المعدنية ثابتا ، أما المصادر النباتية فقد يكون محتواها من العناصر المعدنية متباينا .

4.4. محتوى الأغذية من الرماد *Ash Contents in Foods :*

يوضح جدول (1.4) محتوى مجموعات الأغذية المختلفة من الرماد ونادرا ما يتجاوز محتوى **الأغذية الطازجة** من الرماد عن 5% . وعادة **لا تحتوى** الزيوت والدهون **النقية** على رماد أو قد تحتوى على تركيزات ضئيلة جدا منه . هذا وقد تحتوى بعض المنتجات مثل **السجق المملح** ، **والأسماك المملحة** على نسب رماد تصل إلى 6 % أو ما يربو على ذلك . كما قد تصل نسبة الرماد فى اللحم البقرى المجفف لحوالى 11.6 % (على أساس الوزن الرطب) . وبالإضافة للبيانات التى يوضحها جدول (1.4) عن نسب الرماد فى بعض مجموعات الأغذية نود أن نضيف فى هذا الصدد أن مجموعات الدهون والزيوت والسمن **سواء النباتى** منها أو **الحيوانى** تتراوح نسب الرماد فيها ما بين 0.00 إلى 4.09 % ، بينما تتراوح نسب الرماد فى منتجات **الألبان** المختلفة من 0.5 إلى 5.1 % . أما أنواع **الفواكه** المختلفة **وعصائرها** ، وأنواع **البطيخ والشمام** ، فتتراوح نسب الرماد فيها بين 0.2 إلى 0.6 % بينما تحتوى **الفواكه المجففة** على نسب أعلى تتراوح بين 2.4 إلى 3.5 % . ويتراوح محتوى **الدقيق** ومساحيق أنواع الحبوب المختلفة (القمح، الذرة ، الشعير ،...إلخ) ما بين 0.3 إلى 1.4 % فى جنين القمح . وعلى ذلك فإن منتجات

الحبوب المرتفعة فى نسب الردة تزداد فيها نسب الرماد. أما النقليات ومنتجاتها فيتراوح محتواها من الرماد من 0.8 إلى 3.4 % .

جدول (1.4) : محتوى بعض الأغذية من الرماد (محسوبا على أساس الوزن الرطب).

نوع الغذاء	% للرماد	نوع الغذاء	% للرماد
الحبوب ، الخبز ، المكرونة:		**منتجات الألبان :**	
الأرز (البنى ، الطويل ، الخام)	1.5	اللبن الكامل	0.7
مسحوق الذرة ، الحبة الكاملة ، الذرة الصفراء	1.1	البن المكثف	1.6
الأرز الأبيض ، الحبوب الطويلة ، العادى ، الخام ، المدعم	0.6	زبد مملح	2.1
دقيق القمح ، الحبة الكاملة	1.6	قشدة سائلة ، نصف سائلة	0.7
المكرونة ، الجافة ، المدعمة	2.5	اليوجهورت السادة ، ومنخفض الدهن	0.7
اللحوم ، والدواجن ، والأسماك :		**الفواكه والخضروات :**	
البيض	0.9	تفاح	0.3
شرائح السمك ، شرائح السمك المغطاه بالبيض ومسحوق الخبز	2.5	الموز	0.8
الهامبورجر	1.7	الزبيب	0.5
لحم الدواجن ، الدواجن المعدة للشى ، لحم صدور الدواجن	1.0	البطاطس غير المقشورة	1.8
لحم بقرى	0.9	الطماطم	1.6

المصدر : قاعدة بيانات العناصر الغذائية التى أصدرتها USDA (أغسطس 1997م).

5.4. طرق تقدير الرماد *Ash determination*

1.5.4. إعداد العينة للتحليل *Sample preparation* :

من الأساسيات التى يجب التأكيد عليها دائما أن تكون العينة المعدة للتحليل ممثلة تماما للمادة الغذائية المزمع تحليلها . وعادة يتراوح وزن العينة المناسب لتقدير الرماد من 2 إلى 10 جم . ولا يجب أن تؤثر عمليات إعداد العينات **كالجرش ، الطحن** على محتواها من الرماد ، وفى هذا الصدد تجدر الإشارة إنه إذا كان إنتاج الرماد خطوة من خطوات **تقدير العناصر المعدنية** – يجب أن نتجنب تماما حدوث أى تلوث بعناصر معدنية أخرى .

obeikandi.com

هذا وقد يكون تكرار إستخدام الزجاجيات من مصادر تلوث العينة أو رمادها بعناصر معدنية أخرى . كذلك ، قد يكون إستخدام الماء فى تخفيف العينات مصدرا للتلوث ولذلك يفضل إستخدام ماء مقطر منزوع الأيونات ***Distilled-deionized water***

2.5.4. المواد النباتية *Plant materials* :

عادة ما تجفف المواد النباتية بالطرق الروتينية العادية قبل تقدير الرماد فيها . وعندئذ لا تكون هناك أهمية لدرجة حرارة تجفيف المواد النباتية ويمكن تجفيفها فى زمن قصير على درجة حرارة عالية (130 – 150°م) . ويمكن تقدير الرماد مباشرة فى المواد النباتية التى يقل محتواها الرطوبى عن 15 % دون حاجة لتجفيفها .

3.5.4. المنتجات الدهنية والسكرية *Fat and Sugar Products* :

تتطلب المنتجات الحيوانية المرتفعة فى نسب الدهون ، أنواع الحلوى المختلفة وكذلك التوابل معاملات خاصة قبل تقدير الرماد فيها ، فإرتفاع محتوى المواد الغذائية من الدهون أو الرطوبة قد يسبب حدوث طرطشة أو إنتفاخ ، وإرتفاع محتواها من السكريات يؤدى لتكوين رغاوى أثناء تقدير الرماد مما قد يسبب حدوث فقدا معنويا فى العينة أثناء التقدير.

فاللحوم ، ومنتجات الحلوى والتوابل يفضل تبخير رطوبتها حتى جفافها سواء فى حمام ماء ساخن أو بمصباح أشعة تحت الحمراء ، هذا وقد تضاف نقطة أو نقطتين من زيت الزيتون الخالى من الرماد للسماح بهروب بخار الماء وتجنب تكون قشرة صلبة على سطح هذه المنتجات أثناء تجفيفها أو تقدير الرماد فيها .

obeikandl.com

6.4. تقدير الرماد بالطريقة الجافة *Dry ashing*

1.6.4. بعض الأسس والأجهزة والأدوات المستخدمة

Principles and Instrumentation

يتم تقدير الرماد **بالطريقة الجافة** في المواد الغذائية بحرقها على درجة حرارة 525°م أو أعلى في أفران الحرق ***muffle furance*** . وتتباين سعة أفران الحرق بين الوحدات الكبيرة والتي تعمل بفرق جهد من 208 إلى 240 فولت ، والوحدات الصغيرة التي تستخدم في المختبرات الصغيرة وتعمل بفرق جهد 110 فولت فقط .

ويحتاج إختيار البواتق ***Crucibles*** المستخدمة في تقدير الرماد لمعرفة ودراية بخواصها وصفاتها ودرجة مناسبتها لتقدير الرماد في مادة غذائية معينة . فبواتق **الكوارتز** مقاومة للأحماض والهالوجينات إلا أنها غير مقاومة للقلويات وقد تتفاعل معها خاصة عند درجات الحرارة العالية . وهناك أنواع من البواتق مثل النوع ***Vycor*** تتحمل درجات حرارة حتى 900°م ، بينما لايمكن إستخدام أنواع البواتق **البيركس *Pyrex Gooch*** إذا ما زادت درجة حرارة تقدير الرماد عن 500°م . ويؤدى إنتاج الرماد على درجات حرارة منخفضة نسبيا (بين 500 – 525°م) إلى إرتفاع قيم التقدير وذلك بسبب إنخفاض معدل تحلل الكربونات وتجنب تطاير بعض الأملاح. وتتماثل بواتق **البورسلين *Porcelain*** مع بواتق **الكوارتز** في كثير من صفاتها إلا أنها قد تتعرض للكسر عند حدوث تغير فجائي (صدمة حرارية) في درجات الحرارة . وعادة يكثر إستخدام بواتق البورسلين لإنخفاض سعرها نسبيا . أما بواتق الصلب ***Steel*** فتقاوم الأحماض والقلويات وتتميز بإنخفاض سعرها إلا أنها تتكون من **الكروم والنيكل** مما يجعلها مصدرا محتملا لتلوث الرماد وتغير من تركيبه . أما بواتق **البلاتين** فتتميز بالخمول وتعتبر من أفضل أنواع البواتق إلا أنها تكون مكلفة جدا خاصة إذا كان عدد العينات المرغوب تحليلها كبيرا. ويجب أن يؤخذ في الإعتبار مايلي :

- يجب تعليم أو ترقيم البواتق لتحديد كنه العينة الموضوعة بها ولا يتم تعليم البواتق بأقلام عادية لأنها ستتعرض للمحو أثناء حرق العينات في الفرن . وقد

obeikandi.com

يتم تعليم البواتق بحبر خاص مع أقلام صلب أو قد يتم خدشها بأقلام أطرافها من الألماس ويكتب عليها بحبر (عبارة عن محلول 0.5 مول كلوريد حديد مذاب فى 20 % حامض هيدروكلوريك).

* يجب تنظيف البواتق جيدا ووضعها فى الأفران قبل إستخدامها فى تقدير الرماد.

ومن أهم مزايا تقدير الرماد بطرق الحرق الجاف ما يلى :

1- تعتبر طريقة آمنة ولا تحتاج لإحتياطات خاصة بعد بدء الحرق .
2- يمكن تداول عدد كبير من البواتق سويا وبذلك يتم تقدير الرماد فى عدد كبير من العينات فى آن واحد .
3- يمكن الإستفادة من الرماد الناتج فى تحليلات أخرى كتقدير العناصر المعدنية المكونة للرماد ، أو بتقدير الرماد غير الذائب فى الأحماض أو بتقدير الرماد الذى يذوب أو لا يذوب فى الماء .

أما أهم عيوب تقدير الرماد بطرق الحرق الجاف فنوجزها فيما يلى :

1- طول الفترة الزمنية اللازمة للحرق الجاف والتى تتراوح بين 12 – 18 ساعة.
2- السعر المرتفع لأفران الحرق ***Muffle furance*** .
3- قد يحدث تطاير لبعض العناصر المعدنية ، كما قد تحدث تفاعلات بين بعض المعادن وبواتق التقدير .
4- من أهم العناصر المحتمل تعرضها للتطاير أثناء الحرق الجاف ما يلى : البورون ***B*** ، الكادميوم ***Cd*** ، الكروم ***Cr*** ، النحاس ***Cu*** ، الحديد ***Fe*** ، الرصاص ***Pb*** ، الزئبق ***Hg*** ، النيكل ***Ni*** ، الفوسفور ***P*** ، الفاناديوم ***V*** ، الزنك ***Zn*** .

7.4. طـــرق تقدير الرمـــاد ***Procedures*** :

نشرت الهيئة الرسمية للمحللين الكيمياتيين ***AOAC*** عدة طرق لتقدير الرماد فى مرجعها (1995م) تحمل أرقاما ***A ; B*** 900.02 ، 920.117 ، 923.03 تستخدم فى تقدير الرماد بأنواع أغذية مختلفة .

obeikandl.com

1.7.4. تقدير الرماد بطريقة الحرق الجاف :

ويمكن إيجاز الخطوات العامة لتقدير الرماد فيما يلي :

1- زن من 5 – 10 جم من العينة في بوتقة رماد ، ويفضل تجفيف العينة خاصة إذا كانت رطوبتها مرتفعة .

2- ضع البواتق في فرن إحتراق بارد .

3- إحرق عينات المواد الغذائية المزمع تقدير الرماد فيها لمدة تتراوح بين 12 – 18 ساعة على درجة حرارة 550°م .

4- إفصل التيار الكهربائي عن فرن الإحتراق ، وإنتظر حتى تنخفض درجة الحرارة إلى 250°م على الأقل . ثم إفتح باب الفرن ببطئ وعناية لتجنب فقد الرماد لخفة وزنه وسهولة تناثره .

5- بإستخدام ماسك طويل ، إنقل البواتق بما تحويه من رماد بسرعة إلى مجفف بقاعدة من البورسلين توضع عليها الأطباق ويتحتم وجود مادة مجففة في هذه المجففات .

6- تغطى البواتق ثم غطى المجفف بإحكام وإترك البواتق لتبرد قبل وزنها .

تحسب % للرماد كما يلى :

$$\text{\% للرماد (على أساس الوزن الجاف)} = \frac{\text{(الوزن بعد تقدير الرماد – وزن البوتقة فارغة)} \times 100}{\text{وزن العينة} \times \text{معامل الوزن الجاف}}$$

حيث :

معامل الوزن الجاف = % للمواد الصلبة /100

فإذا كان بدقيق القمح 87 % مواد صلبة فإن معامل الوزن الجاف = 0.87=100/87 ، هذا ويمكن حساب % للرماد على أساس الوزن الرطب وفى تلك الحالة يستبعد معامل الوزن الجاف من مقام المعادلة .

وفيما يلى بعض أهم الإعتبارات الواجب مراعاتها عند تقدير الرماد بطريقة الحرق الجاف :

obeikandi.com

1- إذا ظل جزء من الكربون فى العينات بعد الحرق المبدئى يفضل إضافة بضع نقط من الماء المقطر الخالى من الأيونات أو حامض نيتريك مركز ، ثم يجرى حرق العينة فى الفرن على 550°م .

2- إذا ظلت هناك آثار من الكربون بعد المعاملة السابقة ينصح بإتباع الآتى :

1.2. ضع كمية من الماء المقطر على الرماد.

2.2. رشح الرماد خلال ورق ترشيح خالى من الرماد ***Ashless filter paper*** .

3.2. جفف الراشح .

4.2. ضع ورقة الترشيح بما عليها والراشح فى فرن الحرق وأعد عملية الحرق.

3- يجب إستخلاص الدهون من عينات المواد الغذائية المرتفعة الدهن بالمذيب المناسب .

4- يسرع كل من الجليسرين ، والكحول ، والهيدروجين من عملية إنتاج الرماد بطريقة الحرق الجاف .

5- قد تحدث عينات الجيلى طرطشة ***splattering*** داخل أفران الحرق لذلك يفضل خلطها بصوف قطنى لمنع ذلك .

6- قد تحتاج عينات الأغذية المرتفعة فى الأملاح إلى خطوتى حرق منفصلتين للمكونات الذائبة وغير الذائبة فى الماء . ويفضل إستخدام غطاء للبوتقة لتجنب التناثر والطرطشة .

7- يمكن إضافة محلول كحولى من خلات المغنيسيوم للإسراع من حرق الحبوب وفى تلك الحالة يجب عمل بلانك . وتكون حينئذ نسبة الرماد =

نسبة الرماد فى العينة – البلانك

ويوضح الجدول رقم (2.4) التالى ملخصا لأهم أسباب فقد بعض العناصر المعدنية أثناء تقدير الرماد بالحرق الجاف .

جدول (2.4):أهم أسباب فقد بعض العناصر المعدنية أثناء تقدير الرماد بالطريقة الجافة.

المعـــــدن	ظروف وأسباب الفقـــــــــــد
الزرنيخ *Arsenic*	سهل إرتباطه كما يحدث مع الدم ، وقد يتطاير في صورة مركب غير معروف على 56°م .
البورون *Boron*	يتطاير مع البخار من محاليل الأحماض .
الكادميوم *Cadmium*	يتطاير بسهولة ، إحتمال على صورة كلوريدات ، أو كمعدن . على درجة حرارة بين 400 إلى 500°م.
الكروم *Chromium*	يتطاير ككلوريد الكروميل على درجات حرارة منخفضة نسبيا تحت ظروف مؤكسدة .
النحاس *Copper*	يتطاير كمركب بورفيريني عند حرق عينات بترولية ، يتطاير من الخل (يحتمل كخلات نحاس على درجات حرارة منخفضة) ، ويختزل إلى معدن النحاس الذى لا يذوب في حامض الهيدروكلوريك.
الحديد *Iron*	يتطاير ككلوريد حديديك على 450°م ، يتطاير كمركبات بورفيرين عند حرق عينات بترولية . عند حرق عينات محتواها من نسبة الفوسفور/للحديد عالي تتكون مركبات تقاوم الذوبان في المحاليل أو التحلل فينتج عنها نتائج أقل من الحقيقة .
الرصاص *Lead*	يتطاير من الدم أو البترول إلا إذا وجدت كبريتات .
الزئبق *Mercury*	يتطاير كمعدن على 450°م .
النيكل *Nickel*	يتطاير كمركبات بورفيرين عند حرق عينات بترولية.
الفوسفور *Phosphorous*	يتطاير ، يحتمل كأحد الأحماض الأكسيدية ، خاصة في وجود الكبريتات ، إلا في حالة وجود تركيز زائد من المغنيسيوم .
الفاناديوم *Vanadium*	يتطاير كمركبات بورفيرين عند إحتراق عينات بترولية ، يتطاير كمركبات كلوريد على درجة حرارة أقل من 450°م.
الزنك *Zinc*	يتطاير ، يحتمل ككلوريد ، على درجة حرارة أعلى من 450°م

* المصدر : ***Thiers (1957)*** .

**** Thiers, R.E. (1957). Contamination in trace element analysis and its control. Methods Biochem. Anal. 5, 273 – 335 .***

2.7.4. تقدير الرماد بالطريقة الرطبة *Wet Ashing* :

يطلق على الطريقة الرطبة فى تقدير الرماد أحيانا " بالأكسدة الرطبة " أو " الهضم الرطب " . وأهم غرض لهذه الطريقة هو إنتاج الرماد لتحليل عناصره المعدنية والمواد السامة المعدنية . وهناك مزايا عديدة لتقدير و/أو لإنتاج الرماد بالطريقة الرطبة أهمها :

1- تظل المعادن دائما فى محلول أثناء التقدير ولذلك فليست هناك فرصة لفقدها نتيجة تطايرها خاصة وأن هذا التقدير يتم على درجة حرارة منخفضة .

2- تتميز هذه الطريقة بزمن للأكسدة منخفض نسبيا ، وتتطلب وجود خزانة غازات ، وسطح ساخن ، ومواسك طويلة ، وأجهزة أمان أخرى .

ويعيب هذه الطريقة ما يلى :

1- تحتاج ليقظة وإنتباه تام من الشخص القائم بالتقدير .

2- تستخدم فيها مركبات كيميائية آكلة *Corrosive* .

3- لايمكن إستخدام تلك الطريقة فى تقدير الرماد بعدد كبير من العينات فى آن واحد .

4- يجب إجراء كل العمل أثناء التقدير بخزانة الغازات والتى يتحتم غسلها جيدا بعد كل تقدير حتى لا تلوث العينات . وتعرف تلك الخزانة بخزانة حامض البيركلوريك *Perchloric acid hood* . ولا يفضل أن تحتوى هذه الخزانة على أية مواد بلاستيكية حتى لا تتآكل أثناء عملية تقدير الرماد بالطريقة الرطبة .

5- لسوء الحظ لا يكفى حامض واحد لتقدير الرماد بالطريقة الرطبة حيث لا يؤدى حامض منفرد للأكسدة الكاملة والمرغوبة لسرعة التخلص من كافة المواد العضوية .

وعادة يستخدم حامض النيتريك مع حامض الكبريتيك أو حامض البيركلوريك وكذلك كلوريدات أو سلفات البوتاسيوم بخلطات مختلفة لإتمام عملية الأكسدة . وعادة ما تتباين كميات الأحماض اللازمة لأكسدة عينات الأغذية المختلفة . هذا وينتج أثناء عملية الأكسدة ، أكاسيد السلفات والنيترات . ويتميز مخلوط حامضى النيتريك والبيركلوريك بسرعة أكسدته للمواد العضوية بمقارنته بمخلوط حامضى النيتريك والكبريتيك .

1.2.7.4. طـــرق التقديـــر *Procedures* :

نستعرض فى الخطوات التالية إحدى الطرق الرطبة لتقدير الرماد فى النباتات وتلك الطريقة منشورة فى مرجع الهيئة الرسمية للمحللين الكيميائيين ***AOAC*** تحت رقم 975.03 :

1- يوزن بدقة 1 جم من العينة الجافة المطحونة وتوضع فى كأس جريفين ***Griffin*** سعة 150 مل .

2- يضاف للعينة 10 مل من حامض النيتريك بحيث يغطى العينة كلية ، وإذا كانت المادة التى يقدر فيها الرماد تحتوى على نسبة مرتفعة من الدهون ، تترك العينة مغمورة فى حامض النيتريك فترة الليل ***Overnight*** .

3- يضاف لمخلوط العينة وحامض النيتريك ، 3 مل من حامض البيركلوريك $HClO_4$ بتركيز 60 % (ضع كأس تحت طرف سحاحة حامض البيركلوريك) ثم سخن ببطئ على سطح ساخن ***hot plate*** حتى تصل درجة الحرارة إلى 350°م ويتوقف تكون الرغاوى فى الكأس ويتبخر تقريبا حامض النيتريك .

4- إستمر فى الغليان حتى يحدث تفاعل حامض البيركلوريك بتصاعد أبخرة كثيفة، ثم ضع زجاجة ساعة على الكاس ليستمر التفاعل إلى أن تصبح العينة عديمة اللون . (لاتجعل السوائل تقل فى الكأس حتى الجفاف).

5- إرفع الكأس من على سطح التسخين ، وإتركه حتى يبرد .

6- إغسل زجاجة الساعة ، بأقل كمية ممكنة من الماء المقطر منزوع الأيونات ثم ضف 10 مل من حامض الهيدروكلوريك بتركيز 50 % .

7- إنقل كل ما فى الكأس إلى دورق معيارى (عادة بحجم 50 مل) ثم خفف وأكمل حتى العلامة بالماء المقطر منزوع الأيونات .

8- لا تغفل غسيل خزانة الغازات بعد الإنتهاء من العينة الأخيرة .

ولتحليل " الحديد " فى عينات لحوم ، توزن 2 جم كعينة ممثلة ويتم إضافة 30 مل حامض النيتريك فى كأس جريفين وتسخن على سطح ساخن حتى درجة حرارة 350°م ويستمر الغليان حتى يتبقى فى الكأس 10 مل فقط من حامض النيتريك. يضاف عندئذ 10 مل من حامض البيركلوريك (60 %) ثم تستكمل باقى خطوات التقدير بدءا من الخطوة 4

obeikandl.com

كما أوضحنا سابقا. بعد إتمام الأكسدة يخفف محلول الأكسدة وينقل كميا إلى دورق معيارى سعة 100 مل .

وتجدر الإشارة فى هذا الصدد إلى خطورة الغازات الناتجة من عملية إنتاج الرماد بالطريقة الرطبة على الصحة العامة ، هذا وقد تم وصف خطوات الحيطة والحذر فى مرجع الهيئة الرسمية للمحللين الكيميائيين تحت عنوان " **التداول الآمن للمواد الكيميائية الخطرة** ***Safe Handling of Chemical Hazards*** " ويتداخل حامض البيركلوريك فى تقدير الحديد بتفاعله مع الحديد فى العينة لتكوين بيركلورات الحديدوز ، والذى يكون معقدا غير ذائب مع مركب ***O-phenanthrolene*** .

وهناك طريقة معدلة أخرى لإنتاج الرماد بالأكسدة الرطبة والجافة ، هذا وقد نشرت هذه الطريقة تحت عنوان " **المعادن فى تركيبات اللبن الجاهز لطعام الأطفال** ***Minerals in Ready-to Feed Milk-Based Infant Formula*** " فى مرجع ***AOAC (1995)*** تحت رقم " 985.35 " . وتتلخص تلك الطريقة فى الخطوات التالية :

1- بخر العينات الرطبة (التى تتراوح بين 25 – 5 مل) على درجة حرارة 100°م طوال الليل ***overnight*** أو بالتجفيف بالميكروويف (الموجات القصيرة).
2- سخن العينة على سطح ساخن حتى يتوقف الدخان .
3- إحرق العينة فى فرن إحتراق على 525°م لمدة 3 – 5 ساعات فقط .
4- برد ثم رطب العينة بماء مقطر منزوع الأيونات بالإضافة إلى 0.5 إلى 3.0 مل من حامض النيتريك .
5- جفف على سطح ساخن أو فى حمام بخار ثم إحرق العينة مرة ثانية على 525 °م لمدة 1 – 2 ساعة.
6- برد العينة فى مجفف ***Dessicator*** ثم زنها .
7- أعد الخطوتان 4 ، 5 إذا تبقى كربون فى العينات (تحذير: قد يفقد بعض البوتاسيوم أثناء إعادة حرق العينات).

ويبين جدول (3.4) مقارنة بين طريقتى الأكسدة الرطبة والحرق الجاف لتقدير الرماد.

جدول (3.4): مقارنة بين طريقتى الأكسدة الرطبة والحرق الجاف لتقدير الرماد.

الأكسـدة الرطـبة	الحـرق الجـاف
• أكثر سرعة فى آجراءها	• أبطأ (12 – 18 ساعة أو أكثر)
• تجرى على درجة حرارة أقل	• تجرى على درجة حرارة أعلى
• إحتمالات أقل لتطاير العناصر المعدنية	• يحدث تطاير لبعض العناصر المعدنية
• أقل حساسية لنوع العينات	• أكثر حساسية لنوع العينات
• تحتاج لمراقبة أكثر أثناء خطوات العمل	• أقل إحتياجا لإحتياطات التشغيل
• تحتاج لبلانك	• أقل إحتياجا للبلانك
• يفضل أن يكون حجم العينة صغيرا	يمكن أن يكون حجم العينة كبيرا (حتى 10 جم)

3.7.4. طريقة بلازما لتقدير الرماد على درجة حرارة منخفضة

Low temperature plasma ashing

1.3.7.4. المبادئ العامة للطريقة والأجهزة المستخدمة فيها :

يتكون الجهاز المستخدم فى طريقة بلازما لتقدير الرماد من نظام زجاجى يستخدم فيه عدد متباين من **الغرف** توضع فيها العينات المزمع تحليلها ثم يسحب **الهواء** من تلك الغرفة أو الغرف بواسطة مضخة تفريغ . بعد تفريغ الهواء ، يتم إدخال كميات ضئيلة من الأكسجين النشط الذى يجرى توليده بواسطة مولد لمجال كهرومغناطيسى ويتم ضبط معدل الإحتراق بضبط معدل دخول الهواء . هذا ويتم إدخال الهواء برفق للمحافظة على التركيب الميكروسكوبى للمكونات مثل بللورات أكسالات الكالسيوم الموجودة فى مختلف أنسجة الأوراق .

2.3.7.4. طـــرق التقـــدير *Procedures :*

قد تتباين الأجهزة المستخدمة فى طريقة بلازما لتقدير الرماد على درجة حرارة منخفضة طبقا لنوع العينة المراد تحليلها .وعادة ما تحتوى وحدات إنتاج الرماد (على درجة حرارة منخفضة) على غرفتين زجاجيتين أو أكثر مع وحدات زجاجية بشكل القوارب *glass boats* لحجز العينات . توضع المادة الغذائية المطحونه فى الوحدة الزجاجية بشكل القارب وتوضع كل منها فى غرفة زجاجية منفصلة ثم تغلق ويتم تفريغها.

وعندما يكون التفريغ كافيا (1 تور أو أقل) نبدأ فى إدخال تيار طفيف من الهواء أو الأكسجين فى النظام مع المحافظة على حد أدنى من التفريغ . يتم تنشيط مولد الذبذبة عند تردد أقل من 14 ميجاهرتز (*MHz*) ثم يضبط معدل حرق العينات ***rate of incineration*** بواسطة التيار الكهربائى الداخل والذى يتراوح بين 50 – 200 وات (*watt*) .

وهناك بعض أنواع هذه الأجهزة التى تحتوى على وحدات هزازة ***shaking devices*** لتقليب العينات لإسراع ولتجانس عملية الحرق . هذا ويتم مراقبة تطور حرق العينات بمشاهدة العينات والنظر إليها بالغرف الزجاجية .

ومن أهم المشاكل التى تحدث أثناء تشغيل هذه الأجهزة حدوث تسرب فى نظام التفريغ ، وقد يكون ذلك بسبب حدوث تسرب فى الشنابر الجلدية المحيطة بالغرف الزجاجية لإحكام قفلها أثناء إجراء التفريغ ، وفى تلك الحالة يجب إستبدال تلك الشنابر الجلدية . كما قد تحدث تشققات فى وصلات *T* المصنوعة من البلاستيك وفى تلك الحالة يفضل لو تم إستبدالها بوصلات زجاجية.

هذا ويعتبر أهم ما يميز طريقة بلازما لتقدير الرماد درجة الحرارة المنخفضة المستخدمة فى تلك الطريقة (150°م أو أقل) مما يؤدى لعدم تغيير التركيب الميكروسكوبى والبللورى للمعادن المزمع تحليلها ، كما يؤدى أيضا لإحتمال أقل لفقد العناصر المعدنية . أما أهم ما يعيب تلك الطريقة فهو الحجم الضئيل والعدد القليل للعينات التى يمكن تحليلها فى آن واحد ، وكذلك إرتفاع تكلفة الأجهزة المستخدمة فى التقدير .

4.7.4. تقدير الرماد بإستخدام طريقة الموجات القصيرة (ميكروويف) *Microwave ashing*

يمكن تقدير الرماد بإستخدام أجهزة إنتاج الموجات القصيرة (الميكروويف) المبرمجة بحيث تجفف العينة أولا ثم تحرقها . وقد أثبتت الدراسات أن الحرق الجاف لمدة 40 دقيقة بنظام الموجات القصيرة يعطى نفس التأثير والنتيجة عما لو تم الحرق فى الأفران العادية ***muffle furnace*** لمدة 4 ساعات . هذا وقد وجد أنه يمكن تقدير الرماد فى الأنسجة

النباتية بطريقة الموجات القصيرة فى زمن يقدر بعشرين دقيقة فقط إلا عند الرغبة فى تقدير عنصر النحاس " *Cu* " فيستغرق زمن التقدير حينئذ 40 دقيقة .

وموجز القول أنه يمكن بإستخدام أفران الميكروويف إختزال زمن التحليل بصورة كبيرة ، إلا أنه لايمكن تقدير عدد كبير من العينات بهذا النظام فى نفس الوقت .

5.7.4. تقدير الرماد الذائب وغير الذائب فى الماء
Soluble and Insoluble Ash in Water

يستخدم هذا الإختبار كدلالة على نسبة الفواكه فى المربات والجيليات حيث يدل إنخفاض نسبة الرماد الذائب فى الماء على زيادة نسبة الفاكهة فى منتجاتها المحفوظة بالتركيزات العالية من السكر . وتستخدم الطريقة التالية لقياس نسب الرماد الذائب وغير الذائب فى الماء :

1- زن الرماد الكلى فى البوتقة .

2- ضف 10 مل من الماء المقطر للرماد فى البوتقة .

3- غطى البوتقة وسخن مخلوط الرماد والماء حتى درجة حرارة الغليان تقريبا.

4- رشح المحلول بإستخدام ورقة ترشيح خالية من الرماد *Ashless filter paper* وإغسل ورقة الترشيح عدة مرات بالماء الساخن المقطر لإزالة آثار الأملاح الذائبة منها .

5- جفف ورقة الترشيح وما تبقى عليها من رماد وأعد حرقها لمدة حوالى 30 دقيقة على 525°م .

6- زن شق الرماد المتبقى (غير الذائب) فى البوتقة وإحسب النسبة المئوية للرماد غير الذائب.

7- إحسب الرماد الذائب فى الماء بطرح الرماد غير الذائب من الرماد الكلى أو جفف الراشح وأعد حرقه ، وزنه ، لتحصل على نسبة الرماد الذائب فى الماء مباشرة .

6.7.4. الرمـــــاد غير الذائب فى الأحماض
Ash Insoluble in Acids

يعتبر هذا التقدير مقياسا لتلوث أسطح الفواكه والخضروات وأغلفة القمح والأرز بملوثات التربة كالسليكات والتى لاتذوب فى الأحماض عدا بروميد الهيدروجين .

وتستخدم لتقدير الرماد غير الذائب فى الأحماض الطريقة التالية :

1- يضاف للرماد الكلى أو للرماد غير الذائب فى الماء 25 مل من حامض الهيدروكلوريك 10 %.
2- تغطى البوتقة بزجاجة ساعة أو بغطاءها ويغلى المخلوط لمدة 5 دقائق .
3- رشح المخلوط بإستخدام ورقة ترشيح خالية من الرماد ، ثم إغسل الورقة عدة مرات بالماء الساخن المقطر .
4- أعد حرق ورقة الترشيح بما تبقى عليها من رماد غير ذائب فى الأحماض لمدة 30 دقيقة على الأقل .
5- زن وإحسب % للرماد غير الذائب فى الأحماض .

7.7.4. قلويـــــــة الرمـــــــــاد
Alkalinity of Ash

يتميز رماد **الفواكه والخضروات** بقلويته لإحتوائه على عناصر **الكالسيوم والمغنيسيوم والبوتاسيوم والصوديوم** ، أما رماد اللحوم وبعض الحبوب فيكون حامضيا لإحتوائه على عناصر الفوسفور والكبريت والكلوريد . ووتتخذ درجة قلوية الرماد كدليل على جودة الفواكه وعصائرها ، فأملاح أحماض **الستريك والماليك والطرطريك** تنتج **كربونات (قلوية التأثير)** عند حرقها . وتستخدم الطريقة التالية لتقدير قلوية الرماد :

1- ضع الرماد الكلى أو الرماد غير الذائب فى الماء فى طبق بلاتينى ثم ضف عليه 10 مل بالضبط من حامض الهيدروكلوريك 0.1 ع.
2- يمكن إضافة كمية أخرى من الماء المقطر المغلى أو سخن المخلوط فى حمام مائى.

obeikandl.com

3- برد ثم إنقل المخلوط كميا إلى دورق مخروطى.
4- عادل الزيادة من حامض الهيدروكلوريك (0.1 ع) بمحلول صودا كاوية قياسى 0.1 ع وإستخدم دليل الميثيل البرتقالى لتحديد نقطة التعادل .
5- عبر عن قلوية الرماد بعدد ملليلترات الحامض 0.1 ع/100 جم من العينة

هذا ويمكن تقدير قلوية الرماد بالمعايرة المباشرة بمحلول حامض الهيدروكلوريك 0.1 ع بإستخدام نفس الدليل (المثيل البرتقالى). وعبر عن النتيجة كما سبق .

8.4. بعض الإعتبارات العامة لطرق تقدير الرماد :

* يتطلب تقدير الرماد أجهزة مكلفة للطرق الثلاث السابق تناولها وتزداد تكلفة هذه الأجهزة إذا كانت من الأنواع ذات السعة الكبيرة التى تستخدم فى تقدير الرماد فى عدد كبير من العينات .
* يفضل عادة فى المختبرات وضع أفران تقدير الرماد وكذلك الرطوبة فى غرف منفصلة يطلق عليها الغرف الساخنة .
* عادة ما تكون مواسير (أنابيب) التسخين فى أفران حرق الرماد مكشوفة ولذلك يجب الحذر والحيطة الكاملة تماما عند إدخال أو إخراج بواتق التقدير فى تلك الأفران وتستخدم لذلك مواسك طويلة .
* عند إستخدام طريقة الموجات القصيرة (الميكروويف) فى تقدير الرماد يجب إجراء معايرة لتلك الطريقة بتقدير رماد نفس العينات بالطرق الأخرى القياسية ومقارنة النتائج وحساب معامل التصحيح .
* تحتاج أجهزة تقدير الرماد على درجة حرارة منخفضة بطريقة البلازما (يستخدم فيها غاز O_2 مؤين) لمضخة تفريغ كبيرة بالإضافة لتكلفة جهاز التقدير مما يزيد من تكاليف الأجهزة ويقلل من الطلب عليها.
* بينما يؤدى تقدير الرماد سواء بطريقة الأكسدة الرطبة أو بطريقة البلازما لتطاير محدود جدا لبعض العناصر فإن الطريقة الجافة لتقدير الرماد بالحرق (على درجات حرارة بين 500 - 600°م) تؤدى بالضرورة إلى فقد وتطاير نسبة من العناصر المعدنية .

9.4. أسئـــــــــلة عامـــــــــــــــة

1- تحدث عن أربعة مصادر للأخطاء فى إعداد العينات لتحليل الرماد ، وبين كيف يمكن تجاوز هذه الأخطاء ؟

2- كنت دائما تقوم بتقدير الرماد فى عينات المواد الغذائية بالطريقة الجافة . وقد طلب منك أحد السادة المشرفين على رسالتك لتغيير التقدير بالطريقة الجافة إلى طريقة الأكسدة الرطبة ، فما هو رأيك ؟

أ- هل أنت تتفق مع مشرفك على تغيير الطريقة ؟ ولماذا ؟
ب-بغض النظر عن إختصار الزمن عند تحولك لطريقة الأكسدة الرطبة لتقدير الرماد ، لماذا قد تصر على إستمرارك فى إستخدام طريقة الحرق الجافة ؟ ولماذا قد تغيرها إلى طريقة الأكسدة الرطبة ؟

3- قام الفنى الذى يعاونك بالمعمل بتقدير الرماد فى الزبد بطريقة الحرق الجاف كما يلى:

أ- وزن الفنى 5 جرامات من الزبد فى بوتقة من البلاتين .
ب-وضع الفنى البوتقة فى فرن الإحتراق بإستخدام ماسك من الصلب .
ج- ثم حرق العينات فى الفرن لمدة 48 ساعة على 800°م .
د- أزيلت البوتقة بعد ذلك من الفرن وتم وضعها على حامل فى الهواء الجوى حتى تمام التبريد ، ثم أعيد وزنها .

وضح أهم الإرشادات التى يجب عليك أن تؤكد عليها للأخ الفنى لتجنب الأخطاء الفنية التى شاهدتها أثناء قيامه بالتقدير السابق .

4- قارن بين طريقة بلازما لتقدير الرماد على درجة حرارة منخفضة ، وطريقة الحرق الجاف .

5- وضح أهم التوصيات التى تؤكد عليها للفنى القائم بتحليل الرماد فى عينات مواد غذائية مختلفة ، بطريقة الحرق الجاف ، للتغلب على المشاكل التالية:

أ- إحتمالات حدوث تطاير للفوسفور ، أثناء تقديرك له فى عينة مادة غذائية غنية فيه .
ب-لم يحدث إحتراق كامل للعينات المرتفعة فى نسبة السكر بعد حرقها بالطريقة الجافة ***Dry ashing*** (أى لم يكن الرماد أبيض اللون أو رمادى شاحب).
ج- طريقة الحرق الجاف التى قدرت بها الرماد إستغرقت وقتا طويلا . فكيف تسرع من تلك الطريقة دون أن تستخدم طريقة الأكسدة الرطبة بدلا منها؟

د- هناك من الأسباب التى تدعوك للإعتقاد أن العنصر المعدنى الذى ستقوم بتقدير نسبته فى الرماد بعد الحرق الجاف قد تفاعلت نسبة منه مع بواتق البورسلين المستخدمة .

هـ- إذا كنت تريد تقدير الحديد فى بعض الأغذية ولكنك لم تستطع الحصول على حديد ذائب بعد طريقة الحرق الجاف .

6- إشرح مقياسين من مقاييس تقدير الرماد يمكن أن تستفيد منهما فى تقييم جودة الفواكه ومنتجاتها .

مســـــــائل :

1- حبوب تحتوى على 11.5 % رطوبة . وضع 5.2146 جم منها فى بوتقة رماد وزنها الفارغ 28.5053 جم وبعد إتمام عملية الحرق الجاف كان وزن البوتقة والرماد 28.5939 جم . إحسب % للرماد على أساس (أ) الوزن الرطب ، (ب) والوزن الجاف .

2- كانت كمية الرماد غير الذائب فى الأحماض فى عينة فاصوليا (تزن 23.500 جم) 0.0940 . فما هى % للرماد غير الذائب فى الأحماض .

3- إذا كنت ترغب فى الحصول على 100 مجم من الرماد من عينة حبوب كان متوسط نسبة الرماد بها 2.5 % . فكم جراما من الحبوب تستخدمها فى إنتاج هذه الكمية من الرماد .

4- إذا أردت الحصول على معامل تباين (CV) أقل من 5 % أثناء تحليلك للرماد وكانت نتائج تقديرك للرماد كالتالى : 2.15 % ، 2.12 % ، 2.07 % فهل هذه النتائج مقبولة وتعطى معامل التباين المطلوب ؟

5- تم الحصول على النتائج التالية فى تجربة أجريت على عينة هامبورجر : وزن العينة = 2.034 جم ، وزن العينة بعد تجفيفها =1.0781 جم ، وزن العينة بعد إستخلاص الدهن منها = 0.479 جم ، وزن الرماد = 0.0233 جم . فما هى النسبة المئوية للرماد ؟ (أ) على أساس الوزن الرطب ، (ب) على أساس الوزن الجاف .

• الإجابات : (1) أ- 1.70 % ، ب- 1.92 % ; (2) - 0.04 % ; (3) - 4 جم ; (4) نعم ، 1.9 % (5) أ - 1.1 % ، ب - 1.57 % .

10.4. المراجـــــع *REFERENCES*

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

Aurand , L.W. , Wood , A.E. and Wells , M.R. 1987. Food Composition and Analysis. Van Nostrand Reinhold, New York.

Fennema , O.R. 1976. Principle of Food Science . Part 1, Food Chemistry . Marcel Dekker, Inc.

Thiers, R.E. (1957). Contamination in trace element analysis and its control. Methods Biochem. Anal. 5, 273 – 335 .

Pomeranz , Y. and Meloan , C. 1994. Food analysis : Theory and Practice , 3rd ed. Chap an and Hall , New York.

Wong , D.W.S. 1989. Mechanism and Theory in Food Chemistry. AVI. , Van Nostrand Reinhold, New York.

obeikandl.com

البـــاب الخامــــس
تحـــليل العناصر المعدنيـــة

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

obeikandl.com

الـــباب الخامــــــس
5. تحليل العناصر المعدنية
Elemental Analysis

تعتبر المواد الغذائية ، بوجه عام ، المصدر الرئيسى لمعظم العناصر المعدنية فاللبن ، على سبيل المثال ، يعتبر مصدرا جيدا **للكالسيوم** حيث يحتوى كوب اللبن (حوالى 250 جم) على ما يقرب من 300 مجم من الكالسيوم . وقد يضاف الملح (كلوريد الصوديوم) للأغذية أثناء التصنيع إما لإكساب المنتج طعما مقبولا أو كعامل حفظ لخفض درجة **النشاط المائى** " a_w" وبالتالى يزيد محتوى هذه الأغذية من عنصر ***الصوديوم*** (مثل أنواع الجبن المختلفة ، الأسماك المملحة ، واللحوم المصنعة) . هذا ، وقد يضاف عنصر ***الحديد*** للدقيق الأبيض ، كوسيلة لتدعيمه غذائيا ، بنسبة تعيده إلى مستواه الأصلى فى القمح قبل إزالة الردة . وعند تدعيم الأغذية ***Fortification*** يسمح بإضافة المعادن (اللازمة لتحقيق ذلك) بمستويات أعلى من مستوياتها الطبيعية الموجودة بها فى الأغذية . فمنتجات حبوب الإفطار يتم تدعيمها غالبا ببعض العناصر المعدنية مثل الكالسيوم ، الحديد ، والزنك والتى يعتقد عادة أن مستوياتها فى المواد الغذائية محدودة وتقل عن متطلبات الإنسان الغذائية . ومما تجدر الإشارة إليه ، أن عملية تدعيم ملح الطعام بعنصر اليود ، قد أدت إلى تقليص حالات الإصابة بمرض الجويتر ***goiter*** فى الدول التى أصدرت سلطاتها الصحية قرارها بذلك . ويؤدى تصنيع بعض الأغذية لصورها المختلفة لخفض محتواها من العناصر المعدنية ، فعلى سبيل المثال ، توجد النسبة العظمى من عناصر الفوسفور ، والزنك ، والمنجنيز ، والكروم فى الحبوب فى طبقة الغلاف (الردة) التى تزال أثناء التصنيع عند إنتاج الدقيق خاصة فى الإستخلاصات المنخفضة (مثل الدقيق إستخلاص 72 %) . وعند إنتاج جبن الكوتاج بالتحميض المباشر يقل محتواه بشدة من عنصر الكالسيوم وذلك لأن الحامض يحرر الكالسيوم من إرتباطه بالكازين فيفقد هذا العنصر فى الشرش .

ويوجد فى الهيكل العظمى للإنسان نسبة تقترب من حوالى 98 % من عنصر ***الكالسيوم*** ، 85 % من عنصر ***الفوسفور*** من نسب تواجد هذين العنصرين فى جسم الإنسان . ولعناصر ***الصوديوم ، والبوتاسيوم والكالسيوم ، والمغنيسيوم*** دورها الأساسى والفعال فى الإتصالات العصبية ، وإنقباض العضلات بجسم الإنسان . ويؤثر ***حامض***

obeikandl.com

الهيدروكلوريك بتركيزه فى المعدة على ذوبان وإمتصاص ***عناصر معدنية عديدة*** بغذاء الإنسان .

وتقسم العناصر المعدنية ذات الأهمية بغذاء الإنسان إلى عناصر معدنية كبرى كالصوديوم ، والبوتاسيوم ، والكالسيوم ، والمغنيسيوم ، والفوسفور ، والكبريت . ويعتبر الكلور أيضا من العناصر ذات الأهمية الغذائية ويساهم فى تكوين حامض الهيدروكلوريك بالمعدة (ويصل لمعدة الإنسان من إستهلاك ملح الطعام) . وتصل الإحتياجات الغذائية من هذه العناصر ما يربو على 100 مجم فى اليوم للبالغين . ولكل عنصر من العناصر السابقة وظيفته المحددة فى جسم الإنسان ولذلك فإن نقصانها فى الوجبة الغذائية وعدم تناولها بإنتظام قد يؤدى لأعراض مرضية .

وهناك عشرة عناصر أخرى يحتاج إليها الإنسان فى غذائه ، ولكن بتركيزات ضئيلة تقدر بملليجرامات معدودة ولذلك يطلق عليها العناصر النادرة ***trace (minor) elements*** وتشمل تلك العناصر الحديد ، والنحاس ، والزنك ، والكروم ، والمنجنيز ، والموليبدينم ، والسيلينيوم والسليكا بالإضافة للفلوريد واليود . ولكل عنصر من العناصر السابقة وظائفه البيوكيميائية اللازمة لإستمرار عمل الجسم . فالحديد على سبيل المثال ، يعتبر جزءا من مكونات جزيئات الهيموجلوبين والميوجلوبين واللذان يساهمان فى نقل الأكسجين للخلايا ، وتخزينه لعمليات التمثيل الغذائى ، على التوالى .

كما توجد مجموعة من العناصر المعدنية يطلق عليها العناصر المعدنية فائقة الندرة ***ultratrace minerals*** والتى يحتمل آداءها لوظائف بيولوجية . وتلك العناصر هى الفاناديوم ، والقصدير ، والنيكل ، والزرنيخ ، والبورون .

هذا وقد ناقشت العديد من الأبحاث سمية بعض المعادن لجسم الإنسان ولذا صدرت التوصيات المختلفة بضرورة تجنب وجودها فى الوجبة الغذائية . وتشمل تلك العناصر الرصاص ، والزئبق ، والكادميوم ، والألومينيوم ، والبيريليوم ، والتانتالم ***tantalum***. وهناك بعض العناصر الأساسية كالفلوريد والسيلينيوم تكون ضارة إذا ما إستهلكت بكميات أكبر من تلك اللازمة لأداء وظائفها البيولوجية .

ويوضح جدول (1.5) العناصر المعدنية ذات الأهمية من الناحية الغذائية مقسمة طبقا للإحتياجات الأساسية التغذوية ، خطورة سميتها ، وما تحتويه أيضا قاعدة البيانات التى أصدرها قسم الزراعة فى الولايات المتحدة الأمريكية " *USDA* " كمرجعية قياسية لبعض العناصر المعدنية .

جدول (1.5) : العناصر المعدنية فى الأغذية ، الأساسية من الناحية الإغتذائية ، وذات المخاطر السمية ، والتى تحتويها قاعدة بيانات قسم الزراعة بالولايات المتحدة الأمريكية.

العناصر الأساسية	العناصر المعدنية السامة	العناصر المعدنية المتاحة فى قاعدة البيانات
الكالسيوم	الرصاص	الكالسيوم
الفوسفور	الزئبق	الحديد
الصوديوم	الكادميوم	المغنيسيوم
البوتاسيوم	النيكل	الفوسفور
الكلوريد	الزرنيخ	البوتاسيوم
المغنيسيوم	–	الصوديوم
الحديد	–	الزنك
اليود	–	النحاس
الزنك	–	المنجنيز
السلينيوم		
الكروم		
المنجنيز		
الزرنيخ		
البورون		
الموليبدينم		
النيكل		
السليكون		

المصدر :

U.S.Department of Agriculture, Agriculture Research Service. 1997.

USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 11-1. Nutrient Data Laboratory Home Page, http://www.nal.gov/fric/Food comp.

ويعتبر الماء أكثر العناصر الغذائية أهمية ويحتاج الإنسان لتناول حوالى 2 –3 لتر منه يوميا يتحصل عليها من ماء الشرب ، والمشروبات ، والأغذية ، أو كناتج ثانوى لعمليات التمثيل الغذائى للعناصر الغذائية من بروتين وكربوهيدرات ودهون . وعادة مايستخدم فى صناعة المشروبات المختلفة ماء نقى يتباين تركيبه من العناصر المعدنية بإختلاف مصادره . وقد يكون ماء الشرب من المصادر الهامة لحصول الإنسان على إحتياجاته من العناصر المعدنية اللازمة له . وفى الدول التى تعتمد على إستهلاك ماء الشرب المقطر يضاف للماء المقطر نسبة من الأملاح المعدنية والتى تحسن من إستساغة طعمه كما تكون مصدرا لبعض العناصر المعدنية اللازمة للإنسان . هذا وقد أضيف الفلوريد فى بعض الدول لماء الشرب بنسبة 0.7 إلى 1.0 جزء فى المليون فقلل فرص حدوث تسوس الأسنان فى الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين 10 إلى 12 سنة بنسب تصل إلى حوالى 70 % .

وتجدر الإشارة فى هذا الصدد ، إلى أهمية التقدير الدقيق للمعادن فى غذاء الإنسان لأهميتها الغذائية ، ولدورها فى التصنيع الغذائى ، ولإحتمالات سميتها. هذا ولم تتاح حتى الآن طريقة معملية لتقدير كل العناصر بدرجة متساوية من الدقة التحليلية وفى مختبرات تحليل الأغذية الصغيرة ، والتى يكون القائمين على تشغيلها من الفنيين المهرة ، يفضل إجراء تحليل العناصر المعدنية بالطرق التقليدية البسيطة ، لخفض تكاليف التحليل . أما إذا كان عدد العينات المطلوب تحليل محتواها من العناصر المعدنية كبيرا خاصة فى المختبرات التى تقوم بدراسات مسحية دورية للدولة على الأغذية أو ماء الشرب ، فإن عامل الوقت ، والذى يفضل إختصاره ، يجعل الأفضلية لإستخدام أجهزة التحليل السريعة ، برغم تكلفتها العالية كجهاز قياس طيف الإمتصاص الذرى ***Atmic Absorption Spectrophotometer*** أو جهاز طيف الإنبعاث ***emission spectroscopy*** ، ويعتمد إختيار أحدهما فى التحليل على نوع العناصر المطلوب تقديرها . ويؤدى وجود فرن الإحتراق الجرافيتى ***graphite furnace*** بجهاز طيف الإمتصاص الذرى لإكساب الجهاز حساسية عالية تؤدى لإمكانية تقدير العناصر المعدنية التى يصل تركيزها لأجزاء فى البليون (10^{-9})، وهذا التركيز بالطبع ، لا يمكن قياسه بالطرق التقليدية. ويعتمد إتخاذ قرار إختيار جهاز ما لتحليل العناصر المعدنية على عوامل عديدة أهمها تكاليف التحليل ،

وتوافر الأجهزة اللازمة للتحليل فى مختبر ما ، وتكلفة الأجهزة ، ودرجة الدقة والحساسية المطلوبة من التحليل ، والأهمية النسبية لنوعية العناصر موضع التقدير .

ومن أهم الإعتبارات ، والقواعد العامة التى يجب مراعاتها ، وتفهمها جيدا قبل البدء فى تقدير العناصر المعدنية مايلى :

1- يجب أن تكون كل الأجهزة والأدوات المستخدمة فى التقدير نقية وخاملة قدر الإمكان ، كما يفضل إستخدام أدوات من الكوارتز والبلاتين ، والكربون الزجاجى.

2- ضرورة تنظيف الأجهزة والأوعية والأدوات المختلفة المستخدمة فى التقدير بواسطة البخار لخفض معدل فقد بعض العناصر المعدنية بالإدمصاص ، وتقليص قيمة البلانك .

3- يجب تجنب كافة أخطاء التقدير قدر الإمكان ، ويفضل إستخدام طرق التحليل الدقيقة والتى تستخدم فيها أدوات وأوعية صغيرة الحجم ، على أن تكون مساحة سطحها لحجمها مناسبة ، كما يفضل إجراء معظم خطوات تقدير العناصر المعدنية فى وعاء واحد . وإذا كانت العناصر المعدنية متطايرة فيجب تقديرها فى نظام مقفل وأن تكون درجة الحرارة المستخدمة فى التقدير أقل ما يمكن لخفض أو تجنب تطاير تلك المعادن .

4- يجب أن تكون كافة الجواهر الكشافة ، والغازات الخاملة والمواد المساعدة فى التقدير نقية قدر الإمكان . فالماء عند إستخدامه فى الإذابة يجب أن يكون فى أعلى درجات النقاء وخالى تماما من أية عناصر معدنية ، وفى كل الأحوال يفضل دائما إتخاذ عينة بلانك*.

5- يفضل دائما فى تقدير العناصر المعدنية إستخدام أقل درجة حرارة ممكنة ، على أن تكون أيضا ثابتة قدر الإمكان .

---

* البلانك : إجراء نفس التقدير ، بكافة الخطوات تماما ، كما هو الحال فى العينة المراد تحليلها على ألا تستخدم العينة المراد تحليلها على وجه الإطلاق ، ويستعاض عنها بنفس الحجم من المذيب.

obeikandi.com

6- يجب تجنب تلوث العينات من جو المعمل بإستخدام مناضد وحجرات نظيفة ، ويفضل إمرار الهواء الداخل لحجرات التقدير خلال مرشحات لإمصاص أى عناصر ملوثة للهواء ، ويصبح هذا الإجراء إلزاميا عندما يكون التقدير للعناصر المعدنية ذات التركيزات المنخفضة جدا (10^{-6} إلى 10^{-9} مولر).

7- فى كافة طرق التقدير ، يفضل دائما خفض خطوات التقدير قدر الإمكان لتجنب إحتمالات التلوث .

8- يفضل مراقبة كافة خطوات التحليل بإستخدام أجهزة إقتفاء الأثر الإشعاعية ***Radiotracers*** .

9- عادة ما يتم تحليل نفس العينة فى أكثر من مختبر ، وتفضل المختبرات المرجعية ***Reference Laboratory*** للتأكد من كفاءة الطريقة ، وكفاءة الفنيين ، وضمان دقة النتائج ، وكفاءة تكرارية التقدير ***Reproducibility*** .

10- تؤثر عوامل عديدة على دقة نتائج تحليل العناصر المعدنية ، منها على سبيل المثال لا الحصر ، رقم الــ ***pH*** ، شكل العينة ، درجة الحرارة ، نوعية الجواهر الكشافة وبدائلها وكفاءتها فى التقدير ، ... إلخ. ولذلك يجب إتباع كافة الخطوات والإرشادات للمارسة العملية السليمة أثناء تقدير العناصر المعدنية .

11- عند تقدير عناصر الموليبدينم ، والمنجنيز ، والحديد ، والفوسفور ، يجب أن يتم تقديرها وهى ذائبة فى محلول حامض هيدروكلوريك مخفف وذلك بعد الهضم الرطب للعينة الغذائية بحامضى النيتريك والبيركلوريك . أما عند الرغبة فى التقدير الكمى لعناصر الكبريت ، والكالسيوم ، والبوتاسيوم ، والصوديوم فيتم الإستخلاص بمحلول ثنائى ثيازون ***dithiazone*** القلوى . وعند تقدير عناصر الزنك والكوبالت والنحاس يستخدم فى إستخلاصها محلول ثنائى ثيازون الحامضى .

12- فى طرق التقدير الحديثة يمكن تقدير عديد من العناصر المعدنية فى عملية واحدة مهما قلت تركيزاتها إلا أن الأجهزة المطلوبة لمثل هذا التحليل مكلفة وقد تتجاوز الإعتمادات المالية لمعظم مختبرات رقابة الجودة ، ولا يعنى ذلك أن

obeikandi.com

الطرق التقليدية والبسيطة غير دقيقة ، إلا أنها بوجه عام ، لايمكن إستخدامها فى تقدير التركيزات المتناهية الصغر من العناصر المعدنية .

1.5. طرق تقدير العناصر المعدنية

1.1.5. طرق الوزن النوعى :

يقدر محتوى الرماد من العناصر المعدنية **بترسيب وغسيل** وتجفيف ثم وزن الصور **غير الذائبة من** الرماد ، وتقدر فيها بعد ذلك العناصر المعدنية بطرق **الوزن النوعى** . وتعتمد طرق الوزن النوعى لتقدير العناصر المعدنية على **حقيقة** أن المعدن الموجود فى تركيب مركب ما "نقى" عادة ما يوجد **بنفس محتواه** بالوزن . فكلوريد الصوديوم ، على سبيل المثال ، دائما ما يحتوى على 39.3 % من عنصر الصوديوم . وفى طرق الوزن النوعى يتم فصل المكون المناسب المطلوب تقدير عنصر ما فيه من المواد الأخرى فى المخلوط ، وذلك بالترسيب **الإختيارى** ، ثم يغسل هذا المكون لإزالة المركبات الملوثة له . تجفف المركبات المترسبة وتوزن . فعندما يرسب الكلوريد ، عادة ما يرسب على هيئة مركب **كلوريد الفضة** ، وبعد غسيل كلوريد الفضة لإزالة المركبات الملوثة ، يجفف ويوزن ، ثم يتم حساب وزن الكلوريد من نسبته فى كلوريد الفضة ، حيث تبلغ نسبة الكلوريد 27.74 % من الوزن الجزيئى لكلوريد الفضة .

1.1.1.5. تقدير الكالسيوم بطريقة الوزن النوعى المعدلة :

يمكن تقدير الكالسيوم بإعداد الرماد من العينة معلومة الوزن ، ثم يذاب الرماد فى حامض هيدروكلوريك ، وتضاف إليه أكسلات الأمونيوم لترسيب الكالسيوم على صورة **أكسالات كالسيوم** ، تغسل أكسالات الكالسيوم (CaC_2O_4) المترسبة عدة مرات ثم تحول إلى أكسيد كالسيوم (CaO) بعملية حرق أخرى فى فرن إحتراق . يوزن أكسيد الكالسيوم وتحسب من وزنه محتوى العينة من الكالسيوم ($0.7147=MwCaO/MwCa$) .

ويعيب تلك الطريقة زيادة زمن التقدير لإجراء عمليتى حرق ، الأولى للعينة لإنتاج الرماد ، والثانية لتحويل أكسالات الكالسيوم إلى أكسيد كالسيوم ، كما تؤدى عملية غسيل أكسالات الكالسيوم لذوبان جزء طفيف منها مما يسبب خطأ طفيف فى التقدير . وعادة تستخدم طرق الوزن النوعى عندما يكون حجم العينة كبير ونسبة العنصر المطلوب تقديره

فى رماد هذه العينة مرتفعة نسبيا . ولايمكن إستخدام طرق الوزن النوعى فى تقدير العناصر النادرة . ويمكن تقدير عنصر الكلوريد بهذه الطريقة بعد ترسيبه على صورة كلوريد فضة بإستخدام نترات الفضة .

2.1.5. تقدير العناصر المعدنية بتفاعلات الأكسدة والإختزال " *Redox reactions* " :

تعتبر تفاعلات الأكسدة والإختزال أساسا لطرق تحليل عديدة ، فتفاعل المادة مع عنصر الأكسجين يطلق عليه أكسدة ***oxidation*** ، أما إزالة الأكسجين من المادة فيطلق عليه إختزال ***reduction*** . وفى عملية الأكسدة تزال إلكترونات من الذرة أما الإختزال فهو إكتساب الذرة للإلكترونات . ولذلك فهناك تفاعلات أكسدة أو إختزال لايساهم فيها الأكسجين ولكنها تعتمد فقط على إزالة أو إكتساب إلكترونات للذرات المتفاعلة . وبتعبير آخر ، فإن أى تفاعل يؤدى لزيادة الشحنة الموجبة يطلق عليه تفاعل ***أكسدة*** ، بينما يطلق على التفاعل الذى يؤدى لنقص الشحنة الموجبة ***بالإختزال*** . وطالما أنه لايمكن تخليق الإلكترونات أو تحطيمها فى التفاعلات الكيميائية العادية ، فإن أى عملية أكسدة ستصاحبها بالتالى عملية إختزال ، ولذلك فإنه يمكن إعتبار كل تفاعلات الأكسدة والإختزال " ***تفاعل لمادة مؤكسدة مع مادة مختزلة*** " ، فتختزل المادة المؤكسدة وتؤكسد المادة المختزلة . ويمكن أن تعمل المادة المتفاعلة أو تلك الناتجة من التفاعل كدليل ***indicator*** تحدد به نقطة إنتهاء التفاعل . فالبرمنجنات ، على سبيل المثال ، ذات لون قرنفلى غامق ، بينما يكون لون أيون المنجنوز أحمر شاحب جدا ، لذلك ففى عملية المعايرة بالبرمنجنات لا يستخدم دليل لتحديد نقطة الإنتهاء (التفاعل) لأن المواد المتفاعلة تقوم بنفس عمل الدليل ***built-in indicator*** .

وبوجه عام ، فلتفاعلات الأكسدة والإختزال تطبيقات محدودة عند إستخدامها فى التقدير الكمى للمعادن فى الأغذية . ويمكن إستخدامها فى تقدير تركيز الكالسيوم ، والحديد ، والنحاس ، واليود. كما أصدرت هيئة المحللين الكيميائيين الرسمية طريقة تحليل برقم 990.28 لتقدير السلفيت فى الأغذية المصنعة ، وكذلك طريقة أخرى برقم 967.21 لتقدير حامض الأسكوربيك بإستخدام دليل أكسدة وإختزال ألا وهو 6,2 ثنائى كلورو فينول إندوفينول .

1.2.1.5. تقدير الكالسيوم بالمعايرة بنظام أكسدة وإختزال :

تناولنا من قبل عملية تقدير الكالسيوم بطرق الوزن النوعى ، وبيننا كيفية ترسيبه على صورة أكسالات كالسيوم والتى يتم غسيلها لإزالة بعض المواد المتداخلة . ولتقدير الكالسيوم بطريقة الأكسدة والإختزال تذاب أكسالات الكالسيوم فى حامض الكبريتيك ، ويسخن المحلول ، وتجرى عملية المعايرة بواسطة برمنجنات البوتاسيوم حتى نصل لنقطة الإنتهاء ***End point*** ذات اللون الأحمر الفاتح . وبحجم وعيارية برمنجنات البوتاسيوم المستهلكة حتى الوصول لنقطة التعادل يمكن حساب محتوى العينة من الكالسيوم .

2.2.1.5. تقدير الحديد بتفاعل أكسدة وإختزال وتفاعل لونى (*AOAC برقم 944.02*) :

هناك عددا من المركبات العضوية تعمل بكفاءة عالية كأدلة أكسدة وإختزال . وتكون هذه المركبات العضوية ألوانا ثابتة يمكن تقديرها لونيا بقياس إمتصاصها للضوء عند طول موجى معين . فالحديد يتم تقديره بعد إرتباطه مع مركبات عضوية فيكونا معقدا ملونا يتناسب تركيز لونه طرديا مع كمية الحديد . ويلزم عند إجراء هذا التقدير غسيل كل كل الأدوات الزجاجية بالحامض ثم تنقع هذه الأدوات ثلاث مرات فى الماء مقطر لتجنب أى تلوث بالحديد . ولأن معظم الجواهر الكشافة تحتوى على حديد لذلك يجب إستخدام بلانك عند تقدير الحديد . ويتميز تقدير الحديد بهذه الطريقة بالبساطة والسهولة عن تقديره بإستخدام طريقة طيف الإمتصاص الذرى .

ويبين شكل (1.5) رسما تخطيطيا لتقدير الحديد بمعايرته بنظام أكسدة وإختزال :

obeikandi.com

• زن فى بوتقة نظيفة جافة وزنة من عينة المادة الغذائية تتوقع أن تحتوى على 50–500 ميكروجرام من الحديد

▼

• أضف للعينة فى البوتقة 10 مل من مخلوط جليسيرول–إيثانول (بنسبة1:1) وجفف بحرارة هادئة لتجنب الطرطشة Splattering

▼

• إحرق العينة فى فرن رماد على 600°م لمدة 24 ساعة

▼

• برد العينة ثم أضف 1 مل من حامض النيتريك المركز ثم بخر حتى الجفاف

▼

• إحرق العينة مرة ثانية على 600°م لمدة ساعة واحدة لإزالة أى آثار جزيئات كربون

▼

• برد ثم أضف لمخلوط الرماد 5 مل من حامض الهيدروكلوريك 6 ع

▼

• سخن فى حمام بخار لمدة 15 دقيقة

▼

• رشح من خلال ورق ترشيح مقوى فى دورق معيارى 100 مل ثم إغسل ورق الترشيح 3 مرات بماء ساخن مقطر

▼

• أكمل الدورق المعيارى حتى العلامة (100 مل) بعد إنخفاض درجة حرارة الراشح حتى درجة حرارة الغرفة

▼

• إنقل بماصة 10 مل من محلول الرماد الذائب من الدورق المعيارى سعة 100 مل إلى دورق معيارى آخر سعة 25 مل

▼

• أضف 1.0 مل من محلول هيدروكلوريد الهيدروكسيل أمين بتركيز 10 % للدورق المعيارى سعة الـــ 25 مل

▼

obeikandl.com

• أترك المحلول للثبات ، بعد خلطه جيدا لعدة دقائق

▼

• أضف للدورق المعيارى (25 مل) 5 مل من محلول الخلات المنظم (ويحضر بإذابة 8.3 جم من خلات الصوديوم فى 20 مل ماء مقطر فى دورق معيارى حجمه 100 مل ثم أضف 12 مل حامض خليك وأكمل الحجم بالماء المقطر حتى 100 مل تماما فى الدورق المعيارى)

▼

• أضف 1 مل من محلول أورثوفينانثرولين *orthophenanthroline* بتركيز 0.1 % أو يمكن إستخدام بديل له محلول ألفا ، ألفا داى بيريديل *α,α dipyridyl* وذلك لإظهار اللون

▼

• خفف بالماء المقطر حتى العلامة فى الدورق المعيارى (25 مل)

▼

• إترك المحلول فى الدورق المعيارى لمدة 30 دقيقة لإتمام التفاعل

▼

• إقرأ الإمتصاص الضوئى بجهاز *spectrophotometer* على طول موجى 510 نانوميتر

شكل (1.5): رسم تخطيطى لطريقة تقدير الحديد بإستخدام تفاعلات الأكسدة والإختزال ، والقياس الضوئى (طريقة *AOAC* برقم 944.02)

• **إعداد المنحنى القياسى :**

1- حضر محلول حديد قياسى *stock* بتركيز 100 جزء فى المليون ، وذلك بإذابة 0.1 جم من سلك حديد نقى (*A.R*) فى 20 مل محلول حامض هيدروكلوريك مركز فى دورق معيارى سعة لتر ثم خفف وأكمل حتى العلامة بماء مقطر .

2- حضر تخفيفات قياسية من المحلول السابق (*stock solution*) بسحب 0.0 ، 2.0 ، 5.0 ، 10.0 ، 15.0 ، 20.0 ، 25.0 ، 30.0 ، 35.0 ، 40.0 ، 45.0 مل من المحلول المركز (100 جزء فى المليون) ثم أضف 2 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز وأكمل للعلامة فى دورق معيارى سعة 100 مل.

3- تعتبر كل 10 مل من المحاليل المعدة فى الخطوات الثانية 10 مل من العينة المعدة بطريقة التحليل المشار إليها سالفا .

4- إرسم المنحنى القياسى بتوقيع كل قيمة للإمتصاص الضوئى على طول موجى A_{450} قرين تركيز الحديد

5- وقع على المنحنى المرسوم قيمة الإمتصاص الضوئى للعينة للحصول على تركيز الحديد فيها.

3.1.5. طريقة المعايرة بالترسيب *Precipitation titration* :

عندما يكون أحد مواد التفاعل بالمعايرة راسب غير ذائب يمكن تقديره بطرق تعرف بطرق المعايرة بالترسيب . وهناك طريقتان للمعايرة بالترسيب إحداهما يطلق عليها موهر ***Mohr*** ، والثانية يطلق عليها طريقة فولهارد ***Volhard*** . وتستخدم هاتين الطريقتين فى الصناعات الغذائية لتقدير الكلوريد . حيث تعتمد طريقة موهر لتقدير الكلوريد على تكوين راسب صلب ذا لون برتقالى من كرومات الفضة . وتكون نقطة إنتهاء هذا التفاعل هى بداية ظهور اللون البرتقالى وتتلخص خطوات طريقة موهر لتقدير % للملح بتقدير أيون الكلوريد ثم حساب % للملح بضرب % للكلوريد فى المعامل (0.585) كما نوضحها فى الشكل التخطيطى التالى (شكل 2.5):

1.3.1.5. طريقة موهر *Mohr* لتقدير الملح فى الزبد

▼

• زن حوالى 5 جم من الزبدة فى دورق مخروطى سعة 250 مل وضف عليها 100 مل من الماء المغلى

▼

• أترك المحلول من 5 – 10 دقائق مع التقليب كل فترة

▼

• أضف 2 مل من محلول كرومات البوتاسيوم 5 % المذاب فى ماء مقطر سبق غليه

▼

• عاير بإستخدام محلول نيترات فضة 0.1 ع حتى نقطة الإنتهاء التى تتميز بلون برتقالى بنى يثبت لمدة 30 ثانية

شكل (2.5): شكل تخطيطى يبين طريقة موهر لتقدير الملح فى الزبد

(طريقة *AOAC* برقم 960.29)

obeikandl.com

* معايرة المحلول القياسى لنيترات الفضة 0.1 ع :

أ- زن بدقة 300 مجم من محلول كلوريد البوتاسيوم (*KCl*) المعاد التبللوروالمجفف وإنقله إلى دورق مخروطى سعة 250 مل مع 40 مل ماء مقطر .

ب- أضف 1 مل من كرومات البوتاسيوم (K_2CrO_4) وعاير بإستخدام محلول نيترات الفضة $AgNO_3$ (0.1 ع) حتى يبدأ ظهور اللون الأحمر البنى الشاحب .

ج- من حجم المعايرة السابق بالملليلتر ، إطرح عدد ملليلترات نيترات الفضة اللازمة لمعايرة 1 مل من كرومات البوتاسيوم المذاب فى 75 مل من الماء .

د- إحسب عيارية نيترات الفضة من الخطوة ج والحجم الثانى لنيترات الفضة كما يلى:

$$\text{عيارية نيترات الفضة} = \frac{\text{عدد ملليجرامات كلوريد البوتاسيوم}}{\text{عدد ملليلترات نيترات الفضة} \times 74.555 \text{ جم كلوريد بوتاسيوم/مول}}$$

* حساب نسبة الملح فى الزبد :

$$\text{\% للملح} = \frac{\text{عدد ملليلترات نيترات الفضة } 0.1 \text{ ع} \times 0.585}{\text{وزن العينة بالجم}}$$

حيث 0.585 = (58.5 جم كلوريد صوديوم/مول)/100

2.3.1.5. طريقة فولهارد *Volhard method* لتقدير الكلوريد

تعتبر طريقة فولهارد طريقة غير مباشرة أو طريقة معايرة رجعية ***Back titration*** حيث يضاف حجم من محلول عيارى من نيترات الفضة ليكفى وزيادة للتفاعل مع كل الكلوريد فى المحلول المحتوى عليه ، ثم تعادل الزيادة من نيترات الفضة رجعيا بواسطة محلول قياسى من ثيورينات البوتاسيوم أو الأمونيوم ***potassium or ammonium thioryinate*** وتستخدم أيونات الحديديك كدليل . وتتلخص معادلات تقدير الكلوريد بطريقة فولهارد فيما يلى :

$Ag^+ + Cl^- \longrightarrow AgC$ (حتى ترتبط كل أيونات الكلوريد)

$Ag^+ + SCN^- \longrightarrow AgSCN$ (للتقدير الكمى للفضة غير المتفاعلة مع الكلوريد)

$SCN^- + Fe^{+3} \longrightarrow FeSCN$

obeikandi.com

(يعطى هذا التفاعل لونا أحمر عندما لا ترتبط أى ثيوسيانات مع الفضة)

وفيما يلى رسم تخطيطى لتقدير الكلوريد بطريقة فولهارد (شكل 3.5) :

• بلل 5.0 جم من العينة فى بوتقة بواسطة 20 مل من محلول كربونات الصوديوم Na_2CO_3 فى الماء ، ثم بخر حتى الجفاف

▼

• ضع البوتقة على سطح ساخن حتى يتوقف الدخان

▼

• إحرق العينة فى فرن على 500°م لمدة 24 ساعة

▼

• أذب المتبقى بالبوتقة فى 10.0 مل من محلول حامض النيتريك 5.0 ع

▼

• خفف بالماء المقطر حتى يصل الحجم الكلي للمحلول إلى 25.0 مل

▼

• عادل المحلول السابق بواسطة محلول قياسى من نيترات الفضة (0.1 ع) حتى يتوقف ترسيب كلوريد الفضة الأبيض اللون ثم ضف كمية زائدة من نيترات الفضة

▼

•يقلب المحلول جيدا ثم يرشح من خلال ورق ترشيح ، وإغسل راسب كلوريد الفضةجيدا

▼

• أضف 5 مل من محلول مشبع من ثيورينات الأمونيوم $[FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O]$ إلى كل من محلول الغسيل مع الراشح

▼

• أضف 3 مل من حامض النيتريك 12.0 ع، ثم عادل الزيادة من نيترات الفضة بواسطة ثيوسيانات البوتاسيوم (***KSCN***) 0.1 ع

شكل (3.5) : رسم تخطيطى لتقدير الكلوريد بطريقة فولهارد

obeikandl.com

* معايرة محلول ثيوسيانات البوتاسيوم القياسي :

لمعايرة المحلول المحلول القياسي 0.1 ع لثيوسيانات البوتاسيوم ، قس بدقة 40 – 50 مل من محلول نيترات الفضة القياسي وأضفه إلى 2 مل من محلول ثيورينات الأمونيوم $FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$ المستخدم كدليل ثم أضف 5 مل من حامض النيتريك (9 ع). ثم عادل المحلول السابق بإستخدام محلول الثيوسيانات حتى يظهر اللون الوردى الناتج بعد التقليب الجيد .

* حساب تركيز الكلوريد ($C\bar{l}$) :

الحجم الصافى لنيترات الفضة = الحجم الكلى لنيترات الفضة المضافة – حجم نيترات الفضة المعاير بالثيوسيانات .

وكل 1 مل من نيترات الفضة 0.1 مولر يساوى 3.506 مجم من الكلوريد.

وفيما يلى بعض أهم الإعتبارات الواجب مراعاتها أثناء التقدير بطريقتى موهر، فولهارد :

1- أوضحنا سابقا أنه يمكن تقدير الملح فى الأغذية بمعايرة أيون الكلوريد بالفضة . ويظهر اللون البرتقالى لنقطة الإنتهاء عندما ترتبط كل أيونات الكلوريد ، وتتفاعل كمية الفضة الزائدة لتكوين كرومات الفضة الملونة . ولذلك فإنه عند إعداد أى جواهر كشافة لهذا الإختبار يجب إستخدام ماء سبق غليه لتجنب تداخل أيونات الكربونات فى الماء .

2- وفى حالة تقدير الكلوريد بطريقة فولهارد ، يلزم أيضا غلى الماء لتجنب أى تداخل من الكربونات حيث تتميز درجة ذوبان كربونات الفضة بأنها أعلى من درجة ذوبان كلوريد الفضة .

3- عند تقدير الكلوريد بالمعايرة يمكن حساب وزن الملح بضرب وزن الكلوريد فى 1.648 .

4.1.5. الطرق اللونية لتقدير العناصر المعدنية

تمتص بعض الموجات الضوئية فى المنطقة المرئية للطيف الكهرومغناطيسى بينما ترتد بعض هذه الموجات من جراء إنعكاسها بعد إصطدامها بالمادة . ويتكون اللون الذى نراه للمادة من المدى الذى يقع فيه الطول الموجى للضوء المنعكس . ولكى يمكن إستخدام

obeikandl.com

الطرق اللونية فى تقدير عنصر ما ، يتحتم أن ينتج عن التفاعل الكيميائى لون ثابت تكون بتفاعل ما محدد مع العنصر المطلوب تقديره . وتعنى زيادة كثافة هذا اللون زيادة تركيز العنصر المقدر ونتيجة لذلك يقل الضوء المار خلال المحلول. وكلما زادت المسافة التى يمر من خلالها الضوء يقل أيضا الضوء النافذ . ويحكم هذه العلاقات سويا قانون بيير *Beer's law* . وبالتقدير الكمى للضوء المار خلال محلول أو على العكس ، الضوء الممتص فى المحلول يمكن تقدير تركيزات المواد المتفاعلة . هذا ، وقد تم إستخدام تلك الأسس لتقدير التركيز لمعادن كثيرة .

1.4.1.5. الطريقة اللونية لتقدير الفوسفور :

من الطرق الشائعة فى القياسات اللونية إستخدام مركب الموليبدوفانادات *molybdovanadate* والذى يتفاعل مع الفوسفور لإنتاج لون ثابت من مركب الفوسفوموليبدوفانادات *phosphomolybdovanadate* . ويتميز اللون الناتج بثباته العالى مما يعطى الأفضلية لتقدير الفوسفور بهذه الطريقة . ويوضح الشكل التخطيطى التالى (شكل 4.5) طريقة التقدير اللونية للفوسفور.

تقدير الفوسفور بالطريقة اللونية

- إحرق 2 جم من العينة على 600°م لمدة 4 ساعات

▼

- برد ثم أضف 5 مل من محلول حامض الهيدروكلوريك 6 ع ، وبضع نقاط من حامض النيتريك

▼

- سخن لإذابة الرماد كلية

▼

- برد ثم إنقل الرماد الذائب إلى دورق معيارى سعة 100 مل وأكمل الحجم بالماء المقطر حتى العلامة

▼

- إسحب بماصة جزء من المحلول فى الدورق المعيارى (تتوقع أن يحتوى على 0.5 – 1.5 مجم فوسفور) وإنقله إلى دورق معيارى آخر سعة 100 مل .

▼

* أضف إلى المحلول السابق 20 مل من دليل المولبيدوفانادات (يحضر هذا الدليل كالتالى): (أنب 20 جم من موليبدات الأمونيوم فى 200 مل ماء ساخن ، ثم أذب 1 جم من ميتافانادات الأمونيوم *Ammonium meta vanadate* فى 125 مل ماء ساخن وبعد تبريده يضاف إليه 140 مل حامض نيتريك مركز ، يخلط محلول الموليبدات والفانادات بعد تبريدهما فى دورق معيارى سعة 1 لتر ويكمل الحجم حتى العلامة بالماء المقطر) ، وأكمل الحجم حتى العلامة (1000 مل).

▼

* أترك المحلول حتى ظهور اللون المميز للتفاعل فى مدة 10 دقائق

▼

* إقرأ الإمتصاص الضوئى على 400 نانوميتر (A_{400}) وإحسب تركيز الفوسفور من المنحنى القياسي له .

إعداد المنحنى القياسى

▼

حضر محلول *stock* يحتوى على 2 مجم فوسفور/مل ، بوزن 8.7874 جم من فوسفات البوتاسيوم الحامضية KH_2PO_4 والتى تم تجفيفها على 105°م لمدة ساعتين.

▼

إنقل الكمية السابقة كميا لدورق معيارى سعة 1 لتر ثم أضف حوالى 750 مل ماء مقطر لإذابة فوسفات البوتاسيوم ثم أكمل الحجم بالماء المقطر حتى العلامة .

▼

ضع هذا المحلول فى الثلاجة حتى يحين وقت إستخدامه.

▼

حضر محلول التشغيل *working solution* الذى يحتوى على 0.1 مجم فوسفور/ مل ثم إجرى التخفيف بنقل 50 مل من محلول التشغيل القياسى أحجام 0 ، 5 ، 8 ،10 ، 15 مل لدوارق معيارية سعة 100 مل (تمثل التخفيفات السابقة ما مقدارة 0.0 ، 0.5 ، 0.8 ، 1.0 ، 1.5 مجم فوسفور على التوالى).

▼

obeikandi.com

أضف 20 مل من محلول الجوهر الكشاف الموليبدوفانادات لكل دورق معيارى سعة 100 مل يحتوى على المادة القياسية

▼

خفف بالماء المقطر حتى علامة 100 مل بالدورق المعيارى وإخلط جيدا .

▼

إترك الدوارق السابقة لمدة 10 دقائق لإستكمال ظهور اللون .

▼

إقرأ الإمتصاص الضوئى على 400 نانوميتر ، وإستخدم المحلول القياسى الذى لم يضاف إليه محلول فوسفات البوتاسيوم الحامضية لضبط مؤشر جهاز قياس اللون على صفر إمتصاص.

شكل (4.5):شكل تخطيطى لطريقة تقدير الفوسفور اللونية (*AOAC* برقم 986.24)

5.1.5. تقدير العناصر المعدنية بالإلكترودات الإختيارية للأيونات:

Ion selective electrodes:

سبق أن تناولنا الأساس العلمى لهذا الموضوع عند حديثنا عن تقدير أيونات الهيدروجين فى الباب ، فهل يمكن تطبيق طريقة قياس فرق الجهد لتقدير أيونات أخرى ؟ أجريت دراسات عديدة للإجابة على هذا التساؤل ، وإنتهت تلك الدراسات بتطوير إلكترودات عديدة للقياس المباشر للكاتيونات والأنيونات كالبروميد ، والكالسيوم ، والكلوريد ، والفلوريد ، والبوتاسيوم ، والصوديوم ، والسلفيد ، كما أنتجت إلكترودات أخرى لتقدير الغازات الذائبة مثل الأمونيا ، وثانى أكسيد الكربون ، والأكسجين . وبرغم محدودية إستخدام بعض هذه الطرق بسبب تداخل أيونات أخرى أثناء التقدير إلا أنه غالبا ما يمكن التغلب على هذه المشكلة بضبط رقم الـ pH أو إختزال المادة المتداخلة أو إزالتها بواسطة تكوين معقد أو حتى ترسيبها .

ومن وسائل تغيير حساسية الغشاء لأيونات أخرى غير تلك التى يتم تقديرها تغيير تركيب الزجاج فى الإلكترود الزجاجى . وعلى سبيل المثال ، يتميز غشاء الإلكترود الزجاجى ذا تركيب من 71 % أكسيد سليكون ، 11 % أكسيد صوديوم ، 18 % أكسيد

ألومنيوم بحساسيته الإختيارية لعنصر البوتاسيوم . وهناك أيضا الغشاء الزجاجى للإلكترود الحساس للصوديوم ***glass membrane sodium-indicating electrode*** ويمكنه الكشف على تركيزات من الصوديوم تتراوح بين 0.023 إلى 23000 جزء فى المليون . إلا أن هذا الإلكترود يعيبه إحتمال تداخل أيونات أخرى أثناء التقدير مثل أيونات الفضة ، والليثيوم ، والبوتاسيوم ، والأمونيوم . وتتميز تلك الإلكترودات بإنخفاض زمن القياس (أو ما يعرف بزمن الإستجابة ***response time***) إلى أقل من 30 ثانية. ومن الإلكترودات المستخدمة أيضا فى هذا المجال الإلكترود المكون من بوليمر ، وهو إلكترود إختيارى لأيون الصوديوم ويستخدم معه إلكترود كالوميل مرجعى كنصف خلية . وتجدر الإشارة فى هذا الصدد إلى وجود أنواع أخرى من الإلكترودات تعرف بإلكترودات الحالة الصلبة الإختيارية للأيونات ***solid-state ion-selective electrodes*** ولا يستخدم فى تلك الإلكترودات أغشية زجاجية حساسة ، بل يستخدم بدلا منها غشاء نشط يتكون من بللورة غير عضوية معاملة بتراب نادر ***rare earth*** . ومن أمثلة هذا النوع من الإلكترودات الحديثة إلكترود الفلوريد ، والذى يتكون من بللورة كلوريد اللانثانوم ***Lanthanum chloride*** المعاملة باليوروبيوم ***europium*** والتى تسمح بإنتقال الشحنة الأيونية ، وتقلل من المقاومة الكهربية ، ويمكن الكشف بهذا الإلكترود عن تركيزات منخفضة من الفلوريد تصل إلى 0.02 جزء فى المليون . وهناك أيضا إلكترودات حالة صلبة-إختيارية للأيونات متاحة فى الأسواق يمكن بها الكشف عن حد أدنى من تركيزات البروميد والكلوريد يصل إلى 0.04 ، 0.178 جزء فى المليون على التوالى ، وتتميز جميع إلكترودات الحالة الصلبة أن زمن تقدير الأيونات المختلفة بها لايتجاوز 30 ثانية . ويعيب تلك الإلكترودات إحتمالات تداخل أنيونات أخرى أثناء التقدير .

وبالإضافة للأنواع المختلفة من الإلكترودات الزجاجية وإلكترودات الحالة الصلبة فهناك أنواع أخرى من الإلكترودات مثل إلكترودات الترسيب المشبع ***precipitate-impregnated*** ، وأغشية السائل مع السائل ***liquid-liquid membrane*** ، وكذلك الإلكترودات الإنزيمية . وفى الأونة الأخيرة إزداد إستخدام الإلكترودات الحساسة للغاز ***gas-sensing electrodes*** والتى يستخدم فيها غشاء منفذ للغاز وإلكترود مركب يتكون من إلكترود pH مع محلول منظم فى طبقة رقيقة من المحلول المنظم والذى يحيط

بإلكترود الـــ pH المركب . ويؤدى ذوبان الغاز لتغيير رقم pH المحلول فيقيس هذا التغير الإلكترود المركب . هذا وقد أمكن بمثل هذه الإلكترودات قياس تركيز غازات الأمونيا ، وثانى أكسيد الكربون ، وثانى أكسيد الكبريت ، والأكسجين .

1.5.1.5. علاقة النشاط بالتركيز *Activity Versus Concentration* :

عند إستخدام الإلكترودات الإختيارية للأيونات يجب أن ندرك عزيزى الطالب مفهومى النشاط ، والتركيز حيث يعتبر النشاط ***activity*** مقياسا للفعالية الكيميائية ***chemical reactivity*** ، بينما يكون التركيز هو المقياس لكل صور الأيونات فى المحلول سواء المرتبطة أو الحرة . وبسبب التفاعلات التى قد تحدث بين الأيونات وبعضها أو بين الأيونات والمذيب فإن التركيز الفعال أو النشاط يكون عادة أقل من التركيز الفعلى . ويمكن ربط النشاط بالتركيز بالمعادلة الآتية :

$$C \times V = A$$

حيث A = النشاط ، V = معامل النشاط ، C = التركيز

وحينئذ يكون معامل النشاط دالة للقوة الأيونية ***ionic strength*** ، وتكون القوة الأيونية دالة للتركيز ، وللشحنات على كافة الأيونات فى المحلول . وبضبط القوة الأيونية لكل العينات المختبرة وكذلك المحاليل القياسية عند مستوى ثابت تقريبا ، يمكن إستخدام معادلة ***Nernst*** للربط ما بين إستجابة الإلكترود وتركيز المادة التى يتم قياسها . ومن الناحية العملية تضبط القوة الأيونية لكل من العينات المختبرة والمواد القياسية التى تستخدم فى المعايرة إلى قوة أيونية مرتفعة وثابتة بإستخدام المحلول المنظم المناسب . وتعمل المحاليل المنظمة أيضا على إلغاء أثر الأيونات الأخرى المتداخلة ، وضبط رقم الـــ pH ، وكذلك تحد من التداخلات الكيميائية التى تسببها عمليتى الإرتباط ، وتكوين المعقدات ***complexation*** . وتجدر الإشارة فى هذا الصدد ، إلى ضرورة مراعاة الإعتبارات التالية عند قياس تركيز أنواع الأيونات المختلفة بإستخدام الإلكترود الإختيارى للأيونات :

1- المحافظة على جهد ثابت للإلكترود المرجعى .

2- إجراء الإختبار على درجة حرارة ثابتة .

3- ضبط القوة الأيونية بدقة .

obeikandl.com

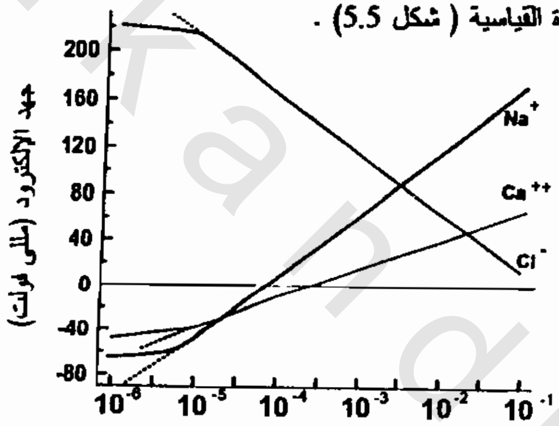
4- ضبط رقم الـ pH .

5- إزالة أية تداخلات أيونية .

6- تجنب تداخل طرق التقدير .

2.5.1.5. المنحنى القياسى *Calibration Curve*

عند تحليل العناصر المعدنية بإستخدام الإلكترودات الإختيارية للأيونات يصبح عمل المنحنى القياسى أمرا حتميا ويتم ذلك بغمر كلا من الإلكترودين (المرجعى ، الدليل) فى سلسلة من محاليل الأيونات موضع التقدير ، معلومة التركيز . ثم يسجل فرق جهد الإلكترود الناشئ فى هذه المحاليل القياسية بالمللى فولت ، وتوقع النتائج على ورق رسم بيانى يعبر محوره الصادى (Y) عن قيم فرق الجهد ، ويعبر محوره السينى (X) عن لوغاريتم تركيز المادة القياسية (شكل 5.5) .



شكل (5.5): أمثلة لبعض المنحنيات القياسية لبعض العناصر المقدرة بطريقة الإلكترودات الإختيارية للأيونات

وبعد رسم المنحنى القياسى ، يتم تحليل العينة المرغوب تقدير تركيز العنصر فيها ، ومن قراءة فرق الجهد يمكن من المنحنى القياسى معرفة تركيز العنصر . ودائما يتميز المنحنى القياسى بجزء خطى ناجم عن الإستجابة الثابتة للإلكترود (مقاسة بالمللى فولت) للتغيرات فى التركيز . ويوضح شكل (5.5) بعض الأمثلة لمنحنيات قياسية لأيونات

مختلفة ، ويلاحظ فى هذه المنحنيات مناطق غير خطية خاصة عند التركيزات المنخفضة من الأيونات (شكل 5.5) . ومما تجدر الإشارة إليه أن أهم عاملان يحددان أقل مستوى للكشف عن نشاط أيونات العناصر المعدنية هما القوة الأيونية الكلية ، وتركيزات الأيونات المتداخلة .

وقد يستخدم جهاز الـ pH ذا التدريجين أحدهما لقياس الـ pH والأخر لقياس فرق الجهد بالمللى فولت لتحليل أيونات العناصر المعدنية بالإلكترودات الإختيارية . فببساطة يمكن إستبدال الإلكترود الزجاجى المستخدم لقياس الـ pH بالإلكترود الإختيارى المناسب لأيون عنصر معين ، مع ضرورة إتباع تعليمات وإرشادات طريقة التحليل المناسبة .

ومن أمثلة إستخدامات الإلكترودات الإختيارية للأيونات ، إستخدامها فى : تقدير الملح والنيترات فى اللحوم المصنعة ، تحديد محتوى الزبد والجبن من الملح ، تقدير الكالسيوم فى اللبن ، تقدير عنصر الصوديوم فى الآيس كريم منخفض الصوديوم ، تقييم ثانى أكسيد الكربون فى المشروبات الغازية ، تحديد مستويات الصوديوم والبوتاسيوم فى البيرة والخمور ، تقدير النيترات فى الخضروات المعلبة ، وهناك أيضا تطبيقات أخرى لايتسع المجال لذكرها . هذا وقد أصدرت هيئة المحللين الكيميائيين الرسمية طريقة لتقدير الصوديوم فى الأغذية المحتوية عليه بنسب أقل من 100 مجم / 100 جم (طريقة *AOAC* برقم 976.25).

ومن أهم مميزات إستخدام طريقة الإلكترودات الإختيارية للأيونات قدرتها على قياس عدد كبير من الأنيونات والكاتيونات بصورة مباشرة . وهذه القياسات بسيطة نسبيا وسريعة فى الإجراء عند مقارنتها بطرق التحليل الأخرى .

قد لايحتاج تقدير أيونات العناصر بطريقة الإلكترودات إختيارية أجهزة إضافية ، فجهاز قياس الـ pH يمكن إستخدامه أيضا فى قياس فرق الجهد (بالمللى فولت) .

ومن مميزات تلك الطريقة أيضا عدم تأثر عملية القياس بصفات غير مرغوبة فى طرق القياس الأخرى مثل وجود عكارة فى محلول القياس، أو لونه ، أو لزوجته .

ويعاب على طريقة قياس العناصر المعدنية بالإلكترودات الإختيارية للأيونات ما يلى :

1- عدم قدرتها على قياس التركيزات المنخفضة والأقل من 2 – 3 جزء فى المليون ولو أن هناك أنواع قليلة جدا من الإلكترودات يمكنها قياس تركيزات منخفضة حتى 1 جزء فى البليون .

2- بطئ إستجابة الإلكترود عند التركيزات المنخفضة للأيونات والأقل من 10^{-4} مولر .

3- إحتمال قصر فترة صلاحية الإلكترودات الإختيارية مما يجعل فترة تشغيلها محدودة .

6.1.5. إطلالة على بعض الطرق الأخرى لتقدير العناصر المعدنية :

1.6.1.5. تحليل طيف الإنبعاث *Emmission Spectroscopy* :

يعتبر جهاز تحليل طيف الإنبعاث من أجهزة التحليل المعروفة خاصة لتحليل العناصر النادرة . وتعتمد فكرة عمل الجهاز على ملاحظة وقياس الإشعاع الصادر من ذرات العناصر المختلفة بعد إثارتها فتتأرجح الإلكترونات المدارية لتلك العناصر وتهبط لمستوى طاقة أقل فيصدر عنها بالتالى طاقة إشعاعية بأطوال موجات مميزة لكل عنصر على حدى. وبتعريف وتمييز الأطوال الموجية فى الطيف المنبعث من هذه الذرات يمكن تحليل العينة ومعرفة أنواع ذرات العناصر المكونة للعينة موضع التحليل .

2.6.1.5. قياس شدة الوهج الضوئى *Flame photometry* :

يتكون جهاز قياس شدة الضوء الناتج عن حرق الرماد باللهب ***flame*** من مرذاذ ***atomizer*** (وحدة إنتاج رذاذ) ، بعض وسائل لعزل الجزء المقدر من الطيف المنبعث ، كشاف حساس لشدة الضوء ، وفى بعض الأحيان وحدة تكبير ***amplifier*** وكذلك طريقة لقياس الإنبعاث بواسطة جلفانوميتر ، مقياس إخفاء ***null meter*** ووحدة لتسجيل البيانات. وقد إستخدم هذا الجهاز بصفة أساسية لتقدير عناصر الكالسيوم ، الصوديوم ، البوتاسيوم .

3.6.1.5. قياس طيف الإمتصاص الذرى *Atomic absorption*

إنتشرت فى الآونة الأخيرة إستخدام جهاز قياس طيف الإمتصاص الذرى فى مختبرات الأغذية لقياس تركيز العناصر المعدنية بسبب سرعة إنجازه للتحليل (يمكن إجراء 1000 تحليل فى الأسبوع) ، حدود الكشف والتى تتراوح بين 0.01 جزء فى المليون لعنصر كالماغنسيوم وحتى 5 جزء فى المليون للباريوم ، كما أن الجهاز نسبيا غير مكلف (يبلغ ثمنه حوالى 20000 دولار). وعادة ما يكون العامل المحدد لعمل الجهاز هو إحتياج كل عنصر أو مجموعة من العناصر للمبات كاثودية خاصة للتقدير . ويعتبر قياس طيف الإمتصاص الذرى من الطرق التحليلية والتى تعتمد على إمتصاص الإشعاع

obeikandi.com

فوق البنفسجى ***ultraviolet*** أو المرئى ***visible*** لذرات حرة فى الحالة الغازية . ويستخدم هذا الجهاز بصورة كبيرة فى قياسات مطياف الكتلة الذرية فى تحليل الأغذية .

هذا وقد لعب جهاز قياس طيف الإمتصاص الذرى ***AAS*** دورا رئيسيا فى تطوير قواعد بيانات العناصر المعدنية الغذائية ، والعناصر المعدنية السامة فى الأغذية . وعندما إنتشر هذا الجهاز فى مختبرات الأغذية فى الستينات والسبعينات من القرن العشرين تطورت طرق قياس الكميات متناهية الصغر من العناصر المعدنية فى العينات البيولوجية مما مهد الطريق لتقدم كبير فى مجالات عديدة كتحليل الأغذية ، علوم التغذية ، والكيمياء الحيوية ، علوم السمية . وقد سبق أن بيننا فى جدول (1.5) العناصر المعدنية التى لها أهمية خاصة فى الأغذية . ونود أن نضيف فى هذا الصدد ، أن قاعدة بيانات عناصر الكالسيوم ، والحديد ، والصوديوم ، والبوتاسيوم فى الأغذية جيدة ومكتملة لحد كبير . أما قواعد بيانات العناصر النادرة ، والعناصر الثقيلة ذات السمية فلازالت تحتاج لمجهودات كبيرة لإستكمالها ونشر بياناتها . وكان لجهاز قياس طيف الإمتصاص الذرى الفضل فى زيادة قدرة المختبرات المختلفة على قياس تركيز وتركيب المعادن فى الأغذية والمواد الأخرى بسرعة ودقة ونتائج مؤكدة لحد كبير .

ومن الناحية النظرية ، يمكن تقدير كل العناصر المتاحة فى الجدول الدورى ***Periodic chart*** بواسطة طيف الإمتصاص ***absorption*** أو الإنبعاث ***emission*** الذرى . أما من الناحية العملية ، فقد إستخدم هذا الجهاز بصفة رئيسية لتقدير العناصر المعدنية ذات الأهمية الغذائية .

2.5. بعض المبادئ العامة المتعلقة بقياس طيف الإمتصاص الذرى
General Principles Related to Atomic Absorption Spectroscopy

1.2.5. تعاريف *Definitions* :

قياس طيف الإمتصاص الذرى ***Atomic Absorption spectroscopy*** : ويقدر "كميا" إمتصاص الذرات المنفصلة جيدا ***well separated*** عن بعضها البعض (وفى حالتها الغازية) للأشعة الكهرومغناطيسية .

أما قياس طيف الإنبعاث الذرى ***Atomic Emission Spectroscopy*** فيقيس الإشعاع المنبعث من الذرات المضطربة أو المثارة (***Exited***) سواء بالحرارة أو بوسائل أخرى . ويناسب قياس طيف الإمتصاص الذرى القياسات التحليلية وذلك لأن الطيف الذرى يتكون من خطوط منفردة (تميزه) ***discrete lines*** ولكل عنصر طيف فريد مميز له ***unique spectrum*** وخاص به وبالتالى يمكن تعريف العناصر وتقديرها كميا بدقة حتى فى وجود ذرات لمعادن أخرى .

2.2.5. إنتقالات الطاقة فى ذرات العناصر *Energy Transitions in Atoms* :

ينتج طيف الإمتصاص الذرى ***Atomic absorption spectra*** عندما تمتص الذرات (الأيونات) فىحالتها الصلبة ***طاقة*** من مصدر ***إشعاعى*** .أما طيف الإنبعاث الذرى ***Atomic emission spectra*** فينتج عندما تنبعث من الذرات المثارة طاقة عند عودتها ***on returning*** للحالة الصلبة الأصلية ***ground state*** . فعندما تمتص الذرة فوتونات إشعاع تقفز ***jump*** إلكتروناتها لمستوى طاقة أعلى مما يصيب الذرة بحالة إضطراب (إستثارة ***excited state***) ، هذا وقد تعود الذرة مرة أخرى إلى سيرتها الأولى كحالة منخفضة فى الطاقة ، وحينئذ ، تطلق الذرة فوتونات . ويعنى ذلك أن الذرة تمتص أو تبعث إشعاع بأطوال موجية مميزة "لكل ذرة على حدى" وذلك لأن مستويات الطاقة المسموح للإلكترونات الإنتقال إليها فى المدارات حول الذرات ثابتة الموضع (أى لكل مستوى طاقة مسافة محددة من نواة الذرة) وليست بعشوائية . ويرتبط تغير طاقة العنصر بإنتقال إلكتروناته بين مستويى طاقة بعلاقة مباشرة مع تردد الطاقة الممتصة ، توضحها المعادلة التالية :

obeikandl.com

$E_c - E_g = h_v$ .... -1

حيث E_c = تمثل طاقة الذرة فى الحالة المثارة (المضطربة) ***Exited state***

أما E_g = تمثل طاقة الذرة فى الحالة العادية ***ground state***

h = ثابت بلانك ***Plank's constant***

وبإعادة ترتيب المعادلة السابقة يكون :

$V = (E_c - E_g)\, h$ .... -2

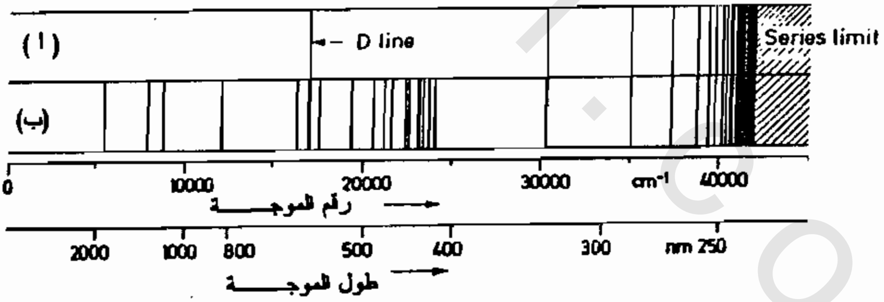
وحيث أن $V = C / \lambda$

فإن $\lambda = (E_c - E_g)\, hc$ .... -3

حيث C = سرعة الضوء .

λ = الطول الموجى للضوء الممتص أو المنبعث .

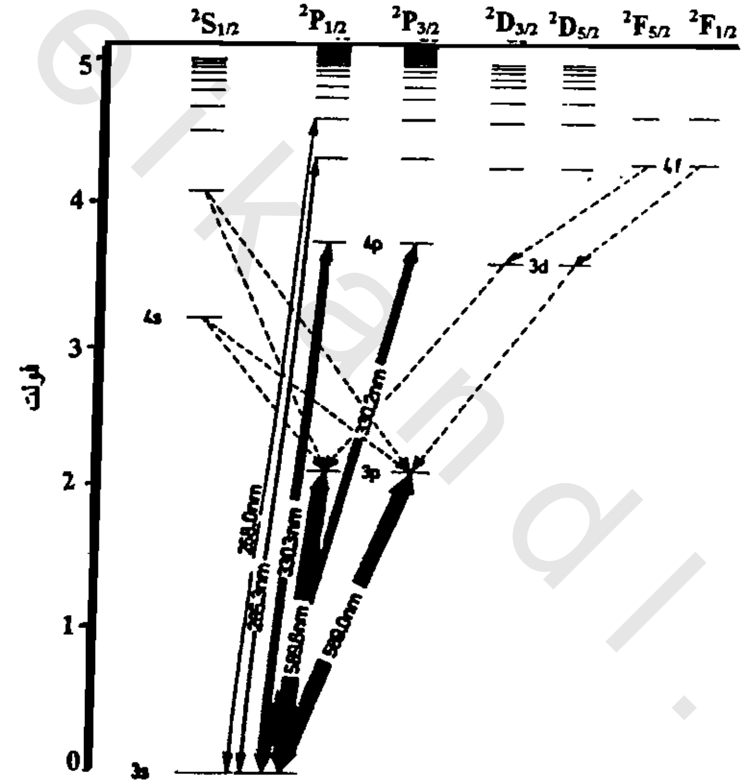
وتبين العلاقة السابقة بوضوح أنه بحدوث إنتقال ***transition*** إلكترونى يمتص أو ينبعث إشعاع بطول موجى معين (منفرد أو مميز لكل ذرة عنصر ما) . ولكل عنصر مجموعة منفردة ***unique*** من الإنتقالات الإلكترونية المسموح بها ولذلك فلكل عنصر طيف مميز له ***unique spectrum*** . ويوضح شكل (6.5) طيفى الإمتصاص ، والإنبعاث ***emission*** لعنصر الصوديوم .



شكل (6.5): أطياف عنصر الصوديوم . يوضح الطيف العلوى " أ " طيف الإمتصاص بينما يوضح الطيف السفلى " ب " طيف الإنبعاث

فللإمتصاص : تحدث الإنتقالات ***transitions*** أولا بإضطراب إلكترونات الذرة وهى فى حالتها الصلبة ولذا فإن عدد الإنتقالات يكون صغيرا نسبيا . أما الإنبعاث ***emission*** ، من ناحية أخرى ، فيحدث عندما تسقط أو تهبط الإلكترونات (فى الصورة المثارة المختلفة) إلى مستويات طاقة أقل ، شاملة ، ولكن لاتقتصر على ، الحالة الصلبة . ولهذا ، يشتمل "طيف الإنبعاث" على خطوط أكثر عما هو الحال بالنسبة "لطيف الإمتصاص" .

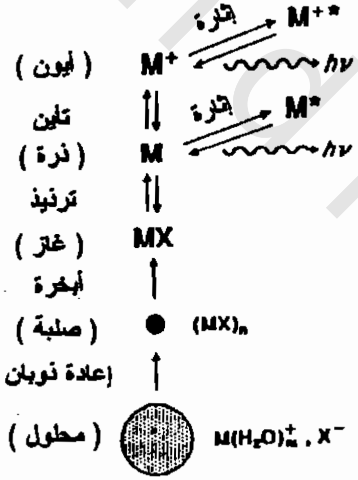
ويوضح شكل (7.5) مستوى الطاقة لإلكترون فى المدار 3s لعنصر الصوديوم .



شكل (7.5) : شكل تخطيطى لمستوى الطاقة لعنصر " الصوديوم " ، ويبين الإنتقالات الإلكترونية بين مستويات الطاقة المسموح بها . يتناسب عرض الخطوط طرديا مع كثافة الإشعاع " الممتص " أو " المنبعث " . وتمثل الخطوط المتصلة *solid lines* الإنتقالات الإلكترونية المسموح بها سواء فى حالة " الإمتصاص " أو حالة " الإنبعاث " أما الخطوط المتقطعة *broken lines* فتمثل الإنتقالات التى تحدث للإلكترونات أثناء " الإنبعاث " *emission* فقط .(المصدر: *VCH Publishers, 1985*) .

3.2.5. فصل العنصر إلى ذراته (الترذيذ) *Atomization* :

يتطلب قياس الطيف الذرى لأن تكون ذرات العنصر (موضع التقدير) فى حالتها الذرية (أى غير مرتبطة مع عناصر أخرى فى صورة مركب) ولذلك يجب فصل تلك الذرات عن بعضها البعض بالإضافة لفصلها عن الإرتباط بأى ذرات أخرى . وفى الأغذية ، فبالتأكيد ، توجد كل العناصر فى صورة مركبات أومعقدات ، ولذلك يجب فصل العنصر إلى ذراته (ترذيذه) " ***atomized*** " قبل إجراء أية قياسات ذرية للإمتصاص أو للإنبعاث . ويعنى مصطلح ***atomization*** (الترذيذ) فصل الجسيمات ***particles*** إلى جزيئات فردية (بالتبخير) ثم يتم تكسير تلك الجزيئات الفردية إلى ذرات منفصلة . ويحدث ذلك عادة بتعرض المادة (التى يتم تحليلها) ***analyte*** إلى درجات حرارة عالية بلهب أوبلازما. حيث يتم إدخال محلول المادة المراد تحليلها إلى لهب أو بلازما ***plasma*** على صورة رذاذ رقيق ***fine mist*** ، فتتبخر المذيب عندئذ بسرعة تاركا الجسيمات الصلبة للمادة (التى يجرى تحليلها) فتبخر تلك المادة وتتحلل إلى ذراتها والتى إما أن تمتص إشعاع (إمتصاص ذرى ***atomic absorption***) أو تثار ***become exited*** فينبعث منها إشعاع (إنبعاث ذرى ***atomic emission***) ويمكن تبسيط ذلك بالشكل (8.5) .



شكل (8.5): تمثيل تخطيطى لعملية ترذيذ ***atomization*** عنصر ما فى لهب أو بلازما .
وتوضح الدائرة الكبيرة أسفل الشكل نقطة من المحلول المحتوى على العنصر M المراد تقديره ويتواجد فى مركب ما .

obeikandl.com

وتجدر الإشارة فى هذا المجال ، إلى أنه توجد ثلاث طرق مختلفة لعملية الترذيذ سنكتفى هنا بتلخيصها فى الجدول (2.5) .

جـــــدول (2.5) : طـــرق فصـــل العناصــــر إلـــى ذرات فـــردية (الترذيذ).

مصدر الطاقة لعملية الترذيذ	درجة حرارة الترذيذ التقريبية (م°)	طريقة التحليل المتبعة
اللهـــــب ***flame***	3150 – 1700	– قياس طيف الإمتصاص الذرى ***AAS*** . – قياس طيف الإنبعاث الذرى ***AES***
كهربى حرارى ***Electrothermal***	3000 – 1200	– قياس طيف الإمتصاص الذرى (فرن الإحتراق الجرافيتى)
المحث المتصل بأرجون البلازما ***Inductively coupled argon plasma***	8000 – 6000	– طريقة مشتركة بين أرجون البلازما وطيف الإنبعاث الذرى ***ICP-AES***

4.2.5. تحليل العناصر بتنشيط النيوترونات ***Neutron activation analysis*** :

فى هذا النوع من أنواع التحليل تعرض العينة المجهولة والمعلومة الوزن وكذلك محلول قياسى يحتوى على وزن معلوم من محلول المقارنة الذى يعتقد أنه يحوى نفس المركب (موضع التحليل) إلى قذائف نووية ***Nuclear bombardment*** مما يسبب حدوث نشاط إشعاعى فى هاتين العينتين (العينة المقاسة ، وعينة المقارنة) . يقارن النشاط الإشعاعى للعنصر الموجود فى العينة المجهولة بالنشاط الإشعاعى لعنصر المقارنة القياسى . وعندئذ تحسب كمية العنصر فى العينة المجهولة بمقارنة نسبة النشاط الإشعاعى بين العينة المجهولة والعينة القياسية . وتتميز طريقة تحليل العناصر بتنشيط النيوترونات بحساسيتها الفائقة ، ودقتها العالية حيث يمكن بها تقدير تركيز العناصر فى حدود 0.001

obeikandl.com

إلى 1.0 جزء فى المليون . كما تتميز تلك الطريقة بتطبيقاتها العديدة فى مجالات الأغذية والنباتات والزراعة بوجه عام وكذلك نتائجها المؤكدة .

5.2.5. تحليل العناصر بإستخدام أشعة إكس *X-ray Spectroscopy* :

هناك ثلاثة إستخدامات لأشعة X فى التحليل الكيميائى . أولها طرق الإمتصاص ***absorption methods*** إلا أن إستخداماتها التطبيقية محدودة لحد كبير وذلك لأن ضبط الطول الموجى أثناء القياس يستلزم حساسية فائقة . وثانيها طرق إنعطاف أشعة X ***X-ray diffraction*** ويتميز هذا التقدير بإمكانية تصوير البللورات ، وفى التعرف على التركيب المعقد للجزيئات البيولوجية . أما الإستخدام الثالث لأشعة X فيعتمد على طرق الإنبعاث ***emission methods*** فى التعرف على المكونات الكيميائية ، سواء كان نوع الإنبعاث ثانوى ***secondary*** أو إنبعاث وميضى ***Fluorescent*** . وعادة ما تفضل طريقة الإنبعاث الوميضى لقياس كثافة الطول الموجى لأشعة الوميض . ويمكن إستخدام تلك الطريقة فى تقدير مجموعة جيدة من العناصر بدءا من الصوديوم ^{11}Na حتى اليورانيوم $^{92}\mu$ سواء كانت فى صورة مسحوق أو سائل أو عينات معدنية . وتبلغ معاملات تباين ***Coefficient of variations*** نتائج هذه الطريقة حوالى 1 % عندما تكون حدود التركيز من 5 – 100 % ، وتتأرجح حول 5 % عندما يتراوح التركيز بين 0.1 إلى 1 % . وتتميز هذه الطريقة بسرعتها إذ يستغرق زمن التحليل ما بين 1 إلى 4 دقائق ، كما أن حساسيتها لا تتأثر بوجود العنصر فى إرتباط ما ، ناهيك عن أن العينة لا تتحطم أثناء القياس ، برغم أن هناك إجراءات خاصة لإعداد العينة . ويعيب تلك الطريقة ، فقط ، إرتفاع سعر جهاز أشعة إكس ، ولذلك ننصح بتوفره فى المختبرات الحكومية .

obeikandi.com

3.5. بعض الطرق المتنوعة لتحليل العناصر

Miscellaneous Methods

* أجرى تقديرا لأنواع عديدة من العناصر النادرة ***trace elements*** فى مختبرات عديدة بطرق مختلفة كالطرق اللونية المتخصصة ، أو طرق تقدير العكارة ***turbidimetric*** ، أو طرق تحليل الوميض أو بطرق الإستقطاب ***polarography*** .

* تم إستخدام طيف إمتصاص الشعة تحت الحمراء فى تقدير الأيونات متعددة الذرات ***polyatomic ions*** .

* كذلك تم إستخدام الطرق الكروماتوجرافية البسيطة للتقديرات الروتينية السريعة للعناصر النادرة فى المحاصيل الزراعية والأغذية .

* وقد كان هناك تطور مشجع فى تطوير أجهزة تسمح بتحليل أساسى وكامل للمعادن فى أنابيب إختبار خارج الجسم ***in situ*** فى التركيبات التى شوهدت فى مقاطع رقيقة بالأنسجة المعدة بالطرق الهيستوباثولوجية القياسية .

* كما أمكن بإستخدام جهاز إحساس إلكترونى للتحليلات الدقيقة ***Electron probe microanalyzer*** يعمل بميكروسكوب ماسح باشعة X ***X-ray scanning*** تحليل بعض المعادن دون أن يتاثر النسيج فى قطاع محدد ومتناهى الصغر يصل إلى 1 ميكروميتر أو فى حجم ضئيل جدا يصل لبضعة ميكرومترات مكعبة . وعادة تبلغ حدود الكشف بهذه الطريقة حوالى 0.1 % . ويمكن بتلك الطريقة قياس نوع وتركيز أنواع عديدة من العناصر المعدنية .

* ومن الطرق التى أعطت نتائج مشجعة فى تقدير العناصر المعدنية طريقة إستخدام وحدة إحساس دقيق ***micro probe*** تعمل بالليزر . حيث تنطلق حزمة من الليزر من عدسة بصرية لميكروسكوب عادى ويتصل هذا الجهاز بمقياس حساس لتحليل الضوء.

* وتجدر الإشارة فى هذا الصدد إلى نجاح بعض الطرق البيولوجية بإستخدام الميكروسكوبات فى تحليل بعض أنواع العناصر المعدنية .

وفيما يلى (جدول 3.5) مقارنة بين بعض طرق تحليل العناصر النادرة ومن هذا الجدول يمكن تحديد وإختيار طريقة التقدير المناسبة .

obeikandl.com

جـــدول (3.5): مقارنـــة بين بعــض طــــرق تحليل العناصـــــــر النادرة

طريق التحليل	هل يمكن تحليل عدد من العناصر سويا	الحساسية (جزء فى المليون)	التخصصية Specifity	الدقـــــة	الخلو من التلوث
التحليل بتنشيط النيوترونات	فى بعض الحالات	1.0–0.001	جيدة	جيدة	جيدة
تحليل:					
- طيف الإمتصاص الذرى	لا	5.0 –0.01	جيدة	جيدة	سيئة
- وطيف الإنبعاث الذرى	نعم	0.1	جيدة	مرضية	سيئة
- تحليل طيف أشعة X	نعم	100.0–10.0	جيدة	تحتاج لمحلول قياسى للمقارنة	جيدة
- تحليل طيف الكتلة بنظام الشعلة *spark* وتحت تفريغ	نعم	0.01	جيدة	تحتاج لمادة قياسية	جيدة
- التحليل الغازى	نعم	زادت فى الأجهزة الحديثة	مقبولة	جيدة	جيدة

المصدر : *Ames, 1966* .

ويوضح الجدول (4.5) التالى الحدود القصوى لبعض العناصر المعدنية الملوثة للأغذية . أما الجدول (5.5) فيبين الخطوط الإرشادية لملوثات الأغذية من النظائر المشعة بعد إحتمال حدوث تلوث إشعاعى فورى على غرار حادث تشرنوبل بالإتحاد السوفيتى عام 1986 م .

obeikandl.com

جـــدول (4.5) : الحـد الأقـصى المسـموح لبعض العناصر الملوثة للأغذية

العنصر	الحد الأقصى المسموح به (مجم/كجم)	أنـــواع الأغـــذية
الزرنيخ ***Arsenic***	0.1	زيت فول الصويا ، زيت بذرة القطن ، وزيت عباد الشمس ، وزيت بذرة الشلجم ، وزيت الذرة ، زيت السمسم ، وزيت جوز الهند ، زيت النخيل ، زيت بذور العنب ، دهن الخنزير ، دهن الضأن ، المرجرين ، الزيوت والدهون بوجه عام .
	0.2	**عصائر:** البرتقال ، الليمون ، التفاح ، الطماطم ، العنب ، الأناناس ، وعصائر المنتجات السابقة المركزة بعد إسترجاعها ، المشمش ، الخوخ ، الكمثرى ، أنواع الفاكهة الأخرى.
	0.5	زبدة الكاكاو ، والشوكولاتة
	1.0	**سكريات:** السكروز ، الدكستروز اللامائي ، شراب الجلوكوز، شراب الجلوكوز المخفف ، اللاكتوز ، مسحوق الدكستروز ، الفركتوز ، الشوكولاتة غير المحلاه ، مسحوق الكاكاو ، مخلوط مسحوق الكاكاو والسكر ، فلقات الكاكاو ، كيك الكاكاو ، غبار الكاكاو ، مخاليط الشوكولاتة ، الشوكولاتة المحشوة .
	2.0	مسحوق السكر (السكر الثلجي)
النحاس ***Copper***	0.1	**زيوت غير بكر للنوعيات التالية:** زيت الذرة ، زيت السمسم ، زيت المسطردة ، زيت جوز الهند ، زيت النخيل ، زيت الشلجم ، زيت عباد الشمس ، زيوت أخرى .
	0.1	**زيوت مأكلة من النوعيات التالية :** زيت القرطم ***safflower*** ، زيت الشلجم منخفض في حامض الإيروسيك ، زيت النخيل ، زيت بذرة القطن ، زيت صويا ، زيت بذور العنب ، ***babassu oil*** ، المنيارين ، المرجرين.
	0.4	**زيوت مأكلة وبكر من النوعيات التالية :** ***Arachis oil*** ، زيت عباد الشمس ، زيت الشلجم ، زيت الذرة ، زيت السمسم ، زيت المستارد ، زيت جوز الهند ، زيت النخيل ، **زيوت ودهون** : دهن الخنزير ، دهن الخنزير المسلى ،شحم الضأن ، زبدة الكاكاو .
	1.0	السكر الأبيض
	2.0	السكر الثلجي (مسحوق السكر) ، الدكستروز اللامائي ، الدكستروز أحادى التأدرت ، اللاكتوز ، مسحوق الدكستروز ، شراب الجلوكوز ، مسحوق شراب الجلوكوز .

obeikandl.com

تابع جدول (4.5)

	•5.0	**العصائر التالية والمحفوظة بالطرق الطبيعية :** **عصائر :** البرتقال ، الجريب فروت ، الليمون ، التفاح ، الطماطم ، العنب ، الأناناس ، العنب الأسود ، عصائر مركزة مسترجعة للمنتجات التالية : الأناناس ، التفاح ، العنب الأسود . **عصائر بمواد حافظة :** • على ألا يزيد المجموع الكلي لعناصر النحاس ، الزنك والحديد عن 20 مجم/كجم .
	•5.0	**العصائر المركزة والمسترجعة للمنتجات التالية :** البرتقال ، العنب ، البرقوق ، الخوخ ، الكمثرى ، العنب الأسود بدون لب ***non-pulpy*** ، بعض مخاليط العصائر لأنواع الفواكه صغيرة الحجم ***pulpy nectar of certain small fruits*** ، عصائر لبعض أنواع الموالح ***Nectars of certain citrus fruits*** . على ألا يزيد المجموع الكلي لعناصر النحاس ، والزنك والحديد عن 5 مجم/كجم .
	5.0	الكازين الحامضي ، الكازينات ، شراب الجلوكوز
	10.0	السكر الناعم
	15.0	الشوكولاتة
	20.0	مخلوط الشوكولاتة والشوكولاتة المحشوة
	30.0	شوكولاتة غير المحلاة ، فلقات الكاكاو ، كاكاو
	50.0	مسحوق كاكاو ومخلوط بالسكر ، كيك الكاكاو .
الحديد ***Iron***	1.5	**الزيوت المأكلة من النوعيات التالية :** زيت الشلجم ، زيت الذرة ، زيت الخردل ، زيت السمسم ، زيت جوز الهند ، زيت النخيل ، الدهون والزيوت.
	1.5	**الزيوت المأكلة من النوعيات التالية :** زيت فول الصويا ، زيت بذرة القطن ، زيت الشلجم منخفض الإيروسيك ، زيت العصفر ***Safflower oil*** ، زيت لب النخيل ، زيت بذور العنب ، دهن خنزير ، دهن خنزير مسلى ، دهن ضأن ، مرجرين ، الميناريين .
	2.0	زبدة الكاكاو
	5.0	**زيوت بكر من النوعيات التالية :** زيت عباد الشمس ، زيت الشلجم ، زيت السمسم ، زيت بذور المسترد ، زيت جوز الهند ، زيت النخيل ، الدهون والزيوت المأكلة .
	10.0	مركزات عصير التفاح المسترجعة ***Reconstituted*** ، عصير التفاح .

تابع جدول (4.5)

	*15.0	العصائر التالية : البرتقال ، الجريب فروت ، الليمون ، الطماطم ، العنب ، الأناناس ، ومركزات العصائر التالية بعد إسترجاعها : البرتقال ، العنب ، ، العنب المحلى ، التفاح ، البرقوق ، والكمثرى ، شرائح الفواكه المعلبة ، أنواع الفواكه صغيرة الحجم كالكريز ، وشرائح بعض أنواع الموالح . * لاتتجاوز نسبة الحديد والزنك والنحاس مجتمعة عن 20 مجم / كجم .
	20.0	كازين حامضى مأكلة ، الكازينات المجففة بالرزاز ومأكلة .
	50.0	كازينات مجففة فى صورة رقائق مأكلة
الرصاص ***Lead***	0.1	* ستستخدم الإختصارات التالية TE وتعنى موافقة مبدئية ، UR تخضع للمراجعة. **زيوت الطعام التالية :** زيت الصويا ، زيت بذرة القطن ، زيت عباد الشمس ، زيت الشلجم ، زيت الذرة ، زيت السمسم ، زيت المستردة ، زيت بذور العنب ، دهن الخنزير ، دهن الخنزير المسلى ، دهن الضأن ، المرجرين .
	0.1 "TE"	زيت الشلجم منخفض الإيروسيك ، زيت جوز الهند ، زيت النخيل ، زيت لب النخيل ، المفيارين ، الدهون والزيوت .
	0.2 " UR "	لب نكتار لبعض الفواكه صغيرة الحجم ، نكتار بعض أنواع الموالح
	0.3 " UR "	بعض العصائر ، النكتار المحفوظة بالطرق الطبيعية : للبرتقال ، الجريب فروت ، التفاح ، الطماطم ، العنب ، والأناناس ، المركزات المسترجعة للفواكه التالية : الأناناس ، العنب الأسود ، التفاح ، البرتقال ، العنب ، العنب المحلى ، المشمش ، الخوخ ، الكمثرى .
	0.3	عصير أناناس مركز ويحفظ بالمواد الحافظة
	0.5	زبد الكاكاو
	0.5 " TE "	الفركتوز ، ***Canned bouillon and consommes***
	1.0	الشوكولاتة ، الشوكولاتة المحشوة
	1.0 " UR "	عصير الليمون المحفوظ بالطرق الطبيعية .
	2.0 " TE "	سكر أبيض ، مرق جاف ، مسحوق سكر (سكر ثلجى) ، سكر ناعم ، دكستروز لا مائى ، شراب جلوكوز مجفف ، لاكتوز ، شراب دكستروز مجفف .
	2.0 " TE "	فلقات كاكاو ، عجينة كاكاو ، عجينة كاكاو مضغوطة ، غبار كاكاو ، مسحوق كاكاو ، مسحوق الكاكاو المخلوط بالسكر .
	2.0	كازين حامضى مأكلة ، كازينات مأكلة ، شوكولاتة غير محلاه

obeikandl.com

تابع جدول (4.5)

الخارصين ***Tin***	" UR " 150.0	العصائر والـــ ***Nectars*** التالية المحفوظة بالطرق الطبيعية : التفاح ، العنب ، العصائر المركزة للمنتجات التالية للتفاح ، للعنب المحلى ، نكتار البلاك كرانت ، نكتار بعض الفواكه الصغيرة .
	موافقة 250 مشروطة	الأسبار اجاس المعلب ، محلوط الفواكه المعلب ، البسلة الناضجة المعلبة ، سلاطة فواكه إستوائية ، خيار مخلل ، جزر معلب ، خوخ معلب ***Canned apricots*** .
	250" TE "	أناناس معلب ، محلوط فواكه معلبة ، بسلة معلبة ، محلوط فواكه إستوائية ، خيار محلل ، جزر معلب ، مشمش معلب ***Canned apricots*** .
	250" TE "	**العصائر التالية والـــ** ***Nectars*** المحفوظة بالوسائل الطبيعية : البرتقال ، جريب فروت ، الليمون ، العصائر المركزة والمسترجعة للمنتجات التالية : أناناس ، أناناس مع مواد حافظة ، برتقال ، مشمش ، خوخ ، برقوق ، نكتار بعض أنواع الموالح .
الزنك ***Zinc***	*5.0	عصائر المنتجات التالية : البرتقال ، الجريب فروت ، الليمون ، التفاح ، الطماطم ، العنب ، الأناناس ، وعصائر المركزات التالية بعد إسترجاعها : الأناناس ، الأناناس مع المواد الحافظة ، التفاح ، البرتقال ، العنب ، المشمش ، الخوخ ، البرقوق ، ونكتار بعض الموالح . * على ألا يتجاوز مجموع عناصر الزنك والحديد والنحاس عن 20 مجم / كجم .

* المصدر : Codex Alimentary Commission, 1989

جدول (5.5): الخطوط الإرشادية لملوثات الأغذية من النظائر المشعة بعد حدوث تلوث إشعاعي نووي (كحادث تشرنوبيل عام 1986).

النظائر المشعة الممثلة	مستواها بالبيكريل/كجم
الأغذية المعدة للإستهلاك الآدمي	
A_m^{241} أمريكيوم ، البلوتونيوم P_u^{239}	10
السترانشيوم S_r^{90}	100
اليود I^{131} ، السيزيوم C_s^{134} ، C_s^{137}	1000
اللبن وأغذية الأطفال	
Am^{241} أمريكيوم ، البلوتونيوم P_u^{239}	1
اليود I^{131} ، السترانشيوم S_r^{90}	100
السيزيوم C_s^{134} ، C_s^{137}	1000

المصدر : ***Codex Alimentarius Comission, 1989*** .

obeikandl.com

4.5 أســـــــئلة عامــــــــة

1- تم تعيينك رئيسا لمختبر لفحص الأغذية ، وكان من ضمن التقديرات التى تجريها تقدير العناصر المعدنية ، وضح أهم أنواع الأجهزة التى تختارها مبينا أسس إختيارك لتلك الأجهزة .

2- بين أهم الإعتبارات والقواعد العامة التى يجب مراعاتها وتفهمها جيدا قبل البدء فى تقدير العناصر المعدنية .

3- ناقش الأسس العلمية لطرق الوزن النوعى لتقدير العناصر المعدنية ، موضحا أهم عيوبها ومميزاتها .

4- بين الأسس العلمية لتقدير العناصر المعدنية بالطرق التالية :

- بتفاعلات الأكسدة والإختزال .
- طريقة موهر لتقدير الملح .
- طريقة فولهارد لتقدير الكلوريد .
- بالطرق اللونية .
- بالإلكترودات الإختيارية للأيونات .

5- ما هى الإعتبارات الواجب مراعاتها عند إعدادك لعينات مواد غذائية تمهيدا لتحليل العناصر المعدنية ؟

6- قارن بين طريقتى موهر وفولهارد لتقدير ملح الطعام فى الأغذية .

7- صف أهم الظروف التحليلية التى يجب تداركها عند تقدير العينة البلانك .

8- عندما قام فنى المعمل بتقدير العناصر المعدنية بطريقة الإلكترودات الإختيارية للأيونات غفل عن إضافة المحلول المنظم اللازم لضبط القوة الأيونية . هل تنصح الفنى بإستكمال التحليل بالعينة التى تم إعدادها ، أو تأمره بالبدء بعينات ومحاليل قياسية جديدة مع ضبط قوتها الأيونية بالمحاليل المنظمة اللازمة ؟ علل أسباب توجيهاتك ، ثم إشرح للفنى الأسس العلمية للتقدير الكمى للأيونات بإستخدام الإلكترودات .

9- إشرح أهم الإعتبارات الواجب مراعاتها عند تقديرك للعناصر المعدنية بطريقة الإلكترودات الإختيارية للأيونات ***ISE*** للحصول على نتائج مؤكدة .

obeikandi.com

10- ما هى أهم العوامل التى يجب وضعها فى إعتبارك عند إختيارك لطريقة معينة لتقدير العناصر المعدنية إذا توفرت لديك كافة الأجهزة وكافة إمكانيات التحليل ؟

11- قررت شراء إلكترود إختيارى للأيونات لتستخدمه فى تقدير عنصر الصوديوم فى الأغذية فى المصنع الذى تعمل فيه . وضح أهم المزايا التى يحققها إختيارك عما لوكنت إخترت جهاز قياس الإمتصاص أوالإنبعاث الذرى ، أو عزمت على إجراء التحليل بإحدى طريقتى موهر أو فولهارد . ثم وضح دون تحيز أهم عيوب إختيارك .

12- إشرح عملية إنتقالات الطاقة فى ذرات العناصر ، وضح عملية الترذيذ *atomization* عند إلقاءك محاضرة عن تحليل العناصر المعدنية بطريقة قياس طيف الإمتصاص أو طيف الإنبعاث الذرى .

13- بين أوجه التشابه والإختلاف بين طريقتى قياس طيف الإمتصاص ، قياس طيف الإنبعاث عند تحليلك للعناصر المعدنية .

14- ناقش بعض مصادر الأخطاء أثناء إعدادك لعينة ترغب فى تقدير عناصرها المعدنية بطريقة الإمتصاص الذرى .

15- بصفتك مديرا لمختبر لرقابة الجودة فى أحد المصانع ، طلبت من أحد الفنيين إختيار طريقة رسمية (*AOAC*) لتقدير عنصر الصوديوم فى منتج غذائى معين . قام الفنى بتجميع تلك الطرق : طريقة فولهارد ، طريقة الإلكترود الإختيارى للأيونات ، وطريقة قياس طيف الإنبعاث . وعندئذ سألك الفنى عن أهم الإختلافات بين هذه الطرق . وضح الأسس التى تشرح له بها إجابتك على أن توضح له الفرق بين الأسس العلمية لتلك الطرق ، ثم بين له لماذا إخترت من تلك الطرق طريقة دون أخرى .

مســـــــــائل :

1- تم تسجيل تلك البيانات عند تقدير الحديد فى دقيق مدعم . إحسب تركيز الحديد فى الدقيق وعبر عن إجابتك بالمجم/رطل دقيق . وكانت خطوات الإختبار والقياسات كالتالى:

- تم وزن 10 جم من الدقيق ، ثم تم نقلها إلى دورق كلداهل 800 مل ، أضيف 20 مل ماء ، 5 مل حامض كبريتيك ، 25 مل من حامض النيتريك ، جرى تسخين

المخلوط حتى ظهور أبخرة ثالث أكسيد الكبريت " SO_3 " . بعد تبريد المخلوط أضيف 25 مل ماء ، وتم ترشيح العينة ونقلها كميا إلى دورق معيارى سعة 100 مل ،ثم أكمل الحجم بالماء المقطر حتى العلامة . تم إعداد المحلول القياسى للحديد بتركيزات 0 ، 2 ، 5 مجم حديد / لتر . ثم قراءة الإمتصاص الضوئى للمحاليل القياسية وللعينة بجهاز سبكتروفوتوميتر .

العينة	تركيز الحديد (مجم/لتر)	الإمتصاص الضوئى	الإمتصاص الضوئى المصحح
محلول قياسى رقم 1	0.00	0.01	0.00
محلول قياسى رقم 2	2.00	0.21	0.20
محلول قياسى رقم 3	5.00	0.51	0.50
الدقيق المدعم بالحديد	؟	0.38	0.37

الإجابة : 18.16 مجم حديد / رطل دقيق .

2- إشرح طريقة تقدير عناصر الكالسيوم ، البوتاسيوم ، الصوديوم فى غذاء أطفال بإستخدام طريقة طيف الإنبعاث الذرى علما بأن تلك العناصر توجد فى غذاء الأطفال فى حدود 700 ، 730 ، 300 مجم /كجم على التوالى .

الإجابة : يفضل إتباع طريقة هيئة المحللين الكيميائيين الرسمية برقم 984.27 .

وفيما يلى أهم خطوات الإجراء :

1.2- رج علبة غذاء الأطفال جيدا .

2.2- إنقل 15.0 مل من غذاء الأطفال إلى دورق كلداهل سعة 100 مل .

3.2- أضف 30 مل من حامض النيتريك – حامض البيركلوريك (بنسبة 2 : 1)

4.2- إترك العينة فترة الليل .

5.2- سخن حتى يحدث حرق كامل للعينة (إحذر أن هذا المخلوط قد يسبب إنفجارا ، لذلك إتبع تعليمات طريقة AOAC بعناية) .

6.2- إنقل بعناية كميا لدورق معيارى سعة 50 مل وخفف بالماء المقطر حتى العلامة.

7.2- قم بمعايرة الجهاز . وإختر الأطوال الموجية التالية للتقدير 317.9 ، 766.5 ، 589.0 نانوميتر لعناصر الكالسيوم ، البوتاسيوم ، الصوديوم على التوالى . أعد

محاليل معايرة قياسية تحتوى على 200 ، 200 ، 100 نانوجرام / مل من عناصر Na ‘ K ‘ Ca على التوالى .

8.2- ستتولى وحدة الحاسب الالى فى جهاز قياس طيف الإنبعاث الذرى حساب التركيزات فى العينات التى تم تحليلها .

9.2- لتحويل نتائجك إلى تركيزات العناصر فى غذاء الأطفال - إستخدم المعادلة التالية:

التركيز فى غذاء الأطفال = التركيز بالجهاز X 50 مل/15 مل

3- عند تقدير تركيز الكلوريد بطريقة الوزن النوعى كان وزن كلوريد الفضة 0.75 جم فما هو وزن الكلوريد فى العينة ؟

الحل : x جم كلوريد/0.75 جم كلوريد فضة = 35.45 جم/مول/143.3 جم/مول = 0.1855 جم كلوريد

4- تم تجفيف 10 جم من عينة مادة غذائية ، ثم تم حرقها لإنتاج الرماد ، ثم أجرى تحليلها لتقدير محتواها من الملح ($NaCl$) بطريق موهر *Mohr* وكان وزن العينة بعد تجفيفها 2 جم ، وكان وزن العينة بعد حرقها 0.5 جم . وبعد ذلك تمت معايرة الرماد بمحلول نيترات فضة قياسى . فإستهلكت العينة 6.5 مل من نيترات الفضة للوصول لنقطة الإنتهاء التى تم الإستدلال عليها باللون الأحمر عند إستخدام كرومات البوتاسيوم كدليل . وتمت معايرة محلول نيترات الفضة بإستخدام 300 مجم من كلوريد البوتاسيوم المجفف . وكان حجم محلول نيترات الفضة بعد التصحيح 40.9 مل . إحسب % للملح فى عينة المادة الغذائية .

الحل :

عيارية نيترات الفضة = 0.3 جم كلوريد بوتاسيوم/مل نيترات الفضةx 74.555 جم كلوريد بوتاسيوم/مول

= 0.3 جم/ 4.9 x 74.555 = 0.0984 عيارى

0.0984 مول نيترات فضة x (0.0065 لتر) = 0.0006396 مول أيون فضة Ag^+

= 0.0006396 مول أيون كلوريد Cl^-

= 0.0006396 مول كلوريد صوديوم $NaCl$

∴ (0.0006396 مول كلوريد صوديوم) x 58.5 جم كلوريد صوديوم/ مول= 0.0374 جم كلوريد صوديوم

5- جففت 25 جم من عينة مادة غذائية ن ثم حرقت لإنتاج الرماد ، وأجرى تحليلها لمعرفة محتواها من كلوريد الصوديوم بإستخدام طريقة فولهارد . وكان وزن العينة المجففة 5 جم ، وكان وزن الرماد 1.0 جم . أضيف 30 مل من محلول نيترات الفضة

obeikandl.com

0.1 ع إلى الرماد ، ثم رشح المخلوط . وأضيفت كمية ضئيلة من كبريتات الحديد النوشادرية ***Ferric ammonium sulphate*** إلى الراشح . ثم تمت معايرة الراشح بإستخدام 3 مل من ثيوسيانات البوتاسيوم حتى نقطة الإنتهاء ذات اللون الأحمر .

أ- إحسب المحتوى الرطوبي للعينة .

ب- إحسب % للرماد في العينة على أساس الوزن الجاف .

ج- إحسب % لملح الطعام في العينة الأصلية (الوزن الذرى للصوديوم 23 ، الكلور 35.5)

الحل :

أ- % للرطوبة = وزن العينة الرطبة (25جم) - وزن العينة الجافة (5جم) x 100/وزن العينة الرطبة = 80 %

ب- % للرماد على أساس الوزن الجاف = وزن الرماد (1جم) x 100 /وزن العينة الجافة (5جم) = 20 %

ج- عدد مولات الفضة Ag^+ المضافة = عدد مولات الكلوريد Cl^- + عدد مولات الثيوسيانات (SCN^-)

عدد مولات Ag^+ = (0.1 مول/لتر)(0.03 لتر) = 0.003 مول

عدد مولات SCN^- = (0.1 مول/لتر)(0.003 لتر) = 0.0003 مول

0.003 مول فضة = عدد مولات Cl^- + 0.0003 مول SCN^-

∴ عدد مولات Cl^- = 0.0027 مول

عدد جرامات NaCl = 0.0027 x 58.5 جم NaCl /مول = 0.1580 جم كلوريد صوديوم

% للملح = 0.1580 x 100 /25.0 = 0.632

6- أجرى تقدير كمي للمركب x بطريقة لونية . إستخدم المعلومات التالية وقانون ***Beer*** لحساب % للمركب x في العينة .

أ- تم حرق 4 جرامات من العينة .

ب- تم إذابة الرماد الناتج من حرق العينة فى 1 مل حامض ثم أكمل الحجم فى دورق معيارى 250 مل حتى العلامة بالماء المقطر.

ج- تم سحب 0.75 مل من المحلول من الدورق المعيارى ثم أجرى عليه التفاعل اللونى وبعد حدوث التفاعل تم تجفيف ناتج التفاعل إلى 50 مل .

د- كان الإمتصاص الضوئى لناتج التفاعل اللونى على طول موجى 595 يساوى 0.543 .

هـ- كان ثابت الإمتصاص (أى معامل ***molar extinction coefficient***) يساوى 1754 لتر$^{-2}$ سم$^{-1}$

و- كان القطر الداخلى لأنبوبة القياس اللونى لجهاز الإسبكتروفوتوميتر 1 سم

الحل :

c x b x a - A

0.543 - (1.574 لتر جم$^{-1}$. سم$^{-1}$)(1 سم) x C

C - 3.4498 x 10^{-4} جم/لتر

- 3.4498 x 10^{-4} مجم/مل

- 3.4498 x 10^{-4} مجم/مل x 50 مل - 1.725 x 10^{-2} مجم

- 1.725 x 10^{-2} x 250 مل / 0.75 مل x 4 جم - 1.437 مجم/ جم

% للمركب x فى العينة - 1.437 x 100 / 1000 - 0.1437

obeikandl.com

REFERENCES 5.5.المـــــــراجع

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

Beaty, R.D. and Kerber, J.D. 1993. Concept, Instrumentation Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. Perkin-Elmer Corporation, Nor walk, C.T.

Codex Alimentarius Commission, 1989. Codex Alimentarius Abriged Version. Summarized and Edited by Barry L. Smith.

Comer, J. 1986. Ion selective and oxygen electrodes. Presented at IFT Short Course, " Instrumental Methods for quality assurance and Research" Dallas, TX, June 18 – 20.

Fennema, O.R. 1976. Principles of Food Science " Part –1 Food Chemistry. Marcel Dekker, Inc., New York.

Kirk, R.S. and Sawyer, R. 1991. Pearson's Composition and Analysis of foods. 9th ed. Longman Scientific and Technical, Essex , England.

Pomeranz, Y. and Meloan, C. 1994. Food analysis , Theory and practice. Chapman and Hall, New York, London.

Shoog, D. A. 1985. Principles of Instrumental analysis, 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia, PA.

U.S. Department of Agriculture, agricultural Research Service, 1997. USDA Nutrient Data base for Standard Reference, Releas 11-1.

obeikandl.com

الباب السادس

تحليل الكربوهيدرات

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

obeikandl.com

الباب السادس

6. تحليل الكربوهيدرات

Carbohydrate Analysis

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

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

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

- **السكريات الأحادية** ***Monosaccharides*** : (هيدروكسيدات عديدة ألدهيدية أو كيتونية) وقد تكون من 5 ذرات كربون مثل الزيلول ، الأرابينوز ، أو تتكون من 6 ذرات كربون كالجلوكوز والفركتوز .

- **الأوليجوسكريدات** ***Oligosaccharides*** : وتتكون بتكثيف رابطة هيدروكسيلية من أحد السكريات الأحادية مع مجموعة مختزلة من سكر احادى آخر فيتكون سكر ثنائى ***disaccharides*** (كالسكروز ، المالتوز ، اللاكتوز ... إلخ) وعندما يرتبط عددا من

جدول (1.6) : بعـــض أنــواع الكربوهــيدرات الرئيســية فى الأغذيـــــة.

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

obeikandl.com

تابع جدول (1.6) :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

obeikandl.com

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

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

1.6. إعداد العينة *Sample preparation* :

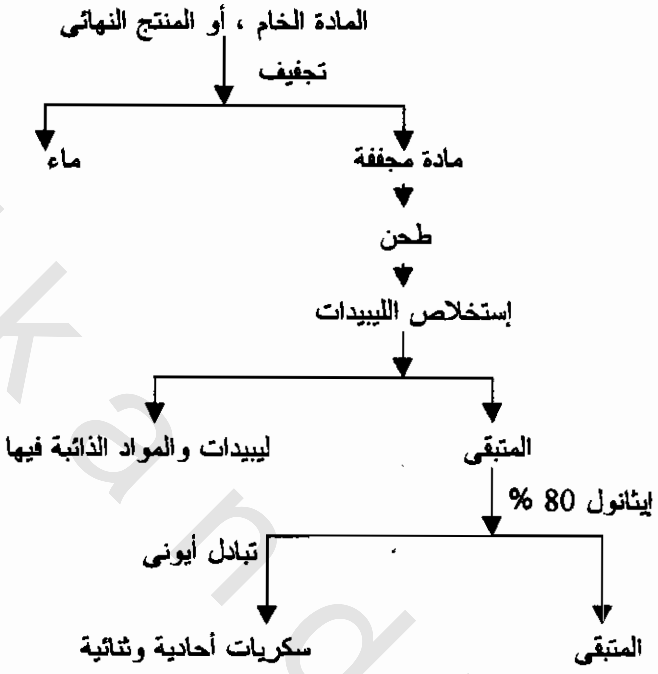
للكربوهيدرات صور عديدة تتباين فى درجات ذوباتها ، ويرتبط إعداد عينة المادة الغذائية لتحليل الكربوهيدرات فيها بعدة عوامل أهمها :

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

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

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

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



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

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

obeikandi.com

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

1.2.6. الإستخلاص *Extraction :*

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

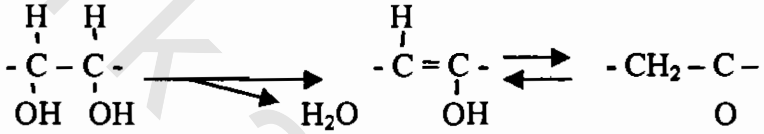
1- يجب أن تجرى عملية الإستخلاص بكحول الإيثانول مرتين على الأقل لضمان إستخلاص كل المكونات المطلوبة . وتجدر الإشارة إلى أن الإستخلاص بكحول الإيثانول الساخن 80 % متخصص لحد كبير .
2- إذا كانت المادة الغذائية حامضية (كالفواكه) فيجب معادلة الحموضة قبل الإستخلاص لتجنب تحلل السكروز لذلك تضاف كربونات البوتاسيوم لهذا الغرض .
3- يحتوى مستخلص الإيثانول (80 %) على مركبات أخرى (ملوثات) خلاف الكربوهيدرات أهمها الرماد ، الصبغات ، الأحماض العضوية ، وربما أيضا الأحماض الأمينية الحرة والببتيدات منخفضة الوزن الجزيئى . ولأن السكريات الأحادية والثنائية متعادلة الشحنة ومعظم الملوثات تحمل شحنة كهربية لذلك تزال بإستخدام كروماتوجرافيا التبادل الأيونى . وتتم عملية التنقية بوضع 50 مل من المستخلص الإيثانولى فى دورق مخروطى سعة 250 مل ، ويضاف 2 جم من راتنج تبادل كاتيونى (فى صورة حامض) ، 3 جم راتنج تبادل أنيونى (فى صورة هيدروكسيد) ويترك المخلوط لمدة ساعتين مع التقليب كل فترة وبعد ذلك يتم الترشيح.
4- عند الرغبة فى تقدير تركيز السكروز فى المستخلص بالبولاريميتر يجب أن يكون المحلول رائقا ، ولذلك تضاف مادة ترويق كخلات الرصاص بدلا من إجراء معاملة التبادل الأيونى ، ثم يتم الترشيح أو الطرد المركزى لفصل الراسب (طرق *AOAC* أرقام 44.1.0713 ، 44.10 ، 44.6.01).

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

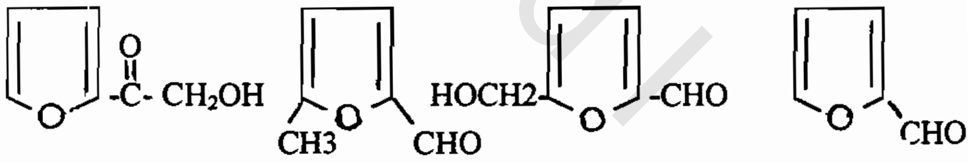
3.6. تقدير الكربوهيدرات الكلية بطريقة " الفينول – حامض الكبريتيك" :

Total Carbohydrate: Phenol-Sulfuric acid Method :

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



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



فورمالدهيد (فورفورال) (1) — هيدروكسى ميثيل فورفورال (HMF) (2) — (3) — (4)

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

obeikandl.com

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

1- يسحب بماصة محلول الكربوهيدرات ويوضع فى أنبوبة إختبار ، ويعد البلانك بوضع ماء بدلا من المحلول الكربوهيدراتى بنفس الحجم فى أنبوبة أخرى .

2- يضاف محلول الفينول وتخلط المكونات جيدا فى الأنبوبة .

3- يضاف حامض كبريتيك مركز بسرعة إلى الأنبوبة ويؤدى البخار الناتج عن الحرارة الناتجة من إضافة الحامض لخلط جيد لمحتويات الأنبوبة .

4- يقاس الإمتصاص الضوئى للون الناتج على طول موجى 490 نانوميتر .

5- تطرح قيمة الإمتصاص الضوئى للبلانك من نظيره للعينة .

6- تقدر كمية الكربوهيدرات الكلية عن طريق منحنى قياسى ويفضل أن يتكون من نفس كربوهيدرات العينة ، أو قد يستخدم محلول D- جلوكوز لإعداد المنحنى القياسى .

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

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

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

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

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

obeikandl.com

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

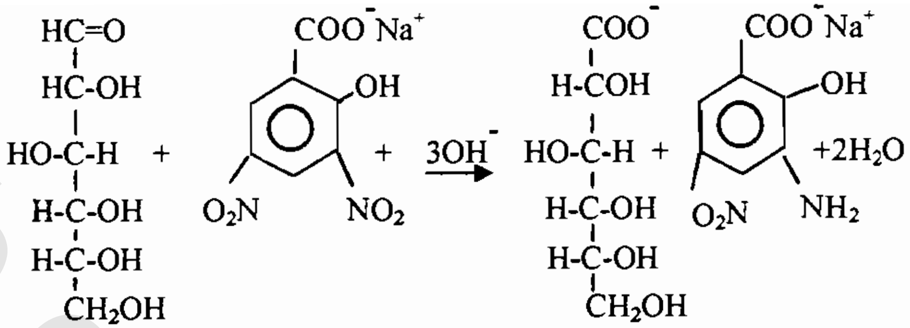
1- يضاف محلول كبريتات النحاسيك ومحلول منظم قلوى بواسطة الماصة إلى محلول السكريات المختزلة ، ويضاف أيضا إلى محلول ماء كبلانك.
2- يتم تسخين المحلول السابق فى حمام مائى يغلى .
3- يضاف الجوهر الكشاف المعد بخلط محلولى موليبدات الأمونيوم الحامضية وزرنيخات الصوديوم .
4- بعد الخلط يخفف المحلول ، يعاد خلطه جيدا ثم يقاس الإمتصاص الضوئى للمحلول على طول موجى 520 نانوميتر .
5- تطرح قيمة الإمتصاص الضوئى للبلانك (A_{520}) من قيمة الإمتصاص الضوئى للعينة . ثم يتم تحويل القيمة إلى ما يكافئها من جلوكوز بإستخدام المنحنى القياسى الذى سبق إعداده من محاليل جلوكوز معلومه التركيز وإمتصاصها الضوئى .

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

2.4.6. بعض الطرق الأخرى لتقدير السكريات المختزلة

1.2.4.6. طريقة ثنائى نيتروحامض الساليسيليك *dinitrosalicylic acid* :

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



D- جلوكوز   D- جلوكونات   صوديوم 3-أمينو-5- نيتروساليسيلات

2.2.4.6. طريقة *Walker–Munson* :

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

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

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

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

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

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

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

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

5.6. طرق التحليل المتخصصة للسكريات الآحادية والأوليجوسكريدات :

Specific Analysis of Mono- and Oligosaccharides:

1.5.6. كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى :

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

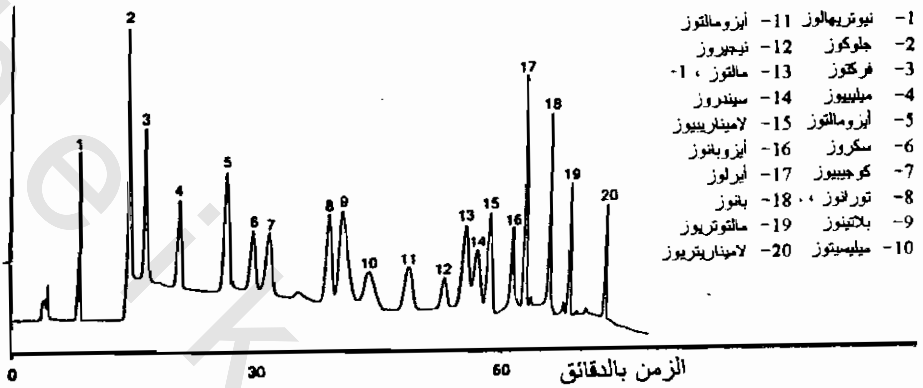
ولا تتطلب طريقة كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى إلى تحويل السكريات إلى مشتقات سهلة التطاير قبل التحليل كما هو الحال فى كروماتوجرافيا الغاز " ***GC*** " ولكنها تحتاج إلى ترشيح من نوع خاص بمرشح دقيق ***micron filter*** قبل حقن العينات فى الجهاز .

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

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

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

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



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

2.1.5.6. كروماتوجرافيا الطور العادى *Normal phase chromatography* :

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

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

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

3.1.5.6. كروماتوجرافيا التبادل الكاتيونى *Cation exchange chromatography*

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

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

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

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

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

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

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

1- كشاف معامل الإنكسار *Refractive index detector* :

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

2- أجهزة الكشف الكهروكيميائية *Electrochemical detectors* :

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

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

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

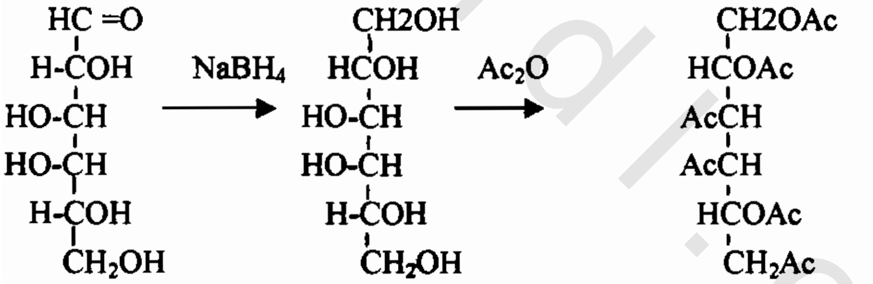
3.5.6. تحليل السكريات بكروماتوجرافيا الغاز *Gas chromatography* :

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

أ- إختزال المجموعة الألدهيدية إلى مجموعة كحول أولى .

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

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



D- جلاكتوز   D- جلاكتيتول   D- جلاكتيتول أسيتات

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

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

obeikandl.com

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

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

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

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

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

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

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

1.6.6. النشا ***Starch*** :

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

وتتلخص طريقة تقدير النشا فى الخطوات التالية :

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

2- تسخن الأنبوبة بمحتوياتها فى حمام مائى يغلى .

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

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

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

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

7- يقاس الإمتصاص الضوئى للعينة المختبرة والبلانك .

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

شكل (5.6): رسم تخطيطى لخطوات تقدير النشا الكلى

obeikandl.com

وفيما يلى بعض أهم الإعتبارات الواجب مراعاتها أثناء تقدير النشا :

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

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

3- توجد أنواع من النشا تقاوم التحليل الإنزيمى أهمها :

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

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

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

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

محلول أو معلق النشا

↓ إنزيم يمنع تفرع الجزيئ (*pullulanase*)

سلاسل خطية (غير متفرعة) من الأميلوز والأميلوبكتين

↓ إنزيم البيتا أميليز

مالتـــــــــوز

↓ تقدير السكريات المختزلة

" تقارن النتائج " بنتائج تقدير نشا " مجلتنة تماما "

شكل (6.6) : رسم تخطيطى لتقدير درجة جلتنة النشا

2.6.6. المركبات غير النشوية كالصموغ والمركبات الغروية

Non starch food gums / hydrocolloids:

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

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

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

obeikandi.com

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

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

1.2.6.6. تقدير محتوى المواد الغذائية من الصموغ/ الغرويات :

Gum / Hydrocolloid –content determination:

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

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

obeikandl.com

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.6.6. تقـــديــــر البكتــــين *Pectin determination* :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.6.6. ترسيب المواد البكتينية :

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

ويمكن ترسيب المواد البكتينية بإحدى الطرق التالية :

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

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

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

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

2.3.6.6. تقدير البكيتن :

توجد عدة طرق تقريبية لتقدير البكتين أهمها الطريقة التالية :

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

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

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

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

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

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

7.6. درجـــــة الأسترة *Degree of esterification* :

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

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

ويتم تقدير درجة الأسترة كما توضحها بإيجاز الخطوات التالية :

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

2- يغسل البكتين للتخلص من الزيادة من الحامض .

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

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

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

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

= عدد ملليمكافئات القلوى التى إستهلكت فى تصبن مجاميع إسترات الميثيل

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

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

8.6. الأليـــاف الغذائـــــية *Dietary fibers* :

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

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

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

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

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

1.8.6. إعداد العيـــــنة *Sample preparation* :

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

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

عينة المادة الغذائية (1 جم)

▼

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

▼

حضن الإنزيم على 95 – 100°م لمدة 15 دقيقة

▼

يتم التبريد إلى 60°م

▼

يضاف إنزيم البروتيز ***protease***

▼

حضن على 60°م لمدة 30 دقيقة

▼

يضبط الـــ pH على 4.5 – 4.7 ثم يضاف إنزيم الأميلوجلوكوسيداز

▼

حضن على 60°م لمدة 30 دقيقة

▼

رشح بعد عمليات الهضم السابقة

▼

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

▼

يستخدم الراشح + ماء الغسيل لتقدير الألياف الذائبة

▼

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

▼

جفف بالفرن

▼

زن البوتقة

▼

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

▼

قدر البروتين في التكرار الثاني

▼

إحسب محتوى المادة الغذائية من الألياف غير الذائبة

obeikandl.com

▼

ولتقدير الألياف الذائبة

▼

أكمل وزن المترشح السابق الحصول عليه ونواتج الغسيل إلى 80 جم بالماء

▼

أضف 320 مل من كحول الإيثانول 95 % المسخن إلى 60°م

▼

إترك المخلوط حتي تمام الترسيب

▼

رشح نواتج الهضم

▼

إغسل المترشح بــ 20 مل كحول إيثانول 78 % (3 مرات)

▼

إغسل المترشح مرة ثانية بــ 10 مل كحول إيثانول 95 % (مرتين)

▼

إغسل المترشح للمرة الثالثة بــ 10 مل أسيتون (مرتين)

▼

<u>جفــف</u>

▼

زن البوتقة وإحرق أحد التكرارين وأعد الوزن

▼

قدر البروتين فى التكرار الثانى

▼

إحسب محتوى المادة الغذائية من الألياف الذائبة

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

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

obeikandi.com

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

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

9.6. أســــــئلة

1- أذكر ثلاثة أسباب لأهمية تحليل الكربوهيدرات .

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

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

4- صف طريقة واحدة يمكن إستخدامها لكل مما يأتى :

أ- لتجنب تحلل السكروز عند إستخلاص السكريات بالكحول الساخن .

ب- إزالة البروتين من محلول سيستخدم للتحليل الإنزيمى .

ج- لتقدير الكربوهيدرات الكلية .

د- لتقدير السكريات المختزلة الكلية .

هـ- لتقدير تركيز السكروز بإحدى الطرق الطبيعية .

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

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

obeikandi.com

7- إشرح الأساس العلمى لكروماتوجرافيا التبادل الأيونى للكربوهيدرات .

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

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

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

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

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

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

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

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

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

إحسب % للألياف الكلية .

obeikandl.com

10.6. المراجـــــــع
REFERENCES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Obeikandl.com

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

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

obeikandl.com

البـــاب الســـابـــع

الزيـــوت والدهـــــون

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

obeikandl.com

البـــــاب السابـــــــع

7. الزيوت والدهون المأكلة

Edible Oils and Fats

1.7. مقدمـــــــــة :

تعتبر الزيوت النباتية والدهون الحيوانية من العناصر الغذائية ذات الأهمية الكبيرة فى حياة الإنسان فهى تمثل أحد المكونات الثلاثة الرئيسية للمواد الغذائية ولهل إستعمالات كثيرة فى الغذاء مثل زيوت السلاطة والقلى والطبخ بالإضافة لإستخدامها فى صناعة المارجرين والمسلى الصناعى . وتتميز الزيوت والدهون بأنها مصدرا غنيا للطاقة ، حيث أن الجرام الواحد منها يمد جسم الإنسان بمقدار من الطاقة (9 كالورى/جم) يساوى تقريبا ضعف الطاقة الناتجة من جرام واحد من الكربوهيدرات أو البروتين . ، كما تدخل فى كثير من الصناعات غير الغذائية المهمة مثل صناعة الصابون والدهانات والأحبار ، كما تتخلف عن مصانعها منتجات ثانوية مثل الأعلاف الحيوانية ومركزات البروتين والجليسيرول ... وغيرها .

كما تذوب بعض الفيتامينات فى الزيوت والدهون أ (A) ، ك (K) ، هـ (E) ، د (D) ، بالإضافة إلى إحتواءها على العديد من الأحماض الدهنية الأساسية والتى لايستطيع الجسم تكوينها . وعليه فهى مهمة للنمو والتكاثر وحماية الجسم من بعض الأمراض وتزداد أهميتها فى فترة الحمل والرضاعة وفى تغذية الأطفال .

ومن الملاحظ فى المراجع السابقة أنه لايوجد تعريف ثابت ومحدد لليبيدات ، حيث عرف ***Christie*** سنة ***1982*** الليبيدات بأنها " ***منتجات طبيعية واسعة الإنتشار وتشمل الأحماض الدهنية ومشتقاتها والإستيرويدات ، والتربينات ، والكاروتينات وأحماض الصفراء*** " والتى تتميز بطبيعتها بذوبانها فى المذيبات العضوية مثل الإيثير البترولى ***petroleum ether*** ، الهكسان ***hexane*** ، والبنزين ***benzin*** ، والكلوروفورم ***chloroform*** . أما التعريف الشائع للزيوت والدهون فهى عبارة عن : ***مجموعة من المواد غير الذائبة فى الماء وتذوب فى المذيبات العضوية وتتكون بصفة أساسية من جليسريدات ثلاثية (فى صورة إسترات الجليسيرول للأحماض الدهنية).***

obeikandi.com

وعموما فإن الزيوت تختلف عن الدهون الحيوانية فى أنها سائلة على درجة حرارة الغرفة (لإحتواءها على نسبة عالية من الأحماض الدهنية غير المشبعة) فى حين الدهون الحيوانية تكون صلبة على درجة حرارة الغرفة (لإحتواءها على أحماض دهنية مشبعة) .

2.7. أقسام الليبيـــــدات *Lipid Calsses* :

1.2.7. *الأحماض الدهنية* *Fatty Acids* :

سبق الإشارة إلى أن الزيوت والدهون الغذائية والموجودة فى الطبيعة عبارة عن جليسريدات ثلاثية ناتجة من تفاعل الأحماض الدهنية مع الجليسيرول ، وتتوقف صفات الزيت أو الدهن على ما يحتويه من أحماض دهنية من حيث طول السلسلة ودرجة عدم التشبع . وتحتوى الدهون الطبيعية على أحماض دهنية يتراوح عدد ذرات الكربون بها من 4 – 24 ذرة . وقد تكون الأحماض الدهنية مشبعة ***saturated*** أو غير مشبعة ***unsarurated*** (أحادية عدم التشبع ***monounsaturated*** أو عديدة عدم التشبع ***polyunsaturated*** تحتوى على رابطتين زوجيتين أو أكثر) . وسوف نتناول بإيجاز بعض تلك الأحماض الدهنية :

1.1.2.7. الأحماض الدهنية المشبعة *Saturated Fatty Acids* :

وهى عبارة عن سلاسل هيدروكربونية مستقيمة تتميز بإحتواءها على جميع ذرات الهيدروجين التى يمكن للسلسلة الكربونية أن تحتفظ بها . وتتوقف صفات الأحماض الدهنية المشبعة على طول السلسلة الكربونية حيث أنه كلما زاد طول السلسلة الكربونية كلما زادت نقطة إنصهارها وإنخفضت درجة ذوبانها فى الماء . وأول أفراد هذه المجموعة والذى يكون صلبا على درجة حرارة الغرفة هو الحامض الدهنى المحتوى على 10 ذرات كربون وهو حامض الكابريك ***Capric*** . ويبين الجدول رقم (1.7) بعض الأحماض الدهنية المشبعة والشائعة فى معظم الزيوت والدهون الغذائية .

جدول (1.7): بعض الأحماض الدهنية المشبعة الشائعة فى معظم الزيوت والدهون الغذائية

الإسم الكيميائى	الإسم الشائع	الرمز الكيميائى	عدد ذرات الكربون	المصدر
بيوتانويك *n-Butanoic*	بيوتيريك *Butyric*	$CH_3(CH_2)_2COOH$	4	دهن اللبن - زيت نخيل
هكسانويك *n-Hexanoic*	كابرويك *Caproic*	$CH_3(CH_2)_4COOH$	6	اللبن - جوز الهند
أوكتانويك *Octanoic*	كابريليك *Caprylic*	$CH_3(CH_2)_6COOH$	8	اللبن - نخيل - جوزهند
ديكانويك *Decanoic*	كابريك *Capric*	$CH_3(CH_2)_8COOH$	10	اللبن - جوزهند - زيت الحوت
دوديكانويك *Dodecanoic*	لوريك *Lauric*	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	12	اللبن - جوز الهند - نخيل
ترادیکانويك *Tetradecanoic*	ميرستيك *Myristic*	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	14	معظم الزيوت
هكساديكانويك *Hexadecanoic*	بالمتيك *Palmitic*	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	16	معظم الزيوت
أوكتاديكانويك *Octadecanoic*	إستيارك *Stearic*	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	18	معظم الزيوت
إيكوسانويك *Eicosanoic*	أراكيدك *Arachidic*	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	20	سوداني - دهون حيوانية
دوكوسانويك *Docosanoic*	بيهينيك *Behenic*	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	22	سوداني - شلجم
تتراكوزانويك *Tetracosanoic*	ليجنوسيريك *Legnoseric*	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	24	سوداني - شلجم

2.1.2.7.الأحماض الدهنية أحادية عدم التشبع *Monounsaturated Fatty Acids* :

وهى تلك الأحماض التى فقدت ذرتى هيدروجين (ذرة هيدروجين من كل ذرتى كربون متجاورتين) لتكون الرابطة الزوجية ***double bond*** . ومن أهم أفراد هذه المجموعة وأوسعها إنتشارا حامض الأوليك ***Oleic acid*** والذى يحتوى على 18 ذرة كربون ورابطة زوجية واحدة بين ذرتى الكربون 9 – 10 من مجموعة الكربوكسيل كما هو موضح فيما يلى :

1 2 9 10

$$COOH\text{-} CH_2\text{-} (CH2)_6\text{-}CH_2 – CH_2\text{-} (CH_2)_6 - CH_2 - CH_3$$

حامض ستياريك مشبع

فقد 2H ↓

1 2 9 10

$$COOH\text{-} CH_2\text{-} (CH_2)_6 - CH = CH - (CH_2)_6 - CH_2 - CH_3$$

حامض أوليك

obeikandi.com

3.1.2.7. الأحماض الدهنية عديدة عدم التشبع *Polyunsaturated Fatty Acids* :

تعتبر هذه المجموعة من الأحماض الدهنية ذات أهمية خاصة من الناحية التغذوية حيث أنها تحتوى على بعض الأحماض الدهنية الأساسية التى لايستطيع الجسم أن يكونها ومن أهم هذه الأحماض حامض اللينولييك ***linoleic*** ($C18{:}_2$ ω-6) ، حامض اللينولينيك ***linolenic*** ($C18{:}_3$ ω-3) .

1 6 7 8 9 10 18

$$CH_3 - (CH_2)_5 - CH = CH - CH_2 - CH = CH - (CH_2)_6 - COOH$$

Linoleic Acid ($C18{:}_2$ ω-6)

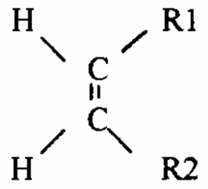
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 18

$$CH_3 - CH_2 - CH = CH - CH_2 - CH = CH - CH_2 - CH = CH - (CH_2)_7 - COOH$$

Linolenic acid ($C18{:}_3$ ω-3)

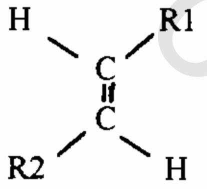
وهناك أحماضا دهنية تحتوى على أكثر من ثلاث روابط زوجية وينتشر وجودها بصفة اساسية فى زيوت الأسماك . وتستخدم الجليسريدات عديدة عدم التشبع فى صناعة الزيوت المهدرجة وإنتاج المسلى الصناعى ***Shortening*** .

وعادة توجد الأحماض الدهنية غير المشبعة على صورة مشابهات فراغية وهى توجد عادة فى الطبيعة على صورة وضع مضاهى (سيس ***Cis***) أما الصورة ترانس ***Trans*** (الوضع المخالف) فهى تتكون خلال التفاعلات الكيميائية مثل الأكسدة أوالهدرجة، ويمكن توضيح ذلك فى النموذج التالى :



مشابه فى وضع مضاهى

Cis isomer



مشابه فى وضع مخالف

Trans isomer

obeikandl.com

ويبين الجدول رقم (2.7) بعض الأحماض الدهنية غير المشبعة الشائعة فى معظم الزيوت والدهون الغذائية .

جدول (2.7): بعض الأحماض الدهنية غير المشبعة الشائعة فى معظم الزيوت والدهون

الإسم الكيميائى	الإسم الشائع	الرمز الكيميائى	عدد ذرات الكربون	المصدر
9- ديسينويك *9-decenoic*	كابروليك *Caproleic*	$C_{10}H_{18}O_2$	10:1	دهن اللبن- زيت الحوت
9- دوديسينويك *9-dodecenoic*	لوروليك *Lauroleic*	$C_{12}H_{22}O_2$	12:1	دهن اللبن- زيت الحوت
9-تترادسينويك *9-tetradecenoic*	ميريستوليك *Myristoleic*	$C_{14}H_{26}O_2$	14:1	دهن اللبن- زيت الحوت
9-هكساديسينويك *9-hexadecenoic*	بالميتوليك *Palmitoleic*	$C_{16}H_{30}O_2$	16:1	دهن اللبن- دهون حيوانية
9-أوكتاديسينويك *9-octadecenoic*	أوليك *Oleic*	$C_{18}H_{34}O_2$	18:1	معظم الزيوت والدهون
9-12-أوكتاديكاداى اينويك *9-12-octadecadienoic*	لينوليك *Linoleic*	$C_{18}H_{32}O_2$	18:2	معظم الزيوت والدهون
9-12-15-أوكتاديكاتراى اينويك *9-12-15-Octadecatrienoic*	لينولينيك *Linolenic*	$C_{18}H_{30}O_2$	18:3	الصويا – الكتان – زيوت الأسماك
9-ايكوسينويك *9-eicosenoic*	جادوليك *Gadoleic*	$C_{20}H_{38}O_2$	20:1	زيوت الأسماك
13-دوكوسينويك *13-decosenoic*	ايروسيك *Erucic*	$C_{22}H_{42}O_2$	22:1	زيت الشلجم- الخردل
5-8-11-14-ايكوساتترا اينويك *5-8-11-14-eicosatetraenoic*	أراكيدونيك *Arachidonic*	$C_{20}H_{32}O_2$	20:4	زيوت الحيوانات البحرية

4.1.2.7. أحماض دهنية أخرى :

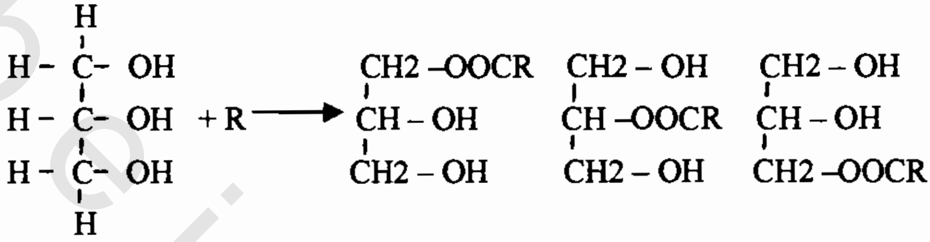
بالإضافة إلى الأحماض الدهنية السابقة فإن هناك أحماض دهنية أخرى غير شائعة فى الزيوت أو الدهون الغذائية فعلى سبيل المثال لا الحصر مايلي:

- أحماض أسيتيلينية (حمض إيساميك *Isamic*) ويوجد فى زيت نبات الوانجوكيا.
- أحماض هيدروكسيلية (حمض ريسينوليك***Ricinoleic*** ويوجد فى زيت الخروع)
- أحماض حلقية (حمض الشالموجريك ***chaulmoogric***) ويوجد فى زيت بنات الشلموجرا .
- أحماض ثنائية الكربوكسيل (أكساليك ***Oxalic*** ، سكسنيك ***Succenic*** ، مالونيك ***Malonic***) هى من نواتج تمثيل الليبيدات .

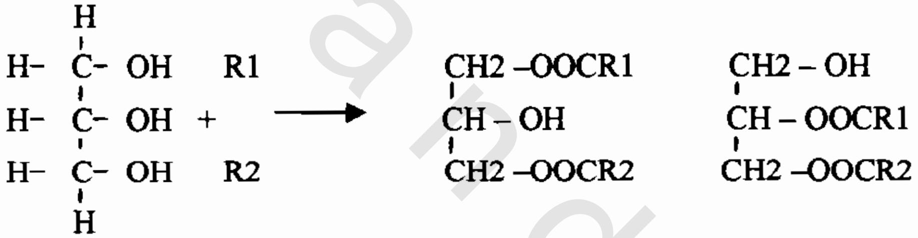
obeikandl.com

2.2.7. الجليســـــريدات *Glycerides* :

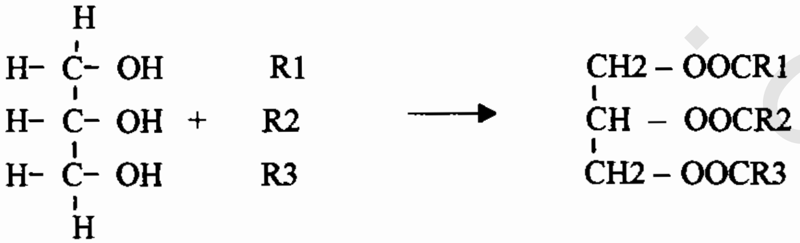
تنتج الجليسريدات من تفاعل الجليسيرول مع الأحماض الدهنية ويرتبطا برابطة إستيرية فينتج عن ذلك جليسريدات مختلفة حسب نوع وعدد الأحماض الدهنية على الجليسيرول كما هو موضح فيمايلى :



جليسيرول	حامض دهنى	ألفامونوجليسيريد	بيتامونوجليسيريد	ألفا مونوجليسيريد
Glcerol	Fatty Acid	α- M.G.	β- M.G.	α- M.G.



جليسيرول	أحماض دهنية	α- ά دایجلیسیرید	α- β دایجلیسیرید
Glycerol	Fatty Acids	α-ά.D.G.	α-β .D.G.



جليسيرول	أحماض دهنية	ترای جلیسیرید
Glycerol	Fatty acids	Triglyceride

obeikandl.com

3.2.7. المواد غير الجليسريدية *Nonglyceride Substances* :

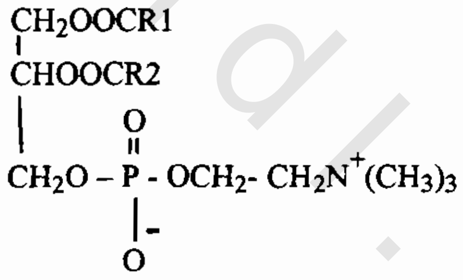
تحتوى الزيوت والدهون على نسب منخفضة من مركبات يطلق عليها المواد غير الجليسريدية وتنخفض نسبة هذه المواد بعد عمليات الإستخلاص والتكرير المختلفة وقد يختفى بعضها نهائيا . ومن أهم تلك المواد ما يلى :

1.3.2.7. الفوسفوليبيدات *Phospholipids* :

وهى عبارة عن كحولات عديدة مثل الجليسيرول متحدة برابطة إستيرية مع أحماض دهنية وحمض الفوسفوريك والذى يتحد بدوره مع قاعدة نيتروجينية . وتترسب تلك المواد بالأسيتون أو بخلط الزيت مع الماء وتترك فترة من الزمن لترسب ويمكن فصلها بعد ذلك بالطرد المركزى . ومن أهم أنواع الفوسفوليبيدات ما يلى :

- **الليســـــيثين *Lecithin* :**

وهو عبارة عن جليسيريد ثلاثى إستبدل حامض دهنى منه بحمض فوسفوريك مرتبط بقاعد نيتروجينية (قاعدة الكولين ***choline base***) ، ويعمل الليسيثين كمادة مستحلبة بكفاءة عالية ويخفض كذلك من لزوجة الزيت ، بالإضافة إلى أنه يعمل كمساعد لمضادات الأكسدة ***Synergist*** .

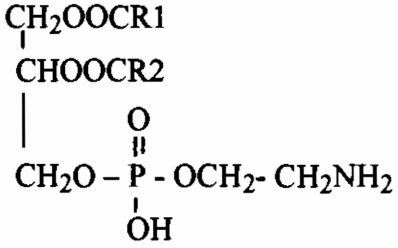


اليسيثين *Lecithin*

- **السيـــــفالين *Cephaline* :**

وهو يشبه فى تركيبه الكيميائى تركيب الليسيثين فيما عدا أن القاعدة النيتروجينية هى الكولامين ***cholamine*** (***Ethanolamine***) .

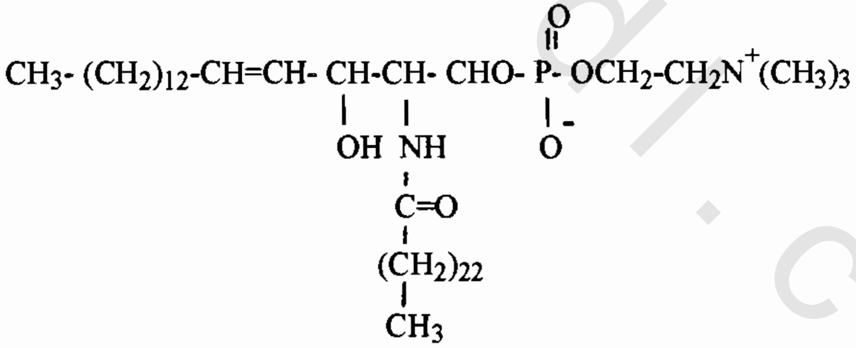
obeikandl.com



السيفالين ***Cephaline***

• الإسفنجـــومايلين ***Sphingomyelin*** :

هذا المركب يشابه التركيب الكيميائي لليسيثن فيما عدا أن القاعدة النيتروجينية هى قاعدة الإسفنجوزين ***Sphingosine*** .



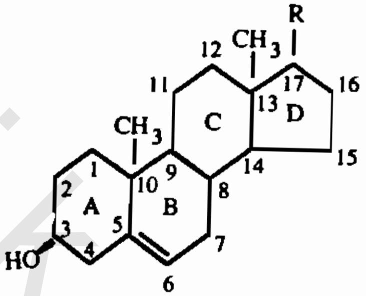
سفنجومايلين ***Sphingomyelin***

obeikandi.com

وعموما فإن الأحماض الدهنية الموجودة فى الفوسفوليبيدات على الجليسيريد تختلف بإختلاف مصدرها النباتى وكذلك تتباين نسبة الفوسفوليبيدات حسب نوع المادة الخام ودرجة نضج البذور عند الإستخلاص .

2.3.2.7. الإستيرويدات (الإستيرولات) *Esteroids* (*Esterols*) :

وهى عبارة عن كحولات قابلة للتبللور ومتعادلة وغير قابلة للتصبن ، والرمز البنائى للإستيرولات ما يلى:



ومن أهم أنواع الإستيرولات ما يلى :

- **الكوليستيرول *Cholesterol* :** ويوجد بصفة أساسية فى الدهون الحيوانية ورمزه البنائى كما يلى :حيث تستبدل مجموعة الــ R فى التركيب البنائى السابق للإستيرولات بالتركيب الكيميائى التالى :

$$R = -CH(CH_3)(CH_2)_3CH(CH_3)_2$$

- **بيتاسيتوستيرول *β-sitosterol*** : وهو من الإستيرولات النباتية وشائع وجوده فى زيت بذرة القطن وتستبدل مجموعة الــ R فى التركيب الأساسى بما يلى :

$$R = -CH(CH_3)\,CH_2\,CH_2\,CH\,CH(CH_3)_2$$

$$C_2H_5$$

- **ستيجماستيرول *Stigmasterol* :** وهو من الإستيرولات النباتية وهو يمثل الصورة الرئيسية للفوسفوليبيدات فى زيت فول الصويا ، حيث تستبدل الــ R من الرمز البنائى للإستيرولات بالمجموعة التالية :

$$R = -CH(CH_3)\,CH = CH - CH - CH(CH_3)_2$$

$$C_2H_5$$

• **كامبستيرول** ***Champesterol*** : تم عزل هذا النوع من الفوسفوليبيدات من فول الصويا وجنين القمح وزيت الشلجم ورمزه البنائى كما يلى : حيث تستبدل الـ R بمايلى:

$$R = -\,CH\,(CH_3)CH{=}\,\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}\text{-}CH\,(CH_3)_2$$

• **أرجوستيرول** ***Ergosterol*** : يوجد هذا النوع من الإستيرولات فى كلا من الزيوت النباتية والدهون الحيوانية ، يتحول عند تعرضه للشمس إلى فيتامين " ***D*** " والذى يقى الأطفال الرضع من الكساح . ورمزه البنائى يحتوى على رابطتين زوجيتين فى الجزء الحلقى واحدة بين ذرتى الكربون 5 ، 6 والأخرى بين ذرتى الكربون 7 ، 8 ، وتستبدل مجموعة الـ R بمايلى :

$$R = -\,CH(CH_3)CH = CH\text{-}\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}\text{-}CH\,(CH_3)_2$$

وتعتبر الإستيرولات مهمة من الناحية التغذوية والطبيه لما لها من أهمية فى تخليق الهرمونات الجنسية . ويعتبر الكوليستيرول من أهم هذه الإستيرولات حيث يوجد بصورة طبيعية فى جسم الإنسان ، ويعتبر الكبد هو المصنع الرئيسى لتخليق الكوليستيرول ، كما أنه فى نفس الوقت أكبر مستهلك لمركبات الكوليستيرول ، فكل خلية يمكنها تخليقه أو تصنيعه ، ويوجد الكوليستيرول بنسبة كبيرة فى المخ . وتؤدى زيادة مستوى الكوليستيرول عن الحد المناسب إلى حدوث تصلب للشرايين .

وعموما فإذا كانت نسبة الكوليستيرول فى دم الإنسان أقل من 200 ملليجرام/ديسيلتر فإن مستواع يعتبر منخفضا ، فى حين إذا كانت نسبته فى الدم تتراوح بين 200 إلى 240 ملليجرام/ديسيلتر فإن مستواه يعتبر متوسطا ، أما إذا زادت نسبته عن 240 ملليجرام/ديسيلتر فذلك نذير بمخاطر حتمية تؤدى لمرض تصلب الشرايين . ***atheroclerosis***

وينتقل الكوليستيرول داخل الخلايا المختلفة عن طريق ناقلات خاصة يطلق عليها بالليبوبروتينات ***lipoproteins*** ، ويوجد منه أربع صور لكل صورة منها دور فى عملية التمثيل الغذائى وهى : الليبوبروتين منخفض الكثافة جدا ***very low density***

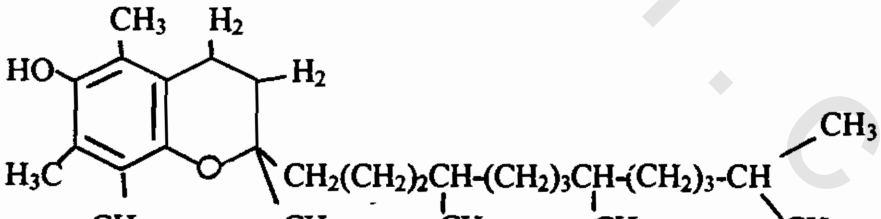
obeikandl.com

lipoprotein (*vLDL-C*) ، الليبوبروتين منخفض الكثافة *low density lipoprotein* (*LDL-C*) ، الليبوبروتين متوسط الكثافة *intermidiate density lipoprotein* (*IDL-C*) ،الليبوبروتين مرتفع الكثافة *high density lipoprotein* (*HDL-C*) . وتعتبر الكوليستيرول مرتفع الكثافة (*HDL-C*) هو النوع الجيد ولا يسبب أى مخاطر صحية للإنسان .

ومن ناحية أخرى تعتبر الزيوت والدهون من العناصر المحددة لمستوى الكوليستيرول فى البلازما حيث يعتقد أن الأحماض الدهنية المشبعة فى الدهون هى المسئولة عن زيادة مستوى الكوليستيرول فى البلازما . أما الأحماض الدهنية غير المشبعة وعديدة عدم التشبع (خاصة ω-3 ، ω-6) فيعتقد أنها تعمل على خفض مستوى الكوليستيرول فى الدم ، حيث أثبتت الأبحاث أن الأحماض الدهنية غير المشبعة تعمل على زيادة معدل تفريغ الفوسفوليبيدات من البلازما إلى الكبد ، مما يؤدى لخروج بعض الكوليستيرول إلى الصفراء وبالتالى ينخفض مستوى الكوليستيرول فى البلازما .

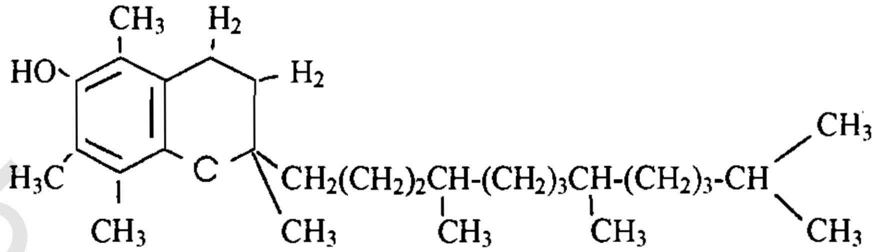
3.3.2.7. التوكوفيرولات *Tocopherols* :

تعمل التوكوفيرولات كمواد مضادة للأكسدة ***antioxidants*** فى الزيوت النباتية وتتأثر بالعمليات التكنولوجية المختلفة أثناء الإستخلاص ، كما تعرف بفيتامين هـ (*E*) ولها علاقة بتنشيط الجهاز التناسلى . ويعتبر زيت جنين القمح من أغنى الزيوت فى محتواه من التوكوفيرولات . ومن أهم مركبات هذه المجموعة مايلى :

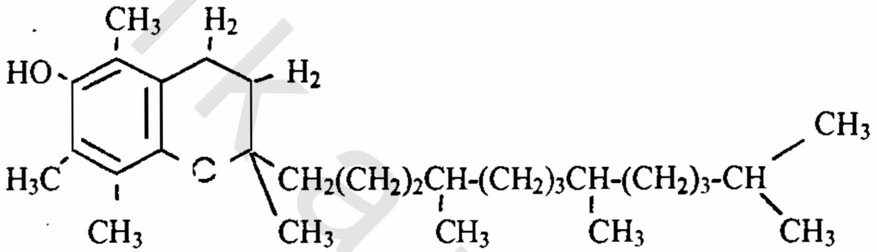


الفا توكوفيرول

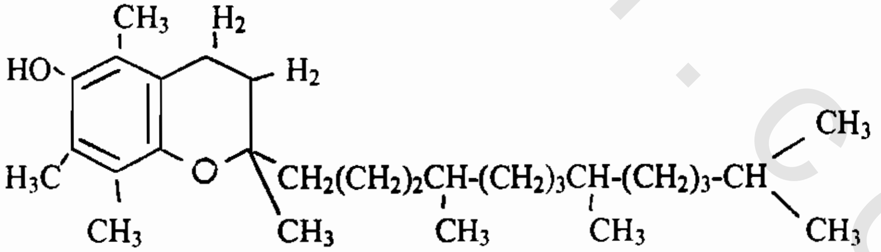
obeikandl.com



بيتا توكوفيرول



جاما توكوفيرول



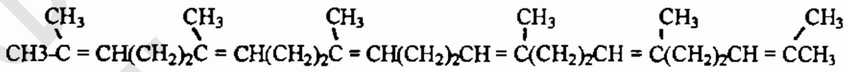
دلتا توكوفيرول

4.3.2.7. الهيدروكربونات *Hydrocarbons* :

وهى عبارة عن مواد غير قابلة للتصبن ولا تحتوى على مجموعات هيدروكسيلية , ومن أهم مركبات هذه المجموعة ما يلى :

1- سكوالين *Squaline* :

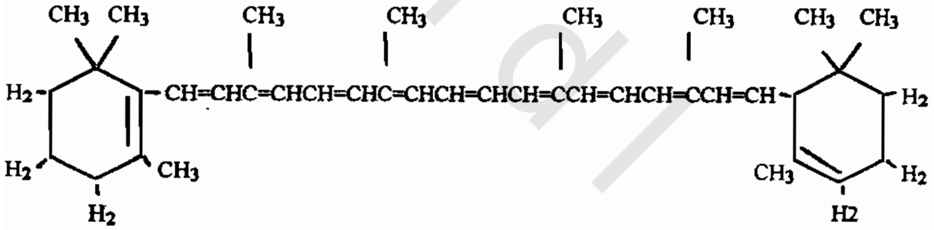
يوجد بكثرة فى زيوت الأسماك وخاصة زيت كبد القرش ، كما لوحظ وجوده فى بعض أصناف من زيت الزيتون فى الجزء الغير قابل للتصبن .



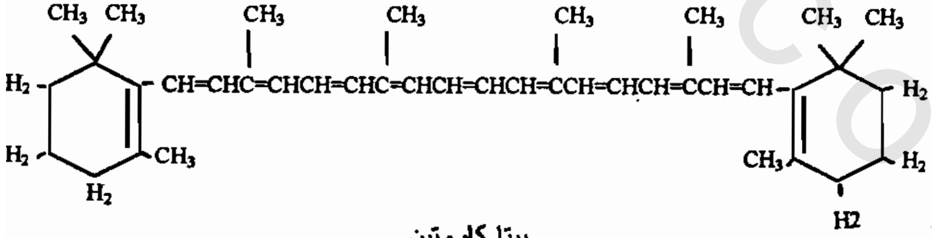
سكوالين ***Squaline***

2- الكاروتينات *Carotenes* :

وهى عبارة عن مواد هيدروكربونية ملونة توجد فى الزيوت النباتية والتى تعطى الزيوت اللون المميز لها، وتتأثر هذه المركبات بعمليات التنقية المختلفة أثناء إستخلاص الزيوت النباتية من مصادرها المختلفة وكذلك أثناء الهدرجة ، وهناك عدة أنواع من الكاروتينات من أهمها ألفا ، بيتا ، جاما كاروتين :

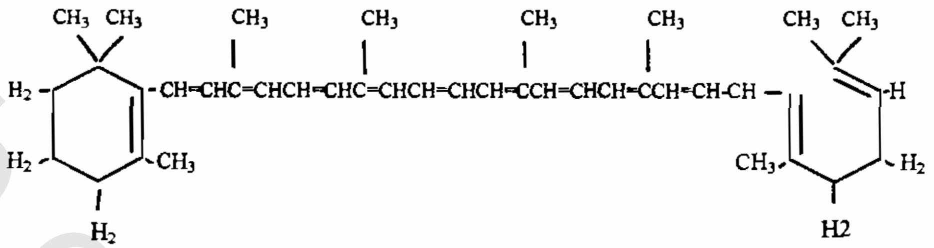


ألفا كاروتين



بيتا كاروتين

obeikandl.com



جاما كاروتين

3.7. تحلـــــيل الزيوت والدهون

قبل أن نبدأ بشرح الطرق المختلفة لتحليل الزيوت والدهون لا بد من إلقاء نظرة فاحصة على طرق تجهيز العينات قبل عملية التحليل لما لها من أهمية بالغة فى إمكانية الحصول على نتائج سليمة .

1.3.7. تجهيز العينة *Sample preparation* :

تعتمد عملية إستخلاص الزيوت والدهون من الأنسجة النباتية أو الحيوانية يعتمد على عدة أسس عامة أو خطوات رئيسية كما يلى :

1.1.3.7. معاملات ما قبل الإستخلاص *Pretreatments before extraction* :

• ***التجفيف Drying*** : فى كثير من الأحيان لاتستطيع المذيبات العضوية التى تستخلص بها الزيوت والدهون أن تتخلل الأنسجة ذات الرطوبة العالية بسهولة ، وبالتالى تنخفض كفاءة عملية الإستخلاص ، فعلى سبيل المثال يعتبر الإيثرثنائى الإيثيل ***diethylether*** من المذيبات الهيجروسكوبية ويتشبع بسهولة بالماء وبالتالى تنخفض قدرته على الإستخلاص . وكذلك فإنه بالإضافة لأهمية عملية التجفيف فى زيادة كفاءة الإستخلاص فإنها تؤدى كذلك لسهولة طحن العينات وبالتالى زيادة مساحة سطح الإستخلاص وكسر المستحلب المائى . إلا أن تجفيف العينات على درجة حرارة مرتفعة قد يؤدى لنتائج عكسية حيث يؤدى لإرتباط الدهن مع البروتين والكربوهيدرات مما يؤدى إلى تعقيد وصعوبة عملية الإستخلاص بالمذيبات .

• **حجم الجزيئات *Particle size*** : تعتمد كفاءة عملية الإستخلاص من العينات الجافة على حجم الجزيئات فكلما كان حجم الجزيئات صغير كلما زادت مساحة سطح الإستخلاص وكفاءته. وفى بعض الأحيان يمكن خلط هذه الجزيئات مع مذيب واحد أو نظام مذيبات مختلطة .

• **التحليل الحامضى *Acid hydrolysis*** : يجرى التحليل الحامضى لتكسير الروابط بين الليبيدات والبروتينات والكربوهيدرات ويتم الهضم الحامضى بواسطة حمض الهيدروكلوريك 3 ع تحت تفريغ فيؤدى ذلك لتحويل هذه الروابط إلى صورة سهلة الإستخلاص .

2.1.3.7. إختيار المذيب *Selection of solvent* :

يؤدى عدم ذوبان الزيوت والدهون فى الماء لسهولة إستخلاصها من المكونات الأخرى فى الأنسجة كالبروتينات والكربوهيدرات . وللزيوت والدهون مدى واسع من التباين فى درجة عدم القطبية ***degree of non polarity*** والتى تعتمد أساسا على تركيبها (الكيميائى) الجزيئى . لذلك فقد يلزم إستخدام أكثر من نوع واحد من المذيبات لإستخلاص الليبيدات من الأنسجة. وبالرغم من أن روابط فاندرفالس ***Vanderwaals*** والروابط الإلكتروستاتيكية ***electrostatic bonds*** ، والروابط الهيدروجينية ***hydrogen bonds*** تتكسر أثناء الإستخلاص بالمذيبات إلا أن الروابط التساهمية ***covalent bonds*** تظل كما هى ولا تتأثر. فالليبيدات المتعادلة تتميز بروابط غير قطبية وبالتالى يسهل إستخلاصها من الأنسجة بواسطة المذيبات غير القطبية ***non polar*** . أما الليبيدات القطبية فتحتاج لمذيبات قطبية ***polar*** لكسر الروابط الإلكتروستاتيكية والهيدروجينية . وعلى النقيض من ذلك ، لايمكن إستخلاص شقوق الليبيدات ذات الروابط التساهمية (بين الليبيدات والسكريات) بالمذيبات العضوية وتظل كائنة فى الجزء غير الليبيدى . ولهذا فالإتمام عملية الإستخلاص يتحتم إجراء تحليل حامضى لكسر هذه الروابط.

وتعتمد صفات المذيبات المختارة لإستخلاص الليبيدات بصفة أساسية على التركيب الكيميائى الطبيعى للمادة الغذائية ونوع الليبيدات المراد إستخلاصها ويجب أن تتوفر الشروط التالية فى المذيبات المستخدمة فى عملية الإستخلاص :

obeikandl.com

- أن يكون لها قدرة عالية ومتميزة على إذابة الدهون ولا تذيب البروتينات أو الكربوهيدرات.
- أن تكون ذات درجة غليان منخفضة .
- يجب أن تتبخر بسهولة بعد الإستخلاص دون أية آثار منها فى العينة .
- يجب أن يكون لها درجة إشتعال منخفضة ، غير سامة لتقليل المخاطر كلما أمكن ذلك .
- أن يكون سعرها منخفض نظرا لإحتمال إستهلاك كميات كبيرة منها فى عملية الإستخلاص.

ويبين جدول رقم (3.7) أهم أنواع المذيبات العضوية المستخدمة فى إستخلاص الليبيدات (الزيوت والدهون) من مصادرها المختلفة ودرجة قطبيتها.

جدول (3.7) : الخواص القطبية للمذيبات الشائعة الإستخدام فى إستخلاص الليبيدات

القطبية	المذيـــــــب	الإختلاط بالماء
Non polar	هكسان ***Hexane***	لا
↓	أيسوأوكتان ***Isooctane***	لا
	رابع كلوريد الكربون ***Carbon tetrachloride***	لا
	كلوروفورم ***Chloroform***	لا
	كلوريد الميثيلين ***Methylene chloride***	لا
	تتراهيدروفوران ***Tetrahydrofuran***	نعم
	الإيثيرثنائى الإيثيل ***Diethyl ether***	لا
	خلات الإيثيل ***Ethyl acetate***	ضعيف
	الأسيتون ***Acetone***	نعم
	الأسيتونيتريل ***Acetonitrile***	نعم
	الأيزوبروبانول ***Isopropanol***	نعم
	الميثانول ***Methanol***	نعم
	حامض الخليك ***Acetic acid***	نعم
Polar		

obeikandl.com

3.1.3.7. إستخلاص الليبيدات *Extraction of lipids* :

بعد تجهيز العينات المراد إستخلاص الليبيدات منها بتجفيفها وطحنها يجرى خلطها جيدا بالمذيب المناسب. وهناك عدة طرق لعملية الإستخلاص نذكر منها مايلى :

أ- الطرق الغير مباشرة *Indirect Methods* *للتقدير التقريبى لنسبة الليبيدات الكلية* :

* **طريقة الكثافة *Density method*** : أمكن تقدير الليبيدات الكلية عن طريق حساب كثافة البذور الزيتية ، حيث لوحظ أن معامل الإرتباط بين كثافة البذور وكمية الزيت مرتفع ($r = 0.96$) .لذا فهى تستخدم فى تقدير الليبيدات فى البذور ذات المحتوى المرتفع من الزيت . وتقدر الليبيدات بهذه الطريقة عن طريق جداول قياسية خاصة تبين العلاقة بين كثافة البذور وكمية الزيت فيها (مقدرة بالطرق الكيميائية العادية) .

* **إمتصاص أشعة إكس *X-ray absorption*** : وجد أن هناك علاقة بين درجة إمتصاص اشعة إكس وكمية الدهون فى العينات ، حيث لوحظ أن الأنسجة الحيوانية منخفضة الدهن تمتص أشعة إكس أكثر من الأنسجة المرتفعة فى الدهن . وتستخدم هذه الطريقة فى تقدير الدهون فى اللحوم ومنتجاتها بإستخدام منحنى قياسى يبين العلاقة بين الأشعة الممتصة ومحتوى الدهون المقدرة بطرق الإستخلاص المعتادة .

* **درجة التوصيل الكهربى *Dielectric*** : من المعروف أن درجة التوصيل الكهربى للمذيب العضوى تتغير عندما يذوب الدهن فيه . فبعد طحن العينة وخلطها بالمذيب يقاس درجة التوصيل الكهربى للمخلوط ، وعن طريق جداول قياسية لمحتوى الدهن والتى توضح الإختلافات فى درجة التوصيل الكهربى ومحتوى الدهون فى نفس المذيب يمكن معرفة محتوى الدهون بالعينة . كما أن معامل الإرتباط بين محتوى الزيت (فى فول الصويا) ودرجة التوصيل الكهربى علاقة خطية ويساوى ($r = 0.98$) .

* **التحليل الطيفى بالأشعة تحت الحمراء *Infrared spectroscopy*** : تستخدم هذه الطريقة فى تقدير الدهن فى اللبن ومنتجاته ، حيث أن دهن اللبن يمتص الأشعة تحت الحمراء عند طول موجى 5.73 μm وتعتمد درجة الإمتصاص على كمية الدهن فى العينة ، وعن طريق منحنى قياسى يمكن معرفة كمية الدهن فى العينة .

ب- الطرق المباشرة لتقدير الليبيدات الكلية ***Direct methods*** :

* **طريقة النقع *Steeping method*** : تستخدم هذه الطريقة لإستخلاص الليبيدات من المواد الغذائية الجافة بعد طحنها جيدا مثل الحبوب ، حيث تنقع وزنة معينة منها فى المذيب العضوى (هكسان أو بتروليم إيثر) فى كأس زجاجى ويغطى بالألومنيوم فويل حتى لايتطاير المذيب على درجة حرارة الغرفة مع التقليب لمدة 24 ساعة ، ثم يرشح المستخلص ، وينقل الراسب المتبقى على ورقة الترشيح إلى الكأس مرة أخرى وتضاف إليه كمية من المذيب وينقع مرة أخرى كما سبق لمدة 24 ساعة إضافية ، ثم يرشح ويضاف الراشح الناتج على الراشح الأول مع إضافة مادة ممتصة للرطوبة مثل كبريتات الصوديوم اللامائية ***sodium sulphate anhydrous*** لتجفيف المستخلص ثم يرشح مرة أخرى لإزالة كبريتات الصوديوم اللامائية ويبخر فى جهاز تبخير المذيبات ***Rotary evaporator*** تحت تفريغ . وهذه الطريقة لا يعتد بها فى حساب النسبة المئوية للزيت أو الدهن فى العينة حيث أنها لا تعطى نتائج دقيقة ولكن يمكن إستخدامها فى الحصول على الزيت لإجراء التحليلات المختلفة .

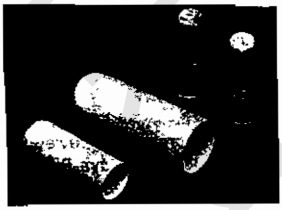
* **طريقة سوكسلت *Soxhlet method*** : تستخدم هذه الطريقة فى إستخلاص الزيوت والدهون من العينات (**الجافة**) المختلفة بعد تجهيزها (**تجفيفها وطحنها**) ، ويستخدم فى هذه الطريقة جهاز سوكسلت الذى يتكون من عدة أجزاء وهى كما يلى :

- كستبان ***thimble*** خاص لوضع العينة المطحونة فيه ، وإذا لم يتوفر هذا الكستبان يمكن إستخدام ورقة ترشيح تشكل على شكل إسطوانى مقفل من أحد الطرفين قبل وضع العينة فيها .
- مكثف مائى لإعادة تكثيف المذيب المتبخر على العينة بإستمرار لتحسين كفاءة الإستخلاص .
- وحدة إستخلاص مزودة بذراع جانبى ***side arm*** يجمع فيها المذيب بعد تكثيفه على العينة وبعد وصول حجمه لمستوى أعلى من الذراع الجانبى يعاد مرة أخرى إلى قابلة تجميع الزيت والمذيب والتى بتسخينها يتبخر المذيب ويتكثف على العينة مرة أخرى لإستخلاص مزيد من الزيت ، وفى كل الأحوال يظل المستخلص فى القابلة .

- قابلة (دورق ذو قاع دائرى سعة 500 مل) لتجميع الزيت والمذيب بعد عملية الإستخلاص.

- حمام مائى مزود بثرموستات لضبط درجة الحرارة .

ويوضح الشكل رقم (1.7) رسم تخطيطى لأجزاء جهاز سوكسلت المختلفة .



كستبانات

جهاز سوكسلت

شكل (1.7): جهاز سوكسلت

ويمكن تلخيص خطوات إستخلاص الزيت بطريقة سوكسلت فيما يلى :

- زن وزنة معلومة بدقة من العينة الجافة المجهزة وضعها فى الكستبان (أو بتغليفها بورقة ترشيح) مع تغطية الكستبان بقطعة من القطن لعدم تسرب العينة منه أثناء الإستخلاص.

obeikandi.com

- يوضع الكستبان وبه العينة فى وحدة الإستخلاص ذات الذراع الجانبى ويضاف عليه حجم من المذيب يعادل مرة ونصف حجم وحدة الإستخلاص مع ملاحظة وجود القابلة تحت وحدة الإستخلاص .
- ثم يركب المكثف المائى على وحدة الإستخلاص ، ثم يوضع الجهاز فى حمام مائى ويثبت بمواسك خاصة ، ويسخن على درجة حرارة مساوية أو أعلى قليلا من درجة تبخر المذيب . فأثناء عملية التسخين يتبخر المذيب من القابلة بفعل الحرارة ويمر خلال الذراع الجانبى لوحدة الإستخلاص ثم إلى المكثف فيتكثف المذيب على العينة حتى يصل حجمه إلى مستوى الذراع الجانبى ثم يحدث تفريغ (*Siphon*) للمذيب والزيت الذى إستخلصه إلى القابلة مرة أخرى ، ومع إستمرار التسخين تستمر عملية الإستخلاص حتى نهاية الفترة المحددة وهى حوالى 16 ساعة إستخلاص . ويمكن تجزئة وقت الإستخلاص حسب ظروف القائم بالعملية بحيث يكون مجموع زمن الإستخلاص 16 ساعة .
- بعد ذلك يبخر المذيب من الزيت فى جهاز تبخير المذيبات ***Rotary evaporator*** تحت تفريغ ثم ينقل الزيت مع جزء من المذيب فى كأس معلوم الوزن ويكمل تبخير المذيب من العينة فى فرن على درجة حرارة 50 - 60°م حتى ثبات الوزن ، ثم يحسب وزن الزيت المستخلص .
- تحسب النسبة المئوية للزيت فى العينة من المعادلة الآتية :

$$\text{\% للزيت فى العينة} = \frac{\text{وزن الزيت}}{\text{وزن العينة}} \times 100$$

وتجدر الإشارة فى هذا الصدد إلى ضرورة تجفيف العينات قبل إستخلاصها بهذه الطريقة لتحسين كفاءة الإستخلاص .

*** طريقة بلاى وداير *Blight & Dyer method* :** تستخدم هذه الطريقة فى حالة إستخلاص الدهون من العينات ذات النسبة المرتفعة من الرطوبة (70 %) مثل اللحوم والأسماك والدواجن . ويستخدم فى هذه الطريقة نوعين من المذيبات الأول غير قطبى نسبيا (كلوروفورم) والآخر قطبى (ميثانول) ويستغرق زمن الإستخلاص أقل من 5 دقائق ويمكن إيجاز هذه الطريقة فى النقاط التالية :

- زن بدقة 100 جرام من العينة المتجانسة وإنقلها إلى خلاط كهربائى ***Warring blender*** من نوع لايحتوى على أى أجزاء أو جوانات من الكاوتشوك حتى لاتتأكل بالمذيبات .
- إضف عليها بعد ذلك 100 مل من الكلوروفورم + 200 مل ميثانول + حجم من الماء عبارة عن الفرق بين 80 – % لرطوبة العينة (5 مل ماء مقطر عندما تكون رطوبة العينة 75 %) وإخلط لمدة 2 ق .
- أضف 100 مل أخرى من الكلوروفورم وإخلط مرة أخرى لمدة 30 ثانية ، ثم إضف 100 مل من الماء المقطر وإستمر فى الخلط لمدة 30 ثانية أخرى .
- رشح المخلوط بعد ذلك فى قمع بوخنر ***Buchner*** بإستخدام ورق ترشيح واتمان رقم 1 تحت تفريغ لسهولة الترشيح .
- إنقل ورقة الترشيح وما عليها من راسب إلى الخلاط مرة أخرى وأضف عليها 100مل كلوروفورم لإستخلاص الدهن المتبقى فى العينة .
- رشح كما سبق ، ثم أضف هذا الراشح إلى الراشح الأول فى قمع فصل وإتركه فترة من الزمن حتى تمام الفصل .
- ويلاحظ أن طبقة الكلوروفورم (الطبقة السفلية) لونها أصفر لإحتواءها على الزيت او الدهن المستخلص فى حين الطبقة العليا (الميثانول والماء) رائقة إلى حدما .
- تفصل بعد ذلك طبقة الكلوروفورم من قمع الفصل فى دورق يحتوى على كبريتات صوديوم لامائية لتجفيف المستخلص .
- يرشح المستخلص بعد ذلك لإزالة كبريتات الصوديوم اللامائية ، ثم يبخر فى جهاز تبخير المذيبات ويعبر وزن الدهن عن % للدهن فى العينة الرطبة مباشرة (لأن وزن العينة 100 جم تماما).

2.3.7. طرق تحليل الزيوت والدهون *Analysis of fats and oils :*

1.2.3.7. الإختبارات الوصفية *Qualitative tests :* تتميز معظم هذه الإختبارات بأنها إختبارات لونية ، تعتمد أساسا على تكوين لون خاص للمواد غير المتصبنة التى تتفاعل مع جواهر كشافة معينة وتعطى لون مميزا للإختبار ، وهذه الإختبارات غير دقيقة ولا يصح الإعتماد عليها كليا دون الإستعانة بالطرق الأخرى الطبيعية والكيميائية .

obeikandi.com

* **إختبار الأكرولين** ***Acrolein test*** : يعتبر هذا الإختبار عام لجميع الزيوت والدهون حيث يتم تسخين الزيت أو الدهن بشدة فينتج مركب الأكرولين أو الأكرالدهيد ***acrolein or acraldehyde*** ذو الرائحة النفاذة ، والذى ينتج من فقد الجليسيرول 2 جزئ ماء كما هو موضح فى المعادلة الآتية :

$$\begin{array}{c} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} - 2H_2O \longrightarrow \begin{array}{c} CH_2 \\ \| \\ CH \\ | \\ CHO \end{array}$$

Glycerol ***Acraldehyde***

* **إختبار هالفن** ***Halphen's test*** : يستخدم هذا الإختبار فى الكشف عن غش الزيوت والدهون والزبدة بزيت بذرة القطن ويجرى هذا الإختبار طبقا لطريقة (***AOAC*** رقم 897.02) كما يلى :

- ضع حوالى 8–10 مل من الزيت فى أنبوبة إختبار كبيرة
- أضف عليها 10 مل من محلول هالفن (1% كبريت فى ثانى كبريتيد الكربون) + 10مل كحول إمايل ، ثم سخن فى حمام مائى يغلى لمدة ساعة .
- إذا تكون لون أحمر دل ذلك على أن العينة تحتوى على زيت بذرة القطن ويرجع ذلك إلى إحتواء زيت بذرة القطن على أحماض دهنية حلقية ***cyclopropenoid*** بنسبة 0.5 % ممثلة كحامض المالفاليك ***malvalic*** والذى يعطى اللون الأحمر مع محلول هالفن.

* **إختبار فلافيشيا** ***Villavecchia test*** : يستخدم فى الكشف عن زيت السمسم ***sesame oil*** ، حيث يتفاعل الفورفورال مع الإستيرولات الموجودة فى زيت السمسم ويعطى لون أحمر ، ويمكن إجراء الإختبار كما يلى (طريقة ***AOAC*** رقم 893.01) :

- أضف 10 مل من الزيت فى أنبوبة إختبار + 0.1 مل محلول فلافيشيا (2 % فورفورال فى كحول إيثايل 95 %) + 10 مل حامض هيدروكلوريك مركز .
- قلب الأنبوبة جيدا لمدة 30 ثانية ، ثم أترك الأنبوبة حتى تمام الفصل .

obeikandi.com

– إذا لم يتكون لون أحمر فى طبقة الحامض دل ذلك على عدم وجود زيت السمسم.

– إذا تكون لون أحمر فى طبقة الحامض يضاف 10 مل من الماء والرج ، ثم تترك الأنبوبة فترة من الزمن ، فإذا أعطت لون أحمر فى طبقة الحامض دل ذلك على وجود زيت السمسم .

2.2.3.7. الإختبارات الطبيعية *Physical tests* :

• ***الوزن النوعى Specific gravity*** : وهى عبارة عن وزن حجم معين من الزيت أو الدهن منسوبا إلى وزن نفس الحجم من الماء عند درجة حرارة معينة .وعادة يقدر الوزن النوعى للزيوت أو الدهون على درجة حرارة 25°م ، ولكن هناك بعض أنواع من الزيوت والدهون لايمكن قياسها عند هذه الدرجة من الحرارة وعليه فإنه يفضل تقدير وزنها النوعى على درجات حرارة مرتفعة نسبيا ثم تصحح قيمة الوزن النوعى بإستخدام معامل التصحيح التالى :

الوزن النوعى (25°م)= الوزن النوعى (25°م) + 0.00064 (د – 25°م)

حيث أن د = درجة الحرارة المقاس عندها الزيت أو الدهن

ونظرا لأن الكثافة تتأثر بكل من الوزن الجزيئى للأحماض الدهنية ودرجة عدم التشبع فإنه يمكن تقديرها عن طريق قياس كل من رقم التصبن والرقم اليودى من المعادلة الاتية:

$$\text{Density (Sp.G)} = 0.8475 + 0.0003\,(S) + 0.00014\,(IV)$$

حيث أن : S = رقم التصبن ***Saponification value***

IV = الرقم اليودى ***Iodine value***

وعموما فإن الإختلافات فى الكثافة بين الزيوت المختلفة ليست كبيرة لذا فإن تقديرها ليس له أهمية كبيرة لدى محللى الأغذية ، ولكنها تستخدم فقط فى حساب وزن محتوى تنكات الزيت فى المصانع عن طريق الحجم وأثناء عمليات الهدرجة حيث تتغير مع درجة عدم التشبع . وتقدر الكثافة بالطريقة التقليدية بإستخدام قنينة الكثافة ***Pyknometer*** (*AOAC Method 920.213*).

• **معامل الإنكسار *Refractive Index*** : يعتبر معامل الإنكسار من الثوابت الطبيعية للزيوت والدهون ويقاس بإستخدام الرفراكتوميتر (***Abbe refractometer***) المزود بحمام مائى لضبط درجة حرارة القياس (طبقا لطريقة ***AOAC*** رقم ***921.08***) ،

حيث يقاس معامل إنكسار الزيوت على درجة حرارة 20°م أما الدهون فتقاس على درجة حرارة 40°م . وفى حالة إختلاف درجة حرارة الإختبار عن الدرجة المطلوبة يصحح معامل الإنكسار كما يلى :

يضاف أو يطرح 0.00035 عن كل 1°م إرتفاع أو إنخفاض فى درجة حرارة الإختبار عن الدرجة المطلوبة .... فى حالة الزيوت .

يضاف أويطرح 0.00036 عن كل 1°م إرتفاع أو إنخفاض فى درجة حرارة الإختبار عن الدرجة المطلوبة .... فى حالة الدهون .

كما يدل تقدير معامل الإنكسار على مدى نقاوة الزيت أو الدهن المختبر ، وينخفض معامل الإنكسار بزيادة نسبة الأحماض الدهنية غير المشبعة . ومن ناحية أخرى يزداد معامل الإنكسار بزيادة مدة تسخين الزيوت (خاصة زيوت القلى) نتيجة لحدوث بلمرة وتحلل حرارى للزيت أثناء عمليات القلى ، ويمكن أن يعبر معامل إنكسار الزيوت عن جودة نوع معين من زيوت القلى .

• **اللزوجـــــــة** ***Viscosity*** : تعرف لزوجة الزيت بأنها عبارة عن المقاومة الداخلية لجزيئات الزيت ***internal resistance*** عند إنسيابه . ونظرا لعدم وجود تباينات كبيرة بين لزوجة الزيوت المختلفة ، فإن تقديرها ليس له أهمية كبيرة لدى محللى الأغذية إلا إذا كانت سوف تستخدم فى تقدير درجة جودة الزيوت المسخنة وخاصة زيوت القلى ، حيث تزداد اللزوجة أثناء المعاملة الحرارية (القلى) نتيجة لتكوين البوليمرات ***polymers***

كما أنها تستخدم أيضا فى تقدير حجم المضخات والمواسير فى العديد من المصانع ويمكن تقديرها بإستخدام طرق عديدة منها ***Uebbelohde-type capillary viscometers*** أو طريقة أوستوالد ***Ostwald*** أو جهاز هوبلر ***Hoebbler*** .

• **نقطـــــة الإنصهار** ***Melting point*** : تعتبر درجة الإنصهار للزيوت والدهون مصطلحا عاما ، حيث أن الدهون لاتنصهر عند درجة حرارة محددة نظرا لأنها مواد غير نقية (لأن المركبات النقية عادة ما تنصهر إنصهارا كاملا عند درجة حرارة معينة) ، حيث أنها عبارة عن مخاليط مكونة من إسترات الجليسريدات الثلاثية ذات درجات متباينة من درجة عدم التشبع . ويعتبر الدهن منصهرا تماما عندما تنصهر المكونات الأصلب فى المكونات الأكثر سيولة . وهناك عدة طرق لتقدير نقطة الإنصهار:

– نقطة إنصهار الأنبوبة الشعرية المقفلة ***Closed capillary melting point*** :

ويجرى هذا الإختبار بوضع عينة الدهن السائلة فى أنبوبة شعرية ***capillary tube*** زجاجية ذو نهاية مقفلة ، ثم توضع فى الثلاجة على درجة حرارة 5 – 10°م حتى تتجمد تماما ، ثم توضع بعد ذلك فى حمام مائى مزود بترمومتر لقياس درجة الحرارة وترفع درجة حرارة الحمام المائى ببطئ ، وتكون نقطة الإنصهار هى درجة الحرارة التى يصبح عندها الدهن فى الأنبوبة صافيا (رائقا) تماما(***AOAC method 920.157***).

– نقطة إنصهار الأنبوبة الشعرية مفتوحة الطرفين ***Open capillary melting point***:

وفى هذه الطريقة توضع الأنبوبة الشعرية مفتوحة الطرفين فى عينة الدهن السائل (المنصهر) فيصعد الدهن فيها بالخاصية الشعرية فى الأنبوبة ، ثم توضع الأنبوبة وبها العينة داخل الفريزر لعدة ساعات (ويفضل طوال الليل) حتى تتجمد . بعد ذلك تربط الأنبوبة الشعرية مع ترمومتر بقطعة من الكاوتشوك ويوضع فى كأس به ماء بارد ويسخن ببطء مع التقليب حتى يبدأ الدهن فى الإنصهار وعندما يصعد عمود الدهن داخل الأنبوبة الشعرية بفعل ضغط الماء السفلى وعند هذه النقطة تسجل درجة الحرارة التى تمثل نقطة إنصهار الدهن . ويعتبر تقدير نقطة الإنصهار من الإختبارات الهامة فى الصناعة وخاصة أثناء تتبع خطوات عمليات الهدرجة كما تذكر كثيرا فى المواصفات القياسية للدهون .

* **إختبار التبريد *Cold test* :** يستخدم هذا الإختبار لقياس مقاومة الزيت للتبللور ، ويجرى على الزيوت النقية ، حيث يكون الزيت ناجحا مقبولا عن تخزينه لمدة 5.5 ساعة فى درجة حرارة الصفر المئوى دون تكوين راسب أو حدوث يتبللور. وبالتالى يمكن تحديد قدرة زيوت السلطة بصفة خاصة على تحمل التخزين داخل الثلاجة .

* **اللـــــــون *Color* :** يعتبر لون الزيت من أهم عوامل الجودة التى أقرها العديد من الباحثين ، حيث أنه من المعروف أن لكل نوع من أنواع الزيوت لون يتميز به . فبعض الزيوت يبدو طبيعيا داكنا بدرجة أكبر من البعض الآخر . وقد توجد صبغات ملونة فى زيوت مميزة (كزيت الزيتون) . ويتأثر لون الزيت بالمعاملات التكنولوجية المختلفة أثناء الإستخلاص والتنقية وكم الصبغات التى تتم إزالتها أثناء تلك المعاملات .

وتعتمد درجة لون الزيت على المادة الخام التى تم إستخلاص الزيت منها ، فإذا كانت رديئة أضفت على الزيت لونا داكنا غير مقبول . وقد يتغير لون الزيت عند تخزينه

obeikandi.com

لفترة طويلة على درجات حرارة مرتفعة ويرجع ذلك إلى تأكسد التوكوفيرولات ***tocopherols*** عديمة اللون إلى توكوكوينونات ملونة ***colored tocoquinones*** .

ويقاس لون الزيت عادة بمقياس لوفيبوند للألوان ***Lovibond tintometer*** ، حيث يقارن لون الزيت بلون عدة شرائح زجاجية قياسية مدرجة فى ثلاث ألوان هى : الأصفر ، والأحمر ، والأزرق . وقد يستخدم بدلا من الشرائح الزجاجية الملونة محاليل كيميائية ملونة قياسية توضع فى أنابيب مقفلة لمقارنة الألوان . ويمكن توضيح هذه الطريقة فيما يلى (طريقة ***AOCS Method Cc 13b-45***) :

- رشح العينة المجهزة (تصهر إذا كانت غير سائلة) خلال ورقة ترشيح لإزالة أى عكارة أو شوائب .
- جهز الشرائح الزجاجية القياسية الملونة (الصفراء أو الحمراء) الخاصة بجهاز لوفيبوند فى خلايا ***cells*** مختلفة المقاسات (6.35 مم ، 12.70 مم ، 25.4 مم ، 133.35 مم) . ثم نظف الخلية الزجاجية ***glass cell*** ذات المقاس المطلوب بمحلول رابع كلوريد الكربون وجففها قبل وضع عينة الزيت المراد قياس لونها.
- إملأ الخلية النظيفة بالعينة المرشحة ثم ضعها فى المكان المخصص لها فى الجهاز ويوضع فى الجانب الآخر الشرائح القياسية الملونة اللازمة لمضاهاة لون العينة.
- يعبر عن لون الزيت بوحدات اللوفيبوند أصفر أو أحمر كما يلى :

اللون مقاسا بخلية مقاس(6.35 أو12.70 أو 25.4 أو 133.35 مم) =
مجموع أرقام شرائح اللون الأصفر + مجموع أرقام شرائح اللون الأحمر

وهناك أنواع من الزيوت يوجد بها الصبغة الخضراء (كلوروفيل ***chlorophyll***) والتى تميز الزيت باللون الأخضر ، ويمكن تقديرها بطيف الإمتصاص ***Absorption spectra*** (كمية الضوء الممتصة) عند أطوال ضوئية محددة . وفى هذه الحالة فإن أطوال الموجات المستخدمة تكون عند 630 ، 670 ، 710 نانوميتر ، ويعبر عن النتائج بجزء فى المليون (***ppm***) من الكلوروفيل . كما يستخدم رقم اللون الأزرق فى مقياس لوفيبوند حيث يؤدى إندماج اللون الأصفر مع الأزرق بنسب متفاوتة لإعطاء درجات متباينة من اللون الأخضر .

هذا ويمكن إستخدام أجهزة قياس الإنعكاس الضوئى ***Reflactance meter*** والتى تعتمد على قياس إنعكاس الضوء ذو الموجات المختلفة فى الطول فى تقدير لون السمن الصناعى وزبدة الفول السودانى والمارجرين والمايونيز . وتفسر القيم المتحصل عليها عن طريق المقارنة بقيم قياسية مختارة .

*** نقط التدخين ، الوميض والإشتعال *Smoke , Flash and fire points* :**

تعرف نقطة التدخين ***smoke point*** بأنها درجة الحرارة التى يبدأ عندها الدهن أو الزيت فى إطلاق خيوط مستمرة من الدخان . وتعتبر من الإختبارات الهامة فى قياس درجة تدهور الزيوت وخاصة زيوت القلى . أما نقطة الوميض ***flash point*** فهى عبارة عن درجة الحرارة التى عندها يظهر وميض على أى جزء من سطح الزيت أثناء تسخينه والذى يستمر حوالى 1 ثانية . فى حين أن نقطة الإشتعال ***Fire point:*** هى درجة الحرارة التى يشتعل عندها الزيت وتستمر حوالى 5 ثوانى . ويجب الأخذ فى الإعتبار ضرورة تجفيف عينات الزيت أو الدهن قبل تقدير هذه الإختبارات حيث يؤثر وجود آثار من الرطوبة فى الزيت على هذه الصفات.

وبصورة عامة يؤدى تكون الأحماض الدهنية الحرة والمركبات القطبية الأخرى أثناء عمليات القلى إلى خفض نقطة التدخين ، وبمقارنة نقطة التدخين لنفس نوع الزيت المستخدم فى القلى يمكن التقدير النسبى لمدى تدهور جودته بتكرار عملية القلى .

3.2.3.7. الطرق الكيميائية لتحليل الزيوت والدهون:

Chemical Analysis of Oils & Fats:

*** الإختبارات الخاصة بالتحلل *Methods related to hydrolysis* :**

أ- **رقم الحموضة *Acid value*** : يستخدم رقم الحموضة عادة كدلالة على حدوث تحلل للزيت وذلك بفعل الحرارة والأكسجين فى وجود آثار من الرطوبة مما يؤدى إلى زيادة الأحماض الدهنية الحرة المنفردة مؤدية فى النهاية إلى حدوث تحلل وفساد للزيت أو الدهن . وقد تحتوى الزيوت النباتية على نسبة عالية من الأحماض الدهنية الحرة إذا ما كانت قد إستخلصت من بذور مخزنة بطريقة غير مناسبة . ويلاحظ عادة أن الزيادة فى نسبة الأحماض الدهنية الحرة يصحبها ظهور وتطور رائحة التزنخ التحليلى ويعرف رقم الحامض بأنه عبارة عن " ***عدد ملليجرامات البوتاسا الكاوية***

الكحولية اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الحرة فى 1 جرام زيت أو دهن "

وتوضح المعادلة التالية طريقة التفاعل :

CH_2OOCR1			CH_2OH		HOOC-R1
$CHOOCR2$	$+ 3H_2O \longrightarrow$		$CHOH$	+	HOOC-R2
CH_2OOCR3			CH_2OH		HOOC-R3
Triglceride			***Glycerol***		***Free fatty acids***

ويجرى هذا الإختبار كما يلى طبقا لطريقة (***AOAC*** رقم 940.28) :

- زن 10 جرام من الزيت أو الدهن فى دورق مخروطى ، ثم أضف 25 مل من كحول الإيثايل المتعادل وسخن محتويات الدورق لمدة 5 ق فى حمام مائى مع التقليب لإذابة العينة .
- أضف 1 مل من دليل الفينولفثالين ***phth*** (1 جم فى 100 مل كحول إيثايل 95%)
- عادل مع الرج المستمر بواسطة محلول ***KOH*** 0.1 ع إلى أن يظهر اللون القرنفلى لمدة 1 ق مع التقليب الشديد ليساعد على إتصال الأحماض الدهنية بالمحلول القلوى العيارى.
- إحسب رقم الحموضة كما يلى :

$$\text{رقم الحموضة} = \frac{56.1 \times \text{ع} \times \text{ح}}{\text{وزن العينة}}$$

حيث أن:

ح = حجم القلوى ***KOH*** المستخدم فى التعادل بالملليلتر

ع = عيارية القلوى ***KOH*** المستخدم فى التعادل .

- ويمكن حساب النسبة المئوية للحموضة مقدرة كحامض أوليك أوعلى حسب نوع الحامض الشائع وجوده فى الزيت المستخدم كما يلى :

$$\text{\% للحموضة مقدرة كحمض أوليك} = \frac{100 \times 282 \times 56.1 \times \text{ع} \times \text{ح(مل)}}{1000 \times \text{وزن العينة}}$$

obeikandl.com

ب- رقم التصبن ***Saponification value*** : يعرف رقم التصبن بأنه " ***عدد ملليجرامات البوتاسا الكاوية الكحولية اللازمة لتصبن 1 جرام زيت أو دهن*** " ويستدل منه على طول السلسلة الكربونية والوزن الجزيئى للأحماض الدهنية المكونة للزيت أو الدهن . حيث أنه كلما زاد عدد الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة كلما زاد رقم التصبن كما فى حالة دهن اللبن ومنتجاته وزيت جوز الهند . أما إذا كانت الأحماض الدهنية السائدة فى الزيت أو الدهن تتميز بطول سلسلتها الكربونية ينخفض رقم التصبن (كما فى زيوت الأسماك وبذرة الكتان ، عباد الشمس والصويا) . وتوضح المعادلة التالية ميكانيكية هذا التفاعل :

$$
\begin{array}{lcllcl}
CH_2OOCR1 & & & CH_2OH & & KOOC\text{-}R1 \\
| & & & | & & \\
CHOOCR2 & + 3KOH & \longrightarrow & CHOH & + & KOOC\text{-}R2 \\
| & & & | & & \\
CH_2OOCR3 & & & CH_2OH & & KOOC\text{-}R3
\end{array}
$$

Triglceride ***Glycerol*** ***Potassium salt of Free fatty acids***

ويمكن إيجاز طريقة إجراء هذا الإختبار فيما يلى(***AOAC*** رقم 920.160) :

- زن 5 جرام من عينة الزيت أوالدهن فى دورق مخروطى ، ثم أضف عليها 25 مل بوتاسا كاوية كحولية 0.5 ع ، ثم ضع مكثف هوائى عاكس على الدورق .
- ضع الدورق بعد ذلك فى حمام مائى يغلى لمدة تتراوح بين 30 إلى 60 دقيقة لإتمام تصبن الزيت أو الدهن .
- بعد تمام التصبن أضف 1 مل من دليل ***phth*** وعاير بواسطة حامض هيدروكلوريك 0.5 ع حتى نقطة إختفاء اللون الأحمر .
- إجرى عمل تجربة بلانك تحت نفس الظروف السابقة دون إضافة الزيت أو الدهن.

إحسب رقم التصبن كما يلى :

$$\text{رقم التصبن} = \frac{56.1 \times \text{ع} \times (\text{ح}_1 - \text{ح})}{\text{وزن العينة}}$$

حيث أن :

obeikandi.com

ح = حجم الحامض الذى إستهلك فى البلانك بالملليلتر .

ح1 = حجم الحامض الذى إستهلك فى التجربة بالملليلتر .

ع = عيارية حمض الهيدروكلوريك

ج- رقم الإستر : *Ester value* ويعبر هذا الرقم عن عدد ***ملليجرامات البوتاسا الكاوية اللازمة لتصبن 1جرام زيت أو دهن متعادل*** " ، وبعبارة أخرى هو عبارة عن رقم تصبن الزيت أو الدهن الخالى من الأحماض الدهنية الحرة . ويمكن تقديره كما يلى :

- قدر رقم حموضة العينة كما سبق .
- قدر رقم التصبن فى العينة كما سبق .
- إحسب رقم الإستر من المعادلة الآتية :

رقم الإستر = رقم التصبن – رقم الحموضة

* تقدير الأحماض الدهنية الطيارة *Determination of volatile fatty acids* :

1- *رقم رايخرت – ميسيل* *Reichert-Meissl value* : وهو عدد ملليلترات المحلول المائى القلوى 0.1 ع اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الطيارة القابلة للذوبان فى الماء (*C6 – C4*) الناتجة من تقطير 5 جم من عينة الزيت أو الدهن .

2- رقم بولنسكى *Polenske value* : وهو عدد ملليلترات محلول مائى قلوى 0.1 ع اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الطيارة غير القابلة للذوبان فى الماء (*C12 – C8*) الناتجة من تقطير 5 جم من عينة الزيت أو الدهن .

4- رقم كرشنر *Kirschner value* : وهو عدد ملليلترات محلول مائى قلوى 0.1 ع اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الطيارة القابلة للذوبان فى الماء والتى تكون أملاح الفضة (بإضافة 0.5جم كبريتات فضة إلى المحلول المتعادل فى إختبار رايخرت – بولونسكى ويترك لمدة ساعة فى الظلام ، ثم يرشح ويعاد تقطيره مرة أخرى فى وجود وسط حامضى مخفف ويعاير بواسطة محلول الباريوم) القابلة للذوبان فى الماء والناتجة من تقطير 5 جم من عينة الزيت أو الدهن .

وعموما فإنه تم تعريف هذه الطرق الأربع السابقة فقط حيث أنها تحتاج إلى أجهزة زجاجية مصممة بمواصفات خاصة ، ولكن فى وقتنا هذا أمكن إستخدام أجهزة التحليل الكروماتوجرافى فى تقدير هذه الأحماض والذى سوف نوضحه بالتفصيل فيما بعد .

* طرق تقدير درجة عدم التشبع *Determination of unsaturation* :

1- الطرق الإسبكتروفوتومترية ***Spectrophotometric methods*** : تستخدم هذه الطريقة في تقدير التغيرات التى تحدث فى الروابط الزوجية أثناء الأكسدة أو المعاملات الحرارية (عمليات القلى) ، حيث يحدث إنتقال للروابط الزوجية فى الأحماض الدهنية التى تحتوى على أكثر من رابطة زوجية ، كما تتكون هيدروبيروكسيدات تمتص الأشعة فوق البنفسجية ***ultra violet*** فى نطاق طول موجى يتراوح بين 230 – 245 نانوميتر . كما تتكون أيضا ألدهيدات وكيتونات كنواتج ثانوية لعملية الأكسدة لها إمتصاص فى المنطقة بين 262 – 285 نانوميتر . وبمعنى آخر فإن قياس إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجى 232 نانوميتر ، 268 نانوميتر يعطى فكرة عن مدى التغير فى الروابط الزوجية المتبادلة ***conjugated diene*** ، ***conjugated triene*** ، على التوالى .أى أنه عندما يتأكسد حامض اللينوليك ***C18:2*** لتكوين الهيدروبيروكسيدات يحدث إنتقال لإحدى الروابط الزوجية فينتج لينولييك برابطتين زوجيتين متجاورتين فيزداد على أثره إمتصاص هذا الحامض للأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجى 232 نانوميتر . ويمكن إيجاز هذه الطريقة كما يلى :

- زن 0.1 جرام من عينة الزيت أو الدهن بدقة ثم أضف عليها 75 مل من الأيزوأوكتان ***isooctane*** وقلب حتى الذوبان .
- أنقل محلول العينة إلى دورق معيارى سعة 100 مل وأكمل الحجم حتى العلامة .
- ضع العينة بعد ذلك فى خلية الجهاز (جهاز الإسبكتروفوتوميتر) وسجل درجة الأمتصاص للأشعة فوق البنفسجية على طول موجى 232 ، 268 نانوميتر بعد ضبط الجهاز بإستخدام المذيب المستخدم فى عملية الإذابة . وتحسب درجة الإمتصاصية للأشعة فوق البنفسجية من المعادلة الآتية:

$$E^{1\%}_{1cm} = A / (C \times d)$$

حيث A = الإمتصاص عند طول موجى 232 أو 268 نانوميتر

c = تركيز الزيت بالجرام /100 مل

d = طول أنبوبة القياس بالسم .

obeikandl.com

2- الطرق الكيميائية ***Chemical methods*** :

أ- ***الرقم اليودى Iodine value*** : هو عبارة عن " ***عدد جرامات اليود اللازمة لتشبع الروابط الزوجية فى 100 جرام زيت أو دهن*** " . ويستخدم هذا التقدير فى معرفة درجة عدم التشبع ونسبة الأحماض الدهنية غير المشبعة فى الزيت أو الدهن كما يستخدم فى تتبع المراحل المختلفة لعملية الهدرجة ، وفى الكشف عن غش الزيوت والدهون . وتوضح المعادلة التالية طريقة التفاعل :

$$- CH_2 - CH = CH - CH_2\text{-}R + I_2 \longrightarrow - CH_2\text{-}\underset{H}{\overset{I}{C}} - \underset{H}{\overset{I}{C}} - CH_2 - R$$

وقد قسمت الزيوت على أساس الرقم اليودى إلى :

- زيوت غير قابلة للجفاف ***Non drying oil*** : ذات رقم يودى أقل من 100 .
- زيوت نصف جافة ***Semi drying oil*** : ذات رقم يودى من 100- 130 .
- زيوت قابلة للجفاف ***Drying oils*** : ذات رقم يودى أعلى من 130 .

ومن ناحية أخرى فإن قيمة الرقم اليودى تتوافق عادة مع متوسط عدد الروابط الزوجية ***double bonds*** فى العينة المختبرة ، ولكنها لاتعطى فكرة عن توزيع هذه الروابط بين الأحماض الدهنية الموجودة بالعينة . ويمكن تلخيص إحدى طرق إجراء تقديرا للرقم اليودى (***AOAC*** رقم 920.158) فيما يلى :

- زن من 0.1 إلى 0.5 جرام من العينة فى دورق مخروطى بغطاء مصنفر سعة 500 مل ، وأضف عليها 10 مل كلوروفورم أو رابع كلوريد الكربون ، ثم أضف 25 مل من محلول ويج أو محلول هانس وإخلط محتويات الدورق برفق .
- إقفل الدورق بالغطاء المصنفر مع وضع كمية قليلة من يوديد البوتاسوم 15 %على الغطاء لعدم تسرب اليود ، ثم ضع الدورق فى الظلام لمدة 30 ق .
- أضف بعد ذلك 15 مل يوديد بوتاسيوم 15 % + 50 مل ماء مقطر سبق غليانه ، ثم إخلط وعاير اليود المنفرد بواسطة محلول ثيوكبريتات الصوديوم 0.1 ع بسرعة مع تحريك الدورق حركة دائرية حتى يختفى اللون الأحمر (قرب نقطة التعادل) ، ثم أضف بعد ذلك 1 مل من دليل النشا (1%) فيتكون لون أزرق .

- أكمل المعايرة إلى أن يختفى اللون الأزرق .
- إجرى نفس الخطوات السابقة كتجربة بلانك بدون العينة تحت نفس الظروف .
- إحسب الرقم اليودى من المعادلة الآتية :

$$\text{الرقم اليودى} = \frac{100 \times 126.9 \times ع \times (ح - ح_1)}{1000 \times \text{وزن العينة}}$$

حيث أن :

ح = حجم الثيوكبريتات بالملليلتر التى إستهلكت فى البلانك .

$ح_1$ = حجم الثيوكبريتات بالملليلتر التى إستهلكت فى التجربة.

ع = عيارية الثيوكبريتات

ب- التحليل الكروماتوجرافى للأحماض الدهنية *Chromatographic analysis* :

تستخدم أجهزة التحليل الكروماتوجرافى ***Gas chromatography*** فى تقدير تركيب الزيوت والدهون من الأحماض الدهنية سواء المشبعة أو غير المشبعة بعد إجراء ميثلة ***methylation*** لعينة الزيت أو الدهن ، وسوف نتكلم عن طرق التحليل الكروماتوجرافى فيما بعد .

• الطرق الكيميائية لتقدير الأكسدة الأولية وبداية عمليات التزنخ الأكسيدى:

Chemical methods for primary oxidation & the beginning of oxidative rancidity process:

* رقم البيروكسيد ***Peroxide value*** : وهو عبارة عن " ***عدد ملليمكافئات البيروكسيد الموجودة فى 1 كجم زيت أو دهن*** " . ويستخدم فى تقدير درجة التزنخ الأكسيدى للزيوت والدهون حيث أن تكوين الهيدروبيروكسيدات فى المراحل الأولى يعطى فكرة عن درجة صلاحية الزيوت للإستهلاك الآدمى . والهيدروبيروكسيدات عديمة الطعم واللون ولكنها تتحلل بسرعة لتعطى ألدهيدات ذات رائحة ونكهة قوية وكريهة . وترتبط قيمة البيروكسيد إلى حد ما بالنكهة المنبعثة من الألدهيدات وناتجات الأكسدة الأخرى . ولايعتمد عليه بصورة قاطعة فى الحكم على درجة تزنخ الزيوت والدهون حيث يحدث له تكسير مما يعطى نتائج غير دقيقة عند ربط قيم البيروكسيد بالصفات الحسية للزيوت ودرجات التزنخ . ويمكن إيجاز طريقة إجراء هذا الإختبار ***AOAC*** رقم 965.33) فيما يلى :

- زن 2-5 جرام من العينة فى دورق بغطاء مصنفر .

obeikandl.com

- أضف 20 مل من مخلوط المذيبات (حامض خليك ثلجى : كلوروفورم بنسبة 2 :1 ح/ح) + 0.5 مل يوديد بوتاسيوم مشبع ، ثم غطى الدورق ورج لمدة 1 ق.
- أضف 50 مل ماء مقطر لإيقاف التفاعل وإفراد اليود .
- عاير اليود المنفرد بواسطة ثيوكبريتات الصوديوم 0.01 ع فى وجود دليل النشا حتى تمام التعادل (إختفاء اللون الأزرق لناتج تفاعل النشا مع آثار اليود) .
- إحسب رقم البيروكسيد من المعادلة الآتية :

$$\text{رقم البيروكسيد (ملليمكافئ/كجم زيت أو دهن)} = \frac{1000 \times \text{ع} \times \text{ح}}{\text{وزن العينة}}$$

حيث أن : ح = حجم ثيوكبريتات الصوديوم بالملليلتر

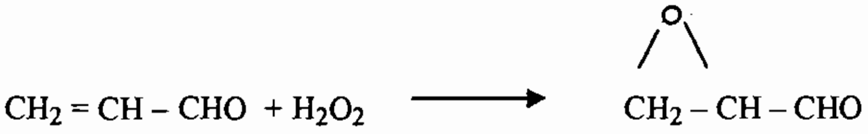
ع = عيارية ثيوكبريتات الصوديوم

ملحوظة : يجب إجراء تجربة بلانك للتأكد من نقاوة المذيبات المستخدمة .

• الطرق الكيميائية لتقدير الأكسدة النهائية :

Chemical methods for secondary oxidation:

1- *إختبار كرايس Kreis test :* من المعروف أن تزنخ الزيوت والدهون ينتج عنه تكوين بيروكسيدات وهيدروبيروكسيدات والتى ينتج عنها مركبات معقدة نتيجة تفاعلها مع المواد القطبية الموجودة فى الغذاء (أثناء القلى) وينتج عنها ألدهيدات وكيتونات وبعض الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة . وإختبار كرايس هو إختبار لونى يعتمد أساسا على تفاعل الفلوروجلوسينول ***phloroglucinol*** مع المواد الكربونيلية المتطايرة ***volatile carbonyls*** وخاصة الإبيهيدرين ألدهيد ***epihydrine aldehyde*** . وقد أمكن تحضير مادة الإبيهيدرين معمليا من تفاعل الأكرولين مع فوق أكسيد الهيدروجين كما هو موضح فى المعادلة التالية :



أكرولين — فوق أكسيد الهيدروجين — إيبيهيدرين ألدهيد

Acrolein — *Hydrogen peroxide* — *Epihydrine aldehyde*

وبإضافة الفلوروجلوسينول فى وجود حامض الهيدروكلوريك يتولد لون أحمر ناتج من أكسدة الفلوروجلوسينول بالأكسجين الموجود فى الألدهيد ويتكون مركب كوينويد ***quinoid compound*** . وينتج اللون غالبا من تكثيف وتجميع المركبات الكوينويدية مع بعضها أو مع الفلوروجلوسينول .

ويمكن إيجاز طريقة إجراء هذا الإختبار كما يلى :

- ضع 10 مل من عينة الزيت فى أنبوبة إختبار + 10 مل من محلول الفلوروجلوسينول (0.1 % فى الإيثر) + 5 مل حامض هيدروكلوريك (ث= 1.19)
- رج الأنبوبة جيدا لمدة 20 ثانية ، ثم أترك الأنبوبة لمدة 10ق حتى يتكون اللون .
- فإذا لم يتكون لون أحمر وردى فى طبقة الحامض دل ذلك على أن العينة غير متزنخة ، أما إذا ظهر لون أحمر فى طبقة الحامض يجرى تخفيف عينة الزيت بنسبة 1 : 10 ، 1 : 20 فى البتروليم إثر ويعاد إجراء الإختبار مرة أخرى كما سبق : فإذا لم يظهر لون أحمر فى التخفيفات المشار إليها دل ذلك على أن العينة فى بداية مرحلة الأكسدة ووجود تزنخ بنسبة بسيطة لا يمكن تمييزه بالطعم أو الرائحة . أما إذا ظهر لون أحمر فى التخفيف 1 : 10 دل ذلك على أن العينة فى مرحلة تزنخ متقدم ويمكن تمييزه بالطعم والرائحة . فى حين لو ظهر لون أحمر فى التخفيف 1 :20 دل ذلك على شدة تزنخ العينة (***Hoffmann, 1986***) .

2- إختبار حامض الثيوباربتيوريك (*TBA*) *Thiobarbituric acid* :

يستخدم هذا الإختبار كدلالة على حدوث الأكسدة النهائية للزيوت والدهون . ويعتمد على قياس المركبات الألدهيدية الناتجة من تكسير الهيدروبيروكسيدات منتجا الرائحة الغير مقبولة للمستهلك . ويعبر عنه بعدد ملليجرامات المالونالدهيد / 1 كجم عينة .

obeikandl.com

والمالونالدهيد الناتج هو عبارة عن مشابه للمركب ***epihydrine aldehyde*** ، ويجرى هذا الإختبار على الأنسجة الدهنية (اللحوم والأسماك ...إلخ) ، الزيوت السائلة والدهون ويمكن توضيح تلك الطريقة (***Tarladgis et al***) كما يلى :

- زن 10 جرام من العينة وجنسها مع 50 مل ماء مقطر لمدة 2 ق .
- إنقل العينة بعد ذلك إلى دورق التقطير بواسطة 47.5 مل ماء مقطر .
- أضف 2.5 مل حامض هيدروكلوريك 4 ع لضبط الـ ***pH*** على 1.5 ، ثم أضف بعض نقط من السيليكون (كمادة مضادة للفوران ***antifoaming***) ، بعض كريات صغيرة من الزجاج ***glass beads*** لتنظيم عملية الغليان .
- قطر محتويات الدورق فى جهاز التقطير الخاص (مكون من دورق التقطير ، مكثف مائى ، وحدة إستقبال نواتج التقطير) وجمع 50 مل من المتقطر فى حوالى 10 ق من بداية وقت الغليان .
- إنقل 5 مل من المتقطر فى أنبوبة إختبار نظيفة بغطاء ثم أضف 5 مل من محلول الـ ***TBA*** (0.2883 جرام /100 مل حامض خليك ثلجى) . غطى الأنبوبة وقلب لخلط المحتويات جيدا .
- ضع الأنبوبة بعد ذلك فى حمام مائى لمدة 35 ق مع عمل تجربة بلانك تحت نفس الظروف . ثم برد الأنبوبة بالماء الجارى لمدة 10 ق .
- إضبط صفر الإمتصاص الضوئى على العينة البلانك .
- إقرأ الإمتصاص الضوئى للون المتكون على طول موجى 538 نانوميتر .
- يتم عمل منحنى قياسى ***standard curve*** من مادة 1،1،3،3 – رباعى إيثوكسى بروبان ***1,1,3,3-tetra ethoxy propane*** ، ويحسب ميل المنحنى وهو يعبر عن معامل التحويل ، ثم إحسب الـ ***TBA value*** من المعادلة الآتية :

قيمة الـ ***TBA*** (مجم مالونالدهيد/كم عينة) = O.D x معامل التحويل (وهو عادة = 7.8)

3- **قيمة الأنسيدين *P-Ansidine value*** : يعبر رقم الأنسيدين عن كمية الألدهيدات التى تكونت فى الزيت أثناء الأكسدة والتحلل (أثناء عمليات القلى) والتى تتمثل فى ***2-alkenals*** ، ***2,4- alkadienals*** حيث تتفاعل تلك المركبات مع مركب الـ ***P-ansidine*** تحت الظروف الحامضية وتكون معقد وردى اللون يتناسب تركيزه طرديا مع كمية الألدهيدات ، وتقاس نواتج التفاعل لونيا على طول موجى 530 نانوميتر .

ويمكن إجراء هذا الإختبار فيما يلى طبقا لطريقة (***IUPAC, 1979***) :

- زن 0.5 – 4 جم من عينة الزيت أو الدهن بدقة (حتى 0.001 جم) فى دورق معيارى سعة 25 مل .
- إذب العينة فى الأيزوأوكتان ***iso-octane*** وأكمل الحجم إلى 25 مل بالمذيب .
- ضع المحلول فى أنبوبة القياس (***Cuvette***) سعة 1 سم وسجل الإمتصاص الضوئى عند طول موجى 350 نانوميتر (E_b).
- جهز أنبوبتى إختبار وضع فى الأنبوبة الأولى 5 مل من محلول الزيت (فى الأيزو أوكتان) ، ثم ضع فى الأنبوبة الثانية 5 مل من المذيب (أيزو أوكتان). ثم أضف على كل أنبوبة 5 مل من ***p-ansidine*** (0.25 %) فى حامض الخليك الثلجى) ثم غطى الأنابيب .
- أترك الأنابيب لمدة 10 ق ثم إقرأ الإمتصاص كما سبق عند طول موجى 350 نانوميتر ، مع ضبط صفر قراءة الإمتصاص على الأنبوبة الثانية (5 مل أيزوأوكتان + 5 مل ***p-ansidine***) ثم إحسب قيمة الأنسيدين من المعادلة الآتية :

$$\text{قيمة الأنسيدين} = \frac{[(E_b - E_a)\ 1.2\ ]25}{P}$$

حيث أن :

Ea = الإمتصاص الضوئى لمحلول الدهن + الأنسيدين

Eb = الإمتصاص الضوئى لمحلول الدهن

P = وزن العينة بالجرام

obeikandl.com

4- قيمة الأكسدة الكلية *Total Oxidation Value (Totox value)* :

من المعروف أن رقم البيروكسيد يقيس تركيز الهيدروبيروكسيدات أثناء أكسدة الزيوت والدهون (حيث يزداد ثم يقل بعد ذلك) ، أما قيمة الأنسيدين فهى تعبر عن مقدار الألدهيدات والتى تزداد بإستمرار نتيجة التكسير المستمر للهيدروبيروكسيدات ، وعليه فإن رقم الأكسدة الكلية (*Totox value*) فهو يعبر عن قيمة الأكسدة الكلية للزيوت أو الدهون حيث أنه يزداد بصورة مستمرة خلال مراحل الأكسدة المختلفة . ويعرف بإنه عبارة عن ضعف رقم البيروكسيد مضافا إليه قيمة الأنسيدين .

$$Totox\ Value = 2\ peroxide\ value + p\text{-}ansidine$$

5- المركبات القطبية *Polar compounds* :

يعتبر تقدير النسبة المئوية للمركبات القطبية فى زيوت القلى من أكثر الطرق المقبولة عالميا لتقدير جودة زيوت القلى . وتشمل تلك المركبات الناتجة من تدهور زيوت القلى على جليسريدات أحادية ***monoglycerides*** ، جليسريدات ثنائية ***diglycerides*** ، أحماض دهنية حرة ***Free fatty acids*** ومركبات أخرى متكونة خلال عمليات قلى المواد الغذائية . ويمكن فصل تلك المركبات القطبية عن المركبات الغير قطبية بإستخدام العمود الكروماتوجرافى طبقا لطريقة (*AOAC*) برقم 982.27) كما يلى :

- جهز العمود الكروماتوجرافى كما سيأتى فيما بعد ، وضع به 25 جم من السليكا جيل 60 ذات حجم جزيئات 0.063-0.00 مم (70-230 مش) ومنشطة على درجة حرارة 160°م لمدة 4 ساعات ، ثم أضبط درجة رطوبتها على 5 %.
- إملأ العمود بالسليكا جيل بإستخدام مخلوط من المذيبات (بتروليم ايثر + الإيثير ثنائى الإيثيل بنسبة 13:87) ، مع مراعاة عدم جفاف سطح العمود . أضف على سطح السليكا جيل حوالى 4 جم من الرمل النظيف (المغسول بالحامض) لتوزيع العينة على سطح السليكا جيل بإنتظام .
- أذب 2.5 جم ± 0.001 جم من العينة بدقة فى 20 مل من مخلوط المذيبات ، ثم إنقلها إلى دورق معيارى سعة 50 مل وأكمل الحجم إلى العلامة .
- إنقل 20 مل من محلول العينة (الزيت) إلى العمود برفق بإستخدام ماصة مدرجة .

– ضع فى قمع فصل 150 مل من مخلوط المذيبات ، ثم ضع قمع الفصل على فوهة العمود وإفتح الصنبور السفلى للعمود وكذلك صنبور قمع الفصل لفصل المركبات غير القطبية ***nonpolar compounds*** بحيث يتم الفصل خلال 60 – 70 ق ويجمع فى دورق سعة 250 مل.

– بخر المذيب من العينة المفصولة من العمود بإستخدام جهاز تبخير المذيبات وسجل وزن المركبات غير القطبية بالجرام .

– إحسب النسبة المئوية للمركبات القطبية كما يلى :

$$\text{\% للمركبات القطبية} = \frac{100 \times (\text{أ} - \text{ب})}{\text{أ}}$$

حيث أ = وزن العينة فى الــ20 مل (1 جم) .

ب = وزن المركبات غير القطبية بالجرام .

4.2.3.7. تقدير المواد الغير قابلة للتصبن :

Determination of unsaponifiable matter:

وهى عبارة عن مواد توجد فى الزيوت والدهون بنسب مختلفة حسب نوع الزيت أو الدهن مثل الإستيرولات ***sterols*** ، والهيدروكربونات ***hydrocarbons*** ، الكحولات الأليفاتية ***aliphatic alcohols*** والكاروتينات ***carotens*** ..... إلخ . ويمكن فصل وتقدير تلك المواد كما يلى (طريقة ***AOAC*** رقم 933.08) :

– زن 5 جرام من عينة الزيت أو الدهن فى دورق مخروطى سعة 250 مل.

– أضف 25 مل بوتاسا كاوية كحولية ***KOH*** 0.5 ع ، ثم ركب المكثف الهوائى العاكس وإجرى عملية التصبن فى حمام مائى يغلى لمدة ساعة أو حتى تمام التصبن

– برد الدورق بعد ذلك وإنقل محتويات الدورق إلى قمع فصل مع غسيل الدورق بـــ 50 مل الإيثير ثنائى الإيثيل ويوضع كل من ماء الغسيل والإيثر فى قمع الفصل .

– غطى قمع الفصل ورج بشدة ثم أترك القمع فترة من الزمن حتى يتم الفصل إلى طبقتين .

– تفصل الطبقة المائية الكحولية وتنقل طبقة الإيثر فى قمع فصل آخر ، ثم إغسل الطبقة المائية الكحولية مرتين بالإيثر 50 مل فى كل مرة ، ثم أضف ناتج الغسيل

obeikandi.com

الإيثيرى إلى قمع الفصل الثانى المحتوى على طبقة الإيثير الأولى ، ثم أضف 20 مل من الماء المقطر على محتويات قمع الفصل .

- رج محتويات القمع جيدا وإتركه حتى تمام الفصل ، ثم إفصل طبقة الماء .
- إغسل طبقة الإيثر بمحلول قلوى مخفف (*KOH* 0.1 ع) مرتين مستخدما 25 مل فى كل مرة ، ثم إغسل طبقة الإيثر بالماء لإزالة القلوى والصابون المتكون حتى لايعطى ماء الغسيل لون أحمر أو وردى مع دليل الفينولفثالين .
- إفصل طبقة الإيثر فى دورق معلوم الوزن ، ثم بخر المحلول على 100 – 105°م حتى ثبات الوزن .
- إحسب النسبة المئوية للمواد الغير قابلة للتصبن كما يلى :

$$\% \text{ للمواد الغير متصبنة } = \frac{\text{و}_1}{\text{و}_2} \times 100$$

، حيث أن :

و_1 = وزن الراسب بالجرام ، و_2 = وزن العينة بالجرام

5.2.3.7. تقدير الفوسفوليبيدات *Determination of phospholipids* :

من المعروف أن الفوسفوليبيدات عبارة عن كحولات عديدة متحدة برابطة إستيرية مع أحماض دهنية وحمض فوسفوريك والذى يتحد بدوره مع قاعدة نيتروجينية . وتستخدم تلك المواد مواد مستحلبة فى كثير من الصناعات خاصة الغذائية ، ومن أمثلتها مركبات اللسيثين ، السيفالين ، والإسفنجومايلين وغيرها . ويمكن تقدير الفوسفوليبيدات الكلية طبقا لطريقة (*Hanahan et al,* 1960) كما يلى :

- زن وزنة دقيقة من العينة (زيت أو دهن) وضعها فى جفنة صينى تحتوى على كمية معينة من حامض السيليسيك ***silicic*** فى صورة بودر وتدهك العينة جيدا مع حامض السيليسيك حتى تمام التجانس وزيادة مساحة سطح الإستخلاص .
- تغسل بعد ذلك عدة مرات بالكلوروفورم ثم ترشح لفصل الشق غير قطبى .
- إغسل حامض السيليسيك وما عليه من مواد مدمصة بواسطة كحول الميثانول لفصل الشق القطبى وهو المحتوى على الفوسفوليبيدات .
- بخر كحول الميثانول فى دورق معلوم الوزن فى فرن على درجة حرارة 100 – 150°م حتى تمام ثبات الوزن .

- إحسب النسبة المئوية للفوسفوليبيدات كما يلى :

$$\text{\% للفوسفوليبيدات} = \frac{و_1}{و_2} \times 100$$

حيث أن : $و_1$ = وزن الراسب ، $و_2$ = وزن العينة بالجرام

وفيما يلى جدول يبين بعض الخواص الطبيعية والكيميائية لبعض الزيوت النباتية الشائعة الإستخدام (جدول 4.7).

جدول (4.7) بعض الخواص الطبيعية والكيمايائية لبعض الزيوت الغذائية الشائعة

الثابت / الزيت	الوزن النوعى 20°م/20°م	معامل الإنكسار 20°م	الرطوبة (%)	الحموضة مقدرة كحمض أوليك	الرقم اليودى	رقم التصبن .	رقم البيروكسيد*	المواد غير القابلة للتصبن
زيت بذرة القطن	من 0.9156 إلي 0.9300	من1.4717 إلي 1.4727	لا تزيد عن 0.2	لا تزيد عن 0.2 %	من 102 إلي 113	من 190 إلي198	لايزيد عن 20	لاتزيد عن 1 %
زيت الذرة	من0.9180 إلي 0.9255	من1.4720 إلي 1.4750	لا تزيد عن 0.2	لا تزيد عن 0.1 %	من 110 إلي 130	من 188 إلي 195	لايزيد عن 20	لا تزيد عن 2.8
زيت عباد الشمس	من 0.922 إلي 0.9250	من 1.4740 إلي 1.4760	لا تزيد عن 0.2	لا تزيد عن 0.2 %	من 125 إلي 136	من 188 إلي 194	لايزيد عن 25	لا تزيد عن 1 %
زيت فول الصويا	لا يقل عن 0.920	من 1.4730 إلي 1.4770	لا تزيد عن 0.2	لا تزيد عن 0.2 %	من 125 إلي 140	من 189 إلي 195	لايزيد عن 25	لا تزيد عن 1.5 %
زيت الزيتون	من 0.9100 إلى 0.9150	من 1.4730 إلى 1.4740	لا تزيد عن 0.3	من 1.4 إلى 3 %	من 75 إلى 90	من 190 إلى 195	لايزيد عن 10	لا تزيد عن 1.5 %
زيت السمسم	من 0.9150 إلى 0.9260	من 1.4730 إلى 1.4740	لا تزيد عن 0.3	لا تزيد عن 0.2 %	من 103 إلى 115	من 188 إلى 195	لايزيد عن 20	لا تزيد عن 1.5 %
زيت الكتان	من 0.9250 إلى 0.9350	من 1.4800 إلى 1.4830	لا تزيد عن 0.3	لا تزيد عن 2.8 %	من 170 إلى 200	من 187 إلى 195	لايزيد عن 35	لا تزيد عن 1.5 %
زيت الفول السودانى	من 0.9120 إلى 0.9150	من 1.4700 إلى 1.4720	لا تزيد عن 0.2	لا تزيد عن 0.2 %	من 83 إلى 95	من 188 إلى 196	لايزيد عن 10	لا تزيد عن 1 %

* المصدر : تم تجميعه من مصادر مختلفة بواسطة المؤلف .

6.2.3.7. التحليل الكروماتوجرافى للزيوت والدهون
Chromatographic Analysis of Fats and Oils

من المعروف أن مستخلص الليبيدات عبارة عن مخلوط معقد التركيب ، وبالتالى فإن عملية التحليل الكامل لهذه المكونات سواء بالطرق الوصفية أو الكمية تعتبر من العمليات الصعبة وبالتالى فإنها تحتاج إلى طرق أخرى لفصل مكوناتها فى صورة نقية ، وتعتبر الطرق الكروماتوجرافية من أهم الطرق التى يمكن عن طريقها فصل الشقوق المختلفة لليبيدات فى صورة نقية.

ويفضل دائما أن تكون أول خطوة فى فصل الليبيدات كروماتوجرافيا هو فصلها إلى شقوقها المختلفة حسب درجة قطبيتها . وسوف نتكلم بشئ من التفصيل عن الطرق الكروماتوجرافية المختلفة فى فصل شقوق الليبيدات المختلفة فيما يلى :

1- *فصل الشقوق الرئيسية لليبيدات بإستخدام كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة:*

Separation of calss lipids by thin layer chromatography:

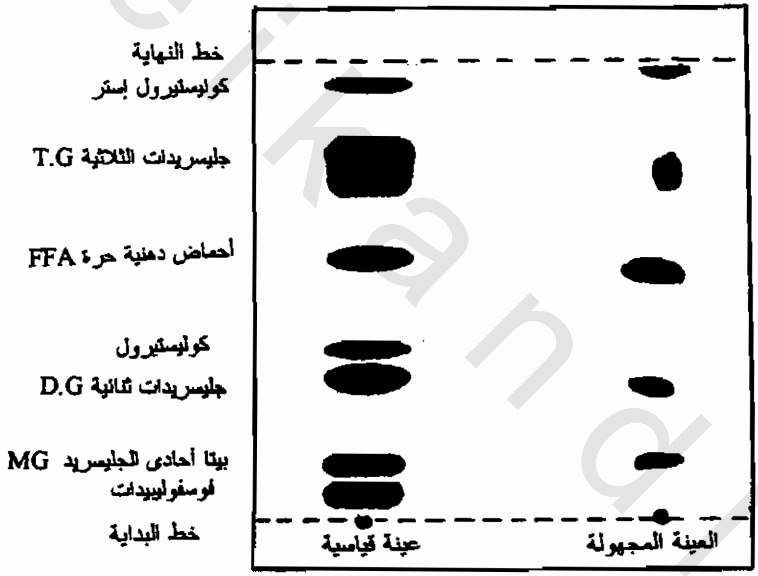
تعتمد هذه الطريقة على درجة إدمصاص ***adsorption*** المشتقات الليبيدية المختلفة على الوسط الصلب وهو يمثل الوسط الثابت ***stationary phase*** ويتم الإدمصاص عن طريق الروابط الهيدروجينية أو روابط فان درفالس أو الروابط الأيونية ، وتعتمد كذلك على درجة ذوبان مشتقات الليبيدات فى مخاليط المذيبات العضوية المستخدمة فى عملية الفصل . ويطلق على هذه الطريقة طريقة الـ ***Chromoplate*** . وقد تجرى هذه الطريقة بإستخدام ألواح زجاجية مقاس 20 x 20 سم تفرد عليها طبقة رقيقة من السليكا جيل الخاصة بالفصل على الألواح الزجاجية ، وفى الوقت الحاضر يمكن الحصول على ألواح من السليكا جيل جاهزة الفرد ***precoated plates*** وهذه الألواح قد تكون من الزجاج أو من رقائق الألومنيوم . ويمكن إيجاز خطوات الفصل بهذه الطريقة فى الخطوات التالية:

• ***تجهيز الألواح الزجاجية:*** يستخدم فى هذه الطريقة ألواح زجاجية مقاس 20 x 20 سم ، وقبل أن نضع مادة الإدمصاص (السليكا جيل) على الألواح الزجاجية يجب أولا تنظيف الألواح جيدا بواسطة الماء والصابون ، ثم تشطف بالماء المقطر عدة مرات وبعد ذلك تغسل بالمذيبات العضوية لإزالة أى دهون عالقة بها ، ثم تجفف وتكون جاهزة لوضع (أو فرد) مادة الإدمصاص عليها .

- زن 5 – 10 جرام من السليكا جيل ونشطها على درجة حرارة 105°م لمدة ساعة ثم ضعها فى دورق ذو قاع دائرى وأضف عليها من 12.5 – 25 مل ماء مقطر (تضاف كمية من الماء على السليكا جيل تساوى مرتين ونصف قدر وزن السليكا جيل) ، ثم قلب المعلق جيدا وضعه على اللوح الزجاجى وإفرده برفق على اللوح فى صورة طبقة رقيقة سمكها حوالى 0.25 مم تقريبا ويفضل عادة فردها بجهاز الفرد ***applicator*** لضمان تساوى سمك الطبقة الرقيقة .
- نشط اللوح بعد ذلك فى فرن على درجة حرارة 105°م لمدة ساعة .
- ضع عدة نقط من عينة الزيت أو الدهن فى كمية صغير من المذيب فى كأس صغير وأذبها جيدا ، ثم نقط العينة بواسطة أنبوبة شعرية دقيقة أو بماصة ميكرومترية ***micropipette*** (حيث توضع العينة نقطة نقطة أو فى صورة خط وتجفف أولا بأول فى وجود مجفف هوائى لتجفيف المذيب) على خط البداية ***start line*** والذى يبعد حوالى 1 – 2 سم من قاعدة اللوح الزجاجى. ثم ضع اللوح بعد ذلك فى وعاء زجاجى ***glass jar*** (حيث يوضع نظام المذيبات المراد إستخدامها فى عملية الفصل فى الـ ***jar*** ويغطى جيدا حتى لا يتغير تركيب مخلوط المذيبات قبل وضع اللوح فيه أو قد توضع ورقة ترشيح كبيرة داخل الـ ***jar*** حول الجوانب الداخلية لتشبع جو الـ ***jar*** بالمذيب) . يجب ألاتغمر العينة فى المذيب الموجود بالـ ***jar*** حتى لاتذوب العينة فيه أى يلزم أن يكون أعلى سطح المذيب تحت مستوى العينة بحوالى 0.5 إلى 1 سم.
- بعد ذلك لاحظ صعود المذيب فى اللوح حاملا معه الشقوق المفصولة ، وقبل أن يصل مستوى المذيب إلى نهاية اللوح بمسافة 2 سم ، إخرج اللوح من الـ ***jar*** وإتركه فى الهواء حتى يتبخر المذيب منه .
- إجرى بعد ذلك عملية إظهار للمركبات المفصولة بإحدى الطرق الآتية:
  - رش اللوح بواسطة حامض الكبريتيك المركز ثم ضعه فى الفرن حتى تظهر الشقوق المفصولة .
  - أو يمكن إستخدام اليود الصلب ، حيث يوضع كمية من اليود الصلب فى الـ ***jar*** ويوضع اللوح بعد ذلك فيتسامى اليود على اللوح وتظهر الشقوق المختلفة .

- أو يمكن إستخدام 2، 7 - داى كلوروفلوريسين ***2,7-dichlorofloroscin*** برشه على اللوح ثم إجرى عملية الإظهار تحت الأشعة فوق البنفسجية .

* بعد عملية الإظهار يمكن التعرف على الشقوق المختلفة المنفصلة عن طريق الـــ R_f والتي‌تعبر عن المسافة التى تحركها المركب منسوبة للمسافة التى تحركها المذيب ، ومن جداول خاصة يمكن التعرف على الشقوق المختلفة . ويمكن التعرف على الشقوق المنفصلة عن طريق مركبات قياسية معروفة توضع بجانب العينة على اللوح . ويوضح الشكل التالى طريقة تجهيز العينة وفصل المكونات المختلفة .



شكل (2.7) : فصل الشقوق الرئيسية لليبيدات بإستخدام كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة TLC
(بإستخدام مخلوط مذيبات مكون من هكسان + إثير ثنائى الإيثيل +حامض فورميك بنسبة 80:20:2).

ومن مميزات هذه الطريقة ، سهولة إختيار مادة الإدمصاص حسب نوع المادة المراد فصلها وسهولة فصل المواد القطبية والمتطايرة .

2- إستخدام العمود الكروماتوجرافى فى فصل الليبيدات :

Separation of lipids by column chromatography :

يعتمد الفصل بالعمود الكروماتوجرافى على توزيع ***distribution*** أو إدمصاص المركبات المفصولة بين الوسط الصلب ***stationary phase*** والوسط السائل ***mobile phase*** . ويتم الفصل هنا على أساس درجة القطبية وقوة الوسط المتحرك ***mobile phase*** . والوسط الثابت عادة هو السليكا جيل ***silica gel*** أو الألومينا ***alumina*** أو الفلوريسيل ***Folrisil*** (سليكات المغنيسيوم) ... إلخ. كما تعتمد عملية الفصل أيضا على قطر حبيبات مادة الإمصاص وطريقة تهيئتها ***conditioning*** وطول عمود الفصل.

ويمكن بإستخدام مذيبات متدرجة القطبية فصل الشقوق المختلفة بسهولة على النحو التالى : هيدروكربونات مشبعة – إسترات الشموع – إستيريل إستر – ألدهيدات طويلة السلسلة – تراى جليسريد – كحولات طويلة السلسلة – أحماض دهنية حرة – كوينونات – إستيرولات – داى جليسريد – مونو جليسريد – سيربروزيد ***cerbroside*** – جليكوزيل داى جليسريد – والسلفوليبيدات – الفوسفوليبيدات . ونظام المذيبات المستخدمة فى الفصل هو : الكلوروفورم – أسيتون – ميثانول لفصل الليبيدات المتعادلة ، ثم الجليكوليبيدات ، وتليها الفوسفوليبيدات على التوالى .

وتعتبر السليكا جيل أكثر المواد إستخداما كمادة إدمصاص ***adsorbant*** وتباع عادة بعدة صور وتختلف كل صورة عن الأخرى فى :

1- حجم الجزيئات : حيث أنه كلما كان حجم الجزيئات صغير ، كانت مساحة السطح أكبر والفصل أحسن أما إذا كان حجم الحبيبات صغيرة جدا فإن معدل السريان يكون بطيئا وبالتالى تكون مدة الفصل أطول. وأنسب حجم لحبيبات السليكا جيل هو 200– ***mesh*** .

2- درجة إمتصاص الماء أو التميؤ ***degree of hydration :***

– إذا كانت نسبة الماء قليلة فى السليكا جيل فإن الليبيدات ترتبط بقوة أكبر مع السليكا بقوة ولا يمكن إزاحتها بسهولة أثناء الفصل (وتحدث ***tailing*** أى يرتبط جزء منها بالعمود ولا تخرج دفعة واحدة).

obeikandi.com

- أما إذا ما إحتوت السليكا على نسبة مرتفعة من الرطوبة فإن الليبيدات لا تدمص على السليكا وتصبح عملية الفصل صعبة وتتداخل الشقوق مع بعضها البعض لضعف كفاءة الفصل .
- ولتحقيق فصل جيد لشقوق الليبيدات فإنه يجب أن تحتوى السليكا علىرطوبة فى حدود 5 % وذلك لضبط درجة القطبية على سطح السليكا جيل بحيث تصبح مناسبة لعملية الفصل .

ويوضح الشكل رقم (3.7) العمود الكروماتوجرافى .

عمود كروماتوجرافى

شكل (3.7) : الفصل بالعمود الكروماتوجرافى

• **طريقة تجهيز العمود** ***Preparation of column :***

- زن 30 مجم زيت أو دهن لكل جرام من السليكا (وعادة يوزن حوالى 30 جرام من السليكا)
- نشط السليكا جيل فى فرن على درجة حرارة 105°م لمدة ساعة .
- إملاء العمود بالسليكا جيل بإحدى الطرق التالية :

• الطريقة الجافة ، حيث توضع السليكا جيل فى العمود مع هز العمود فى وضع رأسى حتى يتم ترتيب الجزيئات فى صورة طبقات رقيقة ، ثم أضف عليها المذيب .

obeikandl.com

• الطريقة الرطبة ، حيث يحضر خليط من السليكا والمذيب فى صورة معلق (*slurry*) ثم إنقل الخليط إلى العمود مع الطرق عليه بالأصابع حتى لا تتكون تشققات .

- ويلاحظ ضرورة عدم ترك عمود السليكا يجف لأن الجفاف يؤدى لتكوين تشققات فى عمود السليكا جيل تؤدى بدورها إلى ضعف كفاءة الفصل .
- أذب العينة فى المذيب المناسب ثم ضعها على سطح العمود برفق بحيث يتم توزيعها بالتساوى على السطح الدائرى .
- ضع حوالى 150 مل من المذيب فى قمع فصل فوق فوهة العمود .
- أضبط معدل نزول المذيب من قمع الفصل والعمود بمعدل 1 – 3 مل /ق
- بعد عملية التنقيط (أى خروج المذيب المحمل بالشق المطلوب) *elution* يجمع المتقطر ويبخر ويتم وزنه وحساب نسبته المئوية .

وتتميز طريقة الفصل بالعمود عن طريقة الفصل بالطبقة الرقيقة بأنه يحمى الليبيدات ضد الأكسدة ، كما يمكن به فصل كميات كبيرة من الليبيدات .

• **فصل مخلوط الليبيدات إلى شقوقه المختلفة بإستخدام العمود الكروماتوجرافى:**

Separation of lipids by column chromatography:

يتم فصل شقوق الليبيدات بإستخدام عمود من السليكا جيل بعد تجهيزه كما سبق ، حيث يوزن 30 مجم من العينة/جم من السليكا جيل ويستخدم فى عملية الفصل نظام المذيبات التالية :

- الكلوروفورم أو الإيثير ثنائى الإيثيل : لفصل الليبيدات البسيطة .
- البنزين : لفصل الجليسريدات الثلاثية .
- الميثانول : لفصل الليبيدات المعقدة والجليسريدات الأحادية والثنائية والمركبات ذات القطبية العالية.
- الأسيتون : لفصل الجليكوليبيدات .

3- تقدير الأحماض الدهنية بإستخدام كروماتوجرافيا الغاز :

Determination of fatty acids by Gas Chromatography (GC):

يعتبر التحليل الكروماتوجرافى الغازى هو أحد أنواع الطرق الكروماتوجرافية المستخدمة فى التحليل الكيميائى ، ويكون الوسط المتحرك فى هذه الطريقة ***mobile***

phase على صورة غاز أما الوسط الثابت ***stationary phase*** فقد يكون سائلا (فيسمى النظام ***gas liquid chromatography***) أو يكون صلبا (فيسمى النظام ***gas solid chromatography***) . ويلاحظ أن الفصل فى الحالة الأولى يعتمد على إختلاف شقوق الليبيدات ومعامل توزيعها ***distribution coefficient*** بين الوسط المتحرك والوسط الثابت ، بينما فى الحالة الثانية فإن الفصل يعتمد على إدمصاص ***adsorption*** شقوق الليبيدات على الوسط الصلب ثم تحريكها بالوسط المتحرك بحيث يخرج أولا الشق الأقل إرتباطا فالأكثر ... وهكذا.

ومما هو جدير بالذكر أنه لابد وأن تكون المادة المراد فصلها (الأحماض الدهنية) فى صورة متطايرة (لذلك يتم تحويلها إلى ميثيل إستر بعملية ***methylation***) . ويلاحظ أن سلوك المواد بين الوسط الثابت والوسط المتحرك يعتمد على عدة عوامل :

- معامل التوزيع ***Destribution coefficient***
- تركيز المادة والتركيب البنائى لها ***Concentration and structure*** .
- زمن الفصل ***Time of separation*** .
- نوع مادة الوسط المتحرك والوسط الثابت

• **طريقة التقدير :**

- إجرى عملية أسترة (ميثلة) للأحماض الدهنية فى عينة الزيت أو الدهن المراد معرفة أحماضها الدهنية . وتجرى عملية الأسترة بعدة طرق ، نذكر منها على سبيل المثال لا الحصر مايلى :

1- طريقة الأسترة بواسطة الصوديوم ميثوكسيد ***sodium methoxide*** .

2- إستخدام البورون تراى فلوريد ***borone triflouride*** .

3- إستخدام الدايازوميثان ***diazomethane*** .

وسوف نقوم بشرح أحد هذه الطرق والسهلة فى الإجراء ألا وهى طريقة البورون تراى فلوريد كما يلى :

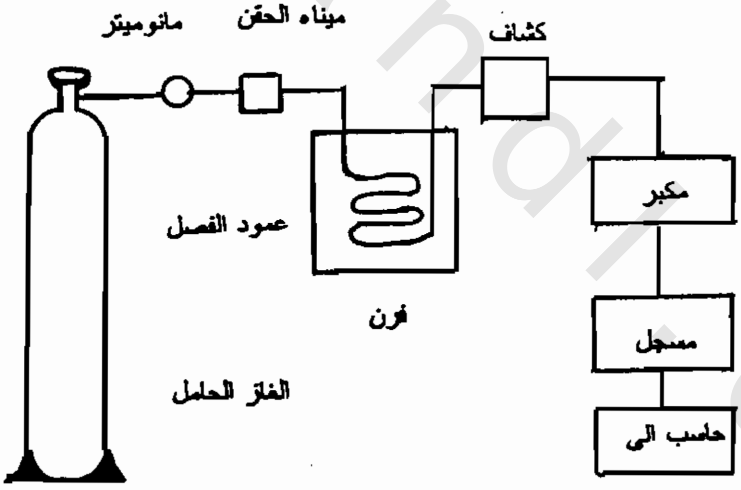
أ- ضع حوالى من 7 – 10 نقط من الزيت أو الدهن المسال فى أنبوبة إختبار كبيرة ، ثم أضف عليها 5 مل من ***KOH*** 0.5 ع كحولية ، ثم ضع كمية بسيطة من الحجر الخفاف لتنظيم الغليان ، ثم غطى الأنبوبة بقمع مخروطى به كرة من

الزجاج ، إجرى عملية تصبن لمدة 5 ق أضف بعد ذلك 5 مل من محلول البورون تراى فلوريد 15 % فى الميثانول وأكمل التسخين لمدة 2 ق .

ب- برد الأنبوبة على درجة حرارة الغرفة ثم أضف حوالى 10 مل ماء مقطر (لاحظ أن المخلوط أصبح لونه أبيضا مثل اللبن) ، ثم أضف حوالى 5 مل من الهكسان ورج الأنبوبة جيدا وإتركها فترة من الزمن حتى تنفصل طبقة الهكسان عن الطبقة المائية ، إفصل طبقة الهكسان وضعها فى أنبوبة نظيفة ، كررعملية الغسيل بالهكسان لإستخلاص أكبر كمية من الإستر.

ج- ركز مستخلص الهكسان (الإستر) فى جهاز تبخير المذيبات تحت تفريغ، وبذلك تكون العينة قابلة للحقن فى الجهاز .

ويوضح الشكل رقم (4.7) الأجزاء المختلفة لجهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازى *Gas chromatography* .



شكل (4.7): رسم تخطيطى لجهاز الفصل الكروماتوجرافى الغازى *GLC*

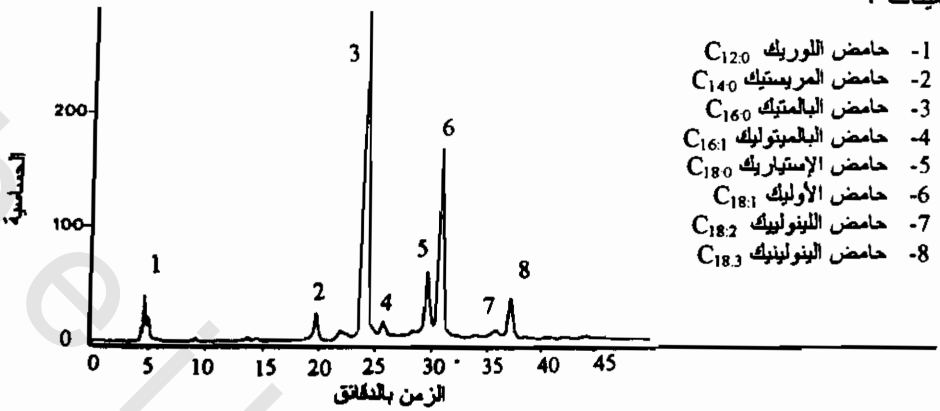
ويمكن توضيح أهمية الأجزاء المختلفة للجهاز فيما يلى :

- ***الغاز الحامل Carrier gas*** : ويكون معبأ فى إسطوانات مركب عليها منظمات خاصة لضبط ضغط الغاز ويعمل الغاز الحامل على حمل العينة المراد فصلها (الإستر) إلى العمود المعبأ بمادة الإدمصاص (الوسط الثابت) بعد حقن العينة فى مكان الحقن ***injection port*** .

- ***عمود الفصل Column*** : يعبأ عمود الفصل بمادة الإدمصاص ، وقد يكون من المعدن :الصلب غير القابل للصدأ ***stainless steel*** أو الزجاج ويصل طوله فى بعض الأحيان إلى عدة أمتار ، وقد يكون فى شكل دائرى أو لولبى أو على هيئة أنبوبة شعرية ***capillary*** طويلة . ويوضع هذا العمود داخل فرن الجهاز حيث يتم فصل المكونات المراد تحليلها تحت الظروف المناسبة من درجة الحرارة . ويتم فصل الأحماض الدهنية داخل العمود على أساس وزنها الجزيئى ، حيث يحدث تنافس بين الأحماض الدهنية المميثلة على الخروج من العمود فتخرج الأحماض الدهنية الأقصر فى طول السلسلة ثم مثيلتها غير المشبعة ، فالأطول فى طول السلسلة ثم مثيلتها غير المشبعة ، وهكذا ويعنى ذلك أن العامل المحدد الأول لخروج الأحماض الدهنية هو طول السلسلة ثم درجة عدم تشبعها .

- ***الكشاف Detector*** : بعد خروج الأحماض الدهنية المفصولة من العمود تنقل إلى الكشاف ***detector*** بواسط الغاز الحامل ، وهناك أنواع عديدة من الكشافات مثل الـــ ***argon B- ، Electron capture detector ، refractive index detector detector ، UV detector*** ، إلا أن أكثرها إستخداما فى مجال الزيوت عادة ما يكون الكشاف من نوع ***flame ionization detector*** ، والذى تعتمد نظرية عمله على حرق المواد الخارجة من العمود ويحولها إلى أيونات والتى يتم تكبير الإشارة الدالة عليها بواسطة المكبر ***amplifire*** الذى يعمل على ترجمتها وتحويلها إلى ذبذبات كهربائية يتم رسمها وتسجيلها على المسجل ***recorder*** فى صورة منحنيات (قمم) ***peaks*** ، وكل قمة من القمم تمثل مركب معين تأخذ شكل مثلث ، حيث يزداد إرتفاع المثلث بزيادة تركيز المركب المفصول حتى يصل إلى مداه بعدها يقل حتى يعود إلى القاعدة مرة أخرى.

ويوضح الشكل التالى (5.7) شكل لكروماتوجرام ناتج من تحليل الأحماض الدهنية لأحد العينات .



شكل (5.7) : كروماتوجرام ناتج من تحليل الأحماض الدهنية لعينة زيت نباتى بإستخدام جهاز الـــ *GLC*

– وتحسب النتائج عن طريق تقدير زمن الخروج ***retention time*** لأحماض دهنية قياسية بعد حقنها تحت نفس ظروف التحليل التى تخضع لها العينات ومقارنة زمن خروج كل حامض بما يضاهيه من الحامض القياسى ، وقد زودت الأجهزة الحديثة بكمبيوتر لحساب النسبة المئوية للأحماض الدهنية المفصولة مباشرة بدلا من طريقة الحساب القديمة التى كانت تعتمد على حساب النسبة المئوية للأحماض الدهنية بحساب مساحة كل حامض (كل مثلث) على حدى كدلالة على تركيزه وتجمع المساحات ، ثم تقسم مساحة كل حامض على المساحة الكلية ثم يضرب الرقم الناتج فى 100 فنحصل على النسبة المئوية لكل حامض وهكذا.

- **العوامل التى تؤثر على عملية الفصل بالتحليل الكروماتوجرافى الغازى:**

1– نوع الغاز   2– سرعة سريان الغاز   3 – نوع المادة المفصولة

4– مادة الإدمصاص   5– طول العمود   6– نوع المسجل

7– برنامج درجات الحرارة

8– إحتمالات تداخل بعض المركبات فى حالة عدم التنقية الكاملة للعينات موضع التحليل .9– نوع الكشاف   10– كفاءة القائم بالتحليل وقدرته على تعديل برنامج الفصل عند الضرورة .

obeikandl.com

* إستخدامات كروماتوجرافيا الغاز :

1- تحديد أنواع الأحماض الدهنية ونسبتها فى عينات المواد الغذائية .

2- تحديد أنواع الأحماض الأمينية فى البروتين .

3- تحديد أنواع السكريات .

4- يستخدم حاليا فى مجال مستحضرات التجميل .

5- يستخدم فى مجال التصنيف الميكروبيولوجى والزيوت العطرية والمواد الطيارة

6- يعتبر طريقة وصفية كمية للتحليل الكيميائى .

4.7. الكشف عن دهن الخنزير فى الأغذية

Detection of lard in foods

تنص تعاليم الشريعة الإسلامية الغراء على ضرورة خلو الأغذية من لحم الخنزير ومنتجاته . ونظرا لأن نسبة الدهن فى لحم الخنزير مرتفع جدا حيث تصل إلى ضعف نسبة الدهن فى اللحم البقرى ، لذلك كان يستخدم دهن الخنزير فى صناعة المسلى الصناعى ***shortening*** لما له من صفات جيدة فى مثل هذه المنتجات . وقد تطورت صناعة الزيوت ودخلت الزيوت المهدرجة فى صناعة المسلى الصناعى بدلا من دهن الخنزير . وهذا لايعنى خلو بعض أنواع السمن الصناعى المصنعة فى بعض الدول من دهن الخنزير ، حيث أن التركيب العام للسمن الصناعى عبارة عن 60 % زيوت نباتية مهدرجة ، 20 % زيوت نباتية سائلة ، 20 % شحم حيوانى (شحم بقرى) ، وعليه فقد يستبدل الشحم البقرى بدهن الخنزير .

ونظرا لتحريم إستهلاك لحوم الخنزير ومنتجاتها فى الدول الإسلامية لذا وجب الأمر فى تلك الدول على إيجاد طريقة أو عدة طرق للكشف عن لحوم ودهون الخنزير فى الأغذية المستوردة من الخارج فى صورة منتجات مختلفة .

وقد أجريت العديد من الأبحاث على هذا الموضوع وقد أمكن الكشف حتى عن آثار التلوث بلحم الخنزير فى منتجات اللحوم بإختبار ***ELISA**** وفى نفس الوقت تطورت

---

* Enzyme Linked Immunosorbent Assay : ELISA وهى إحدى طرق التحليل المناعى والتى تستخدم فى الكشف عن عديد من المركبات العضوية .

obeikandi.com

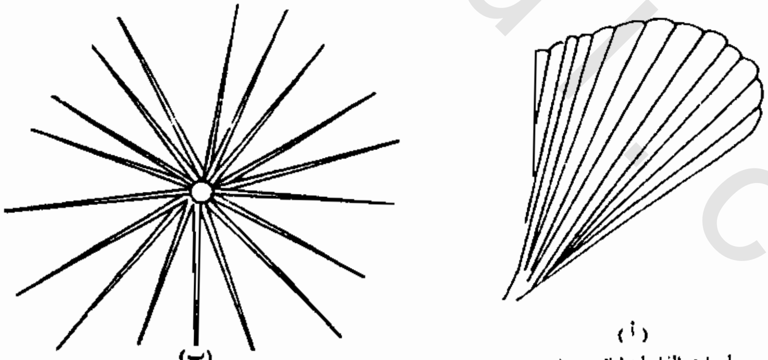
الطرق المختلفة للكشف عن دهن الخنزير فى الأغذية فمنها الطرق الطبيعية والطرق الكيميائية والطرق الكروماتوجرافية ، وسوف نتكلم بإيجاز عن تلك الطرق المختلفة كما يلى:

1.4.7. فحص الشكل البللورى لدهن الخنزير بالميكروسكوب :

Microscopic examination of crystal structur of lard:

لوحظ أنه عند إذابة عينة من الدهن فى الداى إثيل إيثر ووضعها فى الفريزر لمدة 12 ساعة يتكون بللورات راسبة فى الأنبوبة ، وبفحص هذه البللورات لوحظ أن لكل نوع من أنواع الدهون الحيوانية شكل خاص يتميز به . لذلك إتخذ الإختلاف فى الشكل البللورى للدهن فى الكشف عن دهن الخنزير فى الدهون الأخرى (مثل الشحم البقرى) ، حيث أن دهن الخنزير يعطى بللورات على شكل أزميلى ***chisel-shaped like structure*** ، والدهن البقرى يعطى بللورات على شكل مروحى ***fan-like structure*** وقد أثبتت الدراسات التى أجراها العديد من الباحثين أن الزيوت المهدرجة تعطى أشكال بللورية تشابه بللورات دهن الخنزير أو الدهن البقرى فى مراحل مختلفة من الهدرجة ، وبالتالى لايعتمد على إختبار الكشف الميكروسكوبى للبلورات على تأكيد وجود دهن الخنزير فى العينات المختبرة ، ولكنه يمكن أن يستخدم كإختبار وصفى فى الكشف المبدئى السريع عن دهن الخنزير ونؤكد ثانية أن هذا الإختبار غير قاطع .

وتوضح شكل (6.7) بعض الأشكال البللورية للدهون المختلفة



(أ) بلورات الفا-ليونوثاني ستيارين (دهن خنزيرى)

(ب) بلورات الجليسريدات الأخرى (دهون أخرى)

شكل (6.7): الشكل البللورى لبعض الدهون المختلفة

2.4.7. إختبار بومر *Bomer's test* : يستخدم هذا الإختبار فى الكشف عن غش الدهن البقرى ***beef tallow*** بدهن الخنزير ***lard*** ، ويعتمد على قياس نقطة إنصهار ***melting point*** الجليسريدات الثلاثية والأحماض الدهنية المفصولة . ويحسب رقم بومر من المعادلة الآتية :

رقم بومر $\text{Bomer No} = (t_g - t_a)2 + t_g$

حيث أن :

t_g = نقطة إنصهار الجليسريدات الثلاثية .

t_a = نقطة إنصهار الأحماض الدهنية المفصولة .

وقد لوحظ أن رقم بومر للدهن البقرى يساوى 71 ، وينخفض هذا الرقم عند غش الدهن البقرى بدهن الخنزير وتتوقف نسبة الإنخفاض على نسبة الغش بدهن الخنزير .

3.4.7. إختبار فوليست *Wulst's test* : ويجرى هذا الإختبار بصهر عينة دهن الخنزير ثم تبريدها بسرعة فتتكون كتلة حلقية مستديرة بها ثقب فى المنتصف وهذا يميز دهن الخنزير عن الدهون الأخرى .

4.4.7. تقدير عامل الإثراء بحامض البالمتيك *Palmetic acid enrichment factor*:

يعتمد إجراء هذا الإختبار على أن الجليسريدات الثلاثية لدهن الخنزير تتميز بإحتواءها على أحماض دهنية مشبعة (خاصة حامض البالمتيك) بنسب مرتفعة فى موضع معين ألا وهو الوضع بيتا فى الجليسرول ، بينما الأحماض الدهنية غير المشبعة تكون مرتبطة بالموقعين α ، ά من الجليسيرول . فى حين لاتتوافر هذه الخاصية فى الزيوت أو الدهون الأخرى ، ومن هنا بدأ البحث فى إيجاد عامل محدد للكشف عن دهن الخنزير فى الأغذية الدهنية المختلفة . وسوف نتكلم عن هذه الطريقة بشئ من التفصيل حيث أنها كانت موضع دراسة مستفيضة فى كليتى الصيدلة بجامعة القاهرة* وكلية الزراعة جامعة عين شمس * كما يلى :

---

* رسالة دكتوراه – ليلى السيد عبد الفتاح سنة 1970 رسالة ماجيستير – عاطف أنور أبو عرب سنة 1980

1.4.4.7. فصل الجليسريدات الثلاثية بالعمود الكروماتوجرافى :

Separation of triglycerides by column chromatography:

- زن 30 جرام من السليكا جيل ونشطها على درجة 105°م لمدة ساعة .
- ضع على السليكا جيل فى جفنة نظيفة كمية من البنزين الجاف (مجفف بواسطة كبريتات الصوديوم اللامائية) مع التقليب الجيد لخروج فقاقيع الهواء منها ، ثم ضعها فى عمود الفصل الكروماتوجرافى مع إتخاذ كافة الإحتياطات التى سبق الإشارة إليها فى تجهيز العمود الكروماتوجرافى.
- زن من 0.5 – 1 جرام من العينة وإذبها فى كمية بسيطة من البنزين ، ثم ضعها فى العمود بالطريقة المناسبة.
- جهز قمع فصل به 250 مل من البنزين وضعه فوق العمود ، وأضبط معدل سريان المذيب من كلا من قمع الفصل والعمود.
- إجمع البنزين النازل من العمود فى كأس ، ثم بخره تحت تفريغ وبذلك يمكننا الحصول على الجليسريدات الثلاثية فى صورة نقية . تجرى عملية أسترة للجليسريدات الثلاثية ثم حقنها فى الـــ *GC* للتعرف على أنواع الأحماض الدهنية المختلفة بها.

2.4.4.7. فصل البيتا مونو جليسيريد *Separation of β-monoglycerides* :

يتم فصل البيتا مونوجليسيريد بواسطة إنزيم ليبيز البنكرياس ***pencreatic lipase*** ويمكن توضيح ذلك فى الخطوات التالية :

- يحضر مخلوط من كلوريد الأمونيوم (8 جم) ، كلوريد الكالسيوم (2.2 جم) ، الصمغ العربى (10 جم) فى 100 مل ماء مقطر مع الرج جيدا لخلط المكونات .
- يضبط pH المخلوط على 8.2 – 9 بإستخدام هيدروكسيد أمونيوم (4 ع) ، حمض الهيدروكلوريك (0.1 ع).
- يوزن 1 جم من العينة فى كأس ويضاف عليها حوالى 50 – 60 مل من المخلوط السابق تحضيره ، ثم جنس المخلوط لمدة 3 – 5 ق ،
- يذاب إنزيم الليبيز البنكرياسى (200 ملجم/1 جم دهن) فى كمية من الماء المقطر ، ثم يضاف على المخلوط السابق على درجة حرارة 40°م ± 1°م لمدة 20 –

30 ق ، حيث يقوم الإنزيم بتحليل الجليسريدات الثلاثية وفصل الجليسريدات الأحادية فى الوضع بيتا كما هو موضح فى المعادلة الآتية :

$$\begin{array}{llll} CH_2OOCR1 & & CH_2OOH & HOOC\text{-}R1 \\ | & & | & \\ CHOOCR2 & +\text{Enzyme} \longrightarrow & CHOOCR2 & + \\ | & & | & \\ CH_2OOCR3 & & CH_2OH & HOOC\text{-}R3 \end{array}$$

Triglceride   ***β-Monoglyceride***   ***Fatty acids***

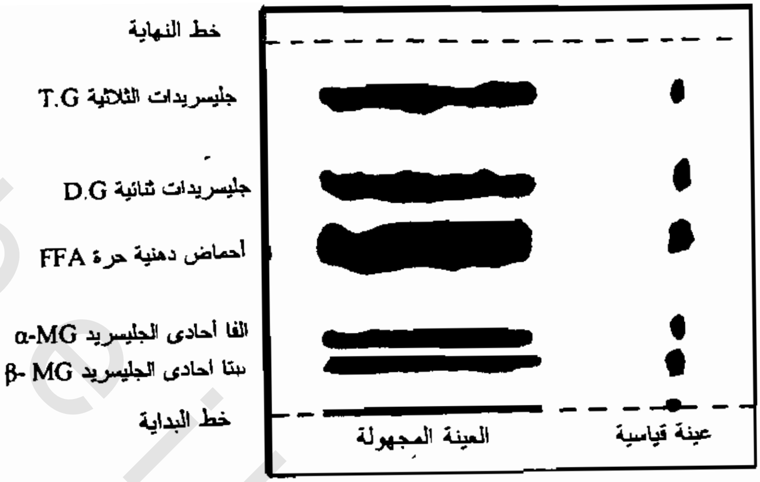
- أضف 80 – 100 مل من الداى إثيل إيثر (لوقف نشاط الإنزيم) على محتويات الكأس وقلب جيدا ، ثم إنقل المحتويات فى قمع فصل سعة 250 مل .
- إفصل طبقة الإيثر التى تحتوى على المونوجليسيريد وبخر الإيثر ونواتج التحليل الأنزيمى .

3.4.4.7. فصل المونوجليسيريد على الطبقة الرقيقة :

Separation of monoglycerides on thin layer chromatography:

حيث يتم فرد السليكا جيل على لوح زجاجى مقاس 20 x 20 سم بسمك 0.5 مم فى حامض البوريك 0.4 ع ، وينشط اللوح (كما سبق توضيحه). تذاب بعد ذلك الـ β مونوجليسيريد المفصولة فى كمية قليلة من الكلوروفورم وتوضع على اللوح الزجاجى المجهز فى صورة خط مع الشقوق القياسية بجوار الخط للتعرف على المونو جليسيريد من مقارنة الـ R_f لكل منهما . يوضع لوح السليكا جيل فى الـ ***jar*** الزجاجى المحتوى على كلوروفورم وبنزين بنسبة 96:4 ح/ح. وبعد تمام سريان ***running*** المذيب من خط البداية ***bottom*** حتى قمة اللوح الزجاجى ***front*** (خط النهاية ***end line***) يجفف اللوح فى الهواء ويرش بواسطة الداى كلوروفلوريسين (0.2 % فى الإيثانول) ، ثم يتم الإظهار بواسطة الأشعة فوق البنفسجية وبالتالى يمكن تحديد موضع المونوجليسيريد . بعذ لك تكشط طبق المونوجليسيريد وتستخلص بالكلوروفورم وتحقن فى الـ ***GC*** لتقدير نسبة الأحماض الدهنية الموجودة بها بعد ميثلتها بإحدى الطرق السابقة. ويوضح الشكل التالى شكل (7.7) ترتيب خروج الشقوق المختلفة على اللوح الزجاجى .

obeikandi.com



شكل (7.7) : فصل البيتا مونوجليسيريد بكروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة TLC
(باستخدام مخلوط مذيبات مكون من : كلوروفورم + أسيتون بنسبة 96:4).

4.4.4.7. حساب عامل الإثراء بحامض البالمتيك :

Calculation of palmetic acid enrichment factor:

يحسب عامل الإثراء بحامض البالمتيك من المعادلة الآتية :

$$\text{عامل الإثراء بحامض البالمتيك} = \frac{\text{\% لحامض البالمتيك فى البيتامونوجليسيريد}}{\text{\% لحامض البالمتيك فى التراى جليسيريد}}$$

وزيادة هذا العامل عن 0.7 يعتبر دلالة على وجود دهن الخنزير فى العينة (منتجات اللحوم) ، أما إذا كان 0.5 أوأكثر فإنه يدل على وجود دهن الخنزير فى الزيوت والدهون المهدرجة بنسبة 5 % أو أكثر . وتعتبر هذه الطريقة من الطرق المناسبة فى الحكم على وجود دهن الخنزير من عدمه فى العينات المختبرة .

5.7. أسئلة عامـــــــــة

1- قارن بين طرق الإستخلاص الآتية : طريقة النقع ، طريقة سوكسلت ، طريقة بلاى وداير . موضحا الإحتياطات الواجب مراعاتها فى كل طريقة للحصول على إستخلاص جيد .

2- رتب الأحماض الدهنية التالية طبقا لزمن خروجها من جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازى *GLC* : C18:2 , C16:1 , C16:0 , C18:3 , C18:1 , C12:0 , C14:0 , C14:1, C12:0 , C20:1 , C18:0 .

3- أردت أن تقارن بين العديد من الزيوت والدهون من حيث خواصها الكيميائية التالية:

- درجة عدم التشبع .
- التزنخ التأكسدى .
- متوسط الوزن الجزيئ للأحماض الدهنية .
- التزنخ التحليلى .

أذكر إسم الإختبار أمام كل خاصية من هذه الخواص.

4- علل لما يأتى :

أ- يفضل ترك حوالى 5 – 10 مل من المذيب على سطح عمود السليكا جيل أثناء عملية الفصل بالعمود الكروماتوجرافى .

ب- لا يعتمد على الكشف الميكروسكوبى للبلورات على تأكيد وجود دهن الخنزير فى العينات المختبرة .

ج- يفضل إستخدام أكثر من مذيب واحد من المذيبات لإستخلاص الليبيدات من الأنسجة المختلفة .

د- ظهور لون مميز (لون أحمر) عند إضافة الفلوروجلوسينول إلى عينة الزيت فى وجود حامض الهيدروكلوريك .

هـ- لايمكن الإعتماد على رقم البيروكسيد فقط للحكم على درجة جودة زيوت القلى .

5- رتب المذيبات التالية حسب درجة قطبيتها : رابع كلوريد الكربون ، الهكسان ، الكلوروفورم ، الإيثير ثنائى الإيثيل ، الأسيتون ، الميثانول ، الأيزوأوكتان

6- قمت بتحليل عينة من الزيت وحصلت على النتائج التالية :

- إرتفاع فى رقم التصبن .
- إرتفاع فى قيمة الـ *TBA* .
- إرتفاع فى نسبة الأحماض الدهنية الحرة .

أكتب تقريرا عن هذه العينة بناءا على النتائج المتحصل عليها .

7- البيروكسيد ، الأنسيدين ، رقم الأكسدة الكلية ، *TBA* تعتبر من الإختبارات التى تساعد فى تحديد درجة جودة الزيوت والدهون . فبماذا تدل هذه الإختبارات موضحا دلالة كل إختبار .

مســـــائل :

1- إحسب النسبة المئوية للشقوق المختلفة المفصولة بالعمود الكروماتوجرافى لعينة زيت غذائى وزنها 1.8 جم بإستخدام 150 مل من كل من المذيبات التالية : كلوروفورم ، ميثانول ، بنزين ، أسيتون . علما بأن الأوزان المتحصل عليها بعد تبخير المذيبات كما يلى :

وزن الشق الذى تم إستخلاصه بالكلوروفورم = 0.5 جم .

وزن الشق الذى تم فصله بالبنزين = 0.3 جم

وزن الشق الذى تم فصله بالميثانول = 0.8 جم

وزن الشق الذى تم فصله بالأسيتون = 0.2 جم

أذكر أيضا إسم الشقوق التى تم فصلها بكل مذيب .

(الحل : 27.8 ، 16.7 ، 44.4 ، 11.1)

2- إحسب رقم التصبن لعينة زيت غذائى وزنها 5 جم علما بأن الفرق بين حجم حامض الهيدروكلوريك 0.5 ع المستهلك فى معايرة البلانك والحجم المستهلك فى التجربة يساوى 25.8 مل . (الحل : 144.7) .

3- عينة زيت وزنها 0.15 جم أضيف إليها 25 مل محلول ويج وبعد تمام التفاعل لزم لمعايرة اليود المنفرد 20 مل من محلول ثيوكبريتات الصوديوم 0.1 ع . علما بأن

obeikandi.com

التجربة البلانك قد إستهلكت حجم من الثيوكبريتات قدره 35 مل لمعايرة اليود المنفرد من 25 مل من محلول ويج . إحسب الرقم اليودى لهذه العينة . (الحل : 126.9) .

4- تم تحليل الأحماض الدهنية فى الجليسريدات الثلاثية ، والأحماض الدهنية فى الوضع بيتا مونو جليسريد ***β-position*** لعينة سمن إصطناعى وكانت النتائج المتحصل عليها كما يلى :

الحامض الدهنى	الجليسريدات الثلاثية	بيتا مونو جليسريد
C14:0	% 3.6	% 7.9
C16:0	% 35.4	% 50.5
C16:1	% 4.1	% 3.8
C18:0	% 13.9	% 4.3
C18:1	% 32.4	% 24.4
C18:2	% 10.6	% 9.1

هل هذه العينة مغشوشة بدهن خنزير أم لا ؟

5- إحسب رقم البيروكسيد لعينة زيت غذائى وزنها 5 جم علما بأن حجم ثيوكبريتات الصوديوم 0.1 ع المستهلكة فى التفاعل يساوى 0.6 . (الحل : 12) .

6- عينة زيت نخيل وزنها 15 جم عوملت بحجم قدره 30 مل من كحول الإيثيل المتعادل. ثم عودلت الأحماض الدهنية الحرة بها فلزم حجم قدره 5 مل من الصودا الكاوية 0.09 عيارى .

- إحسب رقم الحموض لهذه العينة .
- إحسب % للحموضة مقدرة كحامض أوليك .
- إحسب % للحموضة مقدرة كحامض بالمتيك .

(الحل : 1.68 ، 47 % ، 42 %) .

obeikandl.com

REFERENCES المراجـــع .6.7

Akoh, C.C. and Min, D.B. 1997. Food Lipids: Chemistry, Nutrition and biotechnology. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, HongKong.

AOCS. 1980. Am. Oil Chem Soci .Official Methods of analysis. Am.Oil Chemiste' Sco.,Chicago.

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

Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification.Can. J. BioChem. Physiol.37:911-917

Christie, W.W. 1982. Lipid Analysis. Pergamon Press, New York P.1

Hanahan, D.J., Brock erhoff , H. and Barron, E.J. (1960). The site of attack of phospholipids (lecithinase) A on lecthin: A re-evaluation , position of fatty acids on lecithin and triglycerides . J. Biol. Chem. 235 :1917.

Hoffmann, G. 1986. Quality control in the food industry. Vol.2, 2nd ed. Chapter 5: Edible oils and fats, pp. 407 – 497. Academic press Inc. London . Ltd.

IUPAC. 1979. Standard Methods for the analysis of oils, fats and drivatives 6th ed. C.paquot (ed). Pergamon press, New York.

Pearson, D. 1976. The chemical analysis of foods. 7th ed. P. 496-497. Churchill Livingstone, Edinbergh, London and New York.

Pomeranz, Y. and Meloan, C.L. 1994. Food Analysis Theory and Practice. 4th ed. AVI Publishers, Westport, CT.

Swern, D., Formo, M.W., Jungermann, E., Norris, F.A., and Sonntage, N.O.V. 1979. Baily's industrial oil and fat products.

obeikandl.com

Vol.1. 4th ed. A Wiley-Interscience Publication, John Wely & Sons. New York, Chichester, Brisbane, Toronto.

Tarladigis, B.G., Pearsonn , A.M. and Dugan, L.R. (1964). Chemistry of the 2-thiobarbituroc acid test for determination of oxidation of oxidation rancidity in foods. II. Formation of the TBA-Malonaldehyde complex without acid heat treatment. J.Sci. food Agric. Vol. 15. pp 602 – 607.

obeikandl.com

البـــاب الثـــامـــن

المركبات النيتروجينية البروتينية وغير البروتينية

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

obeikandl.com

البـــــاب الثامـــــن

8. المركبات النيتروجينية البروتينية وغير البروتينية
Nitrogenous Compounds

1.8. مقدمـــــــة:

يعانى عالمنا منذ فترة ، ولا يزال ، من مشاكل **نقص الغذاء** وخاصة فى الدول النامية *developing countries* ، وقد كانت الزيادة الرهيبة فى أعداد السكان العامل الرئيسى فى تلك **الفجوة الغذائية** التى أدت إلى إنتشار المجاعات فى مناطق متفرقة من العالم . وتأتى مشكلة نقص المصادر البروتينية فى المرتبة الثانية بعد مشكلة نقص موارد الغذاء بوجه عام .ويلخص جدول (1.8) محتوى بعض الأغذية من البروتين .

جدول (1.8): محتوى بعض الأغذية من البروتين (على أساس الوزن الرطب)*

نوع الغـــــــذاء	% للبروتين	نوع الغـــــــذاء	% للبروتين
* منتجات الحبوب والمكرونة *Cereals & Pasta*		اللحوم والدواجن والأسماك *Meats, poultry & Fish:*	
– الأرز ، الأرز البنى ، الأرز طويل الحبة	7.9	– اللحم البقرى الخام ، أجزاء مختلفة حمراء ذات نسب دهن منخفضة	18.5
– الأرز ، الأرز الأبيض ، طويل الحبة العادى ، الخام ، الأرز المقوى	7.1	– اللحم البقرى المقدد ، المجفف	29.1
– القمح ، دقيق القمح	13.7	– الدواجن ، للشى ، والتحمير ، وصدور الدواجن الخام	23.1
– حبوب الذرة ، الذرة الصفراء ، دقيق الذرة	6.9	– لحم الخنزير ، شرائح ، عادى	17.6
– المكرونة الإسباجيتى ، الجافة ، المدعمة	12.8	– بيض كامل خام	12.5
– نشا الذرة	0.3	– أسماك كالكود ، البلطى ، البياض ، البورى ، الدنيس ، القاروص	17.9
* منتجات الألبان *Dairy products:*		– أسماك التونة ، اللحم الأبيض ، المعلب في الزيت والمصفى .	26.5
– اللبن ، كامل الدسم ، والسائل	3.3	* البقوليات *Legumes:*	
– اللبن الفرز المجفف	36.2	– فول الصويا ، البذور الناضجة ، الخام	36.5
– الجبن الشيدر	24.9	– الفول ، اللوبيا ، كافة الأصناف ، البذور الناضجة والخام	23.6
– الزبادى ، السادة ، ومنخفض الدهن	5.3	– التوفو ، الخام ، الصلب	15.8
* الفواكه والخضروات *Fruits & vegetables:*		– التوفو الخام والعادى	8.1
– التفاح ، الخام ، بالقشرة	0.2		
– الأسبارجاس الخام	2.3		
– الفراولة الخام	0.6		
– الخس ، المبرد ، الخام	1.0		
– البطاطس الكاملة ، بالقشر وبدونه	2.1		

** US. Department of Agriculture, Agricultural Research service, 1997. USDA Nutrient Database for Standard References, Release 11.1. Nutrient Data Laboratory Home page. http;//www.hal.usda.gov/fnic/food comp*

obeikandl.com

وتعتبر البروتينات من المركبات السائدة فى **جميع خلايا الكائنات الحية** ولجميع البروتينات وظائفها **البيولوجية الهامة** كما أن لها دورها الأساسى فى تركيب الخلية . وبروتينات الأغذية غاية فى التعقيد ، وبرغم ذلك فقد تم تنقية ووصف أنواع عديدة منها. وتتباين البروتينات فى **كتلتها الجزيئية** والتى تتراوح بين 5000 دالتون أو أكثر إلى مايقرب من مليون دالتون. وتتكون البروتينات من خمسة عناصر أساسية تشمل **الهيدروجين ، والكربون ، والنيتروجين ، والأكسجين ، والكبريت**. وتتكون وحدات بناء البروتينات من عشرين **ألفا** (α) **حامض أمينى** (جدول 2.8) ، وترتبط الأحماض الأمينية مع بعضها البعض فى جزيئ البروتين بروابط ببتيدية ويعتبر عنصر **النيتروجين** هو العنصر المميز لجزئ البروتين .

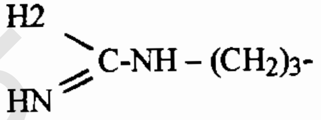
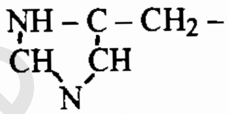
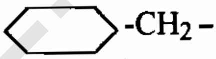
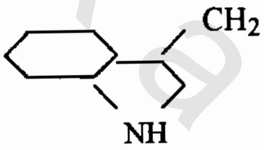
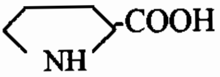
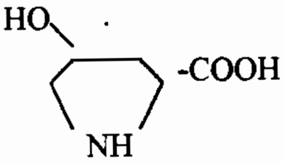
$$- \overset{NH_2}{\overset{|}{C}}H - CO - NH - \overset{R}{\overset{|}{C}}H - COOH$$

الرابطة الببتيدية

جدول (2.8): التركيب البنائى للأحماض الأمينية الأساسية* وغير الأساسية الداخلة فى تركيب جزيئ البروتين

الإســــــم	**إختصار الإسم**	**مجموعـــــة الـــ R**
		الرمز العام $R - \underset{NH_2}{C} - COOH$
1- الجليسين ***Glysine***	***Gly.***	H
2- الآلانين ***Alanine***	***Ala.***	CH_3-
3- الفالين ***Valine*** (أساسى1)	***Val.***	$(CH_3)_2 - \overset{\mid}{C}H-$
4- الليوسين ***Leucine*** (أساسى2)	***Leu.***	$(CH_3)_2 - \overset{\mid}{C}H - CH_2$
5- الأيزوليوسين ***Isoleucine*** (أساسى3)	***Ileu.***	$CH_3- CH_2- \underset{\mid}{C}H- CH_3$
6- السيرين ***Serine***	***Ser.***	$CH_2OH -$
7- الثريونين ***Therionine*** (أساسى4)	***Thr.***	$CH_3- CHOH-$
8- الأسبارتيك ***Aspartic***	***Asp.***	$HOOC-CH_2 -$
9- الجلوتاميك ***Glutamic***	***Glu.***	$HOOC-CH_2-CH_2 -$

obeikandl.com

$H_2N(CH_2)_4-$	*Lys.*	10- الليسين ***Lysine*** (أساسى5)
$H_2N(CH2)_3$	*Orn.*	11- الأورنثين ***Ornithine***
	*Arg.*	12- الأرجنين ***Arginine*** (أساسى9)
	*His.*	13-**الهيستيدين ***Histidine*** (أساسى10)
	*Phe.*	14-الفينيل آلانين ***Phynylalanine*** (أساسى6)
	Tyr.	15- التيروزين ***Tyrosine***
	*Trp.*	16- التربتوفان ***Tryptophane*** (أساسى7)
$HS-CH_2-$	*Cys.*	17- السيستين ***Cysteine***
$CH_3-S-(CH_2)_2-$	*Met.*	18- الميثيونين ***Methionine*** (أساسى8)
	*Pro.*	19- البرولين ***Proline***
	*Hyp.*	20- الهيدروكسى برولين ***Hydroxy proline***

* الأحماض الأمينية الأساسية: ***Essential amino acods*** : هى الأحماض الأمينية التى لاتخلق فى جسم الإنسان بعمليات التمثيل الغذائى ولذلك يجب أن تحتويها الوجبة الغذائية.

** الأرجيلين : أساسي للأطفال

المصدر: تم تجميعه بواسطة المؤلف من مصادر متعددة .

obeikandl.com

يتراوح **محتوى بروتين** الأغذية من النيتروجين ما بين 13.4 إلى 19.1 % ويتأتى ذلك بسبب تباين تركيب **الأحماض الأمينية** فى جزئ بروتين غذاء ما (جدول 3.8) . ويفترض عادة أن مخلوط البروتين النقى يحتوى على 16 % نيتروجين. ولذلك يقدر عادة محتوى العينة من البروتين بضرب النيتروجين فى معامل 6.25 = 16/100 . وبطبيعة الحال ، يختلف تركيز النيتروجين فى البروتينات المختلفة وبالتالى تتباين معاملات تحويل النيتروجين إلى بروتين (جدول 3.8) .

وفى كثير من الأحيان ، يفضل ذكر نسبة النيتروجين بدلا من نسبة البروتين . وبوجه عام تتميز البروتينات بغناها من الأحماض الأمينية القاعدية والتى تحتوى على نسبة أعلى من النيتروجين .

جـــــدول (3.8) : معاملات تحـــويل النيتروجين إلـــى بروتين الأغذية

نوع الغـــذاء	% للنيتروجين فى العينة	معامل التحويل	نوع الغـــذاء	% للنيتروجين فى العينة	معامل التحويل
بيض أو لحم	16.0	6.25	ذرة	17.7	5.65
لبن	15.7	6.37	الشوفان	18.66	5.36
الجيلاتين	*18.00	*5.55	فول الصويا	18.12	5.52
القمح	18.76	5.33	الأرز	19.34	5.17
الوجبة الغذائية	*17.60	*5.68			

المصدر :

- Moss, 1990. Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. Journal of Agriculture & Food Chemistry. 38: 18-24.

- Hohres, D.B. 1931. Factors of converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. U.S. Dept. Agric. Circular No. 183. August. USDA, Washington, DC. C.F. Suzanne Nielsen, S. 1998. Food Analysis, 2nd ed., Aspen Pub., Inc. Gaithersburg, Maryland.

** مصادر مختلفة تم تجميعها بمعرفة المؤلف .*

obeikandi.com

ويمكن تقسيم البروتينات طبقا **لتركيبها** ، أو **لشكلها البنائى** ، أو **لوظائفها البيولوجية** أو **لصفات ذوبانها** . فعلى سبيل المثال ، تتكون البروتينات البسيطة من **أحماض أمينية فقط** ، عند تحليلها مائيا ، أما البروتينات المرتبطة ***conjugated proteins*** فتحتوى بالإضافة للأحماض الأمينية ، على **مكونات أخرى** غير الأحماض الأمينية .

وللبروتينات أهمية غذائية عالية ، كما تلعب دورا كبيرا وأساسيا فى الصفات الحسية للأغذية ، فعلى سبيل المثال ، فالبروتينات الدور الرئيسى فى تشكيل قوام المنتجات الغذائية ، فمحتوى القمح ودقيقه من البروتين ونوعياته من أحد أهم دلالات جودة الخبز ، وكذلك تحدد الإختيار المناسب لنوع معين من الدقيق لإنتاج منتج معين من منتجات المخابز وغالبا ما توجد البروتينات فى الأغذية **مرتبطة إرتباطا طبيعيا أو كيميائيا** مع الكربوهيدرات والليبيدات ، فالجليكوبروتينات والليبوبروتينات تؤثران على الصفات الريولوجية لمحاليل الأغذية ، ولهما إستخداماتهما التكنولوجية كمستحلبات غذائية . وتساهم التغيرات الكيميائية للبروتينات ، لحد كبير ، فى عملية إنضاج وتعتيق اللحوم ***aging of meat*** . وللبروتينات الطبيعية نكهة ضعيفة ، وأثناء التسخين (كالطبخ ، الغليان ، الخبيز ، الشى) تتحطم بعض السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية أو تتفاعل مع مكونات الغذاء الأخرى (كتفاعل الليسين مع السكريات المختزلة) وينتج عن ذلك نكهات مرغوبة ، إلا أن عملية التسخين الشديد للأغذية تفقدها جزءا من قيمتها الغذائية .

وتشكل الأحماض الأمينية المصدر الرئيسى **للقيمة الغذائية للبروتين** . وبعض الأحماض الأمينية تعتبر **أساسية** حيث لايستطيع جسم الإنسان أن يخلقها أثناء عمليات التمثيل الغذائى ولذلك فلا بد أن يحصل عليها الإنسان من غذائه لما لها من أهمية قصوى لصحة الإنسان وسلامة عقله . ويوضح جدول (4.8) محتوى بعض البروتينات الغذائية من الأحماض الأمينية الأساسية . وهناك بعض البروتينات ، خاصة ، ذات المصادر النباتية (كالحبوب) تنقصها بعض الأحماض الأساسية (كالايسين) . والبروتينات التى تنقصها بعض الأحماض الأمينية الأساسية يمكن **خلطها مع بروتينات** من مصادر أخرى لإعادة الإتزان وإستكمال النقص فى تركيب الخلطة من حيث محتواها من الأحماض الأمينية الأساسية وبالتالى ترفع من القيمة الغذائية لمخلوط البروتينات . فعلى سبيل المثال **يمكن بخلط دقيق القمح باللبن الفرز أو بدقيق الصويا بنسب معينة إنتاج مخلوط بروتينى**

obeikandi.com

جدول (4.8): نسب الأحـــــماض الأمينـــــية الأساســـــية فى بعض الأغذية البروتينية (جم/100 جم بروتين)

الحامض الأمينى	التركيب المرجعى طبقا لمنظمة الأغذية والزراعة *FAO*	لبن فرز	فول صويا	لحم بقرى	بيض	سمك	خميرة
الليسين	4.2	8.6	6.8	8.3	6.3	6.6	6.8
التربتوفان	1.4	1.5	1.4	*1.0	1.5	1.6	*0.8
الفينيل آلانين	2.8	5.5	5.3	3.5	5.7	4.1	4.5
الميثيونين	2.2	3.2	*1.7	2.8	3.2	3.0	2.6
الثريونين	2.8	4.7	3.9	4.5	4.9	4.8	5.0
الليوسين	4.8	11.0	8.0	7.2	9.0	10.5	8.3
الأيزوليوسين	4.2	7.5	.6	4.7	6.2	7.7	5.5
الفالين	4.2	7.0	5.3	5.1	7.0	5.3	5.9

* الحامض الأمينى الأول المحدد للقيمة الغذائية للبروتين ***1st limiting amino acid***

المصدر:

Lichtfield, J.H. and Sachel, G.F.1965. Technology and protein malnutrition. Cereal Sci. Today, 10, 458, 460-462, 464.

القيمة الغذائية من حيث محتواه من الأحماض الأمينية الأساسية . ولدرء الشك باليقين أصدرت منظمة الأغذية والزراعة ***FAO*** التابعة للأمم المتحدة جداول توضح تركيب الأغذية المختلفة من الأحماض الأمينية الأساسية حتى يسهل التعرف على مشاكل نقص القيمة الغذائية فى بعض دول العالم خاصة تلك التى تركز فى إستهلاكها من البروتين على غذاء رئيسي (كمصر وإستهلاكها من الحبوب ، وبعض دول أفريقيا وإستهلاكها من الذرة ... إلخ) .

ويعتبر تحليل البروتين عملية معقدة وتعتريها بعض الصعوبات لأن هناك بعض المكونات الغذائية تتشابه فى صفاتها الفيزيوكيمياتية ***physicochemical*** مع البروتينات.

obeikandl.com

ولا تعتبر البروتينات هى المصدر الوحيد للنيتروجين فى المواد الغذائية فهناك أيضا المركبات النيتروجينية اللابروتينية التى يمكن أن تأتى من الأحماض الأمينية ، والببتيدات الصغيرة ، والأحماض النووية والفوسفوليبيدات ، والسكريات الأمينية ، والبورفيرينات ، والقلويدات ، وحامض اليوريك ، واليوريا ، وأيونات الأمونيوم . وعلى هذا الأساس ، فالنيتروجين العضوى الكلى فى الأغذية يمثله بصفة أساسية النيتروجين البروتينى ، ولمدى أقل النيتروجين المكون لكافة أنواع مواد النيتروجين العضوى اللابروتينى .

وهناك طرقا عديدة تم تطويرها لقياس محتوى الأغذية من البروتينات بدقة عالية ، وتشمل المبادئ الأساسية لتلك الطرق **تقديرات النيتروجين** ، **الروابط الببتيدية** ، **والأحماض الأمينية العطرية** ***aromatic*** ، **وإمتصاص البروتينات للأشعة فوق البنفسجية** ، **المجاميع الأمينية الحرة** ، **صفات تشتت (بعثرة) الضوء** ، **القدرة على الإرتباط بالصبغات** . وبالإضافة لعوامل الدقة ، والحساسية ، واليقين من صحة النتائج ، والسرعة ، وتكاليف التحليل ، يجب على القائم بالتحليل معرفة ماهية المكونات التى يتم تقديرها بالفعل عند إختيار الطريقة المناسبة لتقدير ما .

2.8. أهمية التحليل *Importance of analysis* :

تتأتى أهمية تحليل البروتين من الآتى :

1.2.8. تقدير النشاط البيولوجى : فبعض البروتينات كالإنزيمات والمثبطات لها أهميتها الكبيرة فى علوم الأغذية والتغذية منها على سبيل المثال لا الحصر ، إنزيمات تحليل البروتين التى تستخدم فى تطرية اللحوم ، الإنزيمات البكتينية ودورها الحيوى فى نضج الفواكه ، وكذلك مثبطات التربسين فى البقوليات ودورها كمواد مضادة للتغذية ***Antinutritional factors*** .

2.2.8. تمحيص الصفات الوظيفية : لبروتينات أنواع الأغذية المختلفة صفات وظيفية فالجليادين والجلوتينين لهما دورهما الأساسى فى صناعة الخبز ، كازين اللبن وتكوينه للخثرة فى صناعة الجبن ، وكذلك بياض البيض وإنتاجه للرغوة فى المنتجات الغذائية التى تمتاز بصفة الهشاشة.

البطاقة التغذوية : ودورها الأساسى فى رفع درجة الوعى الغذائى ومعرفة المستهلك بما يتناوله وقيمته الغذائية ومدى تغطية إحتياجاته الغذائية .

هذا ويكون تحليل البروتين مطلوبا عند الرغبة فى معرفة :

- محتوى الغذاء من البروتين .
- تركيبه من الأحماض الأمينية .
- نسبة بروتين معين من غذاء ما .
- محتوى بروتين ما أثناء عملية عزل وتنقية البروتينات .
- تقييم المركبات النيتروجينية اللابروتينية .
- القيمة الغذائية للبروتين (كالقيمة الهضمية ، كفاءة تحويل البروتين ، الميزان النيتروجينى) .

3.8. تقدير البروتين :

تعتمد الطرق المختلفة لتقدير المحتوى الكلى من البروتين فى غذاء ما على تقدير عنصر ما أو مجموعة معينة من البروتين ثم حساب نسبة البروتين بإستخدام معامل تحويل ثبتت صحته بالتجربة . وتشمل طرق تحليل مكونات البروتين والتى سبق ذكرها ، تقدير **الكربون أو النيتروجين** ، أو بعض **الأحماض الأمينية** أو **الروابط الببتيدية** ، وفى بعض البروتينات يدل على تركيزها أو نسبتها بعض العناصر مثل **الحديد** فى بروتين الهيموجلوبين أو **اليود** فى الثيروجلوبين ، ... إلخ. ويمكن إستخدام أى من تلك التقديرات فى تقدير البروتين وفى كل تلك الطرق وغيرها نفترض أن يكون المكون المقدر للتعبير عن محتوى الغذاء من البروتين ، موجود كلية فى شق البروتين فقط . ولذلك فللتقدير الصحيح للبروتين يجب إزالة أى مكون آخر نيتروجينى **وغير بروتينى** حتى لا يتداخل هذا النيتروجين فى تقدير قيمة البروتين فى المواد الغذائية .

1.3.8. طريقة كلداهل *Kjeldahl Method* :

قام العالم الدنماركى **كلداهل** عام 1883م بإبتكار طريقة لتقدير النيتروجين العضوى فى دراساته على تغيرات البروتين فى بعض الحبوب المستخدمة فى صناعة البيرة . هذا وقد أجريت تعديلات عديدة على هذه الطريقة بعد نشرها . ويمكن تلخيص طريقة كلداهل لتقدير النيتروجين العضوى فيما يلى :

- تسخن العينة فى حامض كبريتيك وتهضم حتى تتم أكسدة الكربون والهيدروجين ويختزل النيتروجين العضوى ويتحول إلى كبريتات أمونيوم طبقا للمعادلة الآتية :

$$\underset{\text{Protein}}{\text{n- C-NH}_2} + \text{mH}_2\text{SO}_4 \xrightarrow[\textit{heat}]{\textit{Catalyst}} \text{CO}_2 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{SO}_2$$

- تضاف بعد ذلك صودا كاوية إلى مخلوط الهضم ويسخن المخلوط فتتحرر الأمونيا وتنبعث فيتم إستقبالها فى حجم معلوم من حامض قياسى .

- يتم معايرة الجزء من الحامض الذى لم يتفاعل مع الأمونيا . وتحسب % للنيتروجين ثم تحول إلى % للبروتين فى عينة المادة الغذائية .

وفيما يلى بعض أهم الملاحظات ذات العلاقة بتلك الطريقة :

1- مما هو جدير بالذكر أن كلداهل كان قد إستخدم برمنجنات البوتاسيوم لعملية الأكسدة إلا أن النتائج المتحصل عليها لم تكن مرضية .

2- إكتشف ***Wilforth*** عام 1885م أنه يمكن إسراع هضم العينة (بحامض الكلبريتيك) بإضافة بعض العوامل اللمسية ***catalysts*** وإقترح العالم ***Gunning*** عام 1889م إضافة كبريتات البوتاسيوم لرفع نقطة غليان مخلوط الهضم لخفض زمن التفاعل، وأصبح إسم الطريقة المعدلة ***Kjeldahl-Wilforth-Gunning*** .

3- تحتاج البروتينات التى تحتوى على الحامضين الأمينيين الهيستيدين ، التربتوفان لظروف أقسى وأطول لإتمام عملية الهضم .

4- تؤدى إضافة كمية أكبر من كبريتات البوتاسيوم أو الصوديوم (لرفع نقطة الغليان) للحامض لحدوث تحلل حرارى وفقد فى الأمونيا . وبوجه عام يعتبر المدى من درجات الحرارة بين 370 إلى 410°م هو الأنسب لعملية الهضم .

5- أجريت تجارب مكثفة على معظم عناصر الجدول الدورى لإستخدامها كعوامل لمسية عند هضم عينات المواد الغذائية بطريقة كلداهل . وكانت عناصر النحاس ، والزئبق ، والسلينيوم هى الأكثر جدوى وإستخداما ، إلا أن عنصر الزئبق كان أفضلها ، وعندئذ ، تضاف خطوة إضافية ، وهى ترسيبه بإستخدام ثيوكبريتات الصوديوم وذلك لتحليل معقد الزئبق مع الأمونيا المتكون أثناء عملية الهضم . وفى الأونة الأخيرة قل إستخدام الزئبق

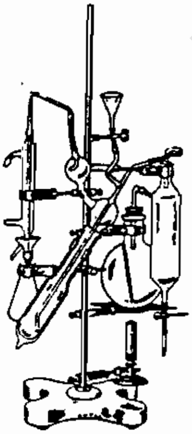
obeikandl.com

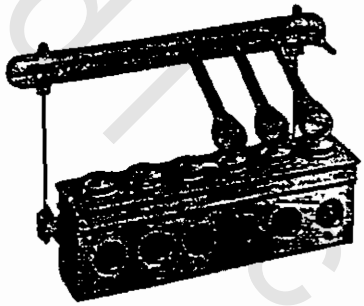
لسميته العالية ، وأصبح إستخدام السلينيوم هو الأكثر شيوعا على أن يضاف بالكمية المناسبة .

6- فى التطبيقات التجارية ، حيث يجرى تحليل عدد كبير من العينات يوميا ، تجرى تعديلات على الطريقة تسمح بسرعة إنجاز التحليل ، ففى القمح والدقيق يتم تقدير البروتين بهضم 1 جم من العينة بإستخدام كمية معلومة من حامض الكبريتيك 0.1253 ع ثم يعاير الجزء من الحامض المتبقى بعد الهضم بمحلول قياسى من الصودا الكاوية له نفس عيارية محلول حامض الكبريتيك (0.1253 ع) ، وبذلك يمكن حساب % للبروتين فى العينة مباشرة بعد قراءة حجم الصودا الكاوية .

7- يمكن إستخدام حامض البوريك لإستقبال الأمونيا المتحررة أثناء التقطير بعد إضافة الصودا الكاوية المركزة بدلا من إستقبال الأمونيا فى محلول الصودا الكاوية القياسى . وفى تلك الحالة تكون كمية حامض البوريك فى دورق الإستقبال تقريبية (فى حدود 50 مل) وكذلك تركيزه (فى حدود 4 %) .

ويوضح شكل (1.8) جهاز ميكروكلداهل للهضم والتقطير .





تقطير　　　　هضم

شكل (1.8): جهاز ميكروكلداهل للهضم والتقطير

وقد أصدرت هيئة المحللين الكيميائيين الرسمية ***AOAC*** طرقا لتقدير البروتين بطريقة كلداهل بأرقام 976.06 ، 976.05 ، 960.52 . فالطريقة الأولى نصف أوتوماتيكية ، والثانية أوتوماتيكية ، أما الثالثة فهى لتقدير التركيزات الضئيلة من النيتروجين والتى تقدر بالميكروجرامات. وفيما يلى خطوات تقدير البروتين بطريقة كلداهل :

1.1.3.8. إعداد العينة : تطحن الأغذية الصلبة بحيث تمر من منخل سعة ثقوبه 20 ثقب فى البوصة الطولية (***20 mesh***) . ويجب أن تكون العينة المعدة للتحليل ممثلة ومتجانسة.

2.1.3.8. الهضم : توزن العينة بدقة فى دورق كلداهل ثم يضاف الحامض والعامل المساعد. تجرى عملية الهضم حتى يصبح المحلول رائقا بعد إكتمال تحطم كل المواد العضوية . وتتكون كبريتات الأمونيوم غير المتطايرة من تفاعل النيتروجين مع حامض الكبريتيك كما يلى :

$$\text{Protein} \xrightarrow[\text{حرارة ، عامل مساعد}]{\text{حامض كبريتيك}} (NH_4)_2SO_4 \ldots\ldots\ldots\ldots(1)$$

وأثناء الهضم يتحرر النيتروجين البروتينى لتكوين أيونات الأمونيوم ، ويؤكسد حامض الكبريتيك المواد العضوية ويرتبط مع الأمونيوم ، ويتحول الكربون إلى ثانى أكسيد الكربون ، والهيدروجين إلى ماء.

3.1.3.8. التعادل والتقطير : يتم تخفيف محلول الهضم بالماء ، ثم يضاف محلول القلوى المحتوى على ثيوكبريتات الصوديوم لمعادلة حامض الكبريتيك . تقطر الأمونيا المتكونة وتستقبل فى حامض بوريك (4 % حوالى 50 مل) يحتوى على مخلوط دليلى الميثيلين الأزرق ***methylene blue*** وأحمر الميثيل ***methyl red*** .

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \longrightarrow 2NH_3 + Na_2SO_4 + 2H_2O \ldots\ldots(2)$$

$$\underset{\text{حامض بوريك}}{NH_3 + H_3BO_3} \;\text{———}\; NH_4 + \underset{\text{أيون البورات}}{H_2BO_3^-} \ldots\ldots\ldots\ldots(3).$$

4.1.3.8. المعايرة *Titration* : يعاير أيون البورات (والذى يتناسب طرديا مع كمية النيتروجين) مع حامض هيدروكلوريك قياسى :

obeikandi.com

$$H_2BO_3 + H^+ \longrightarrow H_3BO_3 \text{.............}(4)$$

.5.1.3.8 الحساب *Calculations* :

عدد مولات حامض الهيدروكلوريك = عدد مولات الأمونيا =عدد مولات النيتروجين فى العينة...(5) .

ويتم إجراء تجربة بلانك وتطرح الملليلترات المستهلكة فى هذه التجربة من ملليلترات حامض الهيدروكلوريك الناتجة من معايرة أنيون البورات .

$$\text{\% للنيتروجين} = \frac{\text{عيارية حمض الهيدروكلوريك x حجم الحامض بعد طرح البلانك}}{\text{وزن العينة بالجم}} \times \frac{14 \text{ جم}}{\text{مول}} \times 100 \text{...}(6)$$

حيث :

عيارية حامض الهيدروكلوريك = عيارية حامض الهيدروكلوريك فى المول/ 1000لتر

حجم الحامض بعد طرح البلانك = عدد ملليلترات حامض الهيدروكلوريك المعادل للعينة – عدد ملليلترات حامض الهيدروكلوريك المستهلكة للبلانك .

14 = الوزن الذرى للنيتروجين .

ثم يستخدم معامل تحويل النيتروجين إلى بروتين كما هو موضح فى جدول (3.8) ، وكما سبق الإشارة إلى أن معظم البروتينات تحتوى على 16 % نيتروجين ، وعندئذ يكون معامل التحويل 6.25

% للنيتروجين /0.16 = % للبروتين أو

% للنيتروجين x 6.25 = % للبروتين ....(7)

.2.3.8 طريقة نسلر *Nessler method* :

وقد يجرى تقدير النيتروجين فى عينات المواد الغذائية بالطرق اللونية . ومن أكثر الطرق اللونية شيوعا طريقة نسلر *Nessler* والتى يتم إجراؤها على مخلوط هضم كلداهل طبقا للمعادلة الآتية :

$$NH_3 + 2K_2HgI_4 + 3KOH \longrightarrow Hg_2OINH_2 + 7KI + 2H_2O \text{......}(8)$$

Nessler reagent — لون يتراوح بين الأصفر إلى البنى–المحمر

وتمتاز طريقة نسلر لتقدير النيتروجين بسرعتها وحساسيتها العالية وبساطتها . وتؤدى إضافة سيانيد البوتاسيوم إلى محلول نسلر *Nessler reagent* لتجنب بعض مشاكل هذا التقدير والتى تحدث بسبب عدم ثبات لون مركب أيوديد الأمونيوم ثنائى الزئبق

obeikandl.com

ammonium dimercuric iodide بما له من صفات غروية ***colloidal*** . ومن الطرق اللونية التى يمكن إستخدامها أيضا طريقة فان سلايك وهيلر ***Van Slyke & Hiller (1933)*** ، وتعتمد هذه الطريقة على تفاعل المحلول المحتوى على أيونات الأمونيوم مع الفينول القلوى والهيبوكلوريت ، وبتسخين هذا المحلول يتكون لون أزرق كثيف يرتبط بشدة مع الإندوفينول طبقا للمعادلة الآتية :

$$NH_3 + \text{phenol} + \text{hypochlorite} \longrightarrow \text{Indophenol } OH^- \text{ ....(9)}$$

(أزرق اللون ، أقصى إمتصاص للضوء
على طول موجى 630 نانوميتر)

كما يمكن إستخدام هيبوبروميت الثيمول ***Thymol hypobromite*** لتقدير النيتروجين فى صورة أمونيا . هذا وقد أدى تطوير جهاز الهضم المستمر لإمكانية تقدير النيتروجين فى السوائل البيولوجية أو المعلقات خلال بضع دقائق ، حيث تعقب عملية الهضم إضافة كلا من الفينول القلوى وهيبوكلوريت الصوديوم . وتتلخص أهم مميزات طريقة كلداهل فيما يلى :

* يمكن إجراءها على كافة أنواع الأغذية .
* بسيطة نسبيا .
* غير مكلفة .
* دقيقة وتعتبر طريقة رسمية معتمدة لتقدير البروتين الخام .
* أمكن تعديلها وزيادة حساسيتها لقياس كميات ضئيلة من البروتين تقدر بميكروجرامات.

أما أهم عيوب طريقة كلداهل فتتلخص فى الآتى :

1- تقيس كل النيتروجين العضوى بمختلف أنواعه ، ولاتقيس نيتروجين البروتين فقط.
2- تستغرق وقت طويل للإنتهاء منها (حوالى ساعتين) .
3- أقل فى درجة تأكيد النتائج عما هو الحال عند إستخدام طريقة البيوريت .
4- تستخدم فيها مواد آكلة ***corrosive reagent*** .

obeikandi.com

3.3.8. طريقة البيوريت *Biuret Method* :

يعتمد الأساس العلمى لطريقة البيوريت التى إقترحها العالم ريجلر (*Riegler,1914*) على تفاعل المواد التى تحتوى على رابطتين ببتيديتين أو أكثر مع أملاح النحاس فى المحاليل القلوية وتكون معقد بنفسجى اللون يقاس إمتصاصه للضوء على طول موجى 540 نانوميتر . وتكون كثافة اللون متناسبة طرديا مع المحتوى من البروتين . وتمتاز طريقة البيوريت ببساطتها وسرعتها ودقتها ، وإنخفاض تكلفتها ، هذا بالإضافة إلى الأهمية الكبرى لهذه الطريقة بإعتمادها على التفاعل مع الروابط الببتيدية ولذلك فهى تعبر بدقة عن كمية البروتين عكس ما هو الحال فى طريقة تحليل كطريقة كلداهل والتى تقيس النيتروجين الكلى فى العينة بغض النظر عن مصدره هل هو بروتينى أم لا بروتينى.

وفيما يلى وصف لطريقة البيوريت لتقدير البروتين :

1- يخلط 5 مل من محلول البيوريت مع 1 مل من محلول البروتين (يحتوى على حوالى 1-10 مجم بروتين/مل). ويحتوى محلول البيوريت على كبريتات النحاس ، هيدروكسيد الصوديوم ، طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم (والتى تستخدم لضمان ثبات أيون النحاسيك فى المحلول القلوى) .

2- بعد ترك مخلوط التفاعل على درجة حرارة الغرفة لمدة 15 أو 30 دقيقة يقرأ إمتصاصه للضوء على طول موجى 540 نانوميتر أمام البلانك .

ويؤخذ على طريقة البيوريت عدة إنتقادات أهمها :

أ- تختلف كثافة اللون الناتج من تفاعل البيوريت مع البروتينات المختلفة حتى لوكانت بنفس التركيز ولذلك تحتاج عملية التقدير الكمى بمقارنة اللون الناتج من تفاعل البيوريت مع العينة موضع التحليل ، باللون الناتج من تفاعل البيوريت مع وزن معلوم من بروتين معين معروف.

ب- يحتاج تقدير البروتين بطريقة البيوريت لكمية أكبر من عينة المادة الغذائية (لاتقل كمية البروتين فيها عن 2-4 مجم بروتين) عما هو الحال فى الطرق اللونية الأخرى.

ج- قد يحدث تداخل لبعض مكونات المادة الغذائية الأخرى فى تكوين اللون الناتج بتفاعل البيوريت مع البروتينات ، وعادة ماتكون هذه المكونات الليبيدات أو الكربوهيدرات ، أو المواد ذات البريق *Opalescence* .

د- تتداخل التركيزات العالية من أملاح الأمونيوم فى التفاعل .

هـ- لاتعطى هذه الطريقة نتائج مطلقة مباشرة ، بل يجب معايرة اللون الناتج مع لون بروتين معلوم الوزن (مثل سيرم البيومين البقر) أو مع طريقة كلداهل .

4.3.8. طريقة لورى *Lowry Method* :

تعتمد طريقة لورى على تفاعل البروتين مع دليل الفينول والنحاس تحت الظروف القلوية فى وجود البولى فوسفات غير المتجانسة (وتتكون من الفوسفوتنجستيك والفوسفوموليبديك) حيث يحدث التفاعل بأكسدة الأحماض الأمينية العطرية كالتيروزين والفينيل آلانين (وبعض المجموعات الأخرى) بصفة أساسية ويتكون لون نهائى أزرق تعبر كثافته الضوئية عن تركيز البروتين فى العينة . وتقاس كثافة اللون الأزرق على 750 نانوميتر عندما يكون تركيز البروتين ضئيلا أو 500 نانوميتر عندما يكون تركيز البروتين فى العينة كبيرا .

وتتميز طريقة لورى بما يلى :

1- حساسيتها العالية والتى تبلغ من 10-20 مرة قدر حساسية طرق إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية ، وتصل إلى 100 مرة قدر حساسية طريقة البيوريت .

2- كما تعتبر طريقة لورى من الطرق المتخصصة نسبيا برغم إمكانية حدوث تداخل فى التفاعل لعدد قليل من المركبات البيولوجية فى العينة موضع التحليل .

3- أقل تأثرا بحدوث عكارة فى العينة .

4- أكثر تخصصا من أغلب الطرق الأخرى .

5- أكثر بساطة وسرعة حيث لاتستغرق أكثر من 1-1.5 ساعة .

ويعيب تلك الطريقة : (1) تباين حساسيتها مع تركيب الأحماض الأمينية فى بروتين ما ، وظروف التحليل ، (2) كما لاتتناسب كثافة اللون الناتج من التفاعل تماما مع تركيز البروتين فى العينة . (3) بالإضافة إلى ذلك أنها تستهلك وقتا أطول عن طرق قياس إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية على طول موجى 280 نانوميتر ، (4) كما أن العينة تتحطم أثناء التفاعل ، وتحتاج كل عينة لظروف تشغيل خاصة ، (5) بالإضافة لحساسية طريقة لورى للتركيزات العالية من السكر مثل تلك التركيزات المستخدمة فى فصل

obeikandi.com

البروتينات عن طريق تدرج تركيز محاليل السكروز مع الطرد المركزى الفائق *Ultracentrifugation* .

ويمكن أن نوجز طريقة لورى لتقدير البروتين فى عينة مادة غذائية فيما يلى :

1- يتم تجفيف عينة البروتين بحيث تكون كمية البروتين فيها من 20-100 ميكروجرام .

2- يضاف محلول طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم مع كربونات الصوديوم بعد تبريده وتركه على درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق .

3- يضاف محلول (كبريتات النحاس- طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم- هيدروكسيد الصوديوم) بعد التبريد والتحضين على درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق .

4- يضاف محلول ***Folin*** المحضر حديثا ، ويخلط مخلوط التفاعل ويحضن على 50°م لمدة 10 دقائق .

5- يقرأ الإمتصاص الضوئى على 650 نانوميتر .

6- يرسم منحنى قياسي ***standard curve*** بإستخدام البيومين سيرم البقر ومن هذا المحنى والكثافة الضوئية الناتجة عن العينة موضع التحليل يمكن تقدير البروتين فيها .

4.8. طرق قياس الطيف المباشرة

Direct spectrophotometric methods

تعتبر طريقة تقدير تركيز البروتينات بإمتصاصها للأشعة فوق البنفسجية من الطرق السريعة الإجراء ، والسهلة نسبيا ، كما تتميز بعدم تحطم البروتين حتى عند تقديره فى السوائل البيولوجية أى أنها لا تستهلك أى كمية من العينة . ويمكن أيضا إجراء تقدير إمتصاص البروتين للأشعة فوق البنفسجية تحت الظروف التى تفشل فيها طرق التقدير الأخرى فى إعطاء نتائج سليمة وواقعية (مثل وجود الأملاح وأيونات الأمونيوم مع محلول البروتين) . وفى كافة الأحوال يجب تفسير النتائج المتحصل عليها للتقدير بعناية بالغة .

وتعتمد تلك الطريقة على إمتصاص معظم البروتينات للأشعة فوق البنفسجية إمتصاصا قويا عند طول موجى 280 نانوميتر ويكون السبب الرئيسى لهذا الإمتصاص وجود الأحماض الأمينية **التيروزين ، والفينيل آلانين ، والتربتوفان (الأحماض الأمينية العطرية)** فى جزئ البروتين . وطالما أن نسبة هذه الأحماض الأمينية الثلاثة تتباين من

obeikandl.com

بروتين لآخر ، فإن هذه الطريقة فى التقدير تعتبر طريقة نسبية ، حيث قد يتباين الإمتصاص للأشعة فوق البنفسجية بين نفس التركيزات من البروتينات المختلفة بمعامل يتراوح بين 5 لأكثر ويفضل للحصول على نتائج واقعية وسليمة بهذه الطريقة ، إجراؤها على البروتينات النقية .

وتتميز **الأحماض النووية** أيضا بأن لها منحنى إمتصاص عند **280 نانوميتر** إلا أن أقصى إمتصاص للأشعة الفوق بنفسجية من الأحماض النووية يكون عند طول موجى 260 نانوميتر .

وقد أمكن إستخدام طريقة قياس إمتصاص البروتين للشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجى 280 نانوميتر فى تقدير البروتين فى اللبن الكامل ، ومنزوع الدهن ، والمبستر والمعقم وكذلك فى القشدة إلا أن هذه الطريقة لم تعطى نتائج دقيقة عند إستخدامها فى تقدير بروتينات الشرش أو محاليل الكازين .

وللرابطة الببتيدية منحنى إمتصاص قوى عند حوالى 180 نانوميتر إلا أنه عادة ما تحدث صعوبات فنية خاصة فى أجهزة القياس عند القياس على هذا الطول الموجى المنخفض .

كما أمكن قياس تركيز البروتين بقياس درجة إمتصاصه للأشعة فوق البنفسجية عند طول موجى بين 210 إلى 220 نانوميتر ، بل وكانت حساسية القياس عند هذا الطول الموجى أعلى من مثيلتها بحوالى 20 مرة عند القياس على طول موجى 280 نانوميتر . إلا أنه يعيب التقدير عند الأطوال الموجية المنخفضة (180 – 220 نانوميتر) ، بوجه عام حدوث تداخل فى إمتصاص البروتين مع بعض المحاليل المنظمة خاصة تلك المحتوية على مجاميع الكربوكسيل . ولذلك فإنه يجب إختيار المحاليل المنظمة بعناية بالغة عند الرغبة فى قياس تركيز البروتين عند الأطوال الموجية المنخفضة حتى لا تتداخل فى عملية إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية . وتجدر الإشارة إلى ضرورة أن يكون محلول البروتين موضع التقدير **رائق تماما وعديم اللون** حيث يؤدى وجود أيه عكارة لزيادة زائفة فى إمتصاص محلول البروتين للأشعة فوق البنفسجية .

وتتلخص طريقة قياس تركيز البروتين بإستخدام صفة إمتصاصه للأشعة فوق البنفسجية فيما يلى :

1- تذاب البروتينات فى محلول منظم أو محلول قلوى .

2- يقرأ الإمتصاص الضوئى لمحلول البروتين على طول موجى 280 نانوميتر أمام البلانك .

3- يحسب تركيز البروتين من المعادلة التالية :

$$abc = A$$

حيث : A = الإمتصاص ***absorbance***

a = الإمتصاصية ***absorptivity*** لتركيز محدد من بروتين قياسى

b = مسافة مرور الأشعة فى أنبوبة القياس

c = التركيز

إستخدمت قياسات الوميض ***Fluorescence*** أيضا فى التقدير الكمى لبعض البروتينات دون أن تسبب تحطيما لها كما يمكن بهذه الطريقة تقدير المستويات المنخفضة جدا من البروتينات . وتعزى صفة الوميض بصفة أساسية لشق التربتوفان ولدرجة أقل التيروزين والآلانين . وبإستخدام محلول اليوريا المحتوى على سترات وفوسفات لا يحدث تجمع للبروتين وتتحسن دقة التقدير وصفة التكرارية ***reproducibility*** .هذا وقد وجد أن الطريقة الفلورومترية ليست مؤكدة النتائج بحسب بل وتمتاز بسرعة الإجراء إلا أنه يجب إستخدام تخفيفات عالية (تركيزات منخفضة) وأن يتم ضبط درجة الحرارة بدقة مع تنقية العينة موضع التقدير من الشوائب.

5.8. طـــــــرق تقديــــــــر العــكارة
Nephelometric or Turbidimetric Methods

عندما يخلط محلول البروتين بتركيز منخفض مع أى مادة مرسبة ***precipitants*** تحدث عكارة يمكن قياسها كدليل على تركيز البروتين . ومن المواد المرسبة شائعة الإستخدام ثلاثى كلورو حامض الخليك ***TCA*** ، وحديدوسيانيد البوتاسيوم ***potassium ferricyanide*** ، وحامض السلفوساليسيك . وتمتاز تلك الطريقة بسرعة إنجازها عندما تكون البروتينات فى محاليلها . ويعيب تلك الطريقة أنها ينتج عنها قيما مختلفة مع التركيزات المتماثلة من أنواع البروتينات المختلفة ولا يمكن بها التمييز بين البروتينات والمكونات الأخرى التى تترسب تحت نفس ظروف التجربة . هذا وقد تم وصف طريقة

تشتيت الضوء ***light scattering*** لتقدير البروتينات الذائبة حيث يتم التقدير أوتوماتيكيا بعد معاملة محلول عينة البروتين بمخلوط من حامض الخليك ، وحديدى سيانيد البوتاسيوم وفي بعض الحالات تنجستات الصوديوم ثم يقاس الضوء المشتت بفعل المادة المرسبة.

وقد تم وصف طريقة لتقدير البروتين فى المستخلص القلوى للقمح أو لدقيقه تعتمد على ترسيب البروتين بواسطة حامض السالفوساليسيك وقياس العكارة .

6.8. طرق الإرتباط بالصـــــبغة
Dye-Binding Methods

ترتبط البروتينات كميا ، تحت ظروف خاصة ، مع بعض الصبغات العضوية ويمكن أيضا بإستخدام طرق الإرتباط بالصبغة تقدير المجموعات الحامضية الكلية والمجموعات القاعدية للبروتين . ومن أمثلة طرق تقدير البروتينات بإرتباطها بالصبغات إستخدام الصبغة الأنيونية ثنائية السلفونيك ***disulfonic anionic dye*** "الـــ ***Orange G***" والتى ترتبط مع البروتين على pH مقداره 2.2 ، خاصة مع المجاميع الأمينية الحرة ، والحامض الأمينى لايسين ، ومجموعة الإيميدازول للهيستيدين ومجموعة الجوانيدين للأرجنين . هذا وقد أمكن تحسين صفات تقدير البروتين بالصبغة بإستخدام صبغة أخرى وهى الصبغة البرتقالية الحامضية رقم 12 " ***Dye acid orange 12*** " والتى يماثل تركيبها صبغة " ***orange G*** " عدا أنها تحتوى على مجموعة واحدة من حامض السلفونيك . ويعتمد تفاعل الصبغة مع البروتين على المعادلة الآتية :

بروتين + كمية زائدة من الصبغة ← معقد غير ذائب من البروتين مع الصبغة + الجزء من الصبغة غير المرتبط

فعند معاملة عينة غذاء ما بكمية زائدة من الصبغة ، تتفاعل كل من الصبغة وبروتين الغذاء كميا لتكوين معقد غير ذائب يمكن فصله بالطرد المركزى أو الترشيح . ومن تركيز الجزء من الصبغة الذى لم يرتبط بالبروتين (يمكن قياسه لونيا) تحسب سعة الإرتباط ***the binding capacity*** ، ومن العلاقة التى قدرت سابقا بين كمية الصبغة

obeikandi.com

المرتبطة ومحتوى الغذاء من البروتين يبنى جدول تحويل لكل غذاء تقرأ منه مباشرة % للبروتين المقدرة فى عينة الغذاء .

وهناك أجهزة متاحة تجاريا للقياس المباشر للبروتين بعد الإرتباط بالصبغة. وفى هذه الأجهزة تخلط الصبغة مع العينة فى وحدة تفاعل خاص أو فى وحدة إهتزاز (رج وتقليب) معملية " ***Laboratory shaker*** " وبعد تمام الخلط وحدوث التفاعل ، تنقل العينة إلى وعاء خاص مثبت على قرص ترشيح من الألياف الزجاجية ، ثم يقدر الضوء المار فى محلول الصبغة المترشح بجهاز قياس ألوان خاص . هذا وقد أمكن إستغلال طريقة إرتباط البروتين مع " الصبغة الحامضية البرتقالية رقم 12 " ***acid orange 12*** " فى تقدير البروتين فى عينات من الحبوب ، والبذور الزيتية ، والبقوليات ، والمنتجات الحيوانية ، والمنتجات اللبنية . ومن أنواع الصبغات الأخرى التى يوصى بإستخدامها لتقدير البروتين فى اللحوم ومنتجات الألبان " صبغة كوشينيل الحمراء " A " (***Cochineal red A***) ، وصبغة الـــ ***buffalo black*** ، وصبغة الأميدوبلاك " 10B " (***Amidoblack 10 B***) .

وفيما يلى وصف لطريقة تقدير تركيز البروتين بإستخدام الصبغات :

1- تطحن العينة لجزيئات دقيقة (بحيث تمر من غربال سعة ثقوبه 60 مش أو أقل) ويضاف إليها كمية زائدة من محلول الصبغة .

2- ترج المحتويات جيدا حتى يحدث تفاعل الصبغة كاملا ثم ترشح العينة أو تطرد مركزيا لإزالة المواد غير الذائبة .

3- يقاس الإمتصاص الضوئى للجزء من الصبغة غير المرتبط مع البروتين ، ويقدر تركيز الصبغة من منحنى قياسى لها .

4- يجرى عمل منحنى معايرة بتوقيع تركيز الجزء غير المرتبط من الصبغة مع النيتروجين الكلى (المقدر بطريقة كلداهل) لغذاء معين بحيث يعطى هذا المنحنى مدى واسع من تركيز البروتين .

5- يقدر محتوى العينة المجهولة من البروتين من المنحنى القياسى أو بإستخدام معادلة إنحدارية يتم بناءها بإستخدام طريقة المربعات الصغرى ***Least squares*** الإحصائية .

ومن أهم مميزات طرق تقدير البروتين بالصبغة ما يلى :

أ- سريعة وتستغرق زمن إجراءها 10 دقائق أو أقل .

ب- غير مكلفة ، وتعتبر دقيقة نسبيا لتقدير محتوى البروتين فى السلع الغذائية بوجه عام .

وقد تبين من الأبحاث المتعددة التى أجريت عن إرتباط البروتين بالصبغات أن صبغة الـ " ***Amidoblack 10 B*** " أكثر حساسية وتعطى تغير أكبر فى الكثافة الضوئية لكل وحدة من بروتين اللبن عما هو الحال لو إستخدمت فى نفس التقدير صبغة " ***orange G*** " . ويتأثر إرتباط البروتين بصبغة الأميدوبلاك بوجود ثنائى كرومات البوتاسيوم والفورمالدهيد ولا تتأثر بوجود كلوريد الزئبقيك ولا تتأثر صفات إرتباط بروتين اللبن بالصبغة بعمليات التجنيس أو تكثيف اللبن لتركيزه أو التسخين على 32°م لمدة 15 دقيقة . أما حدوث تحلل مائى شديد للبروتينات فيؤدى لزيادة الإرتباط بالصبغة ، على عكس الحال ، فى اللبن المسخن بشدة حتى حدوث تلون بالبنى ***browning*** فيقل معدل إرتباطه بالصبغة . وقد بينت الأبحاث أن إختبار الإرتباط بالصبغة يعطى نتائج غير مقبولة ومناسبة مع عينات اللبن العادى السليم ، ويكون هذا الإختبار غير مناسب مع اللبن غير العادى كلبن السرسوب ***colostrum*** ولبن الماشية المصابة بإلتهاب الضرع ***mastitis*** وأيضا فى المراحل المتأخرة من فترة الحليب ***very late lactation milks***.

7.8.إطلالة على بعض الطرق الأخرى لتقدير البروتين الكلى
Other Methods for Assaying Total Protein

1- يمكن تقدير البروتين بأجهزة التأرجح النووى المغناطيسى ***Nuclear magnetic resonance*** .

2- وجد أن التحليل بتنشيط النيوترونات ، تنشيط البروتونات ، التحليل بالتحلل الحرارى ***Thermal decomposition analysis*** كلها إختبارات يعتمد عليها ***reliable tests*** لتحليل البروتين على أن تكون العينة ممثلة ، وتم تحضيرها بطريقة سليمة للتحليل ، وأن تكون الأجهزة معايرة بطريقة صحيحة .

3- إستخدمت طريقة إنبعاث الضوء بالحرق الكيميائى ***pyrochemiluminescent*** فى تقدير محتوى المواد البيولوجية من البروتين ، وتتلخص خطوات تلك الطريقة فيما يلى:

أ- يحول النيتروجين المرتبط كيميائيا فى عينة المادة الغذائية إلى أكسيد النيتريك بواسطة الحرق الأكسيدى ***oxidative pyrolysis*** .

ب- يؤكسد أكسيد النيتريك بالأوزون فينتج ثنائى أكسيد النيتروجين شبه المستقر ***metastable nitrogen dioxide*** والذى يبعث بفوتونات ليتحول للصورة المستقرة. وتكون كمية الفوتونات المنبعثة طردية مع كمية النيتروجين فى العينة ويمكن حينئذ قياسها كميا . وتتميز هذه الطريقة بسرعة الإجراء حيث لايستغرق التقدير أكثر من خمسة دقائق ، كما تكون تكلفة الجواهر الكشافة ضئيلة للغاية ، ولايستخدم فيها أية كيماويات خطرة .

4- هناك طرقا أخرى بالإضافة لطريقة " لورى " تعتمد على إحداث تفاعل كيميائى مع حامض أمينى معين خاصة الأحماض الأمينية العطرية ، فعندما يسخن محلول البروتين مع حامض النيتريك المركز فينتج اللون الأصفر بحدوث نيترته ***Nitration*** للأحماض الأمينية العطرية ، وعند المعادلة يتحول اللون إلى البرتقالى . ويعرف هذا التفاعل بتفاعل حامض الزانتوبروتيك ***xantoproteic acid*** ويتميز ببساطته ، ويعيبه قلة حساسيته ، ومن الصعوبة بماكان تحويله لطريقة قياسية .

5- يمكن بإستخدام الصفات الطبيعية للبروتين تقدير محتوى البروتين فى عينة مادة غذائية بسرعة ودقة ، ودرجة تكرارية ***reproducibility*** مناسبة.

ومن أهم الصفات الطبيعية التى إستخدمت فى تقدير المحتوى البروتينى :

- **معامل الإنكسار** : حيث ثبت أن قياس معامل الإنكسار طريقة جيدة فمعامل إنكسار معظم البروتينات تقريبا متساوى.
- **إنعكاس طيف الأشعة تحت الحمراء *near infrared reflectance*** : ويمكن بهذه اصفة قياس تركيز البروتين ومكونات أخرى أيضا من الغذاء.
- **طريقة تصوير الطيف الضوئى *photoacoustic spectrophotometry*** : إستخدمت هذه الطريقة لتقدير محتوى منتجات الألبان من البروتين عام 1987م.
- من الإختبارات الطبيعية الأخرى المقترحة لتقدير البروتين ، تقدير الوزن النوعى ، اللزوجة ، الجذب السطحى ، التوصيل الكهربى ، الإستقطاب .

6- تتفاعل الأحماض الأمينية والببتيدات والبروتينات مع " الفورمالدهيد المتعادل" من خلال المجموعات الأمينية بها فتظهر الخواص الحامضية لمجاميع الكربوكسيل والتى

تعادل بمحلول قلوى معلوم العيارية ، وعندئذ ، يقدر التركيز بدلالة حجم القلوى . هذا وقد إستخدمت طريقة المعايرة بالفورفورال والتى قد يطلق عليها تسعير مجاميع الكربوكسيل فى تقدير البروتين فى اللبن الطبيعى والمصنع .

7- من الطرق البسيطة جدا لتقدير البروتين هى طريقة تسخين بروتين اللبن مع هيدروكسيد الصوديوم فتنطلق كمية من الأمونيا تتناسب طرديا مع تركيز البروتين . وتتميز تلك الطريقة بسهولة الإجراء وبساطتها كما أن نتائجها ترتبط إرتباطا وثيقا مع طريقة كلداهل .

8- يمكن قياس تركيز بروتينات السيرم فى اللبن بقياس حجم راسب بروتينات السيرم الذى تم ترسيبه بواسطة حامض الفوسفوتنجستيك وذلك بعد أن تزال بروتينات الكازين (بالتجبن الحامضى) ، وسيرم اللبن المدنتر . وترتبط هذه الطريقة أيضا إرتباطا وثيقا مع طريقة كلداهل.

8.8. حساسية طرق التقدير المختلفة
Sensitivity of various assay methods

قدرت حساسية بعض طرق تقدير تركيز البروتين فى المواد الغذائية وقسمت طرق التقدير المختلفة إلى :

1- الطرق التى تعتمد على قياس إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية .

2- الطرق التى تعتمد على التفاعلات الكيميائية (كطرق كلداهل ، لورى ، البيوريت ،...إلخ)

3- طرق إرتباط الصبغات بالبروتينات .

4- الطرق عالية الحساسية (كالطرق الفلورومترية ، مقياس النشاط الإشعاعى ، ...إلخ) .

ويلاحظ أن الطرق عالية الحساسية يمكن إستخدامها لتقدير كمية أقل من 0.1 ميكروجرام ، أما طرق الإرتباط بالصبغة فتقيس الكميات التى تتراوح بين 1-100 ميكروجرام ، ويمكن قياس الكميات الأعلى من 10 ميكروجرام بالطرق الكيميائية كطريقة لورى أما طريقة البيوريت فتقاس بها الكميات الأعلى من 1000 ميكروجرام ، وتقيس

طرق الأشعة فوق البنفسجية كميات فوق 10 ميكروجرام (على طول موجى 215 نانوميتر) أو فوق 100 ميكروجرام (على الطول الموجى 280 نانوميتر) .

9.8. المركبات النيتروجينية اللابروتينية
Nonprotein Nitrogenous Substances

تشمل المركبات النيتروجينية اللابروتينية ذات الأهمية فى الأغذية الأحماض الأمينية والأمينات والأميدات ، والمركبات رباعية النيتروجين ***quaternary nitrogen compounds*** ، والبيورينات ، والبيريميدينات ، ومركبات النيتروزأميدات ***N-nitrose amides*** . ولهذه المركبات أهمية كبيرة فى الأغذية فهى تساهم فى قيمتها الغذائية ، ولونها (خاصة فى منتجات المخابز) وكذلك صفات الأغذية الأخرى الهامة . وتعتبر تلك المركبات كذلك مصدرا للمغذيات وعوامل نمو هامة للأحياء الدقيقة المستخدمة فى التخمرات الصناعية . ومن ناحية أخرى تعتبر ناتجات تحطيم البروتينات الحيوانية وزيادة مستوى المركبات النيتروجينية اللابروتينية دليلا على تدهور جودة تلك المنتجات وإحتمالات حدوث الفساد . هذا وقد إكتشف منذ حوالى ثلاثين عاما أن مركبات ***N-nitrosodimethylamine*** يمكن أن تسبب أوراما بكبد حيوانات التجارب . وقد ثبت أيضا خلال الخمسة وعشرين سنة الأخيرة أن هناك حوالى 300 مركب من مركبات ***N-nitroso*** سامة وسرطانية كما أن لها القدرة على إحداث طفرات ***mutagenic*** . وإستخدم تقدير المركبات النيتروجينية اللابروتينية غير العضوية مثل الأمونيا والنيترات والنيتريت فى تقييم الشئون الصحية للأغذية ***sanitary status of foods*** . كما إستخدم تقدير المركبات النيتروجينية اللابروتينية فى تتبع مراحل تعتيق وإنضاج أصناف الجبن المسواه أو لتتبع تركيز مركبات النيتريت والنيترات فى صناعة اللحوم المعالجة (كالسجق والبسطرمة ... إلخ) .

1.9.8. فصل المركبات النيتروجينية اللابروتينية

من الطرق الشائعة والسهلة لفصل المركبات النيتروجينية اللابروتينية عن البروتينات طريقتى الديلسة ***Dialysis*** ، والترشيح الفائق ***ultrafiltration*** بإستخدام الغشاء المناسب. ويمكن كذلك فصل تلك المركبات بعد تجميع البروتينات بالحرارة ***heat coagulation*** فتتحرر المركبات النيتروجينية اللابروتينية . كما إستخدمت بعض مرسبات البروتين مثل أحماض البكريك ، السلفوساليسيك ، ثلاثى كلورو الخليك ، ويفصل الراشح الذى يحتوى على المركبات النيتروجينية اللابروتينية . وتتميز عمليتى تجميع البروتينات بالحرارة وإستخدام المرسبات بأنها تثبط إنزيمات تحليل البروتين بسرعة وتمنع إستمرار تحلل البروتين . وتعانى معظم عمليات الفصل من خطأ تجريبى يتمثل فى إمكان إحتفاظ المركبات البروتينية أثناء فصلها بجزء من المركبات النيتروجينية اللابروتينية .

وفى دراسة أجريت على تقدير المركبات النيتروجينية اللابروتينية بعد فصلها عن المركبات البروتينية فى اللبن الفرز ، والسيرم ، والمستخلص المائى للدقيق ، والمستخلص المائى للردة بإستخدام طرق عديدة مثل : الديلسة ***dialysis*** ، الحرارة ، حامض التنجستيك ، هيدروكسيد النحاس ، هيدرازول أكسيد الحديديك ، خلات الرصاص ، حامض ثلاثى كلورو الخليك ، حامض الفوسفوتنجستك ، حامض الميتافوسفوريك ، حامض التانيك ، وحامض السلفوساليسيك ، الإيثانول ، كلوريد الزئبقيك ، مخلوط الكلوروفورم مع كحول الأوكتيل (بنسبة 8 :1) ، مخلوط الفينول : حامض الخليك : الماء (بنسبة 1:1:1) . وقد تبين من تلك التجربة حدوث تباين فى شقوق المركبات النيتروجينية اللابروتينية بإختلاف طريقة إستخلاصها وقد وجد أن طرق الديلسة والطرق المشابهة لها كانت أكثر طرق فصل المركبات النيتروجينية اللابروتينية " ***NPN*** " نجاحا .

2.9.8. تقدير الأحماض الأمينية الحرة
Determination of free amino acids

إختبرت طرق عديدة لتقدير الأحماض الأمينية الحرة فى المستخلصات الخالية من البروتين ، وبإيجاز شديد يمكن إلقاء الضوء على بعض هذه الطرق فيما يلى :

1- تستجيب طرق المعايرة ***Titrimetric*** لمجاميع الكربوكسيل من الأحماض الأمينية ولمجاميع الفينول من الجليكوزيدات ، فالمعايرة بالفورمول ***Formol titration*** تكون متخصصة للمجاميع الأمينية إلا أنها لاتميز بين الأحماض الأمينية والأمينات الأخرى.

2- تعتبر طرق تقدير الغاز ***Gasometric*** أكثر تخصصا ويتحرر فيها النيتروجين بعد إضافة حامض النيتروز ***Nitrous acid*** ومن ثم يقاس الغاز بالمانوميتر ، ويعيب تلك الطريقة إعطاءها لنتائج سلبية مع البرولين والأمينات الثانوية الأخرى ***secondary amines*** ، كما يحدث تداخل بين مجموعات الأميد فى الجلوتاثيون والجلوتامين مما ينتج عنه نتائج غير منطقية .

3- تفيد الطرق التى يتكون فيها معقد من الأحماض الأمينية مع النحاس فى التحليلات شبه الكمية ***semi-quantitative*** حيث يكون المركب المعقد الملون متخصص بدرجة بسيطة فقط للأحماض الأمينية الحرة .

4- يستخدم التفاعل اللونى للأحماض الأمينية مع النِنهيدرين (سيشرح لاحقا) بصورة كبيرة حتى إستخدم هذا التفاعل فى التعرف على الأحماض الأمينية بجهاز تحليل الأحماض الأمينية ***Amino acid analyzer "AAA"*** ، إلا أن لهذا التفاعل اللونى عيبين رئيسيين : أولهما أن تلك الطريقة ليست متخصصة للأحماض الأمينية ، وثانيهما تباين اللون وكثافته بتفاعل النِنهيدرين مع الأحماض الأمينية المختلفة .

5- تؤدى عملية فصل الأحماض الأمينية على الورق الكروماتوجرافى فى إتجاهين ***two dimensional paper chromatography*** ، ثم غسيلها وإزالتها من الورق وتجميعها فى مجمع للشقوق ***fraction collector*** ثم تقدير الأحماض الأمينية الفردية بالطرق الإسبكتروفوتومترية المباشرة لتقدير مقبول بدرجة كبيرة كتقدير نصف كمى .

6- تستخدم بعض إنزيمات نزع مجاميع الكربوكسيل ***decarboxylases*** فى تقدير بعض الأحماض الأمينية .

7- من أفضل طرق التقدير الكمى الطريقة التى تعتمد على فصل الأحماض الأمينية على أعمدة التبادل الأيونى ***Ion Exchange column*** قبل إختيار الطريقة الملائمة لتقديرها وتعطى هذه الطريقة نتائج دقيقة وتتميز بالحساسية العالية .

3.9.8. بعض الطرق الأخرى لتقدير المركبات النيتروجينية اللابروتينية

وصف مجموعة من العلماء (*Varner et al., 1953*) طريقة شاملة لتقدير الأمونيوم والأميد والنيترات والنيتريت فى المستخلصات النباتية الخالية من البروتين نوجزها فيما يلى :

1- يضبط pH المستخلص النباتى الخالى من البروتين على 10 بإستخدام محلول منظم البورات .
2- يوضع المخلوط السابق فى وحدة تقطير كلداهل متوسطة ويزال النيتروجين الأمونيومى بالتقطير تحت تفريغ على 40°م .
3- يضاف بعد ذلك محلول قلوى مركز إلى وحدة التقطير فيزال النيتروجين الأميدى بواسطة التقطير البخارى على 100°م .
4- تضاف كبريتات الحديدوز ***Ferrous sulphate*** كمادة مختزلة فيزال حينئذ ، نيتروجين النيتريت على صورة أمونيا .
5- يختزل نيتروجين النيترات إلى أمونيا بواسطة كبريتات الحديدوز وفى وجود كبريتات الفضة كعامل مساعد ***catalyst*** .

ويحتاج إجراء هذا التقدير حوالى 20 دقيقة ، إلا أنه قد يحدث تداخل من الجلوكوز فى التفاعل ولذلك يستخدم مخلوط راتنجى للتبادل الأيونى ***ion exchange resin mixture*** لفصل الجلوكوز وعندئذ يستغرق زمن الإنتهاء من التقدير كله حوالى الساعتين. هذا وإذا ما كان تركيز النيترات ضئيلا جدا يفضل تقديرها بإستخدام طريقة لونية .

وبالإضافة لما سبق ذكره هناك طرقا عديدة تستخدم للكشف عن الأمونيا وتقديرها فى المستخلصات الخالية من البروتين ***protein free extracts*** قد تعتمد على الصفات القاعدية للأمونيا ، أو بأكسدة الأمونيا إلى عنصر النيتروجين ، أو بتحويل أيونات

obeikandl.com

الأمونيوم بواسطة الفورمالدهيد إلى مركب الهكساميثيلين تترامين ، كما أن هناك طرقا أخرى تعتمد فى الأساس على تفاعل نسلر ***Nessler reaction*** وفى جميع الأحوال يجب تجنب تداخل المركبات العضوية المحتوية على النيتروجين والتى قد ينتج عنها تفاعلات ثانوية تؤدى لتكوين الأمونيا .

10.8. تحليل الأحماض الأمينية فى جزئ البروتين

يعتبر تقدير تركيب الأحماض الأمينية فى جزئ البروتين هى الخطوة الأولى فى تعريف التركيب الكيميائى للجزئ . وتؤدى عملية تحليل الأحماض الأمينية فى جزئ البروتين لمعرفة نوعين من المعلومات :

1- وصف تركيب البروتين من حيث نوعية وحدات الأحماض الأمينية الداخلة فى تركيبه .

2- إعطاء وصف دقيق لكمية كل حامض أمينى فى جزئ البروتين . وتزداد دقة وصف جزئ البروتين عند معرفة عدد جزيئات الأحماض الأمينية فى كل جزئ بروتين ويتطلب ذلك معرفة الوزن الجزيئ للبروتين كما سنوضح فيما بعد . وبطبيعة الحال تعطى هذه المعلومات مؤشرا هاما جدا عن القيمة الغذائية للبروتين موضع الدراسة .

هذا ويمكن إجراء تحليل كامل للأحماض الأمينية فى جزئ البروتين عند توافر بضعة ميكروجرامات منه بدقة عالية (تصل إلى 95 % أو أعلى) ويتطلب ذلك بضعة ساعات فقط تجرى خلالها عدد من العمليات المتتابعة كمايلى :

1- تحليل البروتين تحليلا كاملا إلى مخلوط من الأحماض الأمينية .

2- فصل مخلوط الأحماض الأمينية إلى وحدات فردية فيصبح كل حامض أمينى على حدى ، وذلك بإستخدام طريقة فصل ذات كفاءة عالية ***high resolving power*** .

3- تقدير كمية كل حامض أمينى بعد عمليتى التحليل ، والفصل بإستخدام طرق لونية مع نظام آخر للكشف ، ومن ثم ، يتم حساب التركيز بالمولر لكل حامض أمينى.

وفيما يلى شرح مبسط وموجز للخطوات التجريبية اللازمة لتقدير تركيب الأحماض الأمينية الداخلة فى تركيب جزئ البروتين .

1.10.8. التحليل المائى للبروتين *Hydrolysis of protein*

1.1.10.8. التحليل الحامضى *Acid hydrolysis* :

يتم تحليل البروتين ، عادة ، بإستخدام أحماض معدنية على درجة حرارة عالية وعادة ما يستخدم **حامض الهيدروكلوريك** " 6 ع " والثابت فى درجة حرارة الغليان على درجة حرارة تتراوح بين 105– 110°م لمدة ما بين 20 – 96 ساعة ، وتتم عملية التحليل بمعزل عن الهواء لتجنب حدوث تحطيم لبعض الأحماض الأمينية . وفى هذه الطريقة يضاف الحامض إلى عينة المادة الغذائية (المراد تقدير تركيب بروتيناتها من الأحماض الأمينية) فى أنابيب زجاجية ذات عنق ضيق ثم تسخن الأنابيب بما تحتويه من الحامض والمادة الغذائية لطرد الهواء منها ويقفل عنق الزجاجة بلهب قوى . يلى ذلك وضع الأنابيب المقفلة فى فرن على درجة حرارة ثابتة (105 – 110°م) للمدة المناسبة .

وتأتى أفضلية إستخدام حامض الهيدروكلوريك مما يلى :

- درجة النقاء العالية .
- رخص ثمنه
- سهولة إزالته بعد خطوة التحليل .

وتتأثر دقة النتائج عند تحليل الأحماض الأمينية بسبب هاتين المشكلتين :

1- بطئ تحلل الروابط الببتيدية فى السلاسل الجانبية الملتفة والمتكتلة ***bulky side chain*** ، فعلى سبيل المثال ، فإن معدل تحليل ***isoleuc-yl*** ، ***val-yl*** ، ***Tryptophan-yl*** تكون أبطئ من الـ ***glycy-l*** حيث تتم حمايتها ويعيق تحللها وجودها فى السلاسل الجانبية الملتفة للروابط الببتيدية وتؤدى تلك الإعاقة لنقصان تركيز أيونات الهيدرونيوم ***Hydronium*** (التى تحطم وتفكك الروابط الببتيدية) فيصعب تحلل تلك الروابط الببتيدية. وفى المراحل الأولى لعملية التحليل (خلال 20 ساعة) تكون عملية تحلل وتفكك تلك الأحماض الأمينية بالذات منخفضة ولذلك فقد

obeikandi.com

يمتد زمن التحليل حتى يصل إلى 70 – 90 ساعة لحدوث تحلل كامل وإنفصال لكافة الأحماض الأمينية فى جزئ البروتين.

2- تغير تركيب بل وتحطيم بعض الأحماض الأمينية بمعاملة التحليل (بإستخدام حامض *HCl* 6 ع على 105 – 110°م) فيتحول **السيرين** ، **والثريونين** ، **والميثيونين والسيستئين** ***cysteine*** وبعض الأحماض الأخرى جزئيا إلى مركبات أخرى ، ولا يمكن تقديرها بالكامل بعد زمن قدره 20 ساعة من بدء التحليل . أما الحامض الأمينى " **التربتوفان** " فيتحطم بشدة بالتحليل الحامضى ولذلك تستخدم طريقة أخرى لتحليله (كما سنذكر لاحقا).

هذا ويمكن التغلب على المشكلة الأولى بتقدير محتوى البروتين من الأحماض الأمينية بعد فترات تحليل متتالية مثل 24 ، 48 ، 72 ، 96 ساعة فيعطى ذلك بيانات عن قيم مختلفة لمحتوى البروتين من الأحماض الأمينية ، وتحسب بعد ذلك متوسط نسبة الأحماض الأمينية والتى تظل بتركيز ثابت مع الزمن .

3- يتحلل **الأيزوليوسين** ، **والفالين** أكثر بطئا بواسطة حامض الهيدروكلوريك 6 ع عن الأحماض الأمينية الأخرى ولذلك يلزم إطالة فترة التحليل إلى ما يربو عن 48 ساعة للحصول على تركيزهم الحقيقى فى البروتين .

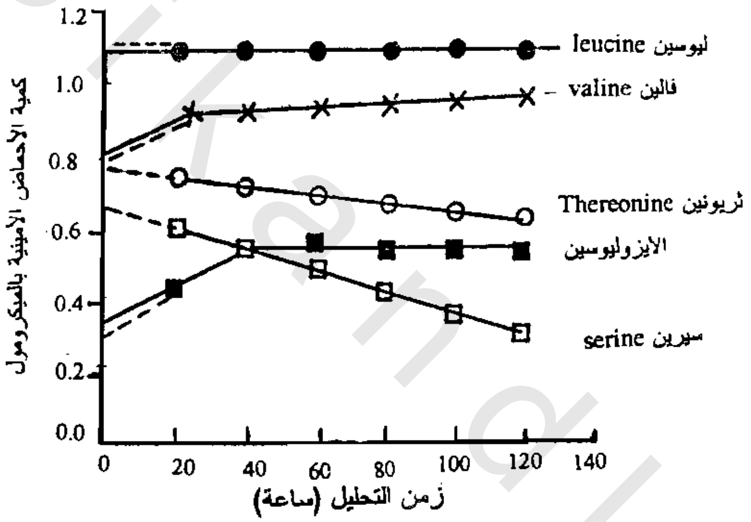
4- يتأكسد التيروزين بمعاملة التحليل الحامضى .

5- يمكن تحويل السيستئين ، والسيستين إلى مركب أكثر ثباتا وهو حامض السيستيك ***cysteic acid*** بإستخدام حامض فوق الفورميك ***performic acid*** ، وبعد ذلك يتم تحليل البروتين فى حامض الهيدروكلوريك الـ 6 ع ، وتستكمل باقى خطوات التحليل .

6- يتحول الأسباراجين والجلوتامين كميا إلى حامضى الإسباراتيك والجلوتاميك على التوالى ، ولايمكن تقديرهم على صورتهم الأصلية بالتحليل الحامضى .

obeikandl.com

ويظهر فى شكل (2.8) بوضوح أن **الفالين** ، **والأيزوليوسن** بعد التحليل لفترة طويلة تزداد كميتهم حيث يمكن الحصول على أقصى نسبة لكميتهم الموجودة فعلا فى البروتين بزيادة زمن التحليل . أما الأحماض التى تتأثر بالحامض ***acid labile amino acids*** والتى يقل تركيزها مع طول زمن التحليل مثل **الثريونين والسيرين والميثيونين والسيستئين** فيمكن تقدير نسبتهم عن طريق منحنيات خاصة أو رسم المنحنى الخاص بهم وتتبع النقص فى تركيزهم بطول فترة التحليل ، وإذا كان تفاعل التحليل ومعدل النقص يعبر عن تفاعل من الرتبة الأولى ***1st order kinetics*** يمكن مد خط المنحنى وإعادته لنقطة البداية لمعرفة تركيزهم الأصلى فى البروتين قبل بداية التحليل (أنظر شكل 2.8).



شكل (2.8): كمية الأحماض الأمينية المقدرة بعد أزمنة تحليل متزايدة للبروتين

ولتقدير الحامض الأمينى التربتوفان لايصلح إجراء التحليل بالحامض المعدنى حيث يتحطم التربتوفان ، ولكن يستخدم *3N-P-toluenesulfonic acid* المحتوى على 0.2 % من مركب *3-(2-aminoethyl)-indole* على درجة 110°م فى أنابيب مفرغة ومقفلة . وإضافة مركبات الإندول فى مخلوط التحليل تمنع هدم التربتوفان وتعطى نسبة ثابتة وأعلى منه . ومن الضرورى أيضا إستخدام أوقات تحليل مختلفة مثل 24 ، 48 ،

72 ساعة وحساب نسبة التربتوفان عند زمن " صفر " بمد الخط أو المنحنى بإعتبار تفاعل التحليل تفاعل من الرتبة الأولى ***1st order kinetics*** .

2.1.10.8. التحليل القاعدى *Base hydrolysis*

تتحطم معظم الأحماض الأمينية فى جزئ البروتين عند تحليله مائيا بالقلوى ، ولذلك فلا يمكن تحليل الأحماض الأمينية كلها بتلك الطريقة ولكنها تستخدم فقط عندما يكون المطلوب تحليل الأحماض الأمينية التى لاتتحمل التحليل الحامضى كالتربتوفان وتجرى عملية التحليل بإستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم بعيارية " 4.2 " فى أنابيب مفرغة ومقفلة على 110°م لمدة 16 ساعة . ويستخدم النشا فى مخلوط التحليل كمضاد للأكسدة لحماية التربتوفان .

3.1.10.8. التحليل المائى الإنزيمى *Enzymic hydrolysis*

يمكن إجراء تحليلا كاملا للبروتينات بإستخدام **الإنزيمات كعامل لمسى** فى عملية التحليل . وقد لاقت عملية التحليل بالإنزيمات قبولا كبيرا وأعطت نتائج مرضية ، وكثيرا ما تستخدم هذه الطريقة أيضا فى دراسات تقدير تتابع ***sequence*** الأحماض الأمينية فى جزئ البروتين .

وفيما يلى بإيجاز شديد خطوات التحليل المائى الإنزيمى :

1- تجرى عملية دنترة بالحرارة للبروتينات لفرد جزئ البروتين حتى يصبح قابلا للتحليل بالإنزيمات .

2- يتم تحليل البروتينات كمادة تفاعل " ***substrate*** " بواسطة واحد أو أكثر من إنزيمات الـ ***Endopeptidases*** (التى تعمل على الروابط الببتيدية الداخلية فى جزئ البروتين) ، لإنتاج مخلوط من الببتيدات الصغيرة .

ويفضل إستخدام الإنزيمات التى لها مدى تخصصى واسع ***broad specifity*** مثل البابايين ***papain*** ، والببسين ***pepsin*** ، والستلين ***subtlin*** . وفى كثير من الأحيان

obeikandi.com

يفضل إستخدام مخلوط إنزيمى من الكيموتربسين ***chemotrypsin*** ، التربسين ***trypsin*** ويعتبر المخلوط المثالى لتلك المعاملة .

3- تستخدم بعد ذلك إنزيمات " ***aminopeptidase M*** " لإجراء التحليل الكامل للببتيدات إلى أحماض أمينية ، وقد يستخدم خليط من إنزيمات الـ ***prolidase*** ، ***Leucine amino peptidase*** .

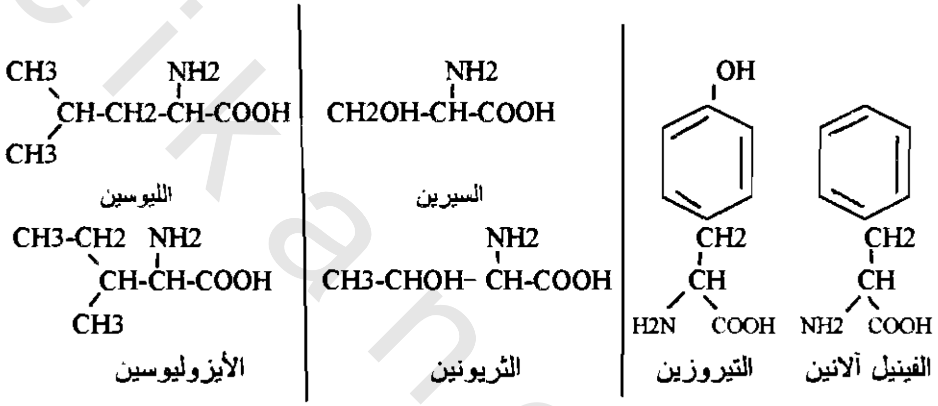
وتتميز عملية التحليل المائى الإنزيمى بعدة مميزات تجعلها تأتى فى الأفضلية قبل طرق التحليل المائى الأخرى سواء بالحامض أو بالقلوى وأهم مميزات تلك الطريقة ما يلى :

* يمكن تحليل البروتين إلى مكوناته من الأحماض الأمينية بتركيزها الحقيقى بإستخدام الإنزيمات أما فى حالة الأحماض المعدنية (كما سبق بيانه) فقد يتغدل تركيب الأحماض الأمينية أو تتحطم . ولذلك يفضل دائما تقدير التربتوفان والإسباراجين والجلوتامين بإستخدام التحليل المائى الإنزيمى .
* يمكن أيضا بالتحليل المائى الإنزيمى تقدير مشتقات الأحماض الأمينية الموجودة فى تركيب بعض البروتينات مثل الفوسفوسيرين ***phosphoserine*** ، سلفونات التيروزين ***tyrosine sulfonate*** ولا يمكن أبدا تقدير تلك المشتقات بالتحليل الحامضى .
* يستخدم التحليل المائى الإنزيمى فى دراسات تقدير تتابع ***sequence studies*** الأحماض الأمينية فى البروتينات .

ومما يؤخذ على التحليل المائى الإنزيمى صعوبة إجراءه بزيادة حجم جزئ البروتين كما أن ناتجات التحليل قد تثبط الإنزيمات مما يمنع إستكمال تحليل البروتينات . وأكثر عيوب تلك الطريقة هى إحتمال حدوث هضم ذاتى ***self digestion*** لإنزيمات تحليل البروتين نفسها ، مما يغير بطبيعة الحال ، من أنواع وتركيزات الأحماض الأمينية الناتجة فى مخلوط التحليل بدخول أحماض أمينية من الإنزيمات ، ويمكن تجنب تلك المشكلة بإجراء التحليل بإستخدام تركيزات ضئيلة من الإنزيمات على أن يكون لهذه الإنزيمات قدرة تحليل عالية .

2.10.8. فصل الأحماض الأمينية
Separation of Amino Acids

يوجد فى مخلوط تحليل البروتين حوالى 20 حامض أمينى ، ولذلك يجب إختيار الطريقة المناسبة لفصصل كل حامض أمينى على حدى ، وذلك لأن فصل كل هذه الأحماض الأمينية عن بعضها البعض ليعد أمرا فى غاية الصعوبة بسبب تشابه تركيب عديد من الأحماض الأمينية مثل :



ولإجراء فصل لعشرين حامض أمينى فى مخلوط يجب إستخدام طريقة للتحليل تتميز بقوة إزاحة عالية ***high resolving power*** ، وقد وجد أن أنسب طرق الفصل لمخلوط الأحماض الأمينية هى طريقة التبادل الأيونى ***ion Exchange*** ، وبعد عملية الفصل يسهل تقدير الأحماض الأمينيى بعملية أوتوماتيكية على جانب كبير من الدقة بإستخدام جهاز تحليل الأحماض الأمينية . كما يمكن أن تستخدم أيضا فى فصل الأحماض الأمينية عن بعضها العض طريقتى كروماتوجرافيا السائل ذات الطور العاكس ***reversed-phase liquid chromatography*** أو كروماتوجرافيا الغاز السائل " ***GLC*** " .

ويستخدم فى فصل الأحماض الأمينية عن بعضها البعض عادة عمود به مادة تبادل أيونى راتنجية ***ion exchange resin*** من نوع حامض السلفونيك . ومادة التبادل الأيونى عبارة عن مركبات ذات وزن جزيئ عالى تتكون من بوليمرات ذائبة ***soluble***

obeikandi.com

polymers يتم تحضيرها بإجراء بلمرة مشتركة للستيرين ***styrene*** مع البنزين ثنائى الفينيل ***divinyl benzene*** يعقبها عملية كبرتة ***sulfonation*** للمركب المبلمر من الستيرين-بنزين ثنائى الفينيل ***styrene-divenyl benzene*** فتتكون مادة التبادل الأيونى ويكون تركيبها عندئذ ثلاثى الإتجاهات من الهيدروكربون الخامل (ستيرين – بنزين ثنائى الفينيل) مع عدد كبير من مجاميع حامض السلفونيك والتى تعمل كمجاميع دالة . وينتج هذا المركب تجاريا بدرجات مختلفة من الروابط المتقاطعة ***Cross-linking*** ، وبأحجام جسيمات مختلفة ***variable particle sizes*** ، كما قد يكون بشكل سبحيات كروية ***spherical beads*** أو جسيمات مطحونة ***crushed particles*** .

ويمكن تمثيل عملية التبادل الأيونى المستخدمة فى فصل مخلوط الأحماض الأمينية بعد معاملة التحليل (والتعادل) بواسطة المعادلة الآتية :

$$\text{Resin-SO}_3(\text{Na}^+) + {}^+\text{H}_3\text{N-}\underset{}{\overset{\text{R}\atop|}{\text{CH}}}\text{-COOH} \longrightarrow \text{Resin-SO}_3^- \text{-}({}^+\text{H}_3\text{N-}\overset{\text{R}\atop|}{\text{CH}}\text{-COOH}) + \text{Na}^+$$

وتتلخص عملية فصل الأحماض الأمينية فى عمود التبادل الأيونى فى الخطوات التالية :

1- يتم ضبط pH مخلوط الأحماض الأمينية على 2.20 ويوضع على سطح مادة التبادل الأيونى ***ion exchange resin*** فى العمود المعبأ بها والتى سبق إجراء إتزان لها بواسطة محلول منظم من سترات الصوديوم عياريته 0.2 ع حتى يضبط رقم pH مادة التبادل الأيونى عند 3.25 . وهكذا فعندما تكون الأحماض الأمينية عند pH أقل وقوة أيونية منخفضة تحل الأحماض الأمينية محل أيونات الصوديوم وترتبط بمجاميع حامض السلفونيك بواسطة التجاذب الإلكتروستاتيكى .

2- تتوقف قوة إرتباط الأحماض الأمينية بمادة التبادل الأيونى على الـ pH ، والقوة الأيونية للمحلول المنظم . حيث ترتبط الأحماض الأمينية بمادة التبادل الأيونى بقوة إرتباط معينة تعتمد على قابلية كل حامض أمينى للإرتباط بمادة التبادل الأيونى ***the affinity of each amino acid for the resin*** . وبالتالى فبإجراء إزاحة ***elution*** مناسبة لتلك الأحماض الأمينية يمكن دفعها خارج العمود بترتيب معين حسب قوى إرتباطها (بمادة

التبادل الأيونى) فيخرج من عمود الفصل الحامض الأمينى الأقل قوة فى إرتباطه أولا ، ثم الأكثر ، فالأكثر ... وهكذا .

3- بزيادة رقم pH محلول الإزاحة تصبح مجموعة α – كربوكسيل متأينة وتكون محصلة الشحنة على الأحماض الأمينية المتعادلة ***neutral amino acids*** تساوى صفرا ... أى تكون قوى الإرتباط الإلكتروستاتيكية بين الأحماض الأمينية المتعادلة ومادة التبادل الأيونى منعدمة ، أما الأحماض الأمينية الحامضية ***acidic amino acids*** فتكون سالبة الشحنة ، وتصبح الأحماض الأمينية القاعدية ***basic amino acids*** موجبة الشحنة ، وحينئذ يتجه تفاعل التبادل الأيونى لجهة اليسار حيث تحدث إزاحة ***elution*** أولا للأحماض الأمينية الحامضية (لتنافرها مع مجموعة السلفونات فى مادة التبادل الأيونى) ، ويعقبها مجموعة الأحماض الأمينية المتعادلة ، وأخيرا القاعدية .

4- تؤدى زيادة القوة الأيونية لمحلول الإزاحة لتوجيه التفاعل جهة اليسار أيضا حيث تؤدى زيادة تركيز أيونات الصوديوم لتنافسها على المراكز النشطة (مجاميع السلفونات) بمادة التبادل الأيونى فيسهل إنفصال الأحماض الأمينية .

وفيما يلى بعض أهم الإعتبارات الواجب مراعاتها عند فصل الأحماض الأمينية بالتبادل الأيونى :

أ- يتم إختيار الظروف المناسبة من تركيب المحلول المنظم المستخدم فى عملية الإزاحة ***elution*** ، وقيمة الـ pH والقوة الأيونية له وكذلك درجة الحرارة ، بحيث يمكن فصل الأحماض الأمينية المرتبطة بمادة التبادل الأيونى بترتيب متتابع ، دون حدوث تداخل حسب قوة إرتباطها بمادة التبادل الأيونى .

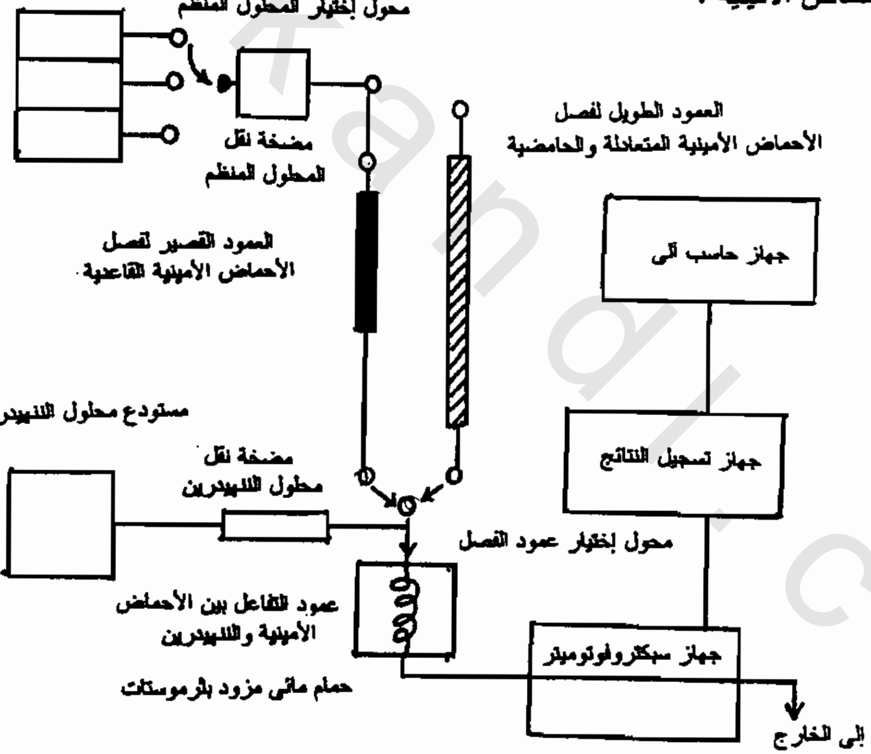
ب- يعتمد فصل الأحماض الأمينية على مادة التبادل الأيونى بصفة أساسية على عملية التبادل الأيونى والقوة الإلكتروستاتيكية لإرتباط الأحماض الأمينية بمادة التبادل الأيونى . وفى بعض الحالات تدمص بعض الأحماض الأمينية على مادة التبادل الأيونى بسبب وجود جزء غير قطبى فى تركيبها فيرتبطا بواسطة قوى الإرتباط الهيدروفوبية ***Hydrophobic interaction*** . ويعنى ذلك أن تلك الأحماض الأمينية ترتبط بقوتين (الإلكتروستاتيكية ، والهيدروفوبية) مما يزيد من قـــوة الإرتباط خاصة بالنسبة

للأحماض الأمينية التى تحتوى على جزء هيدروكربونى أكبر وبذلك يخرج من العمود الجليسين قبل الآلانين والسيرين قبل الثريونين ، ... وهكذا .

ج- عادة تجرى عملية فصل الأحماض الأمينية بإستخدام أكثر من عمود لزيادة كفاءة الفصل وزيادة الحساسية ، وتقليص الزمن اللازم للتحليل .

1.2.10.8. جهاز تحليل الأحماض الأمينية :

يوضح شكل (3.8) رسم تخطيطى لجهاز تحليل الأحماض الأمينية ***amino acid analyzer (AAA)*** الذى يعتمد نظام الفصل فيه على إستخدام عمودين لفصل الأحماض الأمينية أحدهما قصير تفصل فيه الأحماض الأمينية القاعدية عن بعضها البعض أما العمود الأخر الطويل فيستخدم لفصل باقى الأحماض الأمينية سواء المتعادلة أو الحامضية ويعمل كل عمود بنظم مختلفة للمحاليل المنظمة للحصول على أقصى كفاءة لفصل الأحماض الأمينية .



شكل (3.8): رسم تخطيطى لجهاز تحليل الأحماض الأمينية (*AAA*)

obeikandl.com

2.2.10.8. فصل وتقدير الأحماض الأمينية :

• عند بداية التحليل يوضع فى **العمود القصير** محلول سترات الصوديوم بعيارية 0.35 ورقم pH = 5.28 ، أما **العمود الطويل** فيوضع فيه محلول سترات الصوديوم بعيارية 0.2 ، ورقم pH = 3.25 .

• يتم وضع مخلوط الأحماض الأمينية بعد ضبط رقم الـ pH له عند 2.2 فى كلا العمودين ، وطالما كان رقم pH محلول الأحماض الأمينية أقل من رقم pH المحلول المنظم فى كلا العمودين " ***starting buffer*** " فإن الأحماض الأمينية المختلفة ترتبط بقوة بمادة التبادل الأيونى (معادلة) .

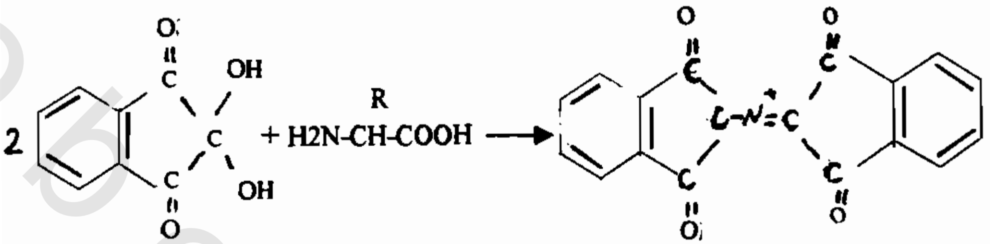
• يمرر المحلول المنظم خلال العمود فتزاح ***displaced*** الأحماض الأمينية من على مادة التبادل الأيونى وتخرج من العمود الأحماض الأمينية الأقل فى قوة إرتباطها ثم الأقوى ، فالأقوى ... وهكذا . حيث يحدث إزاحة ***elutuion*** أولا فى العمود القصير بواسطة محلول سترات صوديوم عياريته 0.35 ، رقم الـ pH له يساوى 5.28 ، وعند إكتمال خروج الأحماض الأمينية القاعدية من العمود القصير بعد إزاحة كل حامض أمينى على حدى بكمية معينة من المحلول المنظم ، نبدأ فى فصل الأحماض الأمينية الحامضية والمتعادلة بإستخدام العمود الطويل .

• يبدأ تشغيل العمود الطويل بإستخدام المحلول المنظم الأول المكون من سترات صوديوم بعيارية مقدارها 0.2 ، ورقم pH = 3.25 (لفصل الأحماض الأمينية الحامضية) ، وبعد خروج كل الأحماض الأمينية الحامضية تباعا من العمود الطويل فى أزمنة محددة بدقة وكمية من محلول الإزاحة تكفى لخروج كل كمية الحامض الأمينى ، يستكمل الفصل فى نفس العمود بإستخدام محلول سترات الصوديوم له رقم pH = 4.28

وتجدر الإشارة إلى أن المحلول المنظم المستخدم فى الفصل يدخل إلى العمودين بواسطة معدل إنسياب محدد بدقة عالية بإستخدام مضخة لدفع المحلول .

• تخرج الأحماض الأمينية تباعا كل فترة زمنية وحجم محلول الإزاحة محددان بدقة وتدخل فى عمود التفاعل حيث تقابل تيار من محلول النتهيدرين ويدفع مخلوط الحامض الأمينى والنتهيدرين خلال أنبوبة لولبية (لزيادة مساحة سطح التفاعل) مغمورة فى حمام

مائى مزود بثرموستات لضبط درجة حرارة التفاعل عند 100°م يكون كافيا لحدوث تفاعل كامل بين الحامض الأمينى والننهيدرين كما توضحه المعادلة التالية :



ثلاثى كيتوهيدرندين-هيدرات
2،2-ثنائى هيدروكسى-1،3 إداندديون

Ruhemman's purple
ثنائى كيتوهيدرندين-ثنائىكيتوهيدريندامين
+ R-C-H- + CO_2

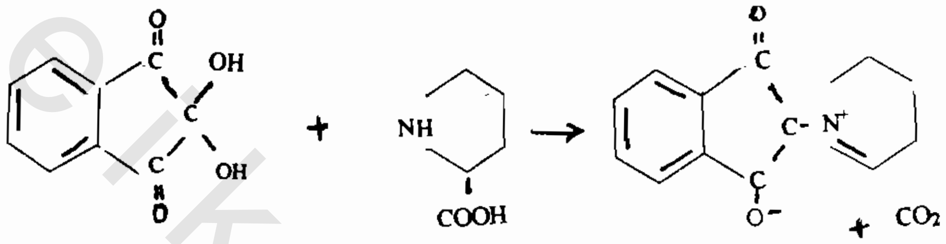
حيث تتفاعل **الأحماض الأمينية** مع **الننهيدرين** ويتكون مركب معقد ناتج من الأمونيا و " 2 " مول من النهيدرين يعرف بإسم ***Ruhemman's purple*** (ذا لون بنفسجى مزرق) ناتج عن أكسدة الأحماض الأمينية بنزع مجاميع الأمين (الأمونيا) والتى ترتبط بدورها مع الـــ 2 مول من مركب النهيدرين وتنتج مركبا كيميائيا يعرف بإسم ***diketohydrindine-diketohydrindamine*** ، كما ينتج فى التفاعل ألدهيد الحامض الأمينى منزوع الأمين ، وثانى أكسيد الكربون . وتفضل أن تكون درجة حرارة التفاعل 100°م ورقم الـــ pH = 5 لزمن يقدر بحوالى 15 دقيقة وذلك للحصول على أقصى كمية من المعقد .

وتجدر الإشارة إلى أن كمية المعقد المتحصل عليها ترتبط بدرجة ثبات النهيدرين أثناء التفاعل ولذلك تتم حماية المحلول ، عادة ، بإضافة كلوريد الستانس ***stannous chloride*** والهيدرانداتين ***hydrindantin*** (الصورة المختزلة للننهيدرين) أو بواسطة السيانيد ***cyanide*** كذلك يدفع فى كثير من الأحيان ، غاز النيتروجين الخامل فى المحلول بالإضافة لذلك يحتوى محلول النهيدرين على محلول منظم قوى ***strong buffer*** كافى لحفظ التيار الخارج من العمود على pH = 5 .

obeikandi.com

يتميز ناتج تفاعل الأحماض الأمينية مع النتهيدرين بثباته (***Rehemman's purple***) لعدة ساعات وتقدر كميته بقياس الكثافة الضوئية عند طول موجى 570 نانوميتر.

ملحوظة : يتفاعل النتهيدرين مع الأحماض الإيمينية ***Imino acids*** مثل البرولين والهيدروكسى برولين ويتكون مركب مختلف كالتالى :



لون أصفر   برولين   ننهيدرين

ويقدر تركيز المعقد الأصفر اللون عند أقصى إمتصاص ضوئى للون الأصفر لطول موجى 440 نانوميتر ، لذلك يتم تغيير الطول الموجى فى جهاز الإسبكتروفوتوميتر لتقدير البرولين .

* تقرأ الكثافة الضوئية لتيار السائل الخارج من عمود التفاعل ، ويتكون جهاز الإسبكتروفوتوميتر من ثلاث أنابيب قياس ***3-cuvettes*** لكل منها مصدر ضوئى مستقل وخلية ضوئية ومرشح للضوء حيث :

- تضبط الأنبوبة الأولى على طول موجى 570 نانوميتر والتى تعطى أقصى إمتصاص للون القرنفلى الناتج من تفاعل معظم الأحماض الأمينية مع محلول النتهيدرين.

- أما أنبوبة القياس الثانية ***2nd cuvette*** فتضبط على طول موجى 440 نانوميتر وهو أقصى إمتصاص للون الأصفر الناتج من تفاعل البرولين مع النتهيدرين .

- وتستخدم الأنبوبة الثالثة عندما يكون حجم الـ ***peak*** المعبر عن تركيز ناتج تفاعل الأحماض الأمينية مع النتهيدرين والمسجل على ورق ***chart*** (جهاز التسجيل)

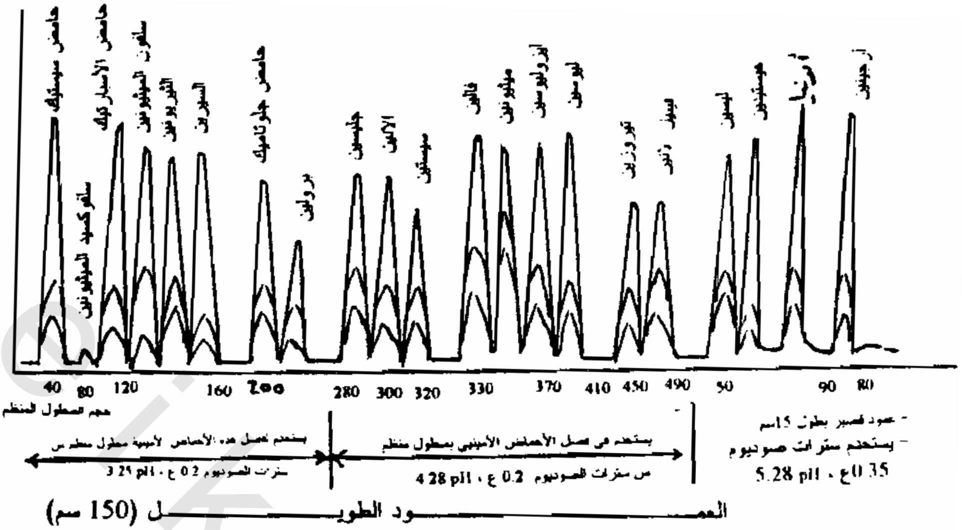
كبيرا ويزيد على مدى قراءة الكثافة الضوئية فى أنبوبة القياس الأولى ، فيعطى الشكل الجديد للـــ ***peak*** بعد تخفيض حساسية الجهاز إلى النصف أو أقل .

* تدخل البيانات التى تعبر عن ناتج تفاعل الأحماض الأمينية مع النِنهيدرين فى جهاز كشاف ***detector*** يعطى إستجابة لكل الأحماض الأمينية محسوبة كشق من البروتين وتعطى مدى واسع من تركيز العينات وتسجل النتائج بواسطة وحدة تسجيل ***Recorder*** على ورق خاص بالجهاز ***chart*** ، ويعطى ثلاث منحنيات " ***peaks*** " ، كل منحنى منها يعبر عن تركيز اللون فى كل أنبوبة قياس على حدى .

* تعرف الأحماض الأمينية من منحنيات قياسية لمخاليط معلومة من الأحماض الأمينية ثم تقدر كمية كل حامض أمينى بمساحة الـــ ***peak*** المعبرة عنها (وتساوى حاصل ضرب الإرتفاع x طول القاعدة عند منتصف الإرتفاع) ، وحديثا تتم هذه الخطوة بإستخدام أجهزة الكمبيوتر . ويعبر عن النتائج عادة بمول % وذلك بعد قسمة كمية كل حامض أمينى (مقدر من الكروماتوجرام) على وزنه الجزيئ ، ثم جمع كل قيم مساحات الأحماض الأمينية لحساب مساحتها الكلية ***total area*** ، ثم قسمة كل منها على عدد المولات الكلى ، وضرب ناتج القسمة x 100 .

* وعادة ما يجرى عمل معايرة داخلية للجهاز ***Internal standard*** ، وعادة مايستخدم حامض أمينى لا يوجد فى المنتجات الغذائية مثل النورليوسين ***norleucine*** .

*ويعتبر جهاز تحليل الأحماض الأمينية ***AAA*** من الأجهزة المرغوبة جدا ويعتبر وحدة أساسية فى معامل التحليل الكبيرة وقد إنتشر فى العالم ، وأدخلت عليه تعديلات كثيرة حسنت من حساسية ودقة القياس ، وزادت درجة الأوتوماتيكية حتى أصبحت عملية التقدير أوتوماتيكية بالكامل فى أواخر السبعينات . ويوضح شكل (4.8) ترتيب خروج الأحماض الأمينية فى جهاز تحليل الأحماض الأمينية ونوعية الأحماض الأمينية المفصولة بالعمود القصير ، وتلك المفصولة بالعمود الطويل .

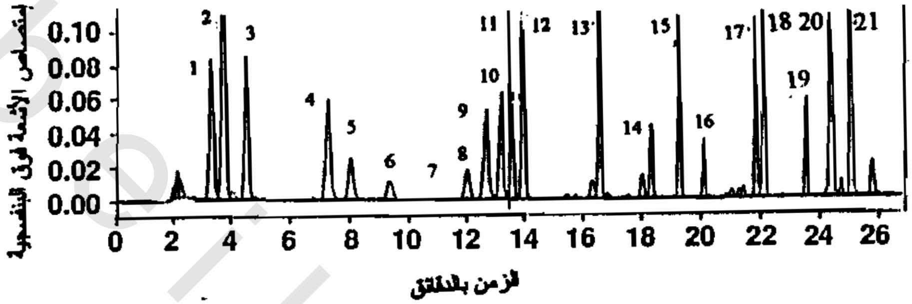


شكل (4.8): ترتيب خروج الأحماض الأمينية بعد فصلها فى العمودين القصير والطويل فى جهاز تحليل الأحماض الأمينية " AAA "

• إستخدمت فى أعمدة الفصل بالجهاز أنواع جديدة من مواد التبادل الأيونى ***resins*** والتى تتكون من حجم جزيئات متماثل فتزيد من سرعة الإزاحة ومعدل السريان مما يقلل الوقت اللازم للتحليل ليصبح حوالى ساعتين فقط بعد أن كان يستغرق 24 ساعة من ذى قبل .

• تم تعديل طريقة تحليل الأحماض الأمينية لتصبح صالحة للإستخدام مع كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى ***HPLC*** فى عام 1980 وذلك بعد إنتاج أنواع جديدة من البوليمرات ***resins*** تتحمل الضغط العالى ومدى واسع من تباينات درجات الحرارة ، والقوى الأيونية pHs . وفى تلك الطريقة يتم أولا تكوين شقوق للأحماض الأمينية بإستخدام ثيوكرباميل الفينيل ***phenylthiocarbamyl*** ، ثم تتم عملية فصل مشتقات الأحماض الأمينية بإستخدام كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى والطور العاكس ***reversed phase LC*** ، وتقدر الأحماض الأمينية المفصولة تباعا بإستخدام طريقة إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية ***UV*** . ويمكن بطرق كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء

العالى *HPLC* الكشف حتى عن الكميات ضئيلة جدا من الأحماض الأمينية تقدر بالبيكومول *picomole* ، وتحتاج طول فترة إجراء التقدير حينئذ 30 دقيقة أو أقل فقط . ويوضح شكل (5.8) كروماتوجرام لفصل الأحماض الأمينية فى غذاء أطفال .



شكل (5.8): تحليل مشتقات ثيوكرباميل الفينيل للأحماض الأمينية فى غذاء أطفال بإستخدام طريقة كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى *HPLC* ، وتم فصل الأحماض الأمينية بإستخدام عمود يعمل بنظام الطور العاكس *reversed-phase column* ، وحقن مع العينة حامض التورين *Taurine* للمعايرة الداخلية للجهاز ، وكان ترتيب خروج الأحماض الأمينية كالتالى :

1- أسبارتيك ، 2- جلوتاميك ، 3- حامض للمعايرة الداخلية ، 4- سيرين ، 5- جليسين ، 6- هستيدين ، 7- تورين ، 8- أرجنين ، 9- ثريونين ، 10- آلانين ، 11- أمونيا ، 12- برولين ، 13- حامض للمعايرة الداخلية ، 14- تيروزين ، 15- فالين ، 16- ميثيونين ، 17- أيزو ليوسين ، 18- ليوسين ، 19- فينيل آلانين ، 20- جوهر كشاف ، 21- ليسين .

11.8. طرق الفصل والتعرف على البروتينات
Protein Separation and Characterization Procedure

لايتكون بروتين أى غذاء عادة من بروتين واحد فحسب ، بل يتكون من مجموعة بروتينات متباينة الصفات . وللتعرف على مخلوط البروتينات المكون لأى مادة غذائية يتم فصلها عن بعضها البعض إلى كل شق على حدى بإستغلال التباينات فى صفاتها من حيث الذوبان ، الحجم ، كثافة ونوعية الشحنات التى تحملها ، صفات الإدمصاص ، الإستجابات

البيولوجية ***biological affinities*** مع جزيئات أخرى . وتستخدم تلك الصفات الطبيعية للحصول على بروتين نقي . وسنتناول فى هذا الجزء بعض طرق فصل البروتينات .

وتستخدم عادة طرق الفصل فى خطوات متتالية لتنقية البروتين فى مخلوط الغذاء وبطبيعة الحال ، تؤدى زيادة عدد خطوات الفصل المستخدمة لزيادة درجة نقاء البروتين المفصول . وبعض المكونات الغذائية كالمركزات البروتينية ***protein concentrates*** يمكن إعدادها فى خطوة فصل فقط واحدة ريثما أن النقاوة العالية لتلك المركزات غير مطلوبة . أما عند إعداد بروتين نقى للدراسات المعملية فغالبا ما يتم تحضيره بثلاث خطوات فصل وتنقية أو أكثر تجرى بتتابع معين حتى يتم إنتاج مستحضر بروتينى نقى . وقبل الحديث ، والخوض فى غمار عمليات الفصل المختلفة ، فإنه من الأهمية بما كان للباحث أو للقائم بالعمل أن يكون على دراية كافية وإلمام بمعلومات دقيقة عن الصفات البيولوجية للبروتينات مثل الوزن الجزيئ (*MW*) ، نقطة التعادل الكهربى (*PI*) ، صفة الذوبان ، ودرجة حرارة الدنترة ، ... إلخ. ويؤدى تميز شق البروتين بأى صفة بيوكيمياتية غير عادية لسهولة فصله بإستغلال تلك الصفة فى الخطوات الإبتدائية لعملية الفصل . وفيما يلى إستعراض موجز لبعض طرق الفصل والتعرف على البروتينات .

1.11.8. فصل البروتينات بتباين درجات ذوبانها
Separation by differential solubility characteristics

تعتبر البروتينات إلكتروليتات عديدة ***polyelectrolytes*** ولذلك يقدر صفات ذوبانها نوع وشحنة الأحماض الأمينية فى جزيئاتها . ويمكن ترسيب البروتينات إختياريا بتغيير رقم pH المحلول المنظم ، أو قوته الأيونية ، أو الثابت ثنائى القطبية ***dielectric constant*** ، أو درجة الحرارة . وتتميز عملية فصل البروتينات بالترسيب بسرعة الإجراء ، كما أنها لا تتأثر بباقى مكونات المادة الغذائية (مثل الكربوهيدرات ، الليبيدات ، ... إلخ) ، وتفضل دائما عمليات الترسيب عندما نتعامل فى التحليل مع كمية كبيرة من المادة موضع الفصل ، وعادة ما تستخدم عملية الترسيب فى المراحل الأولى لعمليات التنقية .

1.1.11.8.طرق الترسيب :

الترسيب بالأملاح ***Salting out*** : للبروتينات صفات فريدة لذوبانها فى محاليل الأملاح المتعادلة . فعادة ما تزداد درجة ذوبان البروتينات فى التركيزات المنخفضة من المحاليل الملحية بسبب زيادة المراكز الهيدروفيلية (المحبة للماء) فى البروتينات ، ثم تترسب البروتينات من محاليلها بزيادة القوة الأيونية للمحلول الملحى . وتستخدم تلك الصفة لترسيب البروتينات بالتتابع فى مخلوط معقد منها بتغيير تدريجى فى تركيز المحلول الملحى .

ومن الشائع إستخدام كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2SO_4$ لسهولة ذوبانها وتستخدم الأملاح المتعادلة الأخرى مثل كلوريد الصوديوم ، وكلوريد البوتاسيوم لترسيب البروتينات .

وعادة تجرى عملية الفصل على خطوتين لزيادة كفاءة الفصل ، ففى الخطوة الأولى تضاف كبريتات الأمونيوم بتركيز أقل قليلا من التركيز اللازم لترسيب شق البروتين المزمع فصله ، وعند إجراء طرد مركزى لهذا المحلول تترسب البروتينات الأقل ذوبانا بينما تظل البروتينات المطلوب فصلها ذائبة فى المحلول . ثم تجرى الخطوة الثانية بزيادة تركيز كبريتات الأمونيوم بحيث يكون أعلى قليلا من التركيز اللازم لترسيب البروتين المطلوب . وعند الطرد المركزى لهذا المحلول ، يترسب البروتين موضع الدراسة ، بينما تظل البروتينات الأكثر ذوبانا فى الجزء الطافى غير المترسب ***supernatant*** . ومن أهم عيوب تلك الطريقة أن البروتين المترسب يعلق به كمية من البروتين غير المترسب . ويفضل دائما إزالة الأملاح قبل إعادة إذابة راسب البروتين المفصول فى محلول منظم . وهناك جداول ومعادلات متاحة فى مراجع الكيمياء الحيوية لحساب الكمية بالضبط من كبريتات الأمونيوم اللازمة لتحضير تركيز معين لإجراء هذه العملية بدقة وكفاءة عالية .

2.1.11.8. الترسيب عند نقطة التعادل الكهربى *Isoelectric precepitation (PI)* :

نقطة التعادل الكهربى للبروتين (*PI*) هى رقم الـ pH الذى تصل عنده محصلة الشحنة الصافية على البروتين إلى الصفر . وعندئذ يتجمع البروتين ويترسب لأنه لاتوجد قوى تنافر بين جزيئاته تسبب إنتشاره فى المحلول . وللبروتينات المختلفة نقطة تعادل كهربى تختلف ، ولذلك فيمكن فصلها عن بعضها بضبط رقم pH محلولها عند قيمة نقطة

التعادل الكهربى الخاصة بكل بروتين . فعند ضبط رقم pH المحلول المكون من مخلوط بروتينات عند نقطة التعادل الكهربى لبروتين ما من هذه البروتينات يترسب هذا البروتين بينما لاتترسب البروتينات الأخرى ذات نقط التعادل الكهربى المغايرة لهذا البروتين . وبعد فصل البروتينات المترسبة عند نقطة تعادلها الكهربى يمكن إعادة إذابتها مرة أخرى بتغيير رقم الـــ pH لمحلولها سواء لأقل أو لأعلى من نقطة التعادل الكهربى.

3.1.11.8. فصل البروتينات بالمذيبات
Solvent fractionation

يحدد ثابت قطبية *dielectric constant* البروتين فى محلول ما رقم الـــ pH ، والقوة الأيونية لهذا المحلول . وبذلك يمكن فصل البروتينات إعتمادا على تباين درجة ذوبانها فى مخاليط المذيبات العضوية والماء . فبإضافة مذيب عضوى يختلط بالماء مثل الأسيتون أو الإيثانول يقل ثابت قطبية المحلول الناتج وتقل درجة ذوبان معظم البروتينات فيه نتيجة خفض درجة تأين الأحماض الأمينية ذات الشحنات الكهربية ، فتميل البروتينات للتجمع والدنترة . وتتباين الكمية اللازمة من المذيبات العضوية التى تسبب ترسبا للبروتينات من 5 إلى 60 % . وعادة ما تجرى عملية الفصل للبروتينات بالمذيبات على صفر°م أو أقل تجنبا لدنترة تلك البروتينات بسبب الزيادة الناجمة فى درجة الحرارة عند خلط المذيبات العضوية بالماء .

4.1.11.8. دنترة البروتينات الملوثة للبروتين المفصول
Denaturation of contaminating proteins

عند فصل بروتين معين من مخلوط بروتينات فى محلول يفضل ترسيب بعض البروتينات الأخرى سواء بالحرارة أو بتغيير أرقام الـــ pH لتجنب ترسيب تلك البروتينات مع البروتين موضع الدراسة .

ويوضح جدول (5.8) الذوبان النسبى لبعض البروتينات فى كبريتات الأمونيوم والأسيتون ، ودرجة الثبات الحرارى لتلك البروتينات على 55°م ويمكن إستخدام تلك

الطرق الثلاثة لفصل مخلوط البرروتينات إلى شقوق بروتينات كل ، شق بمفرده وذلك لتحضير بروتينات عضلات بدرجة نقاء عالية .

جدول (5.8): الظروف المثالية لفصل بروتينات العضلات الذائبة في الماء بإستخدام طرق إذابة مختلفة

الإنزيم	كبريتات أمونيوم على pH = 5.5 ، درجة حرارة 10° م	كبريتات أمونيوم على pH = 6.5 ، درجة حرارة -5° م	كبريتات أمونيوم على pH = 5.5 ، درجة حرارة 55° م
	% للتشبع	% (ح / ح)	
الفوسفوريليز *Phosphorylase*	30 – 40	18 – 30	غير ثابت
البيروفات كينيز *Pyrovate kinase*	55 – 65	25 – 40	ثابت
الألدوليز *Aldolase*	45 – 55	30 – 40	ثابت
لاكتات ديهيدروجينيز *Lactate dehydrogenase*	50 – 60	25 – 35	ثابت
الإينوليز *Enolase*	60 – 75	35 – 45	غير ثابت
كرياتين كينيز *Creatine- kinase*	60 – 80	35 – 45	غير ثابت
الفوسفوجليسرات كينيز *Phosphglycerate kinase*	60 – 75	45 – 60	ثابت
الميوجلوبين *Myoglobin*	70 – 90	45 – 60	غير ثابت

المصدر:

Briskey ,E.J., Cassens,R.G. and Marsh,B.B. 1970. The physiology and Biochemistry of Muscle as a Food. Univ. of Wisconsin press.

وتستخدم طريقة فصل البروتينات بصفات ذوبانها وترسيبها إستخداما تجاريا وصناعيا في إنتاج مركزات البروتين . حيث يمكن إنتاج مركزات الصويا من رقائق الصويا منزوعة الدهن ودقيق الصويا بإستخدام الطرق التي أوجزناها سابقا . فعلى سبيل المثال ، يمكن ترسيب بروتينات الصويا من المكونات الأخرى الذائبة في رقائقه أو دقيقه بإستخدام محلول تركيزه من 60 إلى 80 % ثم الترسيب عند نقطة التعادل الكهربي على pH = 4.5 (نقطة التعادل الكهربي لعديد من بروتينات الصويا) ، أو الترسيب بواسطة الدنترة بالحرارة الرطبة . وتستخدم تلك الطرق لإنتاج مركزات بروتينية تزيد فيها نسبة

obeikandl.com

البروتين عن 65 % . ويمكن بدمج طريقتين أو ثلاث طرق للفصل سويا وإجراءهم بالتتابع إنتاج معزول بروتين الصويا ***protein isolate*** والذى تصل نسبة البروتين فيه إلى 90 % .

5.1.11.8. فصل البروتينات بالإدمصاص
Separation of proteins by adsorption

تعرف كروماتوجرافيا الإدمصاص بأنها طريقة لفصل المركبات بإدمصاصها على سطح مادة صلبة ثم نزعها ***desorption*** من على سطح المادة المدمصة الصلبة بواسطة مذيب يزيح تلك المركبات طبقا لقوة إرتباطها بالإدمصاص . فتنفصل المركبات (البروتينات) الأقل إرتباطا بكمية أقل من محلول الإزاحة ، وهكذا.

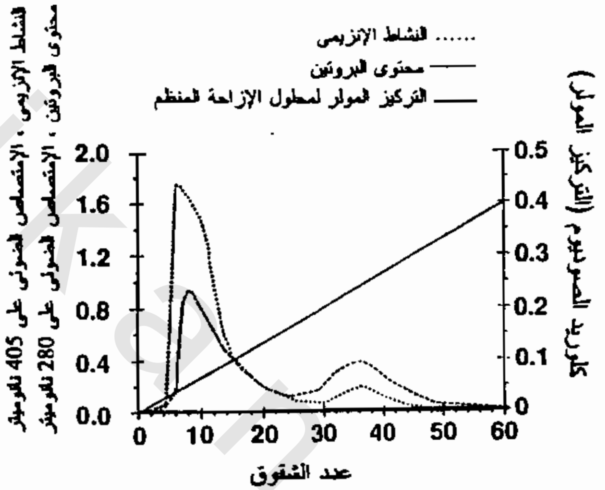
وسنتناول بإيجاز نوعين من نوعيات كروماتوجرافيا الإدمصاص ، وهما كروماتوجرافيا التبادل الأيونى ، وكروماتوجرافيا الإستجابة ***affinity*** .

*** كروماتوجرافيا التبادل الأيونى *Ion exchange chromatography* :**

تعرف كروماتوجرافيا التبادل الأيونى كعملية تبادل الإدمصاص بين جزيئات البروتينات المشحونة ، والأيونات بالمحلول المنظم ويتم ذلك على سطح المادة الحاملة الصلبة الراتنجية . وتعرف المادة الصلبة ***matrix*** التى تحمل شحنات موجبة بالمبادل الأنيونى ***anion exchanger*** ويرتبط هذا المبادل الأنيونى بالأيونات أو الجزيئات سالبة الشحنة . ويطلق على المادة الصلبة الحاملة للشحنات السالبة بالمبادل الكاتيونى ***cation exchanger*** ويرتبط بالأيونات أو الجزيئات موجبة الشحنة . ومن أكثر أنواع المبادلات الأنيونية شيوعا مشتق ثنائى إيثيل أمينو إيثيل ***diethylaminoethyl*** ويليه شيوعا مادتى الكربوكسى ميثيل ، والفوسفوكاتيون.

وعند فصل البروتينات بإستخدام المبادلات الأيونية تدمص بعد ضبط رقم pH والقوة الأيونية للمحلول المنظم لمعظمه درجة إستجابة البروتين للمادة المدمصة . ثم تزاح ***are eluted*** البروتينات موضع الإعتبار إختياريا من عمود الفصل بتغيير القوة الأيونية والـ pH تدريجيا لمحلول الإزاحة ، حيث يؤدى تغيير تركيب محلول الإزاحة المنظم

eluting buffer لتغيير كثافة شحنات البروتين ، فتقل قابليتها للإدمصاص على مادة التبادل الأيونى ، فتخرج من العمود البروتينات الأقل قوة إرتباطا ثم الأكثر ، فالأكثر... وقد يحتاج الأمر لفصل مزيد من البروتينات أو لتحسين كفاءة الفصل بتغيير تركيب محلول الإزاحة المنظم . ويوضح شكل (6.8) عملية إزاحة لأيزوزيمى ألفا جلاكتوزيداز ***a-galactosidase*** على عمود تبادل أيونى معبأ بالكربوكسى ميثيل سليلوز .



شكل (6.8): الإزاحة لأيزوزيمين من الـ β-جلاكتوزيدان على عمود تبادل أيونى من الكربوكسى ميثيل سليلوز.

*** كروماتوجرافيا الإستجابة (المؤالفة) *Affinity chromatography* :**

كروماتوجرافيا الإستجابة أو المؤالفة هى أحد أنواع كروماتوجرافيا الإدمصاص ، وفيها يفصل البروتين بواسطة مادة صلبة حاملة تحتوى على مادة إرتباط تعاونى ***ligand covalently*** عبارة عن جزئ له صفات إرتباط عكسية ومتخصصة وفريدة للبروتين المراد فصله . ومن أهم أنواع مواد الإرتباط مثبطات الإنزيمات ، والمواد المتفاعلة مع الإنزيمات ***Enzyme substrate*** ومرافقات الإنزيمات ***Coenzymes*** ، الأجسام المضادة ***antibodies*** وبعض الصبغات الخاصة . ويمكن إعداد تلك المواد فى المعمل أو شراءها من متاجر الكيماويات .

ولفصل البروتينات بتلك الطريقة يمرر مخلوط البروتين الذائب فى محلول منظم خلال عمود يحتوى على مادة الإرتباط التعاونى المرتبطة بمادة صلبة حاملة لها . ونتيجة لتركيب المحلول المنظم من قوة أيونية ورقم pH ، وتركيز البروتين وكذلك درجة حرارته يرتبط البروتين مع مادة الإرتباط على سطح المادة الحاملة لها . أما البروتينات الأخرى غير ذات العلاقة والتى لا تستجيب لمادة الإرتباط فإنها تخرج من العمود ***are eluted*** دون إرتباط به . يتم بعد ذلك تفكيك إدمصاص أو إرتباط البروتين موضع الدراسة من مادة الإرتباط بالعمود بإستخدام محلول إزاحة مغاير من حيث رقم الـ pH ، درجة الحرارة أو تركيز الملح وقوته الأيونية فينفصل البروتين أو شقوق البروتينات تباعا من العمود طبقا لقوى إرتباطها .

هذا وتعتبر طريقة كروماتوجرافيا الإستجابة من الطرق ذات الكفاءة العالية فى فصل شقوق البروتينات وتعتبر ثانى أهم طريقة من طرق تنقية البروتينات . ويصل مستوى متوسط عملية التنقية التى تصل إليها بإجراء كروماتوجرافيا الإستجابة حوالى 100 ، برغم أن هناك بعض الأبحاث أشارت إلى أنه يمكن أن يصل مستوى التنقية قدر 1000 مرة. ويؤخذ فقط على هذه الطريقة أنها تستهلك وقتا طويلا فى عملية الإعداد لإجراءها لأنه يجب ضبط عديد من المتغيرات للوصول للظروف المثلى للتنقية. كما أن مواد الإرتباط أكثر تكلفة من وسائط الفصل الأخرى .

• كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى :
High performance liquid chromatography:

تعتبر كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى " ***HPLC*** " من الطرق الحديثة ، والتى يمكن إستخدامها لفصل البروتينات عن بعضها البعض . هذا وقد كان نجاح تلك الطريقة بسبب إستحداث مواد تعبئة فى أعمدة الفصل تتحمل الضغط العالى المستخدم فى هذه الطريقة ، ولها أحجام جسيمات ومسامية مناسبان .

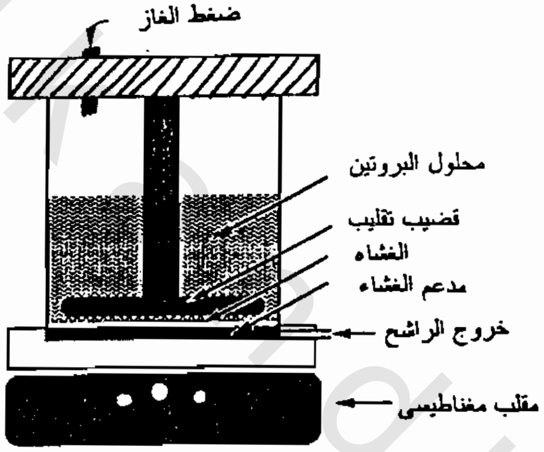
6.1.11.8. فصل البروتينات متباينة الأحجام
Separation by size

يتراوح الوزن الجزيئ للبروتينات من 10000 إلى ما يربو على المليون دالتون ، ويعنى ذلك أن حجم جزيئات البروتينات يعتبر أحد المعايير الهامة والصفات التى يجب إستغلالها فى فصل البروتينات . وبذلك يمكن فصل البروتينات المتباينة فى أنصاف أقطار جزيئاتها . وقد تتساوى البروتينات أو تقترب أوزانها الجزيئية من بعضها البعض ولكنها تختلف فى متوسط أنصاف أقطارها ولذلك يمكن فصلها بسهولة برغم تماثل أوزانها الجزيئية .

2.11.8. بعض طرق الفصل *Procedures*

1.2.11.8. الديلسة *Dialysis*: من الطرق البسيطة لفصل البروتينات وتنقيتها عندما تكون فى صورة محلول ويتم ذلك بإستخدام أغشية شبه منفذة ***semipermeable membranes*** تسمح بالمرور من خلالها ، فقط ، للجزيئات الأصغر من سعة ثقب الغشاء . ولإجراء عملية ديلسة يوضع محلول البروتين فى كيس يتكون من الغشاء شبه المنفذ حيث يقفل أحد طرفيه قفلا كاملا ويربط أو يشبك الطرف الأخر . ويوضع الكيس المحتوى على محلول البروتين فى حجم كبير من الماء أو المحلول المنظم (يبلغ من 500 – 1000 مرة قدر حجم محلول البروتين بداخل كيس الغشاء شبه المنفذ) ، ويحرك الكيس ببطئ فتنتشر الجزيئات ذات الأحجام الصغيرة (أقل من ثقوب الغشاء) من داخل الكيس إلى الخارج للماء أو المحلول المنظم بينما يدخل الماء أو المحلول المنظم لداخل الكيس . وتعتبر طريقة الديلسة من طرق الفصل البطيئة ويستغرق زمن إنجازها حوالى 12 ساعة، وعادة يتم تغيير المحلول المنظم لزيادة كفاءة الفصل . وعادة ما يخفف محلول البروتين أثناء عملية الديلسة بسبب إختلاف القوى الإسموزية بين المحلول المنظم (أو الماء) ومحلول البروتين داخل الكيس الغشائى . إلا أنه يمكن إستخدام نفس هذه الطريقة فى تركيز البروتين بتغطية كيس الديلسة المحتوى على محلول البروتين بالبولى إثيلين جليكول فيمتص الماء أو المحلول المنظم ويزداد تركيز المحلول البروتينى داخل الكيس .

2.2.11.8. الترشيح الفائق *Ultrafiltration* : تعتبر طريقة الترشيح الفائق من الطرق التى يستخدم فيها غشاء شبه منفذ لفصل المركبات على أساس تباين أحجامها ، أيضا ، إلا أنها تتميز بإستخدام الضغط أثناء الفصل للإسراع من عملية إخراج الجزيئات غير المرغوبة من خلال الغشاء شبه المنفذ . وتوجد أغشية شبه منفذة متوفرة لحجز الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية من 500 إلى 300000 . حيث تحتجز الجزيئات الأكبر من درجة نفاذية الغشاء شبه المنفذ داخل الغشاء وتصبح جزء من المكونات المحتجزة ***retentate*** بينما تمر الجزيئات الأصغر من خلال الغشاء وتصبح جزءا من الراشح (أنظر شكل 7.8) .



شكل (7.8) شكل تخطيطى لوحدة ترشيح فائق بمقلب ***Stirred ultrafiltraion***

ويستخدم الترشيح الفائق لتركيز محلول البروتين ، وإزالة الأملاح ، وتبديل المحلول المنظم ، أو لفصل شقوق البروتينات عن بعضها البعض إعتمادا على حجمها حيث تحتجز داخل الأغشية البروتينات الأكبر حجما من سعة ثقوب الغشاء وتنفذ من خلالها إلى الراشح البروتينات الأقل حجما .

وهناك أنواع عديدة من أجهزة الترشيح الفائق المتاحة تجاريا سواء المعملية أو المستخدمة فى الإنتاج وخاصة الوحدات المستخدمة فى الإنتاج المستمر للجبن . ويوضح شكل (7.8) رسما تخطيطيا لوحدة ترشيح فائق ، حيث يرشح محلول البروتين (فى خلية بها مقلب) خلال غشاء شبه منفذ بواسطة ضغط غازى فيحتجز المحلول المركز للبروتينات والذى تكون أحجام جزيئاته أكبر من ثقوب الغشاء داخل الخلية .

3.2.11.8. كروماتوجرافيا الفصل بالإقصاء الحجمى:

Size exclusion chromatography:

وتعرف أيضا تلك الطريقة بإسم كروماتوجرافيا الترشيح بالجيل ***Gel filtration*** أو كروماتوجرافيا نفاذية الجيل ***Gel permeation*** . وهى طريقة من طرق الفصل فى الأعمدة وتستخدم لفصل شقوق البروتينات إعتمادا على تباين أحجامها . حيث يعبأ العمود بمواد متبلمرة مثل الأجاروز أو الدكستران تكون أشكال جسيماتها عبارة عن كريات سبحية مسامية وعند مرور محلول بروتينات من خلال تلك المواد المتبلمرة ، تخرج الجزيئات الكبيرة من ثقوب الكريات السبحية وتتحرك بسرعة فى العمود وتزاح منه فى وقت قصير ، أما الجزيئات الصغيرة الحجم فتدخل فى ثقوب الكريات السبحية ***pores of the beads*** وتتأخر فى سرعة سريانها ومن ثم تتحرك ببطئ شديد خلال العمود . أما الجزيئات متوسطة الحجم فتتحرك بسرعة متوسطة وتخرج من العمود بعد الجزيئات الكبيرة . ويعنى ذلك أن جزيئات شقوق البروتين تزاح من العمود بترتيب تنازلى الأكبر حجما ، فالمتوسطة الحجم ، وأخيرا الأقل حجما .

هذا ويتوفر فى متاجر الكيماويات المواد المتبلمرة السبحية ذات أحجام المسام المتباينة والتى تسمح بفصل البروتينات ذات الأوزان الجزيئية والأحجام المختلفة . وتوجد قائمة بحدود الأوزان الجزيئية لكل نوع من أنواع البروتينات ولأصناف الجيل (المواد المتبلمرة) المنفذة له .

وتستخدم كروماتوجرافيا الإقصاء الحجمى ***Size exclusion chromatography*** لإزالة الأملاح ، وتغيير المحاليل المنظمة ، وفى فصل مخلوط من البروتينات إلى شقوقه كل على حدى ، وكذلك لتقديرات الأوزان الجزيئية للبروتينات . وعند إستخدام هذه الطريقة فى تقدير الأوزان الجزيئة تكون نسبة الخطأ فى حدود ± 10 %. ويتم تقدير

الوزن الجزيئى برسم منحنى للعلاقة بين حجم الإزاحة للبروتين ***elution volume*** مقابل لوغاريتم الوزن الجزيئى لمجموعة بروتينات معروفة الوزن الجزيئ ، فينتج خط مستقيم ، وعند معرفة حجم إزاحة البروتين المجهول يمكن تقدير لوغاريتم وزنه الجزيئ ومن ثم الوزن الجزيئ للبروتين المجهول .

3.11.8. فصل البروتينات بالهجرة فى المجال الكهربى (الإلكتروفوريسيس) *Separation by electrophoresis*

1.3.11.8. إلكتروفوريسيس جيل البولى أكريلاميد : *Polyacrylamide Gel Electrophoresis:*

يعرف الإلكتروفوريسيس بعملية هجرة الجزيئات المشحونة فى محلول بإستخدام مجال كهربائى يحرك تلك الجزيئات . ومن أشهر أنواع الإلكتروفوريسيس ذلك المسمى إلكتروفوريسيس المناطق ***zonal electrophoresis*** حيث يتم فصل البروتينات من مخلوطها المعقد إلى مناطق (حزم) بعد هجرتها فى محاليل منظمة من خلال بوليمر يطلق عليه جيل ، حيث تتحرك البروتينات منفصلة عن بعضها البعض لتباين سرعة حركتها فى المجال الكهربى طبقا لكثافة شحناتها . ومن أكثر أنواع الجيل شيوعا جيل البولى أكريلاميد . وتوجد أنواع أخرى من الجيل كجيل النشا أو الأجاروز قد تستخدم فى بعض طرق فصل مخلوط البروتينات إلى الشقوق المختلفة . ويتم عادة تكوين مادة الجيل بشكل أنبوبى فى أنابيب زجاجية أو على صورة شرائح يتم تشكيلها بين لوحين زجاجيين .

ويعتمد الفصل وسرعة حركة الشق البروتينى على الجيل على عاملين أساسيين ألاوهما ، إحتكاك ***friction*** البروتين أثناء سريانه على الجيل ، وكذلك على الشحنة التى يحملها جزئ البروتين . وتعبر المعادلة الآتية عن قابلية الجزيئات للحركة أو للإنتقال :

$$\text{قابلية الجزئ للحركة أو للإنتقال } \textit{mobility} = \frac{\text{مقدار الفولت x كمية صافى الشحنة على الجزئ}}{\text{مقاومة حركة الجزئ بالإحتكاك مع الجيل}}$$

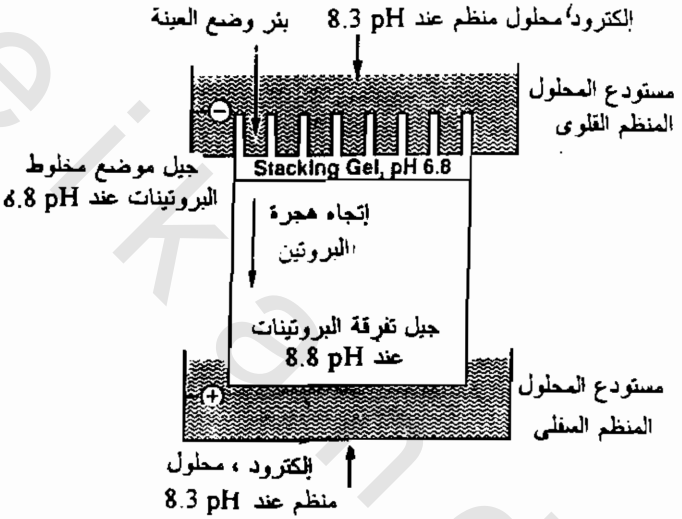
وتكون محصلة الشحنة على البروتينات إما موجبة أو سالبة ويعتمد ذلك على pH محلول البروتين وعلى نقطة التعادل الكهربى للبروتين . ويحمل البروتين شحنة موجبة إذا كان pH المحلول المذاب فيه البروتين أقل من نقطة تعادله الكهربى " PI " ، ويكون محملا بشحنة سالبة إذا كان pH المحلول أعلى من نقطة التعادل الكهربى للبروتين . وتعتمد المسافة التى يتحركها (يهاجرها) البروتين على الجيل على كثافة الشحنة ومقدار الفولت المضاف وذلك على نوع معين من الجيل . فكلما زادت **كثافة الشحنة** وزاد **مقدار الفولت** (فرق الجهد) المضاف زادت المسافة التى ستهاجرها البروتينات (تتحركها) فى المجال الكهربى. ويضاف أيضا للعاملين السابقين المؤثران على مقدار هجرة البروتينات فى المجال الكهربى عاملى حجم الجزئ وشكله . وتقل درجة سريان ***mobility*** البروتينات على الجيل كلما زاد إحتكاك البروتينات بسبب زيادة نصف قطرها ، كما يؤدى النقص فى حجم الثغور والمسافات البينية فى مادة الجيل للنقص أيضا فى درجة ذوبان البروتينات . وعلى العكس من ذلك كلما صغر حجم جزئ البروتين زادت سرعة هجرته خلال مادة الجيل .

ومن الطرق الأخرى للإلكتروفوريسيس والمستخدمة فى فصل البروتينات " **إلكتروفوريسيس الدنترة** " . وفى تلك الطريقة يستخدم مع جيل البولى أكريلاميد ، منظف أنيونى وهو كبريتات دوديسيل الصوديوم ***sodium dodecyl sulphate (SDS)*** ويتم به فصل تحت وحدات ***subunits*** البروتينات طبقا لحجمها . وعادة يحتوى المحلول المنظم المستخدم فى الفصل على الـ ***SDS*** ومادة مختزلة . فتتفكك البروتينات إلى تحت وحداتها ومن أمثلة المواد المختزلة المستخدمة فى هذه الطريقة مواد الميركابتوايثانول ، وثنائى الثيوريتول ***dithioreitol*** واللتان تختزلان الروابط ثنائية الكبريت ***disulfide bonds*** فى تحت وحدات البروتين أو ما بين تحت وحداته ***between subunits*** وتصبح البروتينات التى ترتبط بكبريتات دوديسيل الصوديوم ***SDS*** سالبة الشحنة وتفصل بالإلكتروفوريسيس إعتمادا على حجمها فقط .

2.3.11.8. الطـــــــرق *Procedures* :

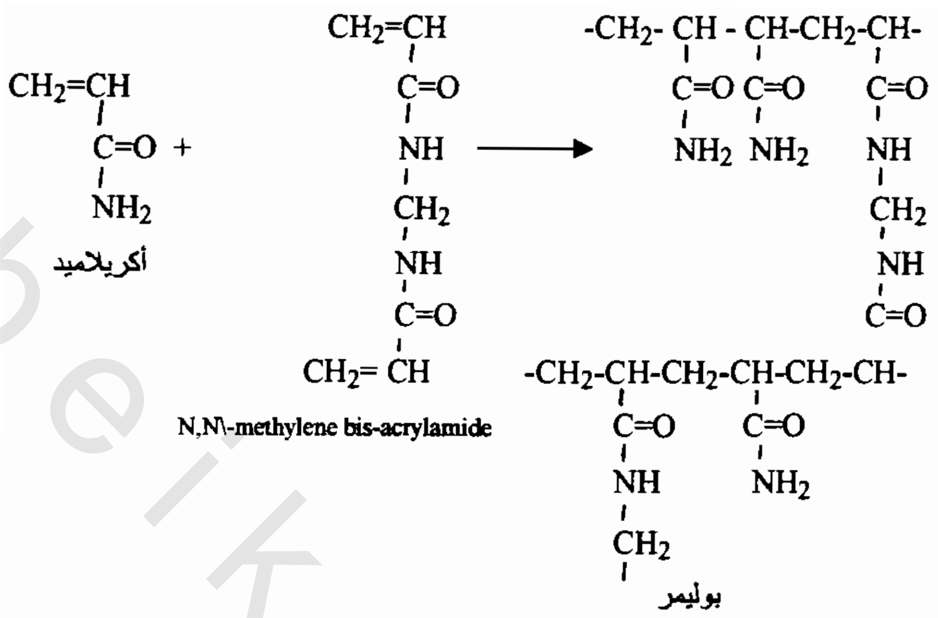
يتكون جهاز الإلكتروفوريسيس من مصدر التيار الكهربى ***power supply*** ، ومادة جيل البولى أكريلاميد ، ومستودعين للمحلول المنظم ويظهر فى شكل (8.8) وحدة تمثل

جهاز إلكتروفوريسيس يوضع فيه الجيل من نوع الشرائح ***slab gel*** ويستخدم المصدر الكهربى لإنتاج تيار ثابت بفرق جهد يمكن ضبطه بدقة . وينظم إلكترود المحلول المنظم الـــ pH للمحافظة على الشحنة المناسبة على البروتين ثم يوصل التيار الكهربى خلال جيل البولى أكريلاميد . وتشمل أنظمة المحاليل المنظمة ، محلول منظم أنيونى ألا وهو ***tis-(hydroxymethyl)amino methane*** مع الجيل الذى يتحرك عليه البروتين عند رقم pH = 8.8 ، وكذلك محلول خلات كاتيونى ***cationic acetate buffer*** عند pH = 4.3 .



شكل (8.8):شكل تخطيطى لجهاز إلكتروفوريسيس لفصل البروتين على جيل من نوع الشرائح ***slab gel***

ويتم تشكيل مادة جيل البولى أكريلاميد ببلمرة الأكريلاميد مع كمية قليلة (5 % أو أقل) من دليل الروابط المتقاطعة ***N,N-methylenebisacrylamide*** فى وجود عامل لمسى هو رباعى الميثيلين ثنائى الأمين ***tetramethylenediamine (TEMED)*** ، ومصدر للشقوق الحرة وهو مركب فوق كبريتات الأمونيوم ***ammonium persulfate*** كما هو مبين بالمعادلة الآتية (شكل 9.8) :



شكل (9.8) : تفاعل بلمرة الشقوق الحرة للبولى أكريلاميد

ويمكن إعداد الجيل فى المعمل أو شرائه جاهزا .

وتستخدم عادة مادة جيل غير مستمر لتحسين سريان البروتين خلال هذا المخلوط المعقد . وتتكون مادة هذا الجيل من جزء متكدس ***stacking gel*** له مسام كبيرة (عادة من 3 – 4 % أكريلاميد) وجيل للسريان ***resolving gel*** ذى حجم مسام أصغر . ويستخدم الجزء المتكدس من الجيل كم هو واضح من تسميته لتكديس أو لتركيز البروتين فى مناطق ضيقة جدا ***very narrow bands*** قبل دخوله إلى جيل السريان .

وعند pH = 6.8 يحدث تدرج فى الجهد بين الكلوريد (بشحنته السالبة العالية) والجليسين (ذا الشحنة السالبة المنخفضة) فى المحلول المنظم للإلكترود . والذى يعمل على حجز وتكديس البروتينات فى مناطق ضيقة جدا بين الأيونات . وتؤدى الهجرة فى جيل السريان عند قيم pH مختلفة لقطع وظهور التدرج فى فرق الجهد مما يسمح بفصل البروتينات إلى مناطق منفصلة ومحددة ***discrete bands*** .

obeikandl.com

وعادة يجرى إختيار حجم ثقوب جيل السريان طبقا للوزن الجزيئ للبروتينات ويتباين كذلك بتبديل تركيز الأكريلاميد فى المحلول . وعادة ما تفصل البروتينات على جيل سريان يحتوى على 4 – 15 % من الأكريلاميد . وتستخدم تركيزات الأكريلاميد التى تصل حتى 15 % ، غالبا ، فى فصل البروتينات التى يقل وزنها الجزيئ عن 50000 دالتون . أما تلك البروتينات التى يزيد وزنها الجزيئ عن 500000 دالتون فيتم فصلها على تركيز جيل أكريلاميد أقل من 7 % . وقد يتم إستخدام جيل متدرج فى التركيز يزداد فيه تركيز الأكريلاميد من قمة الجيل إلى قاعدته وذلك لفصل مخلوط بروتينات على مدى واسع من الأوزان الجزيئية .

ولأداء عملية الفصل ، توضع البروتينات فى المحلول المنظم عند رقم الـ pH المناسب فى قمة الجيل المتكدس ، ثم تضاف صبغة البروموفينول الزرقاء لمحلول البروتين . وتلك الصبغة عبارة عن جزيئات صغيرة تهاجر أمام البروتينات وتستخدم لتبين تقدم عملية الهجرة والفصل . وعقب إنتهاء عملية السريان فى جهاز الإلكتروفوريسيس يتم إظهار مناطق (حزم) شقوق البروتينات على الجيل بإستخدام صبغة مناسبة للبروتين كصبغة كوماسى الزرقاء اللامعة ***Coomassie brilliant blue*** أو صبغة فضة ***silver stain*** . كما يمكن أيضا إستخدام صبغات إنزيمية متخصصة أو أجسام مضادة معينة للكشف عن نوع محدد من البروتين .

وبعد ذلك يتم حساب الحركة النسبية أو الإلكتروفوريتية (R_m) لكل حزمة بروتين إنفصلت بهذا النظام كما يلى :

$$\text{الحركة النسبية } (Rm) = \frac{\text{المسافة التى قطعها البروتين المهاجر من بداية جيل السريان}}{\text{المسافة بين بداية جيل الفصل وطول مسار الصبغة}}$$

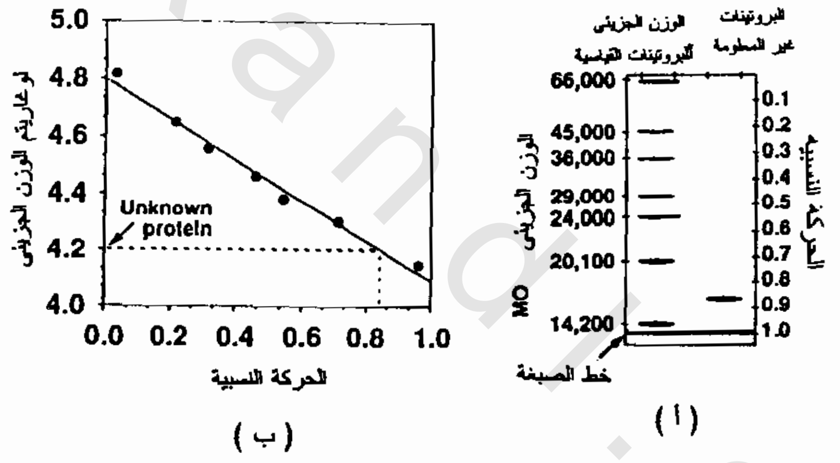
وفيما يلى بعض أهم الإعتبارات والتطبيقات أثناء فصل البروتينات بالإلكتروفوريسيس:

1- يستخدم الإلكتروفوريسيس غالبا لتقدير تركيب بروتين المواد الغذائية حيث يمكن التعرف على التباين الذى يحدث فى تركيب مركزات بروتينات الصويا أو شرش اللبن عند إنتاجهما بطرق فصل أو تركيز مختلفة .

2- يستخدم كذلك الإلكتروفوريسيس فى تقدير درجة نقاء مستخلص البروتين .

3- كما يمكن بإستخدام طريقة جيل البولى أكريلاميد مع كبريتات دوديسيل الصوديوم تقدير تركيب تحت وحدات البروتين ***protein subunits*** وكذلك الوزن الجزيئ لشقوق تلك البروتينات ، وعندئذ تكون نسبة الخطأ فى حدود 5 % .

4- يقدر الوزن الجزيئ للبروتينات بمقارنة الحركة النسبية (R_m) التى قطعتها تحت وحدة البروتين مع R_m بروتين قياسى ذا وزن جزيئى معلوم تحرك على الجيل تحت نفس الظروف التى تفصل فيها البروتينات مجهولة الوزن الجزيئ . ولإعداد المنحنى القياسى يتم توقيع لوغاريتم الوزن الجزيئ للبروتينات القياسية معلومة الوزن الجزيئ مع قيم الـ R_m المقابلة لها فينتج خط مستقيم كما فى شكل (10.8) . ثم يقدر بعد ذلك لوغاريتم الوزن الجزيئ للبروتين غير المعلوم بعد تقدير قيمة الـ R_m له من التجربة ، ومن ثم يحسب الوزن الجزيئ .



شكل (10.8): إستخدام جيل بولى الأكريلاميد مع كبريتات دوديسيل الصوديوم فى تقدير الوزن الجزيئى للبروتين

(أ) : فصل البروتينات القياسية معلومة الوزن الجزيئى ، وكذلك البروتينات غير معلومة الوزن الجزيئى

(ب) : منحنى قياسى لتقدير الوزن الجزيئى للبروتين

obeikandi.com

3.3.11.8. فصل البروتينات عند نقطة تعادلها الكهربى *Isoelectric Focusing* :

تعتبر طريقة فصل البروتينات عند نقطة تعادلها الكهربى من طرق الإلكتروفوريسيس " المعدلة " حيث تفصل البروتينات المشحونة فى مجال كهربى على مادة جيل تتدرج فيها قيم الـــ pH بإستخدام مركبات أمفوليتية ***ampholytes*** ، وعندما تصل البروتينات المتحركة على الجيل إلى الموضع الذى يتساوى فيه قيمة pH الجيل مع نقطة تعادلها الكهربى ، حينئذ ، تثبت البروتينات عند هذا الموضع ولا تتحرك قيد أنملة . ويعتبر سريان البروتينات على جيل من هذا النوع من أكفأ نظم فصل البروتينات ، ويمكن إستخدامه لفصل بروتينات ذات نقط تعادل كهربائية PI_s تختلف عن بعضها البعض بمقدار قد يقل حتى عن 0.02 وحدة pH ، فقط .

• طريـــــقة الفصل :

يتم تكوين الـــ pH المتدرج على الجيل بإستخدام المواد الأمفوليتية ***ampholytes*** والتى تكون عبارة عن بوليمرات صغيرة (كتلتها الجزيئية حوالى 5000 دالتون) تحتوى على مجموعات موجبة ومجموعات سالبة . ويتكون مخلوط الأمفوليتات من الآلاف من البوليمرات والتى تتباين قيم الـــ pK لها . وتضاف الأمفوليتات إلى الجيل قبل البلمرة .

بعد تكوين الجيل المضاف إليه الأمفوليتات وعند سريان التيار الكهربى تهاجر الأمفوليتات على الجيل لتكون على الجيل مناطق متدرجة فى قيم الـــ pH . فالأمفوليتات ذات الشحنة السالبة تهاجر ناحية الأنود بينما تهاجر الأمفوليتات موجبة الشحنة تجاه الكاثود .

وهناك مخاليط من الأمفوليتات يمكنها أن تغطى نطاق محدود من قيم الـــ pH (بحيث يكون الفرق بين الحدين الأدنى ، والأعلى من 2 – 3 وحدات pH) ، وهناك مخاليط أخرى من الأمفوليتات تغطى نطاق واسع من قيم الـــ pH_s التى تفصل عندها البروتينات يتراوح بين 3 إلى حوالى 10 وحدات pH . ويتم إختيار مخلوط الأمفوليتات المناسب منها طبقا لصفات البروتينات التى يجرى فصلها .

4.11.8. بعض التطبيقات *Applications*

* تعتبر طريقة فصل البروتينات عند نقط التعادل الكهربى ***IEF*** من الطرق الممتازة لتقدير نقاوة المستحضر البروتينى ، ويمكن التعرف على بعض البروتينات كأيزوزيم البولى فينول أكسيديز والبروتينات النباتية والحيوانية الأخرى .

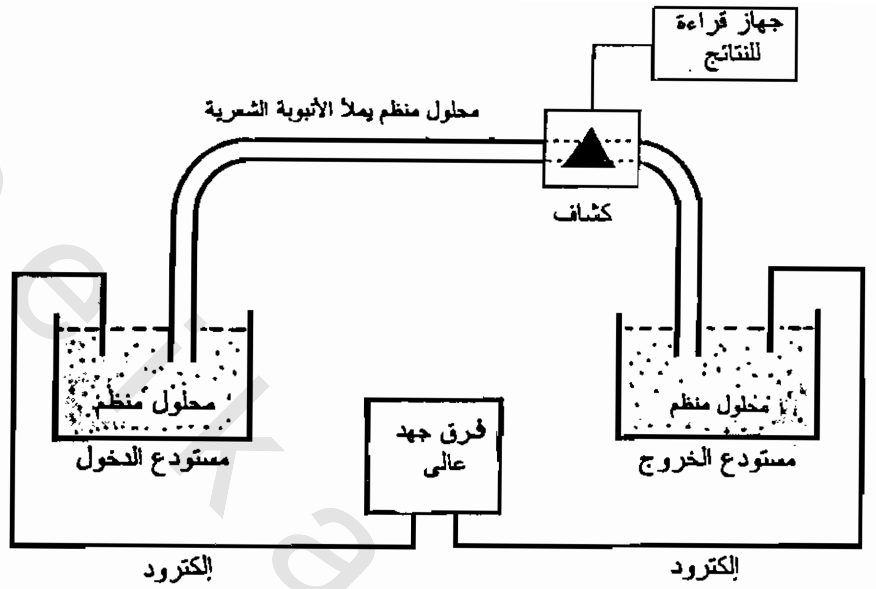
* يمكن بإستخدام طريقة فصل البروتينات بالإلكتروفوريسيس عند نقط تعادلها الكهربى للتمييز بين أنواع الأسماك .

* يمكن دمج طريقتى فصل البروتينات عند نقط تعادلها الكهربى ، وفصل البروتينات بجيل البولى أكريلاميد مع كبريتات دوديسيل الصوديوم فى فصل مخاليط البروتينات شديدة التعقيد ، ويطلق على هذه الطريقة الإلكتروفوريسيس فى إتجاهين .

5.11.8. الإلكتروفوريسيس بطريقة الأنابيب الشعرية *Capillary Electrophoresis*

يوضح شكل (11.8) رسما تخطيطيا لنظام إلكتروفوريسيس الأنابيب الشعرية حيث يتكون هذا النظام من عمود شعرى ***capillary column*** ، ومصدر للتيار ، وكشاف ، ومستودعين للمحلول المنظم . يتم إدخال العينة فى فتحة الدخول ***inlet side*** من الأنبوبة الشعرية حتى يتم إدخال الحجم المرغوب من العينة فى العمود الشعرى . وتتكون الأنابيب الشعرية من سليكا مدمجة لها قطر داخلى يتراوح بين 25 – 100 ميكروميتر . ويمكن فى هذه الطريقة من طرق فصل البروتينات إستخدام تيار كهربى عالى (من 100 إلى 500 فولت/سم) ولا يخشى من الحرارة الناشئة عن هذا التيار العالى لأن العمود الضيق يشتت الحرارة بكفاءة عالية جدا . مما يسمح بتقليص زمن الفصل ليتراوح بين 10 – 30 دقيقة.

بعد الإنتهاء من سريان البروتينات فإن شقوق البروتين المنفصلة عن بعضها البعض يتم إظهارها بإستخدام كشافات الأشعة فوق البنفسجية ***UV*** بدلا من عملية الصبغ ، كما هو الحال ، فى الطرق التقليدية للألكتروفوريسيس .



شكل (11.8): شكل تخطيطى لنظام إلكتروفوريسيس الأنابيب الشعرية

وفيما يلى بعض تطبيقات هذه الطريقة :

* يشبه إلكتروفوريسيس الأنابيب الشعرية كثيرا إلكتروفوريسيس جيل البولى أكريلاميد الطبيعى عدا أن البروتينات تفصل فى محاليل حرة داخل أنابيب شعرية مملوءة بالمحاليل المنظمة ذات الــ pH المرغوب . ولتجنب الإنتشار داخل القطر الضيق للأنابيب الشعرية لا يستخدم فيه مادة جيل .
* يحدث سريان شقوق البروتينات فى إلكتروفوريسيس الأنابيب الشعرية نتيجة التيار الكهربى والضغط الإسموزى حيث يجذب الجدار الداخلى للأنبوبة الشعرية المحمل بشحنات سالبة (لإحتوائه على مجموعات سيلانول $\bar{SiO}$) الأيونات موجبة الشحنة من

المحلول المنظم وتتكون طبقة ثنائية الأيونات ما بين جدار العمود الشعرى والمحلول المنظم . وعندما يسرى التيار الكهربى تجذب الكاتيونات المكونة لطبقة مزدوجة تجاه الكاثود وتدفع الجزيئات الأخرى (بغض النظر عن شحنتها) معها فى نفس الإتجاه . وعلى هذا الأساس يحدث فصلا للكاتيونات والأنيونات والجزيئات غير المشحونة فى إزاحة واحدة ***single run*** . ويمكن التحكم فى السريان الكهربى الإسموزى بتغيير الـ pH أو القوة الأيونية للمحلول المنظم لتغيير الشحنة على سطح الأنبوبة الشعرية وتغير من معدل هجرة البروتينات .

• يستخدم إلكتروفوريسيس فصل البروتينات إلى مناطق ***capillary zone electrophoresis*** فى فصل بروتينات اللبن ، بروتينات الصويا ، بروتينات الحبوب .

• يمكن فصل البروتينات بهذه الطريقة على أساس نقط تعادلها الكهربى فى طريقة تعرف بطريقة الأنابيب الشعرية للفصل عند نقطة التعادل الكهربى ***capillary isoelectric focusing*** وتستخدم الأمفوليتات لإحداث ح فى رقم الـ pH عبر الأنبوبة الشعرية ولا يلزم فى تلك الطريقة وجود مادة جيلية .

12.8. أســـــئلة

1- ما هى أهم العوامل التى تحدد إختيار الطريقة المناسبة لتقدير البروتين ؟

2- تتكون طريقة كلداهل لتقدير البروتين من ثلاث خطوات رئيسية . وضح هذه الخطوات بترتيب إجراءها

3- لماذا يختلف معامل تحويل النيتروجين إلى بروتين فى الأغذية المختلفة ؟ ، ثم وضح كيفية حساب المعامل 6.25 ؟

4- إشرح الأساس العلمى لطريقة نسلر لتقدير البروتين . ثم بين أهم مميزاتها وكذلك عيوبها .

5- وضح الأساس العلمى للطرق التالية لتقدير البروتين :

• طريقة كلداهل • طريقة البيوريت • طريقة لورى

• طريقة التنهيدرين • طريقة دوماس ***Dumas***

• إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية على طول موجى 280 نانوميتر

6- عند إستخدام طريقة الصبغ بصبغة أنيونية لتقدير البروتين ، فهل يكون الإمتصاص أعلى أو أقل عندما يكون مستوى البروتين فى العينة مرتفع . وضح إجابتك .

7- علل لما يأتى :

1.7. يمكن تقدير الأحماض الأمينية التى تتأثر بالتحليل الحامضى عن طريق منحنيات خاصة .

2.7. إضافة مركب ***3-(2-aminoethyl)-indole*** لمخلوط تحليل الأحماض الأمينية عند تقدير التربتوفان .

3.7. عند تقدير مشتقات الأحماض الأمينية فى جزيئ البروتين يفضل إستخدام التحليل المائى الإنزيمى .

4.7. ضرورة تغيير الـ pH ، القوة الأيونية للمحلول المنظم المستخدم فى فصل الأحماض الأمينية على أعمدة التبادل الأيونى.

5.7. إختلاف الأحماض الأمينية المتعادلة فى معدل خروجها من عمود الفصل بالتبادل الأيونى.

6.7. يؤدى تفاعل النهيدرين مع الأحماض الأمينية ليكون لون أزرق – قرنفلى بينما يؤدى تفاعل النهيدرين مع البرولين لتكوين لون أصفر.

8- وضح الأساس العلمى للطرق التالية لفصل البروتين :

* الديلسة ***dialysis*** * ضبط رقم الـ pH إلى نقطة التعادل الكهربى للبروتين
* إضافة فوسفات الأمونيوم * التسخين لدرجة حرارة مرتفعة * إضافة الإيثانول
* الترشيح الفائق * كروماتوجرافيا الإستجابة ***affinity chromatography***
* كروماتوجرافيا الإقصاء الحجمى .

9- قارن بين طريقتى ***SDS-PAGE*** ، ***Isoelectric focusing*** لفصل البروتينات.

10- وضح لماذا يختلف إلكتروفوريسيس الأنابيب الشعرية عن الـ ***SDS-PAGE*** ؟

11- إشرح بإيجاز كيف يمكن تقدير الأحماض الأمينية فى جليادين القمح ؟

obeikandi.com

مســــــائل :

عند تحليل البروتين فى أحد أنواع البقوليات تم الحصول على النتائج التالية :

- **المحتوى الرطوبى = 8.0 %**
- **وزن العينة الأولى = 1.015 جم**
- **وزن العينة الثانية = 1.025 جم**

وكانت عيارية حامض الهيدروكلوريك المستخدم للمعايرة = 0.1142 ع ،

حجم حامض الهيدروكلوريك المستخدم فى العينة الأولى = 22.0 مل ،

حجم حامض الهيدروكلوريك المستخدم فى العينة الثانية = 22.5 مل ،

حجم حامض الهيدروكلوريك المستخدم فى البلانك = 0.2 مل

إحسب محتوى هذا البقول من البروتين الخام على أساس الوزن الرطب ، الوزن الجاف بفرض أن بروتين هذا النوع من البقوليات يحتوى على 17.5 % نيتروجين.

(الحل : محتوى البروتين 19.8 % على أساس الوزن الرطب ، 21.4 على أساس الوزن الجاف).

obeikandl.com

REFERENCES المراجـــــع .13.8

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

Bell, P.M. 1963. A critical syudy of method for the determination of nonprotein nitrogen. Anal. Biochem. 5 :443 – 451 .

Bonnerjea, J., Oh, S., Hoare, M. and Dunnell, P. 1986. Protein purification : The right step at the right time. Biotechnology, 4 :954 – 958.

Chang, S.K.C. 1998. Protein Analysis chapter 15 in: Food Analysis 2nd ed. S.Suzanne Nielsen. An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.

Kosikowski, R.V. 1986 .In membrane separations in Biotechnology, W.C. Mc Gregor (Ed.). pp. 201 – 254. Marcel Dekker, New York.

Moore, S., Spacckman, D.H. and Stein, W.H. 1958. Chromatography of amino acids on sulfonated polysterene resins: An improved system. Analytical Chemistry . 30 : 1185 - 1190.

O'Farrall, P.H. 1974. High resolution of two-dimensional electrophorasis of proteins . J. of Biological Chemistry 250 : 4007 – 4021 .

Pomeranz, Y. and Melon, C. 1994. Food analysis: theory and Practice. 3rd ed. Champan & Hall, New York and London.

Scopes, R.K. 1970. Characterization and study of sarcoplocsmic proteins. Ch. 22 in : Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food , Vol. 2. E.J. Briskey, R.G. Cassens and B.B. Marshal

obeikandi.com

(Eds.), pp. 471 – 492. University of Wisconsin Press, Madison, WI.

Swedberg, S. 1997. Capillary Electrophoresis: Principles and applications. Ch.9, in : Instrumental Methods in Food Analysis, J.R.J. Pare and J.M.R.Belanger (Eds.) pp. 367 – 394, Elsevier Science, New York.

US.Department of Agriculture , Agricultural Research Service, 1977. USDA Nutrient Database for Standard References, Release 11.1.

Vanrner, J.E., Bulen, W.A., Vanecko, S. and Burrel, R.C.,1953. Determination of ammonium , amide, nitrite, and nitrate nitrogen in plant extracts. Anal. Chem. 25, 1528 – 1529.

Wong, T.M., carey, ..M. and Lin, S.H.C. 1994. Rapid characterization of soy protein and hydrolysates by capillary electrophorasis. J. of Chromatography 680 :413 – 417.

البـــاب التـــاســـع

الفيتامينـــــــات

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

obeikandl.com

البـــــاب التاســــــع

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 كيميائية مختلفة . ويوضح جدول (1.9) قائمة بأهم هذه الفيتامينات وطرق تسميتها.

جـــــدول (1.9) : أهـــم الفيتاميـــــنات وطـــــــرق تسميتها

التسمـــــــــــــيـة		
بالحروف الهجائية	**الكيمـــــيائية (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***

obeikandi.com

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 النفاذية 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 .

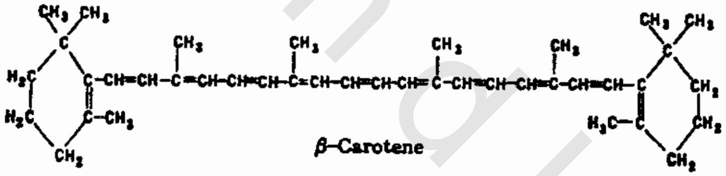
4.3.9. إستخلاص النياسين : يستخلص النياسين بالمعاملة الحرارية (فى الأوتوكلاف) فى وسط حامضى (فى منتجات غيرالحبوب) أو بالقلوى (فى منتجات الحبوب) .

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 :

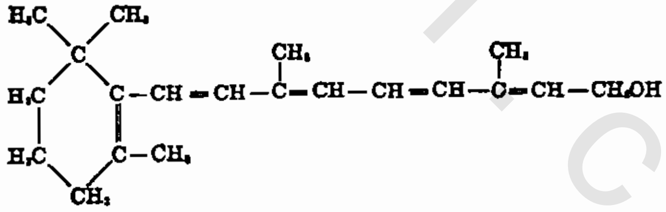
1.4.9. تقدير الفيتامينات الذائبة فى الدهن *Fat – soluble vitamins* :

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 الـــ ***HPLC*** .

obeikandi.com

* **حساب النتائج :**

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

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

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

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 :

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

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 .

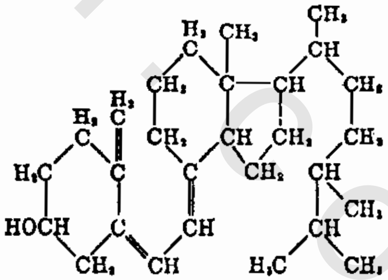
د- طريقة إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية *Ultraviolet absorption* :

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*** .

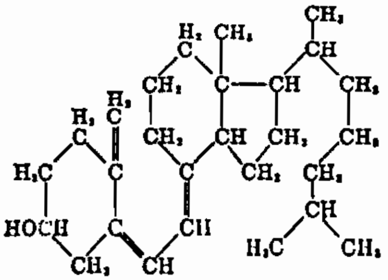
- زن 1 جم من العينة وضعها فى دورق معيارى سعة 100 مل .
- أذب العينة فى كحول أيزوبروبايل ، وأكمل الحجم حتى العلامة بالكحول.
- خفف التركيز بحيث يتراوح تركيز الفيتامين فى المحلول بين 5 – 15 وحدة/مل .
- إقرأ إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية على طول موجى 328 نانوميتربعد ضبط الجهاز بالبلانك .
- إحسب تركيز الفيتامين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

2.1.4.9. فيتامين " د " (المضاد للكساح) *Vitamin " D " (Antirachitic)* : تشتق مجموعة فيتامين " د " (د2 ، د3) 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 " د2 " ***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 (د3 ***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 د2 ، د3 .



D2



D3

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*) .

obeikandi.com

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 :

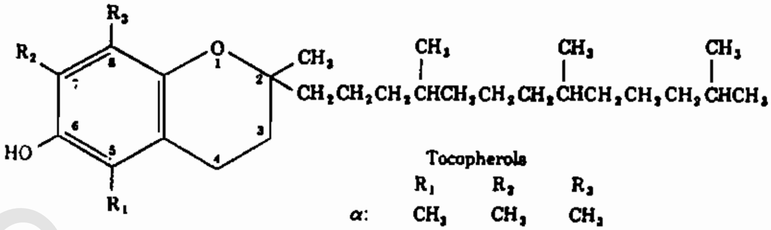
ج- الطريقة الرسمية *AOAC* رقم 975.42 لتقدير فيتامين " د " (D) :

- 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 S_bCl_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 .

obeikandl.com



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 الخس 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-ά 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-ά 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 نانوميتر . ثم قدر محتوى العينة من الفيتامين بواسطة المنحنيات القياسية للفيتامين النقى .

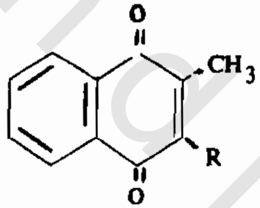
ب- تقدير فيتامين هـ (*E*) *بإستخدام كروماتوجرافيا* السائل ذات الأداء العالى *HPLC*

وتعتمد هذه الطريقة على تصبن العينة وفصل المواد الغير قابلة للتصبن وبعد تنقية المستخلص تحقن العينة المستخلصة فى جهاز الـــ *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 ملليميكرون 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).



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

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

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 .

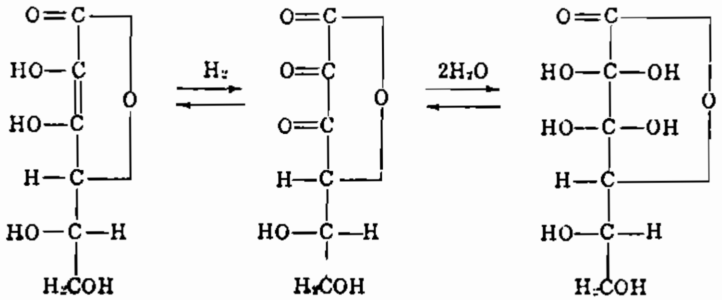
وتعتمد طريقة تقديره (*Menotti 1942*) على تفاعل مستخلص الفيتامين من العينة مع 4,2– ثنائى نيتروفينايل هيدرازين ***2,4-dinitrophynyl hydrazine*** فيتكون لون أزرق أو أزرق مخضر فى وجود أمونيا كحولية ، واللون الناتج يمكن قياسه ومقارنته مع المنحنيات القياسية للفيتامين النقى .

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 الـــ ***L-glucose*** لذا يطلق عليه إسم لاكتون ثنائى–كيتو–جلوكونيك كما هو موضح فيما يلى :



Vitamin C (ascorbic acid) — Dehydroascorbic acid (ketone structure) — Dehydroascorbic acid (hydrate structure)

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 :

obeikandl.com

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 بالمليجرام 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

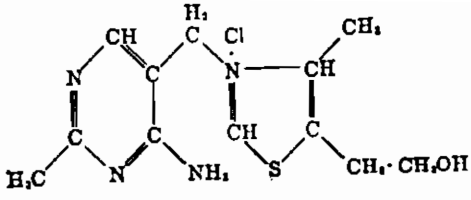
ويمكن حساب قوة الصبغة كما يلى :

* حضر محلول قياسي 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.

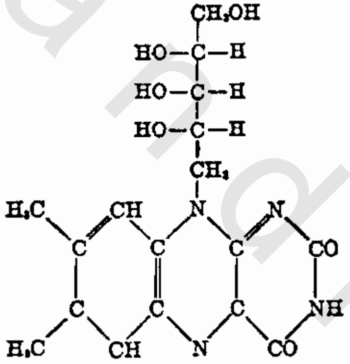
ب- طريقة الدايازو ***Diazo method*** : تعتمد هذه الطريقة (***Prebluda and McCollum, 1936***) على تكوين مركب غير ذائب ناتج من تكثيف فيتامين B_1 ومركب الـ ***diazotized*** (الذى يتكون من تفاعل الـ ***p-aminoacetanilide***

obeikandi.com

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 ب$_2$ (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

obeikandi.com

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 إسترات . 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 في 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 ***A , D , E*** 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

obeikandi.com

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 الـــ ***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 الـــ ***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

مكتبة

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

obeikandl.com

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 الـــ ***HPLC*** .

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

عند تقدير الفيتامينات الذائبة فى الماء بواسط الـــ ***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 الـــ ***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 الـــ ***HPLC*** المزود بعمود فصل من نوع الـــ ***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. أســـــــئلة

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 هـ (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 (6،2- داى كلوروفينول إندوفينول) .
- فيتامين هـ (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

REFERENCES المراجـــع .7.9

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.

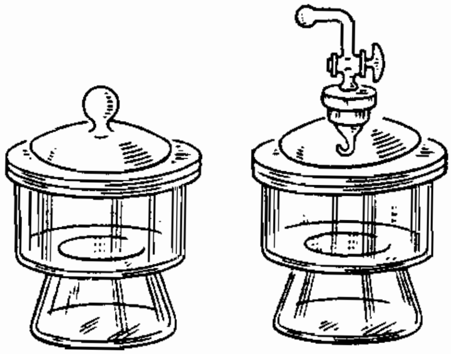
Sobel and Werlin .1947. Anal., Chem. 19 : 107.

obeikandl.com

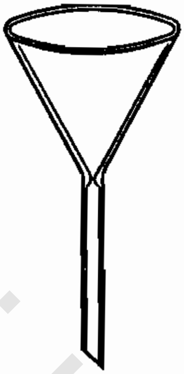
الملحقـــــــــات

* بعض الزجاجيات المستخدكم فى المعامل
* جدول الأوزان الذرية لبعض العناصر
* تحضير بعض المحاليل المستخدمة فى التحليل
* تحضير بض الأدلة المستخدمة فى التحليل.

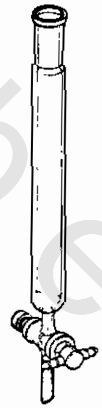
obeikandl.com



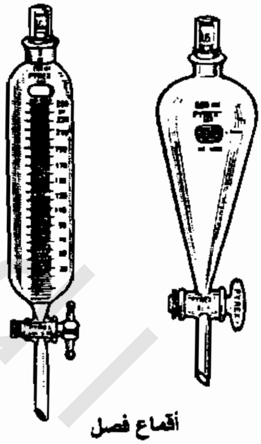
مجففات زجاجية



قمع ترشيح زجاجى



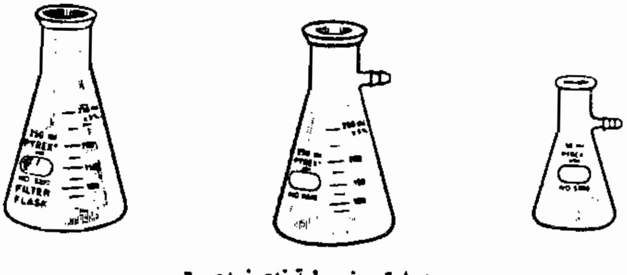
عمود كروماتوجرافى



أقماع فصل

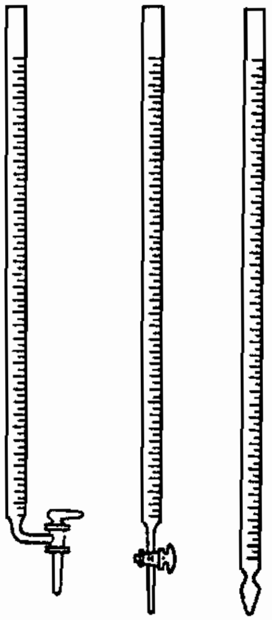
دورق مخروطى

كأس

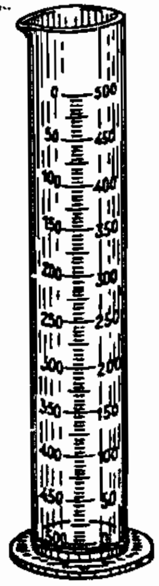


دوارق مخروطية ذات ذراع جانبى

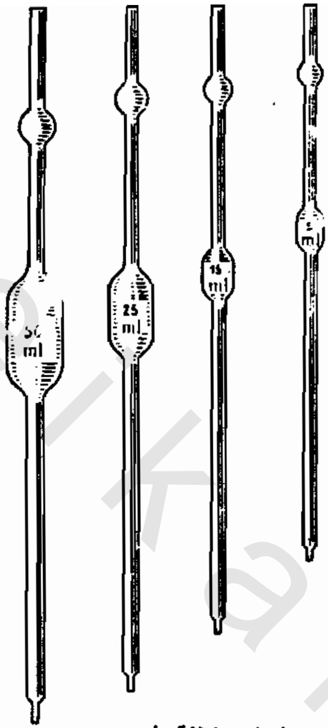
obeikandl.com



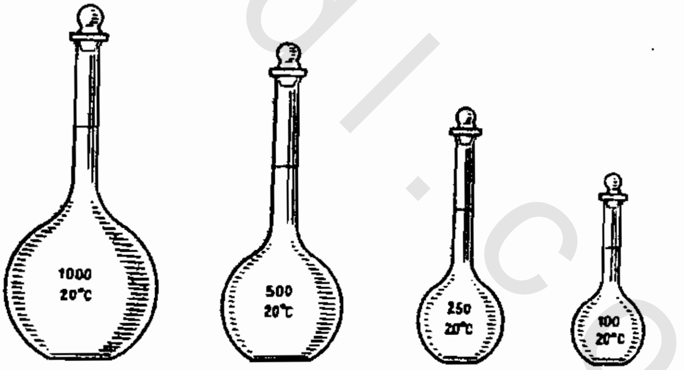
سحاحات مختلفة الأشكال



مخبار مدرج

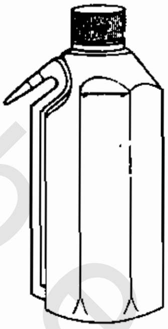


ماصات مختلفة الأحجام

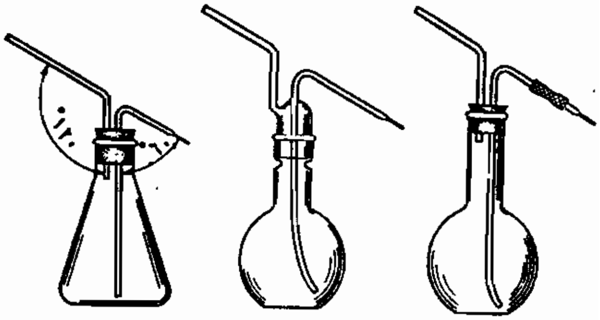


دوارق معيارية مختلفة الأحجام

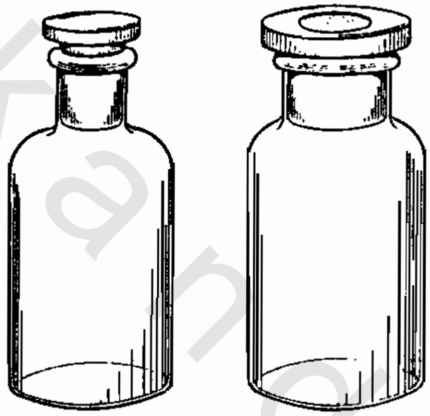
obeikandl.com



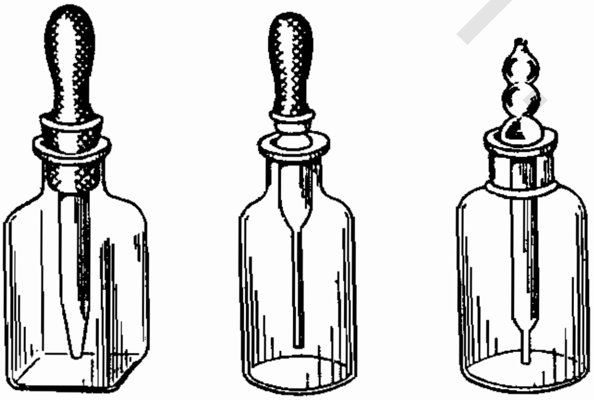
زجاجة ماء مقطر



دوارق الغسيل

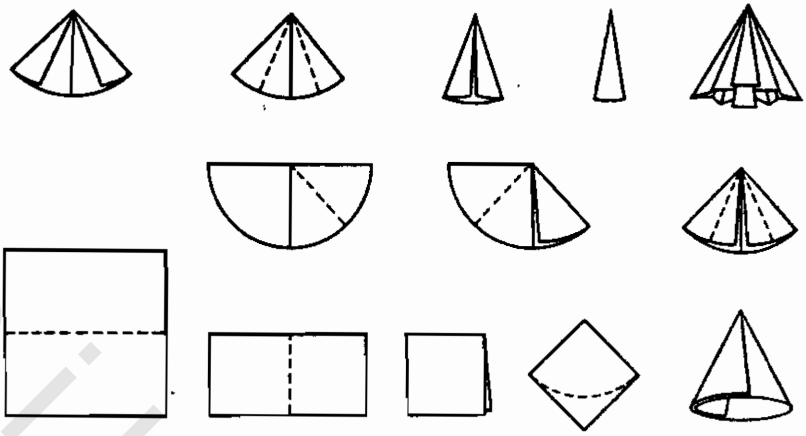


زجاجات لحفظ الكواشف

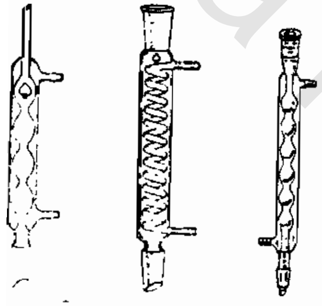


أوعية ذات قطارات لحفظ الكواشف

obeikandl.com

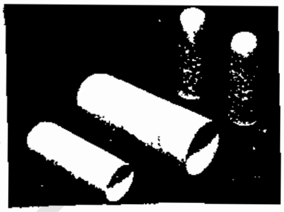


كيفية طى ورقة الترشيح



مكثفات مختلفة الأشكال

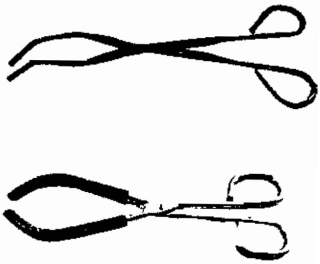
جهاز سوكسلت



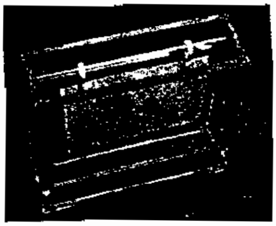
كستبانات

رشاشات مختلفة الأشكال

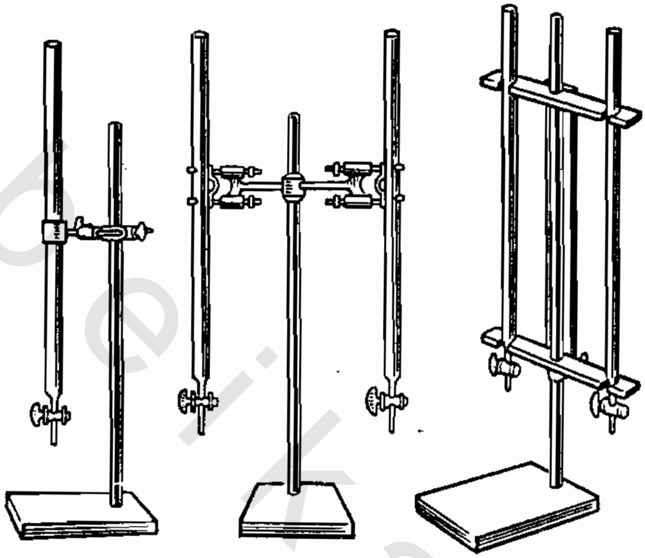
obeikandl.com



مواسك



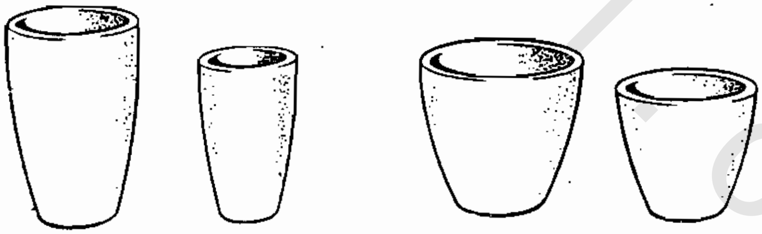
جار كروماتوجرافى



جـ ب أ

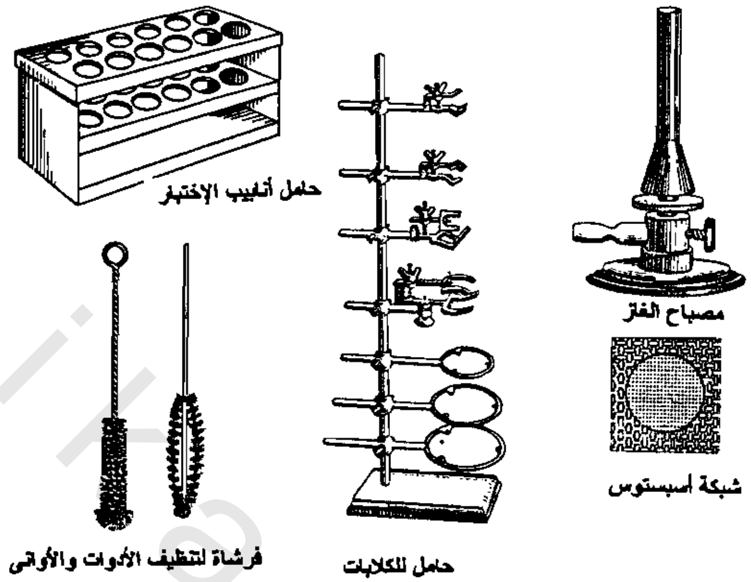
مواسك لتثبيت السحاحات

أ- ماسك خشبى ب ، ج مواسك بكلابات معدنية

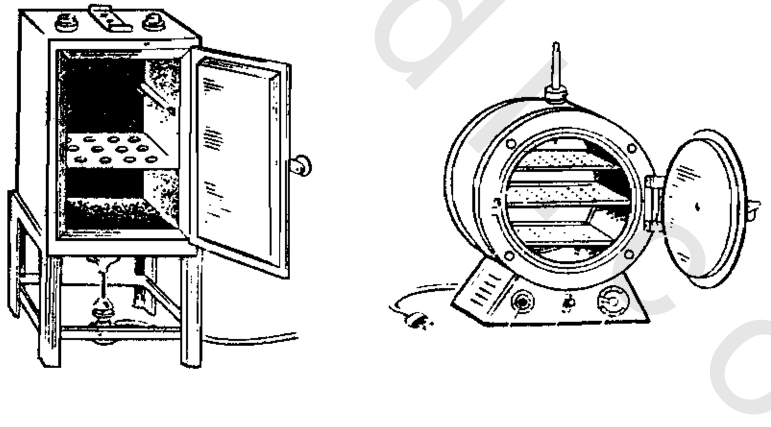


ب بواتق من البورسلين أ

ب- بواتق مرتفعة أ- بواتق منخفضة



الأدوات المخبرية العامة



أفران التجفيف

obeikandi.com

جدول (I): الأوزان الذرية لبعض العناصر الكيميائية الشائعة الإستخدام فى مجال تحليل الأغذية*.

العنصر	الرمز	الوزن الذرى	العنصر	الرمز	الوزن الذرى
أكسجين *Oxygen*	*O*	16	صوديوم *Sodium*	*Na*	22.997
أرجون *Argon*	*Ar*	39.948	فسفور *Phosphorous*	*P*	30.974
ألومنيوم *Aluminium*	*Al*	26.98	فضة *Silver*	*Ag*	107.88
أنتيمون *Antimony*	*Sb*	121.75	فلورين *Fluorine*	*F*	19.00
أيدروجين *Hydrogen*	*H*	1.008	قصدير *Tin*	*Sn*	118.70
باريوم *Barium*	*Ba*	137.36	كادميوم *Cadmium*	*Cd*	112.40
برومين *Bromine*	*Br*	79.909	كالسيوم *Calcium*	*Ca*	40.08
بريليوم *Beryllium*	*Be*	9.012	كبريت *Sulfur*	*S*	32.064
بلاتينيوم *Platinium*	*Pt*	195.09	كربون *Carbon*	*C*	12.011
بوتاسيوم *Potassium*	*K*	39.102	كروميوم *Chromium*	*Cr*	51.996
بورون *Boron*	*B*	10.811	كلورين *Chlorine*	*Cl*	35.457
تنجستين *Tungsten*	*W*	183.85	كوبالت *Cobalt*	*Co*	58.933
تيتانيوم *Titanium*	*Ti*	47.90	ليثيوم *Lithium*	*Li*	6.939
حديد *Iron*	*Fe*	55.85	مغنيسيوم *Magnesium*	*Mg*	24.312
خارصين (زنك) *Zinc*	*Zn*	65.37	منجنيز *Manganese*	*Mn*	54.938
ذهب *Gold*	*Au*	197.20	موليبدينوم *Molybdenum*	*Mo*	95.94
رصاص *Lead*	*Pb*	207.19	نتروجين *Nitrogen*	*N*	14.008
زرنيخ *Arsenic*	*As*	74.922	نحاس *Copper*	*Cu*	63.54
زئبق *Mercury*	*Hg*	200.59	هيليوم *Helium*	*He*	4.003
سليكون *Silicon*	*Si*	28.086	يود *Iodine*	*I*	126.91

*المصدر . International Union of pure and Applied Physics (1960)

International Union of pure and Applied Chemistry (1961).

obeikandl.com

تحضير بعض المحاليل الهامة فى تحليل الأغذية

• تحضير 1 لتر 0.1 عيارى من محلول هيدروكسيد الصوديوم :

- زن 4 جرام من هيدروكسيد الصوديوم النقى غير المتميع وضعها فى دورق معيارى سعة 1 لتر
- أذب تلك الوزنة من هيدروكسيد الصوديوم فى كمية من الماء المقطر قلب جيدا ، ثم أكمل الحجم حتى العلامة . وبذلك نحصل على محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1 ع تقريبا .
- يضبط بعد ذلك عيارية هذا المحلول بواسطة حمض أكساليك 0.1 (حيث توزن وزنة قدرها 6.304 جم بدقة متناهية وتذاب فى 1 لتر ماء مقطر فنحصل على محلول قياسى من حامض الأكساليك 0.1 ع) أو بواسطة فيثالات البوتاسيوم الحامضية 0.1 ع (حيث يوزن 20.4 جم من فيثالات البوتاسيوم الحامضية بدقة متناهية وتذاب فى 1 لتر ماء مقطر فنحصل على محلول قياسى من فيثالات البوتاسيوم الحامضية 0.1 ع) .

• تحضير 1 لتر 0.1 عيارى من حامض الهيدروكلوريك :

- يرد حامض الهيدروكلوريك إلى المعامل فى صورة محلول معلوم الكثافة حيث تتراوح كثافته بين 1.16 إلى 1.18 وتركيزه حوالى 37 % وتركيزه العيارى 12 ع .
- إذن كل 100 مل من هذا المحلول عند تخفيفها بالماء المقطر إلى 1 لتر تعطى محلول تركيزه 1.2 ع .
- ولتحضير 0.1 ع تقريبا من حامض الهيدروكلوريك يؤخذ حوالى من 8 إلى 10 مل من الحامض المركز ويكمل إلى 1 لتر بالماء المقطر فى دورق معيارى سعة 1 لتر .

obeikandl.com

- تضبط بعد ذلك عيارية المحلول المحضر بواسطة مواد كيميائية قياسية مثل كربونات الصوديوم وبيكربونات الصوديوم وغيرها ولكن أكثر هذه المواد إستخداما فى ضبط عيارية حامض الهيدروكلوريك هى كربونات الصوديوم .

• **تحضير 1 لتر 0.1 عيارى من محلول حامض الكبريتيك :**

- تركيز حامض الكبريتيك الذى يصل إلى معامل التحليل عادة يكون تركيزه حوالى 95 إلى 97 % وكثافته 1.835 جم/سم^3 وتركيزه العيارى 49 ع .
- إذن لتحضير 1 لتر 0.1 عيارى من حامض الكبريتيك يؤخذ حجم يتراوح بين 4 إلى 5 مل من الحامض المركز وتخفف بالماء المقطر فى دورق معيارى سعة 1 لتر .
- تضبط بعد ذلك عيارية المحلول المحضر كما سبق بواسطة كربونات الصوديوم .

• **تحضير 1 لتر 0.1 عيارى من هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولية :**

- زن 5.6 جم من هيدروكسيد البوتاسيوم ، وأذبها فى كمية قليلة من الماء المقطر فى دورق معيارى سعة 1 لتر.
- أكمل الحجم بعد ذلك حتى العلامة بواسطة كحول الإيثيل النقى (95 %) .

• **تحضير 1 لتر 0.1 عيارى من ثيوكبريتات الصوديوم :**

- أذب 24.8 جم من ثيوكبريتات الصوديوم فى كمية من الماء المقطر ، ثم إنقلها إلى دورق معيارى سعة 1 لتر .
- أكمل الحجم حتى العلامة بواسطة الماء المقطر .
- أضبط عيارية المحلول الناتج بإستخدام يودات البوتاسيوم .

• **تحضير 1 لتر 0.1 عيارى من اليود :**

- زن 12.7 جم من اليود وضعها فى دورق معيارى سعة 1 لتر .
- أضف 20 جم من يوديد البوتاسيوم فى وجود كمية من الماء المقطر مع التقليب .
- أكمل الحجم حتى العلامة بواسطة الماء المقطر ، ويحفظ المحلول الناتج فى عبوات زجاجية بنية اللون .

opeikanol.com

• **تحضير محلول فهلنج *Fehling solution* :**

عادة يستخدم هذا المحلول فى تقدير السكريات المختزلة ويتكون من محلولين فهلنج ا ، فهلنج ب وفيما يلى كيفية تحضيرهما :

- **فهلنج أ** : أذب وزن قدرها 69.28 جم من كبريتات النحاس النقية فى كمية من الماء المقطر ، ثم أكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر فى دورق معيارى سعة 1 لتر .
- **فهلنج ب**: أذب 100 جم من الصودا الكاوية فى كمية من الماء المقطر (حوالى 500 مل) ، ثم أضف عليها 346 جم طرطرات صوديوم وبوتاسيوم (ملح روشيل) وإستمر فى التقليب حتى تمام الذوبان . ثم أكمل الحجم بالماء المقطر فى دورق معيارى سعة 1 لتر .

ملحوظة : يحفظ كل محلول فى زجاجة منفردة ولا يتم الخلط إلا قبل الإستخدام مباشرة ، وعادة يكون الخلط بينهما بنسبة 1 : 1

• **تحضير صبغة 2،6 داى كلوروفينول إندوفينول *2,6-Dichlorophenolendophenol***

- زن 210 جم من بيكربونات الصوديوم فى كأس وأضف عليها 250 مل ماء مقطر ، ثم إغلى الكأس وبرد محتوياته بعد ذلك .
- أضف إلى الكأس بعد ذلك 250 ملليجرام من صبغة 2،6 داى كلوروفينول إندوفينول والتقليب بشدة حتى تمام الذوبان .
- إنقل المحتويات بعد ذلك إلى دورق معيارى سعة 1 لتر وأكمل الحجم بالماء المقطر حتى العلامة .
- رشح المحلول بعد ذلك وإحفظه فى زجاجة بنية اللون فى الثلاجة .
- تضبط قوة الصبغة بعد ذلك بواسطة محلول قياسى من فيتامين ج .

obeikandl.com

تحضير بعض الأدلة الشائعة الإستخدام فى مجال تحليل الأغذية

• **دليل الفينولفثالين** ***Phenolphthalein*** : يذاب 1 جم من الفينولفثالين فى 50 مل من كحول الإيثايل (95 %) ثم يكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر فى دورق معيارى سعة 100 مل .

• **دليل أحمر الميثايل** ***Methyl red*** : أذب 0.2 جم من أحمر الميثايل فى 50 مل من كحول الإيثايل (95 %) ثم يكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر فى دورق معيارى سعة 1 لتر .

• **دليل البروموثيمول الأزرق** ***Bromothymol blue*** : يذاب 0.1 جم من البروموثيمول الأزرق 50 مل من كحول الإيثايل (95 %) ثم يكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر فى دورق معيارى سعة 100 مل .

• **دليل الميثيلين الأزرق** ***Methylene blue*** : زن 1 جم من الميثيلين الأزرق وأذبه فى 100 مل ماء مقطر فى دورق معيارى سعة 100 مل .

• **دليل الميثيل البرتقالى** ***Methyl orange*** : أذب 0.1 جم من الميثيل البرتقالى فى 100 مل من الماء المقطر الساخن ، ويرشح بعد ذلك فى حالة ظهور أى عكارة .

• **دليل النشا** ***Starch indicator*** : ضع 1 جم من النشا القابل للذوبان ***soluble starch*** فى كمية قليلة من الماء المقطر (لعمل معلق) ثم أضفها إلى 100 مل من الماء المقطر الساخن (مع الغليان) مع التقليب لمدة 2 – 3 دقائق ، ثم يبرد المحلول ويرشح إذا لزم الأمر .

obeikandi.com