

طرائق تحليل الدهون الجزء الثاني

إعداد

م. عبير أبو شعر

١ - المقدمة

- تعد الليبيدات مجموعة متنوعة ومختلفة للغاية من المركبات المكونة من أحادي وثنائي وثلاثي غليسريدات ، بالإضافة إلى الأحماض الدهنية الحرة و الفوسفوليبيدات والستيروولات والكاروتينويدات وفيتامين A,D . إن معظم المجموعات السابقة معقدة من الناحية الكيميائية ، فالليبيد المكون من غليسريد ثلاثي فقط يمكن أن يحوي عدد ضخم من الأنواع الكيميائية المختلفة إذ تختلف الأحماض الدهنية بأطوال السلاسل وعدم الإشباع والموضع على جزيئة الغليسول .
- تخضع الليبيدات إلى العديد من التفاعلات الكيميائية خلال التصنيع والتخزين . يعد بعض هذه التفاعلات مرغوباً والبعض الآخر غير مرغوب ، لذا تتضافر الجهود للتقليل من هذه التفاعلات وتأثيراتها من خلال توصيف الدهون والزيوت مع الأخذ بعين الاعتبار تركيبها وبنيتها وقابليتها للتفاعل .



٢ - أهمية الكشف النوعي عن الليبيدات

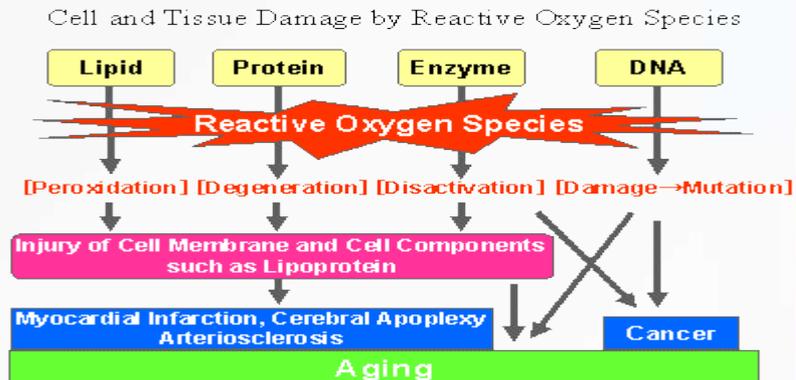
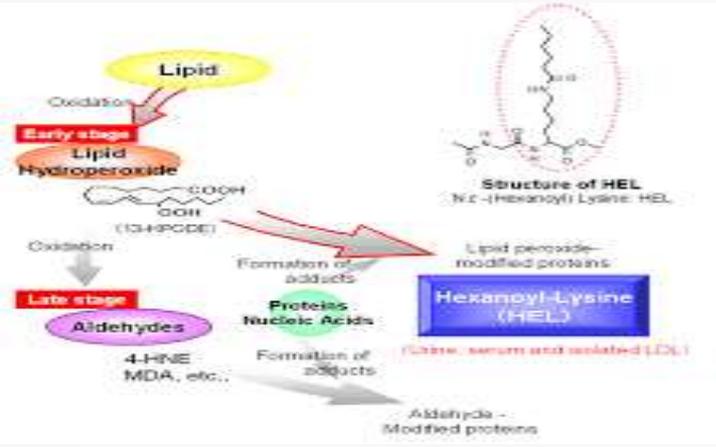


الأسباب الأكثر أهمية لتحديد نمط الليبيدات الموجودة في الأغذية :

- التشريعات القانونية : والتي غالباً ماتطالب بتحديد كميات , USFA , SFA , PUSFA بالإضافة إلى كمية الكوليسترول على بطاقة بيان المنتج .
- جودة الغذاء : تعتمد الخصائص الفيزيائية للأغذية على نمط الليبيدات الموجودة
- أكسدة الليبيدات : إن الأغذية الحاوية على تراكيز عالية من الليبيدات غير المشبعة تكون حساسة بشكل خاص للتأكسد ، والذي يقود إلى تشكل نكهات وروائح غير مرغوبة ، بالإضافة إلى مركبات سامة مثل أكاسيد الكوليسترول .
- الغش: يمكن التحري عن غش الدهون والزيوت عن طريق قياس الأنماط المتواجدة من الليبيدات ومقارنتها مع نموذج متوقع لعينة غير مغشوشة .
- التصنيع الغذائي : يعتمد تصنيع العديد من الأغذية على معرفة نمط الليبيدات الموجودة من أجل تعديل ظروف التصنيع إلى قيمها المثلى ، مثل درجات الحرارة ومعدلات التدفق .

٣ - طرائق تحليل أكسدة الليبيدات في الأغذية

- عند أكسدة المواد الدسمة تتشكل مركبات غير ثابتة لا تملك طعماً أولوناً أو رائحة تسمى البيروكسيدات تعطي بعد فترة من الزمن مركبات تسمى الهيدروبيروكسيدات ، حيث تتفكك هذه الأخيرة إلى ألدهيدات و كيتونات لها طعم ورائحة التزنخ ومن الممكن أيضاً أن تقود إلى تشكل مركبات سامة ، وهي من الأشكال الرئيسية لفساد الأغذية .
- تعد عملية أكسدة الليبيدات عملية معقدة للغاية تتضمن العديد من التفاعلات التي ينتج عنها العديد من التغيرات الكيميائية والفيزيائية في الأغذية.
- لقد طور علماء الأغذية عدداً من الطرائق لتوصيف مدى أكسدة الليبيدات في الأغذية ولتحديد حساسية ليبيد معين للأكسدة أم لا ، وفيما يلي أهم هذه الطرائق :



٣ - ١ - رقم البيروكسيد

- رقم البيروكسيد هو عدد ميلي مكافئات البيروكسيد الموجودة في ١ كغ من العينة
- يتم تقدير البيروكسيدات بواسطة إضافة يوديد البوتاسيوم إلى عينة الدهن المستخلص فتعمل البيروكسيدات على تحرير اليود الذي تتم معايرته بواسطة ثيوكبريتات الصوديوم معلومة النظامية بوجود مشعر النشا .
- يجب ألا يزيد رقم البيروكسيد للزيوت الطازجة عن ١٠ ميلي مكافئ / كغ عينة بينما يتراوح ضمن مجال ٢٠ - ٤٠ ميلي مكافئ / كغ عينة للزيوت المهدرجة .



Figure 3. Determination of the peroxide value.

• طريقة اختبار البيروكسيد:

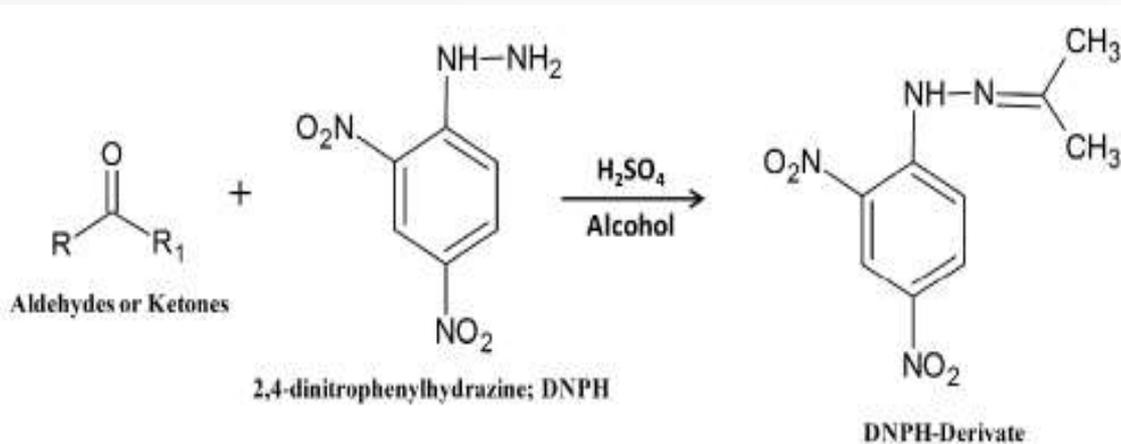
- نزن بدقة ٥ غ من المادة الدسمة في دورق ٢٥٠ مل .
- نضيف ٣٠ مل من محلول حمض الخل الثلجي والكلوروفورم ونحرك بشكل جيد حتى إذابة الدهن .
- نضيف ٠,٥ مل من يوديد البوتاسيوم المشبع مع التحريك قليلاً لمدة دقيقة .
- ندع الدورق لمدة دقيقة في مكان مظلم ثم نضيف ٣٠ مل ماء مقطر نعاير بمحلول ثيوكبريتات الصوديوم (N ٠.٠١) حتى زوال معظم اللون الأصفر ثم نضيف ٠,٥ مل محلول النشاء (١%) ونكمل المعايرة حتى زوال اللون الأزرق .

P.V (meq/100g)

$$= \frac{\text{Titre value} \times \text{Normality of acid used} \times 100}{\text{Weight of sample used 1}}$$

٣ - ٢ - تقدير التزنخ باستخدام مشعر حمض الثيوباربيتيوريك

- يعد اختبار TBA مقياساً على حدوث الأكسدة النهائية للزيوت والدهون ، ويعتمد على قياس المركبات الألهيدية الناتجة عن تكسير الهيدروبيروكسيدات والمنتجة لرائحة غير مقبولة للمستهلك ، ويعبر عنه بعدد الملي غرامات من أدهيد المالونيك / كغ عينة .
- عندما يتفاعل حمض TBA مع أحد نواتج الأكسدة النهائية (أهمها أدهيد حمض المالونيك) يشكل معقداً برتقالي اللون تزداد شدته بازدياد شدة الأكسدة في العينة المختبرة ، وتقاس امتصاصيته عند طول موجة ٥٣٠ نانوميتر .



• طريقة العمل :

- نحل عينة الدهن (٠.٥ غ) بكمية من البوتانول (٢٥ مل) ثم نأخذ ٥ مل من المحلول الناتج ونضيف لها ٥ مل من كاشف TBA ونخلط بشكل جيد ثم نضع الأنبوب ضمن حمام مائي بدرجة الغليان لمدة ٢٠ دقيقة .
- ننتظر حتى تبرد الأنابيب ثم نستخلص اللون الأصفر البرتقالي ونقيس الامتصاصية عند طول موجة ٥٣٠ نانوميتر



٤ - الفصل والتحليل بواسطة الكروماتوغرافيا

- تعد الكروماتوغرافيا من أكثر الطرائق فعالية لفصل وتحليل خصائص الليبيدات خاصة عندما يتم دمجها مع تقنيات أخرى للتعرف على التركيب الكيميائي للقمم مثل مطياف الكتلة أو مطيافية الرنين المغناطيسي .
- يتضمن التحليل الكروماتوغرافي تمرير خليط من الجزيئات لبتن فصله خلال عمود حاوي على قالب قابل للتأخير الانتقائي لتدفق الجزيئات . بعد أن يتم فصلها بواسطة العمود ، يتم تحديد تركيز كل من الجزيئات بينما تمر بمكشاف مناسب (مثال Visible UV أو التآلق أو التاين بالهـب) .

- يمكن استخدام الكروماتوغرافيا لتحديد الصورة الكاملة للجزيئات الموجودة في الليبيد أي يمكن استخدامها لحساب كميات الدهون المشبعة وغير المشبعة والكوليسترول ودرجة أكسدة الليبيد ومدى الضرر الحراري أو الإشعاعي ، كشف الغش وتحديد وجود مضادات الأكسدة .
- إن الأشكال المختلفة من الكروماتوغرافيا متواجدة لتحليل الليبيدات في الأغذية ، مثل TLC,GC ,HPLC .



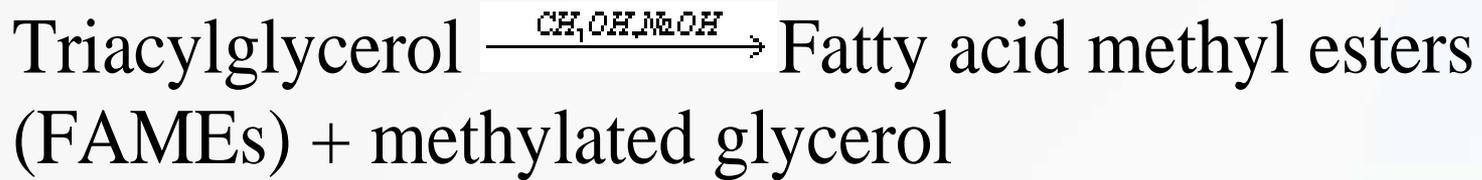
٤ - ١ - كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

- تستخدم بشكل رئيس لفصل وتحديد تركيز الأنماط المختلفة للمجموعات الليبيدية في الأغذية ، مثل الغليسريدات الأحادية والثنائية والثلاثية والكوليسترول وأكاسيد الكوليسترول والفوسفوليبيدات . يتم تغطية طبق TLC بمادة ماصة مناسبة ويوضع داخل المذيب الملائم ، ثم توضع بقعة من كمية صغيرة من عينة الدهن المراد تحليله . ينتقل المذيب لأعلى الطبق نظراً للقوى الشعرية وتفصل الأجزاء الليبيدية المختلفة على أساس ألفتها مع المادة الماصة ، وفي نهاية عملية الفصل يتم رش الطبق بصبغة لجعل البقع مرئية ، وبمقارنة المسافات التي انتقلت بها البقع بمادة قياسية معروفة التركيب يمكن التعرف على الليبيد الموجود .
- يعد هذا الإجراء غير مكلفاً ويسمح بالتحليل السريع لليبيدات في الأغذية الدسمة .

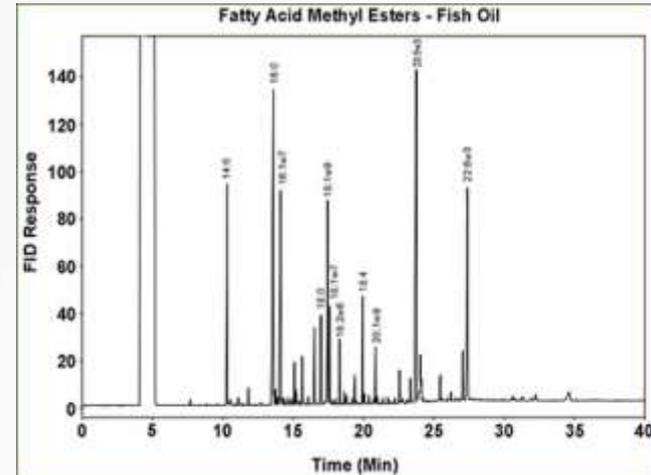
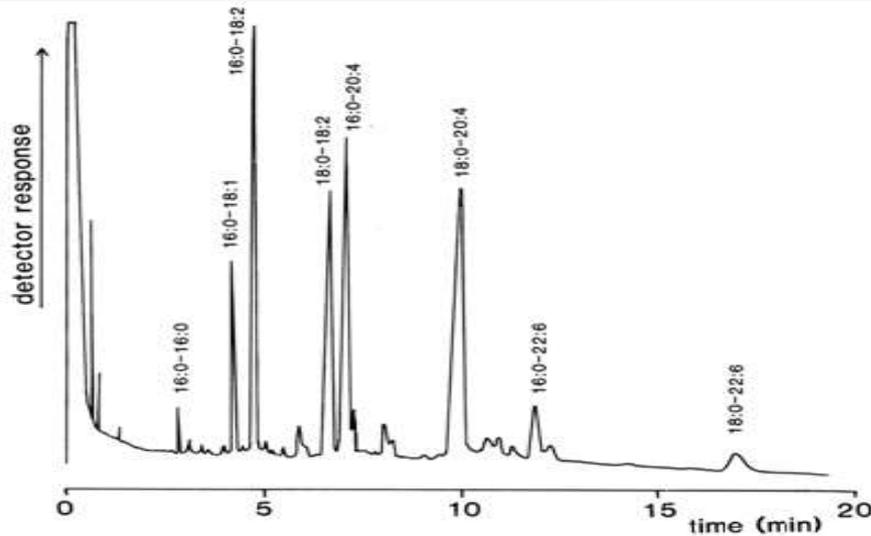


٤ - ٢ - تحليل استرات ميثيل الأحماض الدهنية بواسطة GC

تعد الغليسيريدات الثلاثية والأحماض الدهنية الحرة غير طيارة بنسبة كبيرة ولهذا يعد تحليلها بواسطة GC أمراً صعباً (لأنه يتطلب أن تكون الليبيدات قابلة للتطاير في الجهاز) لذا تجرى عملية تصبن بشكل مسبق للتحليل لزيادة تطايرها ويتم في هذه العملية تحليل الغليسيريدات الثلاثية إلى غليسرول وأحماض دهنية حرة ، ثم تجري فيما بعد عملية مثيلة:



- تخفض عملية التصبن الوزن الجزيئي وتخفف المثيلة من القطبية ، وكلاهما يزيد من تطاير الليبيدات . يتم تحليل استرات ميثيل الأحماض الدهنية الطيارة (FAMES) في GC عن طريق إذابتها في مذيب عضوي مناسب ومن ثم حقنها في حجرة الحقن حيث يتم تسخينها ثم تطايرها ثم حملها إلى عمود الفصل بواسطة الغاز الحامل .
- حالما تعبر FAMESs خلال العمود يتم فصلها إلى عدد من القمم حسب الاختلاف في أوزانها الجزيئية وقطبيتها ويتم تحديد كميتها باستخدام المكشاف الملائم .
- إن تحديد المظهر الجانبي للأحماض الدهنية الكلية يسمح بحساب نمط وتركيز الأحماض الدهنية الموجودة في عينة الدهن الأصلية .



- ويمكن حصر مبدأ الطريقة السابقة في الخطوات التالية:
- نضيف ٥ غ من الزيت المفحوص و ٥٠ مل كحول ايتيلي و ١٥ مل من البوتاس الكحولي النظامي.
- نغلي المزيج بوجود مكثف لمدة ساعة، ثم نضيف ٥٠ مل من الماء المقطر.
- يستخلص الاستر المييتيلي الناتج بالهكسان، وتغسل الخلاصة الناتجة بمحلول كحول مائي تركيزه (١٠ %) للتخلص من باقي الصابون ثم يتم التخلص من الهكسان بالتقطير .
- يجفف الاستر المييتيلي الباقي على حمام مائي لبضع ثواني، ثم تحقن ١٠ ميكروليتر من الخلاصة في حجرة الحقن، وفق الشروط :
- نوع العمود ٥٧
- تدفق الغاز الحامل ٢٥,٦ م ل / دقيقة
- درجة حرارة العمود ٢٠٠ ° م
- درجة حرارة الكاشف ٢٥٠ ° م
- درجة حرارة الحاقنة ٢٢٥ ° م
- ثم تحسب أزمان الاحتفاظ وتحديد نسب المركبات المنوية من المخطط الناتج .

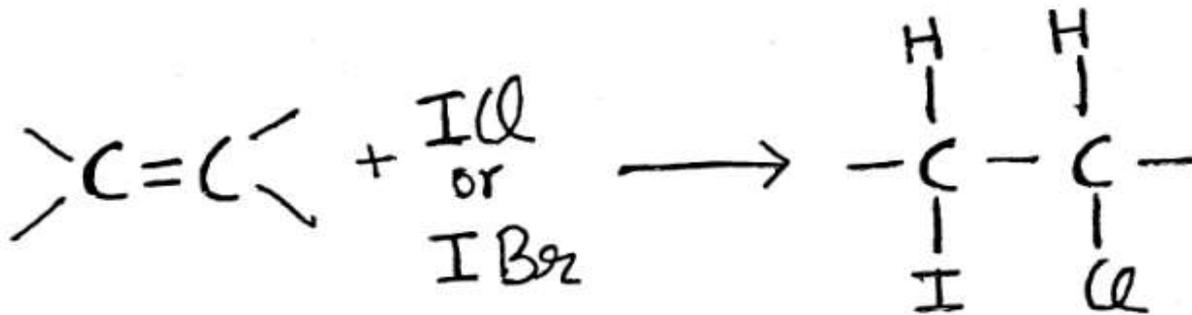
٥ - التقنيات الكيميائية

- تم تطوير عدد من الطرائق الكيميائية للتزويد بمعلومات عن نمط الليبيدات الموجودة في الدهون والزيوت المأكولة .
- تعد هذه الطرائق أكثر بساطة من الطرائق الكروماتوغرافية وهي تعطي معلومات حول الخصائص الوسطية للمكونات الليبيدية المتواجدة مثل الوزن الجزيئي الوسطي أو درجة عدم الإشباع أو كمية الأحماض الموجودة .
- لا تتطلب أجهزة مرتفعة الثمن ولذا تستخدم بشكل واسع في الصناعة والأبحاث .



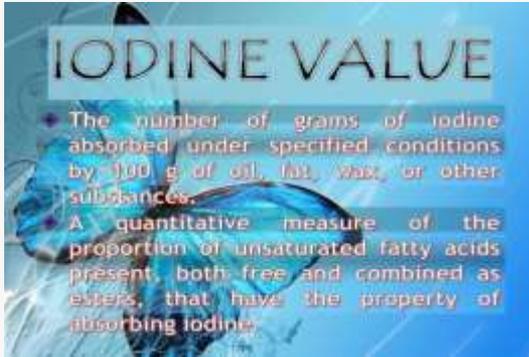
٥ - ١ - الرقم اليودي

- يعبر الرقم اليودي عن درجة عدم الإشباع في الليبيد : كلما ارتفع الرقم اليودي كان عدد الروابط المضاعفة $C=C$ أكبر ، ويستخدم لمراقبة عمليات معينة كالهدرجة والأكسدة التي تتضمن تغيرات في درجة عدم الإشباع .
- ويعرف الرقم اليودي بأنه : عدد غرامات اليود الممتصة لكل ١٠٠ غرام من الليبيد.
- تعد طريقة **Wijs** هي الأكثر استخداماً وشيوعاً حيث يتم وزن الليبيد المراد تحليله (٠,١ - ٠,٥ غ حسب الرقم اليودي المتوقع) ووضعه في مذيب عضوي ملائم (١٠ مل من الكلوروفورم) نضيف ٢٥ مل من محلول **Wijs** الحاوي على كمية زائدة معلومة من كلوريد اليود (يجب أن تكون كمية اليود ٥٠ - ٦٠ % بمايزيد عن تلك التي تمتصها الدهون) فيتفاعل جزء من كلوريد اليود مع الروابط المضاعفة غير المشبعة



- ويتم تحديد الكمية المتفاعلة بحساب كمية كلور اليود المتبقية بعد انتهاء عملية التفاعل بإضافة كمية معلومة من يوديد البوتاسيوم (٢٠ مل) إلى المحلول لتحرير اليود ومن ثم معايرتها مع محلول من ثيوسلفات الصوديوم بوجود النشاء (١ - ٢ مل) كمشعر لتحديد تركيز اليود المتحرر ويشكل النشاء لوناً أزرقاً غامقاً عند إضافته في البداية لتشكيله معقد مع اليود ولكن حالما تتحول جميع جزيئات I_2 إلى I^- يصبح عديم اللون وبالتالي يدل على انتهاء عملية المعايرة بثيوسلفات الصوديوم .

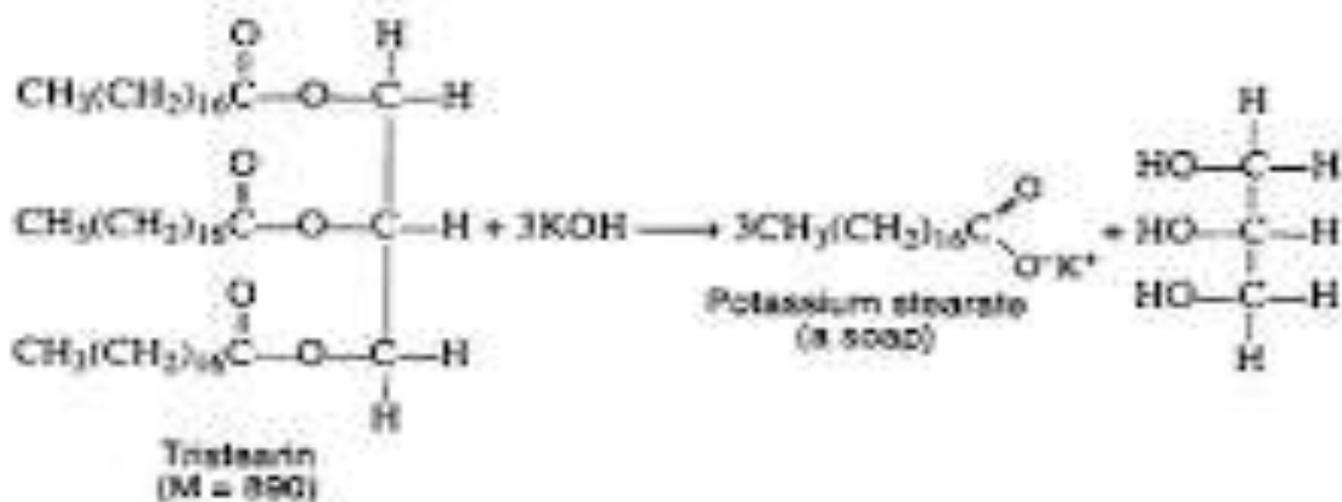
$$\text{Iodine value} = \frac{12.692 (T_B - T_S) \times N}{\text{Weight of the sample oil}}$$



Saponification Value & its Significance

- إن عملية التصبن هي هدم الدهن المتعادل إلى غليسرول وأحماض دهنية عن طريق المعاملة بقلوي ويستخدم لقياس الوزن الجزيئي الوسطي للغليسيريدات الثلاثية في العينة .
- كلما كان رقم التصبن أصغر كان الوزن الجزيئي الوسطي للغليسيريدات الثلاثية الموجودة أكبر .
- يعرف رقم التصبن بأنه عدد ميلغرامات ماءات البوتاسيوم اللازمة لتصبن ١ غ من الدهن .
- يتم استخلاص الدهن في البداية وبعد فلتلته بورق ترشيح نقوم بوزن ٥ غ ومن ثم إذابته في ٥٠ مل من ماءات البوتاسيوم الكحولية (كمية زائدة)
- نقوم بوصل الدورق مع مكثف ونغلي الدورق على سخان أوفي حمام مائي حتى تصبح العينة صافية ومتجانسة (تتطلب ٣٠ - ٦٠ دقيقة)

- بعد أن تبرد العينة يتم تقدير ماءات البوتاسيوم غير المتفاعلة بإضافة مشعر (امل من فينول الفثالين) ومعايرة العينة بحمض كلور الماء (N ٠,٥) حتى ظهور اللون الوردي .
- يتم حساب رقم التصبن من معرفة وزن العينة وكمية KOH التي تفاعلت .



$$\text{Saponification no.} = \left(\frac{3 \text{ moles KOH}}{\text{mole lipid}} \right) \left(\frac{(56 \text{ g mole}^{-1} \text{ KOH})(1000 \text{ mg g}^{-1})}{\text{g mole}^{-1} \text{ lipid}} \right)$$

$$\text{Saponification no. of tristearin} = \frac{168,000 \text{ mg KOH per mole lipid}}{890 \text{ g lipid per mole lipid}} = 189 \text{ mg KOH per g lipid}$$

٥ - ٤ - الرقم الحمضي أوقيمة الأحماض الدهنية الحرة

- الرقم الحمضي هو عدد ميلي غرامات ماءات البوتاسيوم الكحولية (N٠.٠١) اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الحرة في ١ غ من عينة الزيت أو الدهن
- يعد مقياساً جيداً لتهدم الغليسيريدات الثلاثية إلى أحماض دهنية حرة لها تأثير سلبي على جودة العديد من الأغذية .
- يقدر الرقم الحمضي بإذابة الدهن (٥ غ) في محلول الايثانول (١٠٠ مل)
- نضيف (٢ مل) من مشعر فينول فتالئين ونرج لإذابة المزيج بشكل كامل ومن ثم نعاير بماءات البوتاسيوم (N ٠,١) حتى ظهور اللون الوردي .
- يمكن أن يكون تقدير الرقم الحمضي مبالغاً به إن وجدت مكونات حمضية أخرى كالأحماض الأمينية والأحماض الفوسفورية .

[Formula 1]

$$\text{Acid value} = [56.11 \text{ (g/mol)} \times \text{amount of potassium hydroxide necessary for neutralization (mol)}] / \text{medicated patch weight 100 (mg)} (1)$$

٦ - الطرائق الآلية

- يمكن استخدام العديد من الطرائق الآلية للتزويد بمعلومات حول التركيب الليبيدي وأكثر الطرائق فعالية هي مطيافية الرنين المغناطيسي النووي عن طريق قياس طيف التبدل الكيميائي . يمكن استخدام مطيافية الرنين لتقدير تركيز أنماط معينة من الليبيدات .
- يمكن استنباط معلومات غير مباشرة حول الوزن الجزيئي الوسيط ودرجة عدم الإشباع للزيوت بقياس الخصائص الفيزيائية كالكثافة وقرينة الانكسار التي تزداد بازدياد طول السلسلة وازدياد عدم الإشباع ،بينما تتناقص الكثافة بازدياد طول السلسلة وتناقص عدم الإشباع.
- تستخدم الكثافة وقرينة الانكسار لمراقبة العمليات التي تتضمن تغيراً في تركيب الزيوت مثل الهدرجة التي تخفض درجة عدم الإشباع .

٧ - توصيف الخصائص الفيزيائية لليبيدات

٧ - ١ - المحتوى من الدهن الصلب (SFC) :

- يؤثر المحتوى من الدهن الصلب في العديد من الخصائص الفيزيائية والحسية كالقابلية للمد ، الصلابة ، الشعور بالفم ، والمعاملة التصنيعية والثباتية . غالباً ما يقيس مصنعو الغذاء اختلاف SFC مع درجة الحرارة عند توصيف الليبيدات المستخدمة في أغذية معينة مثل المارجرين والزبدة .
- يعرف المحتوى من الدهن الصلب بأنه النسبة التئوية من الليبيد الكلي الذي يكون صلباً عند درجة حرارة معينة

$$SFC = 100M_{solid}/M_{total}$$

- تم تطوير العديد من الطرائق لقياس المحتوى من الدهن الصلب وتبعيته لدرجة الحرارة بالاعتماد على الخصائص الفيزيائية . إن كثافة الدهن الصلب أكبر من الزيت السائل ، وبذلك يوجد زيادة في الكثافة عندما يتبلور الدهن وانخفاض في الكثافة عندما ينصهر . عند قياس الكثافة خلال مجال من درجات الحرارة فإنه من الممكن تحديد صورة المحتوى من الدهن الصلب ودرجة الحرارة . تقاس الكثافة بعدة طرق منها قنينة الكثافة



- وفي الآونة الأخيرة حلت الطرائق الآلية المرتكزة على NMR محل القياس بالأدوات السابقة لأنها أسرع وأبسط في التنفيذ على الرغم من كون هذه المعدات أكثر تكلفة بشكل ملحوظ. في هذه التقنية يتم وضع العينة داخل المكان المخصص في الجهاز ويتم تطبيق نبض من تردد راديوي عايقها وهذا يولد إشارة NMR ويعتمد معدل اضمحلال هذه الإشارة على كون الليبيد جامداً أو سائلاً إذ تضمحل الإشارة من الدهن الصلب بشكل أسرع من الإشارة الآتية من الزيت السائل ولهذا السبب يمكن التمييز بين هذين المكونين .

NMR Spectrophotometer



٧ - ٢ - نقطة الانصهار Melting point

- يصهر الدهن ويمزج مع التحريك ويرشح .
- تغمس عدد من الأنابيب الشعرية النظيفة حتى يصعد فيها منه ما ارتفاعه (٢,٠ سم) ثم تبرد الأنابيب الشعرية باستخدام قطعة جليد إلى أن يتجمد الدهن فيها .
- توضع الأنابيب الشعرية بشكل عمودي في البيشر وتوضع في الثلج لخفض حرارتها لمدة لا تقل عن ١٦ ساعة .
- نخرج العينات ونربط ثلاث منها بالمطاط بحيث إلى ميزان الحرارة تكون نهايتها السفلية مجاورة تماماً لمستودع الزئبق ونضعها في بيشر يحتوي على ماء مفطر بحيث يغمر ميزان الحرارة قليلاً ويغمر الأنابيب الشعرية .
- يوضع البيشر على سخان كهربائي ونستمر بالتسخين بمعدل $1^{\circ}\text{C} / \text{min}$ / الدقيقة حتى يبدأ الدهن بالصعود في الأنابيب الثلاث
- تسجل القراءات ويؤخذ متوسطها على أنه درجة انصهار الدهن .

٧ - ٣ - اختبار التعكير في الزيت (الناتج عن وجود الستيارين)

- اختبار الغشاوة :
- يقصد بها درجة الحرارة التي يتشكل عندها في العينة غشاوة بسبب المرحلة الأولى من تشكل البلورات .
- يجب أن تكون العينة جافة بشكل تام قبل إجراء التجربة لذا نقوم بتسخين الزيت إلى الدرجة ١٣٠ قبل العمل
- نأخذ ٤٥ مل من الزيت في دورق حجمي ونضعه في الحمام المائي البارد ويتم تشغيل خلاط بسرعة ثابتة ليتم التجانس الحراري وعندما تصل العينة إلى حرارة أعلى ب ١٠ درجات من درجة الغشاوة المتوقعة يجب ألا يتم نزع ميزان الحرارة من العينة ويجب أن يكون مستوى الماء في الحمام المائي نفس مستوى الزيت في الدورق .
- يتم إخراج الدورق للفحص المنتظم والنظر إلى العينة ودرجة الغشاوة هي عندما يتشكل غشاوة في العينة (تصبح مغبشة)

٨ - بعض المراجع المستخدمة

AOAC (2009) Official methods and recommended practices of the AOCS, 6th edn. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL

O'Keefe SF, Pike OA (2010) Fat characterization, Ch. 14.

In: Nielsen SS (ed) Food analysis, 4th edn. Springer, New York 112

FOOD SAFETY AND STANDARDS AUTHORITY OF INDIA MINISTRY OF HEALTH AND FAMILY WELFARE. manual of analysis of foods, oils and fats GOVERNMENT OF INDIA NEW DELHI ,2015

كاخيا ، طارق إسماعيل . (٢٠٠٦) . تحاليل الزيوت والدهون وموادها الأولية والمساعدة . .

[http ; \\tarek.kakhia.org](http://tarek.kakhia.org)

Ackman, R. 1998. Remarks on official methods employing boron trifluoride in the preparation of methyl esters of the fatty acids of fish oils. Journal of the American Oil Chemists' Society 75(4): 541-545.

Aldai, N., Murray, B.E., Nájera, A.I., Troy, D.J. & Osoro, K. 2005. Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. Journal of the Science of Food and Agriculture 85(7): 1073-1083.

Backholer, K. & Peeters, A. 2012. Reduction of trans-fatty acids from food. The Journal of the American Medical Association 308(18): 1858-1859.

