

رقم الترتيب:
رقم التسلسل:

وزراء التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الشهيد حمّـه لخضر بالوادي
كلية العلوم الدقيقة



مذكرة تخرج لنيل شهادة

ماستر أكاديمي

قسم: علوم المادة

شعبة: الكيمياء

تخصص: كيمياء عضوية تحليلية

من إعداد الطالبة: آسية سعدي

بعنوان:

تقدير الكولستيرول في بعض الأطعمة و الدهون و بلازما الدم
بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC

نوقشت يوم: 2016/05/24

أعضاء لجنة المناقشة:

رئيسا	جامعة الشهيد حمّـه لخضر بالوادي	أستاذ مساعد (أ)	حوات عمار
مؤطرا	جامعة الشهيد حمّـه لخضر بالوادي	أستاذ مساعد (أ)	التجاني يحي نموسة
مناقشا	جامعة الشهيد حمّـه لخضر بالوادي	أستاذ مساعد (أ)	مصباحي محمد عادل
مناقشا	جامعة الشهيد حمّـه لخضر بالوادي	أستاذ مساعد (أ)	ربيعي عبد الكريم

الموسم الجامعي: 2016/2015

شكر و عرفان

الحمد لله عز وجل حمدا طيبا مباركا مملأ السماوات والأرض وما بينهما على توفيقه لنا في إنجاز هذا العمل المتواضع الذي يعد من الفيض ذرة راجين من المولى سبحانه التوفيق والسداد لمن طرق يوما بابا يطلب فيه علما لينير به أمته .
وأما بعد ..

عملا بقوله صلى الله عليه وسلم "من لا يشكر الناس لا يشكر الله"
أتقدم بأسمى عبارات الشكر والعرفان لأهل الفضل الذين قدموا لي يد المساعدة في إنجاز هذا العمل المتواضع، وأخص بالذكر الأستاذ المحترم التجاني يحيى نموسة الذي تفضل بالإشراف على هذه المذكرة فمئني من الثمين وتوجيهاته ونصائحه القيمة فجزاه الله عني كل خير .

كما أتقدم بجزيل الشكر للأستاذ رئيس قسم الكيمياء ولأعضاء لجنة المناقشة لتفضلهم بقبول مناقشة هذا العمل :
الأستاذ حوات عمار رئيسا والأستاذ ربيعي عبد الكريم مناقشا والأستاذ مصباحي عادل مناقشا .
وأوجه بحالص شكري وامتناني إلى الأستاذ ربيعي عبد الكريم والأستاذ محمد زيدان اللذان عملا على تحفيزي ونصحي كما منحناني الكثير من الوقت والجهد لإتمام هذا العمل .
كما لا أنسى ان أشكر الأستاذ علي طلبة مسؤول مخبر البحث والاستاذتين هادية ومريم على كل ما قدموا لنا من توصيات وتوجيهات .

إلى أبي، أمي، إخوتي، من أي أبواب الشاء سأدخل وبأي أبيات القصيد أعبر، وفي كل لمسة من عملي أرى جودكم، شكر لكم من أعماق قلبي على عطائكم الدائم .
كما لا يفوتني أن أشكر من ساعدني من قريب أو بعيد وأخص بالذكر ابنة الخالة مريم .
كما لا أنسى التوجه بالشكر الجزيل إلى زميلاتي اللاتي يشجعني لإنجاز هذا العمل .
إلى كل من قد ننسى ذكره لكن الله لا ينسى فضله .

قائمة الرموز

معامل الإعاقة	: R_f
الزمن الميت	: t_m
زمن المكوث	: t_r
حجم المكوث	: V_r
معامل السعة	: K
معامل تدفق الطور المتحرك	: F
معامل التوزيع	: D
تركيز المادة في الطور الساكن.	: C_s
تركيز المادة في الطور المتحرك.	: C_m
الطور الساكن	: ϕ_s
الطور المتحرك	: ϕ_m
عدد الطبقات النظرية	: N_{th}
درجة الفصل	: R
معامل الانتقائية	: α
عرض نصف القمة	: $\omega_{1/2}$
الطول الموجي	: λ
ميكرو لتر	: μl

قائمة الإختصاصات

حمض دهني	:AG
Lipoprotéine de basse densité	:LDL
Lipoprotéine de haute densité	:HDL
Hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA	:HMG-CoA
Diméthylallylpyrophosphate	:DMPP
Isopentényl pyrophosphate	:IPPP
Liquide Chromatography High Prefomance	:HPLC
كروماتوغرافيا الغاز	:G.C
كروماتوغرافيا الأيونات	:I.C
مائع جد حرج	:FS
الكروماتوغرافيا جد حرجة	:FSC
الكروماتوغرافيا السائلة	:L.C
الكروماتوغرافيا الغازية	:G.C
الكروماتوغرافيا الغازية الصلبة	:G.S.C
الكروماتوغرافيا السائلة الصلبة	:L.S.C
الكروماتوغرافيا الغازية السائلة	:G.L.C
الكروماتوغرافيا السائلة السائلة	:L.L.C
الكروماتوغرافيا الغازية	:CPG
كروماتوغرافيا الورق	:CP
كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة	:CCM
Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique	:HEPT
الأشعة فوق بنفسجية	:UV
Laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes	:VTRS

الفهرس

الصفحة	فهرس المحتويات
	شكر و عرفان
	قائمة الإختصارات
	قائمة الرموز
	مقدمة عامة
	مراجع المقدمة العامة
	الجزء النظري
	الفصل الأول: عموميات حول الدهون والكولستيرول
7	تمهيد
7	I. عموميات حول الدهون و الكولستيرول
7	1.1.I. الدهون
7	1.1.1.I. تعريف الدهون
7	2.1.1.I. وظائف الدهون
8	3.1.1.I. المصادر الغذائية للدهون
8	4.1.1.I. الأحماض الدهنية
8	1.4.1.1.I. تعريفها
8	2.4.1.1.I. تصنيف الأحماض الدهنية
11	3.4.1.1.I. خصائص الأحماض الدهنية
12	5.1.1.I. تصنيف الدهون
12	1.5.1.1.I. الدهون البسيطة (متعادلة)
12	1.1.5.1.1.I. الغليسيريديات Les glycérides
15	2.1.5.1.1.I. الشموع Les cérides
16	3.1.5.1.1.I. الستيريدات Les stérides
17	2.5.1.1.I. الدهون المركبة
18	1.2.5.1.1.I. غليسيروفوسفوليبيد Les glycérophospholipides
20	2.2.5.1.1.I. الدهون السفنكولية SphingoLipides
21	2.I. الكولستيرول
21	1.2.1.I. تعريف الكولستيرول
21	2.2.1.I. اكتشاف الكولستيرول
22	3.2.1.I. مصادر الكولستيرول
22	1.3.2.1.I. المصدر الأول: مصدر داخلي
22	2.3.2.1.I. المصدر الثاني: مصدر خارجي
22	4.2.1.I. التركيب الكيميائي للكولستيرول
23	5.2.1.I. تواجد الكولستيرول في الجسم
23	6.2.1.I. دور و أهمية الكوليسترول
24	7.2.1.I. أنواع الكولستيرول
24	1.7.2.1.I. ليوبيروتين منخفض الكثافة
24	2.7.2.1.I. ليوبيروتين عالي الكثافة
24	8.2.1.I. آلية اصطناع الكولستيرول عند الكائن الحي (انسان، حيوان)
25	9.2.1.I. ارتفاع تركيز الكولستيرول في الدم
26	10.2.1.I. الأسباب الرئيسية لارتفاع نسبة الكولستيرول

27	11.2.I. تخفيض تركيز الكولستيرول
28	خلاصة
30	مراجع الفصل الأول
الفصل الثاني: طرق الفصل الكروماتوغرافية	
35	تمهيد
35	1.II. عموميات حول الكروماتوغرافيا
35	1.1.II. تاريخ الكروماتوغرافيا
35	2.1.II. تعريف و مبدأ الكروماتوغرافيا
36	3.1.II. طبيعة الأطوار
36	1.3.1.II. الطور الساكن La Phase stationnaire
36	2.3.1.II. الطور المتحرك La Phase mobile
36	4.1.II. تصنيف الكروماتوغرافيا
36	5.1.II. تصنيف التقنيات الكروماتوغرافية
36	1.5.1.II. تصنيف حسب الطبيعة الفيزيائية للطورين
37	2.5.1.II. تصنيف حسب الظاهرة الكروماتوغرافية
38	3.5.1.II. تصنيف حسب الطرق المستعملة
39	6.1.II. أنواع الطرق الكروماتوغرافية
39	1.6.1.II. الكروماتوغرافيا السائلة - الصلبة LSC
39	2.6.1.II. الكروماتوغرافيا السائلة - السائلة LLC
39	3.6.1.II. الكروماتوغرافيا الغازية - الصلبة GSC
40	4.6.1.II. الكروماتوغرافيا الغازية - السائلة GLC
40	5.6.1.II. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني IEC
40	6.6.1.II. الكروماتوغرافيا المستوية Chromatographie Planaire
42	7.1.II. مزايا الطرق الكروماتوغرافية عامة على طرق الفصل الأخرى
42	8.1.II. اختيار الطريقة المناسبة لفصل مادة ما
42	2.II. الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC
43	1.2.II. دراسة نظرية للكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء
43	2.2.II. المبدأ
43	3.2.II. نظام الفصل بالمذيبات
43	1.3.2.II. الفصل بنظام مذيب ثابت Système isocratique
44	2.3.2.II. الفصل بنظام مذيبات بنسب متغيرة Système gradient
44	4.2.II. مفاهيم أساسية
44	1.4.2.II. الأطوار
44	2.4.2.II. مفهوم الزمن و الحجم
45	3.4.2.II. معامل التوزيع
46	4.4.2.II. مفهوم الفعالية
46	5.4.2.II. جودة الفصل
48	5.2.II. الظواهر الكروماتوغرافية التي تحدث خلال عملية الفصل
48	6.2.II. جهاز التحليل الكروماتوغرافي HPLC
48	1.6.2.II. مكونات جهاز التحليل الكروماتوغرافي HPLC
51	خلاصة

53	مراجع الفصل الثاني
	الجزء العملي
	الفصل الثالث: التقدير الكيفي و الكمي للكولستيرول
59	1.III.دراسة الظروف المؤثرة على تقدير الكولستيرول
59	2.III.التقدير الكيفي
60	1.2.III. التجارب اللونية
60	1.1.2.III.تفاعل ليبيرمان – بيرخارد
61	2.1.2.III.تفاعل سالكوسكي
61	2.2.III.استخدام جهاز Spectrophotometer UV-visible
61	1.2.2.III. تحضير عينات الدراسة
61	1- عينة المحلول القياسي
62	2- عينتي الزبدة
62	أ-الزبدة التجارية
63	ب-زبدة الماعز
63	3- الزيت التجاري
64	4- عينة اللحم
64	3.2.2.III. ملخص النتائج المتحصل عليها
65	3.III. التقدير الكمي
65	1.3.III. مكونات جهاز الفصل الكروماتوغرافي السائل ذو الكفاءة العالية HPLC
66	2.3.III. طريقة عمل جهاز HPLC
64	3.3.III. تحضير عينات الدراسة
66	1.3.3.III. عينة المحلول القياسي للكولستيرول
67	1.1.3.3.III. النتائج و المناقشة
68	رسم المنحنى القياسي للكولستيرول النقي
68	2.3.3.III. تطبيق الطريقة المقترحة على عينات الدراسة
69	1.2.3.3.III. تحضير العينات
69	1. عينتي الزبدة
69	2. عينة الزيت التجاري
69	3. عينة اللحم
70	4. بلازما الدم
70	1. الزبدة التجارية
71	2. زبدة الماعز
71	3. عينة الزيت التجاري
72	4. عينة اللحم
72	5. عينة بلازما الدم
73	5.III. حساب تركيز و كتلة الكولستيرول في عينات الدراسة
73	1.5.III. حساب التركيز
73	1. زيت تجاري
73	2. الزبدة التجارية
73	3. زبدة الماعز
73	4. لحم الخروف

73	5.بلازما الدم
74	III.2.5. حساب الكتلة
74	1.زبدة تجارية
74	2.زبدة الماعز
75	3.زيت تجاري
75	4.لحم الخروف
76	مناقشة النتائج
خلاصة عامة	
ملاحق	

الصفحة	فهرس الأشكال
الفصل الأول: عموميات حول الدهون والكولستيرول	
9	الشكل (1.I): الصيغة المفصلة لحمض البالمتيك.
10	الشكل (2.I): المتماكين cis-trans للأحماض الدهنية الأحادية غير المشبعة.
10	الشكل (3.I): الصيغة الطوبولوجية لحمض الأوليك.
11	الشكل (4.I): المتماكين cis، trans لحمض الأوليك.
11	الشكل (5.I): حمض ايليوستياريك.
13	الشكل (6.I): بنية الغليسيرول.
13	الشكل (7.I): أحادي الغليسيريد.
13	الشكل (8.I): ثنائي الغليسيريد.
14	الشكل (9.I): ثلاثي الغليسيريد.
14	الشكل (10.I): ثلاثي غليسيريد مختلط.
15	الشكل (11.I): ثلاثي غليسيريد متشابه.
15	الشكل (12.I): التفاعل العام للشموع.
16	الشكل (13.I): الصيغة نصف مفصلة لـ بالميتات السيتيل.
17	الشكل (14.I): التركيب الكيميائي العام للستيرولات.
17	الشكل (15.I): نواة Cyclo pentano perhydro phantréne.
17	الشكل (16.I): الصيغة المفصلة لـ Palmitate de cholestéryle.
18	الشكل (17.I): صيغة حمض Les glycéro phospholipides.
19	الشكل (18.I): صيغة Phosphatidyl-Sérine.
19	الشكل (19.I): صيغة Phosphatidyléthanolamines.
19	الشكل (20.I): صيغة Phosphatidylcholines.
20	الشكل (21.I): صيغة Phosphatidylinositols.
20	الشكل (22.I): كحول الـ Sphingosine.
20	الشكل (23.I): حمض Lignocérique.
21	الشكل (24.I): صيغة Les Sphingomyélines.
22	الشكل (25.I): الصيغة الكيميائية المفصلة للكولستيرول ($C_{27}H_{46}O=386.67 \text{ g/mol}$).
23	الشكل (26.I): جزيء الفينانثرين.
25	الشكل (27.I): آلية اصطناع الكولستيرول.
26	الشكل (28.I): شكل ترسب الكولستيرول على جدران الخلايا.
الفصل الثاني: طرق الفصل الكروماتوغرافية	
37	الشكل (1.II): يوضح تصنيف مختلف التقنيات الكروماتوغرافية.
41	الشكل (2.II): يوضح التقنية الصاعدة.
44	الشكل (3.II): يوضح عمود الفصل.
45	الشكل (4.II): كروماتوغرام يبين الزمن و عرض القمة.
47	الشكل (5.II): كروماتوغرام ذو قمتين.
48	الشكل (6.II): رسم تخطيطي لجهاز التحليل الكروماتوغرافي بالسائل HPLC.
الفصل الثالث: التقدير الكيفي والكمي للكولستيرول	
60	الشكل (1.III): يوضح تفاعل ليبرمان-بيرخارد لعينة الزبدة التجارية.

61	الشكل (2.III): توضح تفاعل سالكوسكي لعينة زبدة الماعز.
62	الشكل (3.III): قارورة الكولستيرول القياسي.
63	الشكل (4.III): زبدة الماعز
64	الشكل (5.III): لحم الخروف
67	الشكل (6.III): الكروماتوغرام الناتج عن حقن العينات القياسية بتركيز مختلفة.
68	الشكل (7.III): المنحنى القياسي عند أفضل الظروف.
69	الشكل (8.III): مستخلص لحم الخروف.
70	الشكل (9.III): كروماتوغرام عينة الزبدة التجارية.
71	الشكل (10.III): كروماتوغرام عينة زبدة الماعز.
71	الشكل (11.III): كروماتوغرام عينة الزيت التجاري.
72	الشكل (12.III): كروماتوغرام عينة اللحم.
72	الشكل (13.III): كروماتوغرام عينة بلازما الدم.
77	الشكل (14.III): مخطط يوضح ملخص نتائج العينات.

الصفحة	فهرس الجداول
	الفصل الأول: عموميات حول الدهون والكولستيرول
9	جدول (I.1): بعة و الزوجية.
	الفصل الثاني: طرق الفصل الكروماتوغرافية
4 2	جدول (1.II): فية المناسبة لفصل مادة ما
	الفصل الثالث: التقدير الكيفي و الكمي للكولستيرول
6 4	جدول (1.III): لعينات الدراسة.
6 7	جدول (2.III): محاليل القياسية.
7 6	جدول (3.III): تحصل عليها.

مقدمة عامة

مقدمة عامة

كثيرا ما نسمع بالكولستيرول و علاقته بأمراض القلب، لدرجة أن كلمة كولستيرول قد تعني للبعض مرضا خطيرا جدا. و لكن يمكن القول بأن الكولستيرول مادة غذائية ضرورية لا يمكن الاستغناء عنها، و لكنها تنقلب الى عدو قاتل عندما ترتفع نسبتها على المستوى الطبيعي في دم الانسان [1].

وقد تم اكتشاف هذه المادة الشحمية في عام 1913م من طرف العالم الروسي Anichkov، كما تواصلت البحوث والدراسات الى أن تم التوصل الى الشكل البنائي الكامل للكولستيرول عام 1932م [2].

و لأهمية هذه المادة تناولناها في دراستنا، حيث أنها تمثل أحد العناصر الرئيسية التي تقوم بالعديد من الوظائف الحيوية في جسم الإنسان بحيث أن جزيء الكولستيرول هو أساس التركيب الجزيئي لإصطناع الهرمونات الستيرويدية (هرمون الكورتيزون، هرمون الألدوستيرون، الهرمونات الجنسية) و التي تلعب دورا هاما في بناء الجسم و تنظيم الكثير من عملياته الحيوية، كما أنها تعتبر و بصفة خاصة خط دفاع شديد الأهمية للإنسان عند التعرض لأية ضغوط جسدية أو نفسية مما يعمل على حماية الإنسان من مخاطر الحياة اليومية، كما أنه يمثل المكون الرئيسي لفيتامين D و الذي يلعب دورا حيويا في نمو العظام و الأسنان لجسم الإنسان [3].

وقد اشتملت دراستنا على جزئين جزء نظري وجزء عملي، الجزء النظري يشتمل على فصلين وأما العملي يشتمل على فصل واحد، و محتواها كان كالتالي:

الفصل الأول: تطرقنا في هذا الفصل الى الدهون بصورة عامة، مصادرها، تصنيفها و مدى أهميتها في حياة الكائنات الحية، كما اشتمل أيضا بصورة خاصة على الكولستيرول و الذي هو موضوع دراستنا، حيث تم اعطاء نبذة حول اكتشافه، مصادره، تركيبه الكيميائي، دوره و أهميته، تواجدته في جسم الانسان، أنواعه، آلية اصطناعه عند الانسان، الأسباب الرئيسية لارتفاع نسبته و أخيرا الطرق المناسبة لمنع زيادته في دم الانسان.

الفصل الثاني: تطرقنا في هذا الفصل الى طرق الفصل الكروماتوغرافية و التي تم اكتشافها في عام 1906م من طرف العالم الروسي Tswett، حيث اشتمل على مبدأ طرق الفصل

Á

Á

Á

Á

ÁÁÁ

المراجع

المراجع

- [1] د. ماهر عبد اللطيف راشد، « كتاب الكولسترول المتهم البريء في تصلب الشرايين » ، دار النشر للجامعات مصر، الطبعة الأولى، أبريل 1999.
- [2] أ.د. سامي المظفر، «أساسيات الكيمياء الحياتية». دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة.
- [3] د. عبد العزيز أحمد الجعفري، «الكيمياء الحيوية» ، مجلة العلوم والتقنية، الكوليسترول ص29-32 العدد التاسع محرم 1410هـ/1989م.

الجزء النظري

الفصل الأول

عموميات حول الدهون و الكوليستيرول

تمهيد:

تنتشر الدهون في الكائنات الحية النباتية و الحيوانية بدرجات متفاوتة، و لهذه المواد أهمية كبيرة حيث تعتبر من المكونات الأساسية لجسم الإنسان اذ تدخل في تكوين الأنسجة الغشائية للخلايا، كما تستخدمها الإنسان أيضا في صناعة الصابون و مواد الطلاء و غيرها.

سنتطرق في هذا الفصل الى ماهية هذه المواد و تصنيفها كيميائيا و دورها البيولوجي، و سنفصل دراستنا حول أحد العناصر الأساسية و المتواجدة طبيعيا في جسم الإنسان و بنسبة عالية ألا و هو الكولستيرول [1].

I. عموميات حول الدهون و الكولستيرول:**1.1. الدهون:****1.1.1. تعريف الدهون:**

أطلق العالم بلور Bloor في عام 1943 مصطلح الدهون (les lipides) على الشحوم والزيوت، و هي مركبات عضوية لا قطبية غير متجانسة تحتوي على الكربون C، الهيدروجين H، الأوكسجين O و أحيانا على عناصر الفوسفور P، النيتروجين N و الكبريت S، و تمتاز بعدم ذوبانيتها في الماء بينما تذوب في المذيبات العضوية غير القطبية مثل: الأسيتون، الإيثر، الكلوروفورم و الكحول الساخن مثل الميثانول. . الخ، حيث تستخدم هذه المذيبات في استخلاص الدهون من الأنسجة المختلفة [2,3].

2.1.1. وظائف الدهون:

تلعب الدهون دورا هاما في حياة الكائنات الحية أهمها:

- ✓ تعتبر مصدرا أساسيا للطاقة حيث أن الجرام الواحد منها يمد جسم الإنسان بمقدار (9 كيلوكالوري/جم) أي تقريبا ضعف الطاقة الناتجة من جرام واحد من الكربوهيدرات أو البروتين [4].
- ✓ تمثل حوالي 20% من وزن الجسم [3].
- ✓ تدخل في تكوين جميع أغشية الخلايا في جسم الانسان حيث تنظم دخول و خروج المواد المختلفة من و الى الخلايا.
- ✓ تعمل على تزويد جسم الإنسان بالأحماض الدهنية الأساسية و الفيتامينات الذائبة في الدهون مثل الفيتامينات A،D،K،E .
- ✓ تعمل على تركيب الجزء المهم من الجهاز العصبي.
- ✓ تلعب دورا مهما في التأثير على الضغط و تصلب الشرايين.
- ✓ تعمل في بعض الأحيان كمضادات حيوية لبعض الهرمونات و تعمل كمنشطات لبعض الانزيمات.

✓ تعمل كمكونات ناقلة للألكترونات في المايوتوكندري، كما تشكل السطح الذي يكون الليبوزومات و المتركب من طبقتين دهنيتين حيث تساعد في حصول النفاذية التي تتميز بها الأغشية الطبيعية [5].

3.1.I. المصادر الغذائية للدهون:

تعتبر الدهون من الجزيئات الحياتية الكبيرة وتنتشر في جميع الكائنات الحية وتتواجد في مصدرين أساسيين هما [7,6]:

- مصدر حيواني: مثل اللحوم، البيض، الحليب و الزبدة.
- مصدر نباتي: مثل البذور الزيتية، القطن، الكتان و السمسم.

4.1.I. الأحماض الدهنية:

1.4.1.I. تعريفها:

تعرف الأحماض الدهنية بأنها أحماض عضوية هيدروكربونية خطية أحادية الكربوكسيل (COOH) صيغتها العامة من الشكل RCOOH [7,2].

إن أغلب الأحماض الدهنية المتوفرة طبيعياً تكون حاوية على سلسلة كربونية غير متفرعة ذات عدد زوجي من ذرات الكربون، يتراوح بين 4 إلى 32 ذرة، و تعتبر هذه السلسلة الكربونية:

- ✓ سلسلة قصيرة اذا كان عدد ذرات الكربون أصغر من 10 ذرات.
- ✓ سلسلة متوسطة اذا كان عدد ذرات الكربون بين 12 و 16 ذرة.
- ✓ سلسلة طويلة اذا كان عدد ذرات الكربون أكبر من 16 ذرة [9,8].

2.4.1.I. تصنيف الأحماض الدهنية:

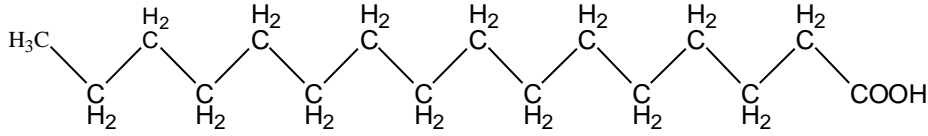
يتم تصنيف الأحماض الدهنية الى أحماض دهنية مشبعة و أحماض دهنية غير مشبعة، هذا و تقسم الأحماض الدهنية الغير مشبعة الى أحماض دهنية غير مشبعة أحادية و أحماض دهنية غير مشبعة متعددة [10].

أ- أحماض دهنية مشبعة:

و هي أحماض دهنية ذات سلسلة هيدروكربونية طويلة، مستمرة، غير متفرعة، تحتوي على روابط أحادية، و صيغتها العامة من الشكل $CH_3 - (CH_2)_n - COOH$ حيث n عدد الميثيلين.

من أكثر الأحماض الدهنية انتشارا تلك التي تحتوي على 16 ذرة كربون مثل حمض البالميتيك، أو التي تحتوي على 18 ذرة كربون مثل حمض الستيريك $(CH_3(CH_2)_{16}COOH)$ [7].

أمثلة: حمض البالميتيك ذو 16 ذرة كربون صيغته العامة $(CH_3(CH_2)_{14}COOH)$.



الشكل (1-1): الصيغة المفصلة لحمض البالميتيك [11].

و يمثل الجدول التالي بعض الأحماض الدهنية المشبعة و الزوجية [12,2].

الجدول (1-1): الأحماض الدهنية المشبعة و الزوجية.

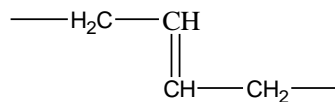
الصيغة الكيميائية	عدد ذرات الكربون	المصدر	اسم الحمض
$CH_3(CH_2)_2 - COOH$	4	الزبد	البيوتريك
$CH_3(CH_2)_4 - COOH$	6	الزبد - جوز الهند	الكابريك
$CH_3(CH_2)_6 - COOH$	8	الزبد - جوز الهند	الكابريك
$CH_3(CH_2)_8 - COOH$	10	الزبد - جوز الهند	الكابريك
$CH_3(CH_2)_{10} - COOH$	12	جوز الهند	لوريك
$CH_3(CH_2)_{12} - COOH$	14	جوز الهند	المرستيك
$CH_3(CH_2)_{14} - COOH$	16	الدهون الحيوانية و النباتية	البلميتيك
$CH_3(CH_2)_{16} - COOH$	18	الدهون النباتية و الحيوانية	ستيريك
$CH_3(CH_2)_{18} - COOH$	20	زيت فستق العبيد	اراشيديك
$CH_3(CH_2)_{20} - COOH$	22	زيت البيمن، زيت فستق العبيد	البيثيك
$CH_3(CH_2)_{22} - COOH$	24	الدهون السفنكولية	لكنوسيريك

ب- الأحماض الدهنية غير المشبعة:

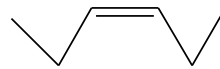
وهي الأحماض الدهنية التي تحتوي في سلسلتها الهيدروكربونية على رابطة مزدوجة واحدة أو أكثر وتكون:

1) أحماض دهنية أحادية غير مشبعة:

وهي الأحماض التي تحتوي على رابطة مزدوجة واحدة وصيغتها العامة من الشكل $C_nH_{2n-1}COOH$. وجود الرابطة المزدوجة في الأحماض الدهنية غير المشبعة ينتج متماكبين cis-trans و لكن الأحماض الدهنية الطبيعية تكون بكثرة على شكل cis [3].



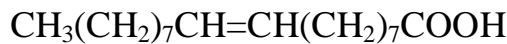
مماكب trans



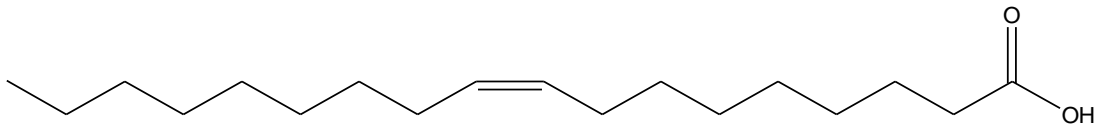
مماكب cis (malonyl)

الشكل (2-1): المتماكبين cis-trans للأحماض الدهنية الأحادية غير المشبعة.

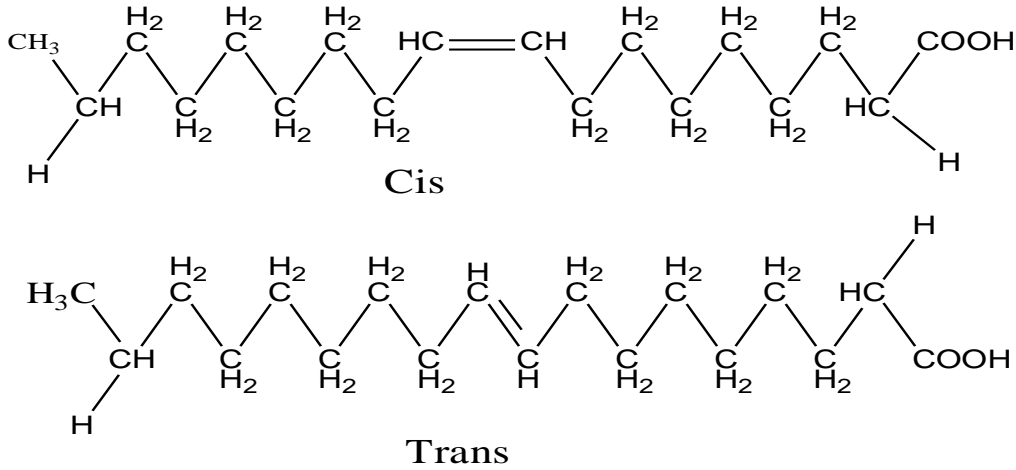
مثال: حمض الأوليك ذو الصيغة النصف مفصلة التالية:



الذي يحتوي على 18 ذرة كربون و رابطة مزدوجة واحدة في الموقع 9 ($\omega 9$) و تسميته تكتب من الشكل $C_{18}:1 \omega 9$ ، و هو من أكثر الأحماض الدهنية الغير مشبعة انتشارا في الدهون الحيوانية و بنسبة أعلى في الدهن البشري و الذي يقدر بنسبة 45% [3,2].



الشكل (3-1): الصيغة الطوبولوجية لحمض الأوليك.

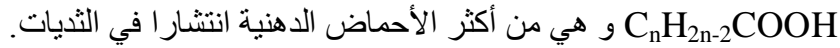


الشكل (4-1): المتماكبين cis، trans لحمض الأوليك.

(2) أحماض دهنية متعددة غير مشبعة:

وهي الأحماض الدهنية التي تحتوي سلسلتها الهيدروكربونية على أكثر من رابطة مزدوجة واحدة و تشمل:

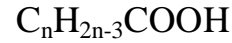
☒ الأحماض الدهنية ذات الرابطتين المزدوجتين: و صيغتها العامة من الشكل



و هي من أكثر الأحماض الدهنية انتشارا في الثدييات.

مثال: حمض اللينوليك الذي يتواجد في بذور الكتان و بذور القطن.

☒ الأحماض الدهنية ذات ثلاث روابط مزدوجة: و صيغتها العامة من الشكل



مثال: حمض ايليوستياريك وهو من الأحماض الدهنية الموجودة في دهن اللسان.



الشكل (5-1): حمض ايليوستياريك.

3.4.1.I. خصائص الأحماض الدهنية:

- ✓ الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة قابلة للذوبان في الماء بينما الأحماض الدهنية طويلة السلسلة غير قابلة للذوبان في الماء.
- ✓ تذوب في المذيبات العضوية غير القطبية مثل: الكلوروفورم، الأسيتون... الخ.
- ✓ الأحماض الدهنية المشبعة تكون صلبة عند درجة حرارة الغرفة.
- ✓ الأحماض الدهنية غير المشبعة تكون سائلة عند درجة حرارة الغرفة.
- ✓ الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة يمكن ان تقطر أو تتطاير مع البخار.
- ✓ الأحماض الدهنية طويلة السلسلة لا يحدث لها تقطير مع البخار.

✓ تكون الأحماض الدهنية أسترات نتيجة تفاعل الوظيفة الكربوكسيلية مع الكحول و تبعاً لنوع الكحول و الحمض الدهني تتكون أسترات عديدة مثل الدهون و الزيوت [2].

5.1.I. تصنيف الدهون:

تنشأ الدهون من اتحاد الكحول ROH مع الأحماض الدهنية RCOOH مشكلة أسترات و تختلف في ما بينها حسب اختلاف نوع الكحول. هناك عدة طرق لتصنيف الدهون (حسب قابلية ذوبانها في بعض المذيبات، حسب امكانية تصنيعها في جسم الكائن الحي، أو قد تصنف اعتماداً على احتوائها لبعض مجموعات الغليسيرول، ستيرويدات.. الخ)، و لكن بصورة عامة يمكن تصنيف الدهون الى دهون بسيطة و أخرى معقدة [2].

1.5.1.I. الدهون البسيطة (متعادلة):

تسمى الدهون البسيطة أيضاً بالدهون المتجانسة و هي أجسام ثلاثية تتكون من الهيدروجين H، الأوكسجين O و الكربون C و هي عبارة على أسترات الأحماض الدهنية مع الكحولات المختلفة و تصنف وفقاً للكحول الى [11,3]:

❖ الغليسيريدات Les glycérides

❖ السيريدات Les cérides

❖ الستيريدات Les stérides

1.1.5.1.I. Les glycérides الغليسيريدات:

الغليسيريدات هي جزيئات غير قطبية كثافتها أقل من كثافة الماء تسمى بالشحوم المتعادلة، تصنف ضمن الدهون الطبيعية المهمة المتواجدة في الأغشية الدهنية (شحوم مخزنة) و في الزيوت النباتية و تمثل مخزون طاقي مهم بالنسبة للإنسان، و هي عبارة على أسترات الأحماض الدهنية و الغليسيرول [14,13,3].

• الغليسيرول: Glycérol

يسمى الغليسيرول بصورة شائعة الغليسيرين Glycerin و هو كحول ثلاثي الهيدروكسيل، و يتصف بكونه سائل زيتي عديم اللون حلو المذاق يتأستر بواسطة الأحماض الدهنية فينتج أحادي أو ثنائي أو ثلاثي الغليسيريد [11,7].



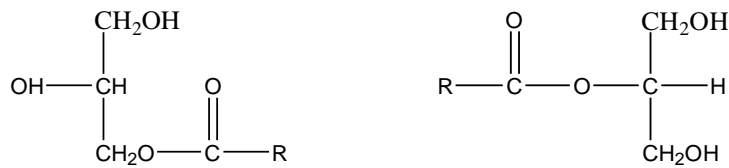
الشكل (6-1): بنية الغليسيرول.

• أشكال الغليسيرول:

يكون الغليسيرول على ثلاثة أشكال و هي كالتالي:

أ- أحادي الغليسيريد **mono glycéride**:

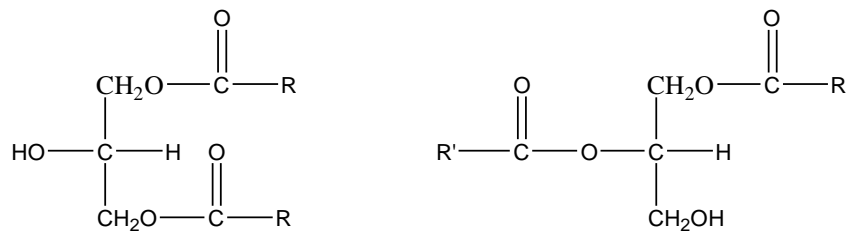
اتحاد جزيئة من الحمض الدهني مع جزيئة غليسيرول.



الشكل (7-1): أحادي الغليسيريد.

ب- ثنائي الغليسيريد **di glycéride**:

و هو عبارة عن أسترة ثنائية لجزيئة غليسيرول بواسطة حمضين دهنيين متشابهين أو مختلفين.

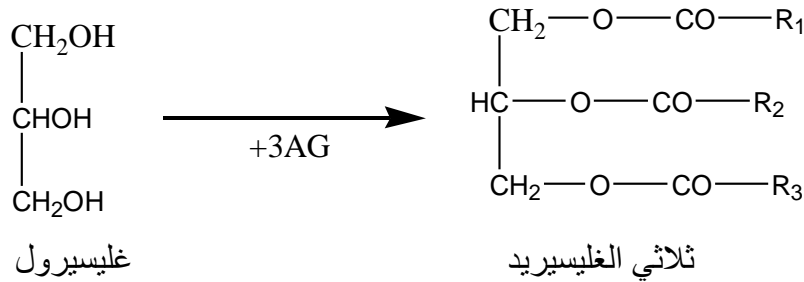


الشكل (8-1): ثنائي الغليسيريد.

ت- ثلاثي الغليسيرييد triglyceride:

و هو عبارة عن أسترة ثلاثية لجزيئة غليسيرول بواسطة ثلاث أحماض دهنية متشابهة أو مختلفة، و يعتبر ثلاثي الغليسيرييد المركب الرئيسي في المادة الدهنية الغذائية اليومية و هو الشكل الذي يخزن تحت الجلد و داخل الأنسجة الدهنية و التي يكون على الأغلب شحوم صلبة بدرجة حرارة الجسم بسبب احتوائه على الأحماض الدهنية المشبعة [3,2].

التفاعل العام للأسترة يكون كالتالي:

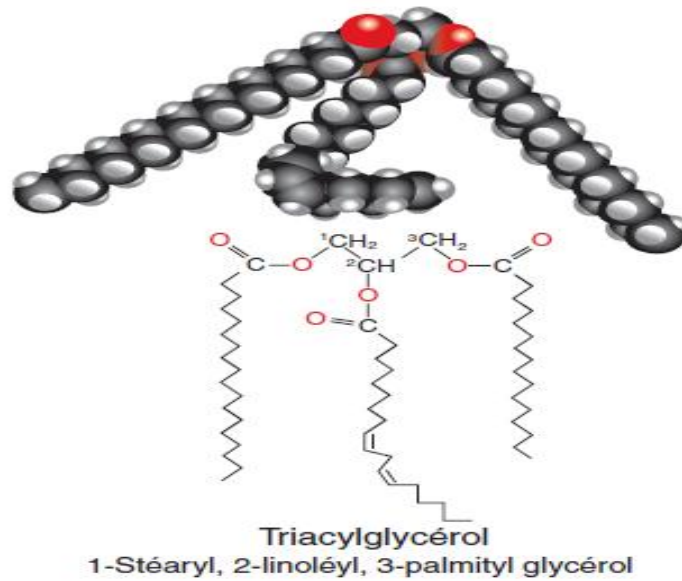


الشكل (9-1): ثلاثي الغليسيرييد.

❖ اذا كانت ثلاث الأحماض الدهنية متشابهة فإن ثلاثي الغليسيرييد يكون متجانس و اذا كانت مختلفة فإنه يكون مختلط [13].

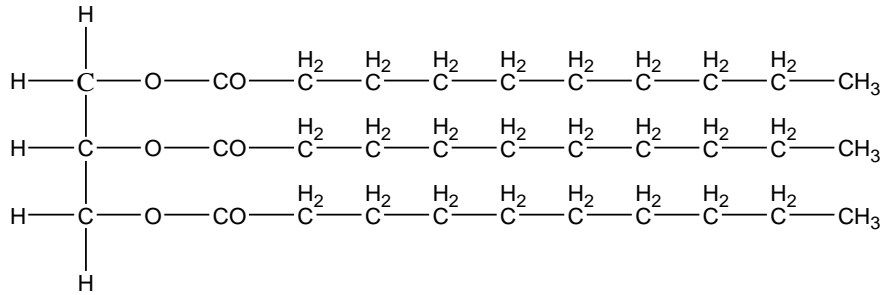
مثال:

ثلاثي غليسيرييد مختلط.



الشكل (10-1): ثلاثي غليسيرييد مختلط.

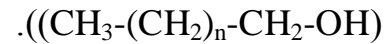
ثلاثي غليسيريدي متشابه:



الشكل (11-1): ثلاثي غليسيريدي متشابه [15].

2.1.5.1.I. الشموع: Les cérides

وهي أسترات الأحماض الدهنية (معظمها مشبعة وغير متفرعة) مع الكحولات ذات السلاسل الطويلة (كحولات دهنية أحادية ذات عدد زوجي من ذرات الكربون صيغتها العامة من الشكل:

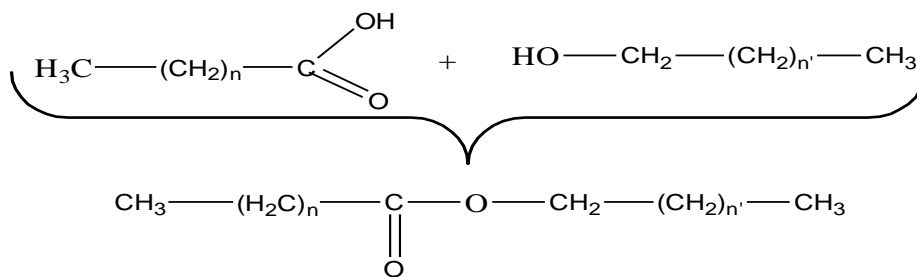


تنقسم الشموع الى صلبة و سائلة و توجد في الحالة الصلبة عند درجات الحرارة العادية و هي سهلة الذوبان في الكحول و الايثر و غير قابلة للذوبان في الماء.

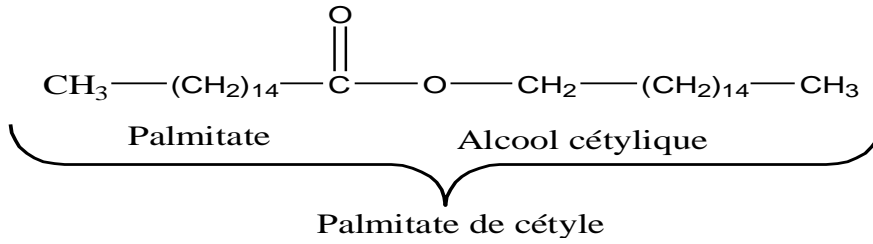
تتواجد الشموع بنسبة 0.02 الى 0.4% في زيت عباد الشمس ولا تتجاوز نسبة 0.002% في زيت الصويا [18,17,16,11].

1) التفاعل العام للشموع:

يكون التفاعل العام للشموع كالتالي:



الشكل (12-1): التفاعل العام للشموع [11].

مثال:

الشكل (I-13): الصيغة نصف مفصلة لـ بالميتات السيتيل [9].

(2) خصائص الشموع:

- ✓ تملك درجة انصهار عالية من 60C° الى 100C° و تكون صلبة في درجة حرارة الغرفة.
- ✓ لا تذوب في الماء، تذوب في المذيبات العضوية.
- ✓ غير قابلة للهضم بواسطة الإنزيمات الخاصة بالدهون لذلك ليس للشموع قيمة غذائية.

(3) الدور البيولوجي:

- ✓ تتواجد الشموع على شكل طبقات لحماية الجلد وعلى أوراق فواكه النباتات الراقية لحماية النباتات من فقدان الرطوبة وتقليل الإصابة بالأمراض.
- ✓ تدخل في تركيب القشرة الخارجية لعدة أنواع من الحشرات.

3.1.5.1.I Les stérides. الستيرويدات

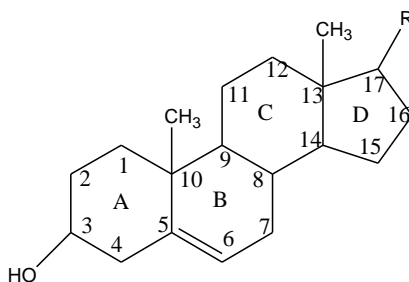
الستيرويدات هي مركبات ناتجة من أسترة الأحماض الدهنية بواسطة الستيروولات.

• الستيروول: Le stérol

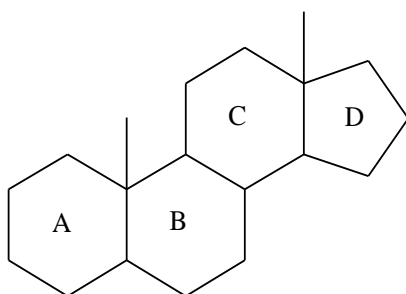
هو عبارة على مركب أليفاتي عالي الوزن الجزيئي والنواة الأساسية المكونة له هي نواة Cyclo pentano perhydro phantréne و التي تتكون من 4 حلقات متصلة، ثلاث حلقات منها سداسية و الحلقة الرابعة خماسية كما موضح في الشكل (1-14)، و من أهمها الكولستيرول. تنتشر الستيروولات في جميع الكائنات الحية و تلعب أدوار وظيفية مهمة جدا و مختلفة تعتمد على طبيعتها الكيميائية مثل: الهرمونات، الفيتامينات، و تنقسم الى ثلاثة أنواع [1,2,19]:

- (1) فيتوستيروولات **Phytosterols**: موجودة في الدهون النباتية.
- (2) زوستيروولات **Zoosterols**: موجودة في الدهون الحيوانية.
- (3) ميكوستيروولات **Mycosterols**: موجودة في الفطريات و الخمائر.

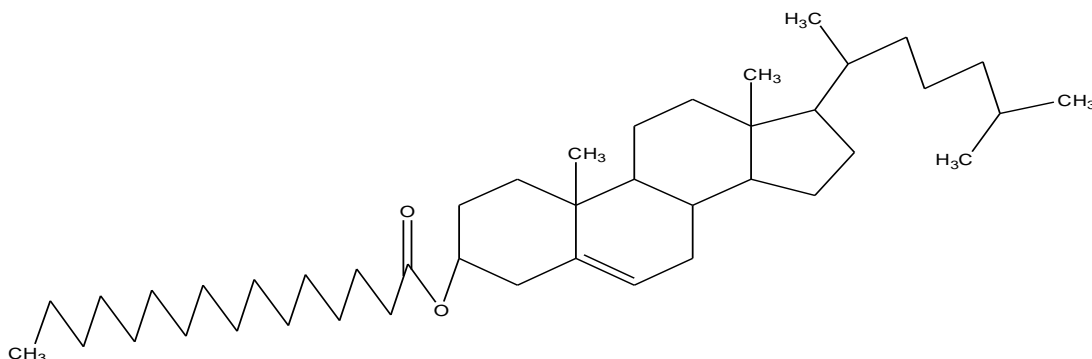
الشكل العام للستيرولات:



الشكل (14-I): التركيب الكيميائي العام للستيرولات.



الشكل (15-I): نواة Cyclo pentano perhydro phantréne.

مثال:

الشكل (16-I): الصيغة المفصلة لـ [19] Palmitate de cholestéryle.

2.5.1.I. الدهون المركبة:

وهي عبارة على أسترات للأحماض الدهنية مع الكحولات المختلفة مع وجود مجموعات أخرى مثل:

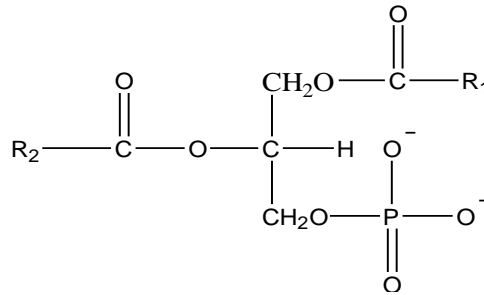
الفوسفور P و النيتروجين N وتشمل [14,3,2]:

1.2.5.1.I. غليسيروفوسفوليبيد Les glycérophospholipides:

يتشكل هذا الدهن عن طريق أسترة حمض الفوسفاتيديك بواسطة الكحول و باختلاف طبيعة الكحول يختلف نوع Le glycérophospholipide.

☒ حمض L'acide phosphatidique:

و هو العنصر الأساسي المكون لـ Les glycérophospholipides و يتكون من:



الشكل (17-I): صيغة حمض Les glycérophospholipides.

الحمضين الدهنيين R_1 و R_2 يكونا ذو سلسلة طويلة حيث عدد ذرات الكربون فيها أكبر من 14 ذرة ويكون R_2 حمض دهني غير مشبع.

☒ طبيعة الكحول المكون لـ Le glycérophospholipide:

تكون الكحولات اما:

موجبة الشحنة مثل: ايثانول أمين ethanolamine، الكولين la choline

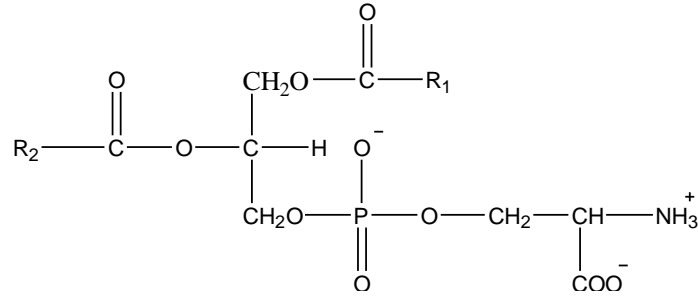
متعادلة مثل: السيرين la sérine، الغليسيرول

سالبة الشحنة مثل: l'inositol 4,5-bisphosphate

باختلاف طبيعة الكحول يختلف تصنيف الدهن و هو كالاتي:

أ- فوسفاتيديل سيرين : حمض الفوسفاتيديك + كحول السيرين

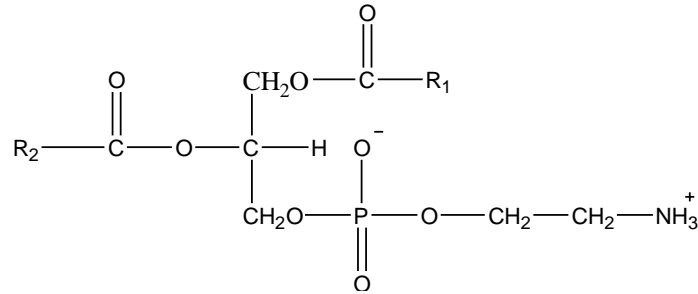




الشكل (18-I): صيغة Phosphatidyl-Sérine.

ب- فوسفاتيديل ايثانول أمين: حمض الفوسفاتيديك + كحول ايثانول أمين

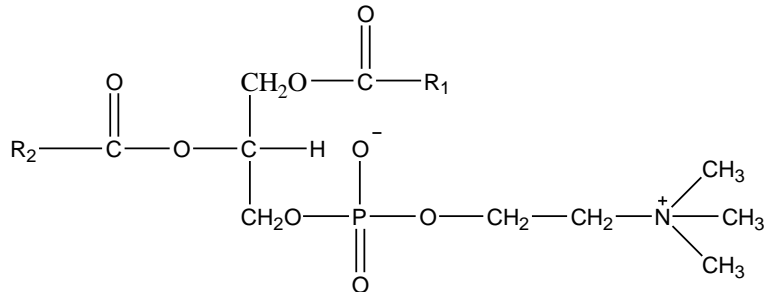
Phosphatidyl-Ethanolamine = Acides Phosphatidiques + Ethanolamine



الشكل (19-I): صيغة Phosphatidyléthanolamines.

ت- فوسفاتيديل كولين: حمض الفوسفاتيديك + كحول الكولين

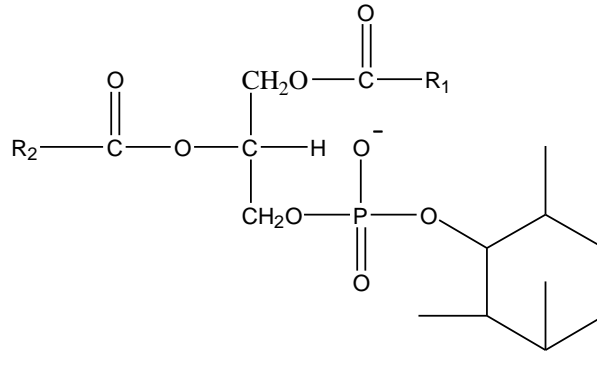
Phosphatidylcholines = Acides Phosphatidiques + Choline



الشكل (20-I): صيغة Phosphatidylcholines.

ث- فوسفاتيديل اينوزيتول: حمض الفوسفاتيديك + كحول الإينوزيتول

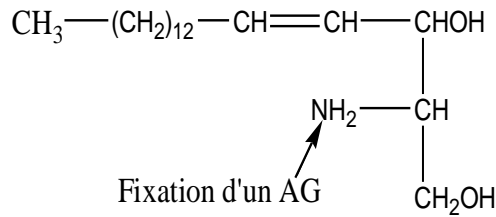
Phosphatidylinositols = Acides Phosphatidiques + Inositol



الشكل (21-1): صيغة Phosphatidylinositols.

2.2.5.1.I. الدهون السفنكولية (الاسفنجية) SphingoLipides

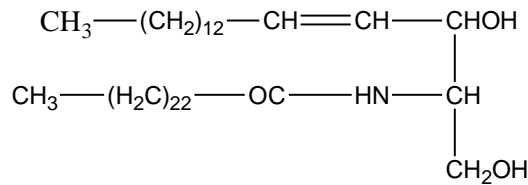
وهي من الدهون التي لا تحتوي على الغليسيرول، حيث أنها تحتوي على السفنكوزين sphingosine الذي هو عبارة على كحول أميني غير مشبع [2].



الشكل (22-1): كحول الـ sphingosine [3].

عند ارتباط الحمض الدهني بجزئته الـ sphingosine ينتج لنا مركب السيراميد le céramide و هو الوحدة الأساسية المكونة للدهون السفنكولية.

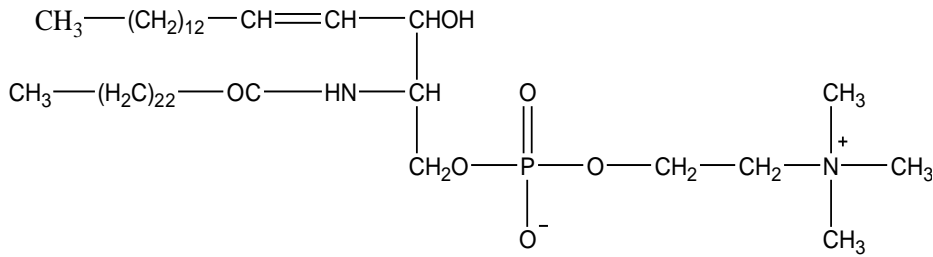
مثال:



الشكل (23-1): حمض Lignocérique.

بعد تكوين السيراميد يتم ارتباط مجموعة R على مستوى الوظيفة الكحولية الأولية من أجل تشكيل الدهون السفنكولية و باختلاف هذه المجموعات يختلف طبيعة الدهن [20].

مثال: تكوين السفنكوماييلين Les Sphingomyélines وهنا يكون R=phosphocholine



الشكل (24-1): صيغة Les Sphingomyélines.

2.1. الكولستيرول:

ينظر الكثيرون للكولستيرول على أنه تلك المادة الضارة التي تتسبب في حدوث تصلب الشرايين و تؤدي الى حدوث أمراض خطيرة للإنسان، و هذه نظرة خاطئة بالنسبة للكثير من الأشخاص، إذ يتواجد الكولستيرول بشكل طبيعي في جسم الإنسان بل و يصنع بنسبة 80% من طرفه [21,20].

1.2.1. تعريف الكولستيرول:

الكولستيرول هو مادة دهنية أو شحمية عديمة اللون، موجودة بشكل طبيعي في الدم و في جميع خلايا الجسم و يمثل أحد العناصر الرئيسية التي تقوم بالعديد من الوظائف الحيوية المهمة فيه، اذ هو المركب الأساسي في تكوين أغشية كل خلية في جسم الإنسان و كذلك لإنتاج فيتامين D و الهرمونات الجنسية [22,5].

2.2.1. اكتشاف الكولستيرول:

في عام 1913م لاحظ العالم الروسي Anichkov و جود انسداد في الأوعية الدموية للأرانب التي تم تغذيتها بوجبات غذائية عالية الكوليسترول، و تواصلت الدراسات الى أن تمكن العالمان Windows و Wieland من التعرف على الشكل البنائي للكولستيرول عام 1930م. ثم تطورت البحوث والدراسات في التعرف على الشكل البنائي للكولستيرول الى أن تم التوصل الى الشكل البنائي الكامل للكولستيرول عام 1932م.

وفي عام 1942م قام العالمان Block and Rittenberg بدراسة التركيب الكيميائي للكولستيرول حيث توصلوا الى وجود الكولستيرول في شكل ثلاث حلقات سداسية احدهما غير مشبعة مرتبطة بحلقة خماسية تحتوي على سلسلة جانبية [23].

3.2.I. مصادر الكولستيرول:

تحصل الكائنات الحية على الكولستيرول من مصدرين أساسيين هما:

1.3.2.I. المصدر الأول: مصدر داخلي

يصنع عن طريق الكبد و بنسبة 80% من إجمالي الكولستيرول في الجسم، حيث جسم الإنسان ينتج بين 500-1000 مغ من الكولستيرول كل يوم و ذلك لأن كل خلية بالجسم لها القدرة على تصنيعه بنسب متفاوتة.

I. 2.3.2. المصدر الثاني: مصدر خارجي

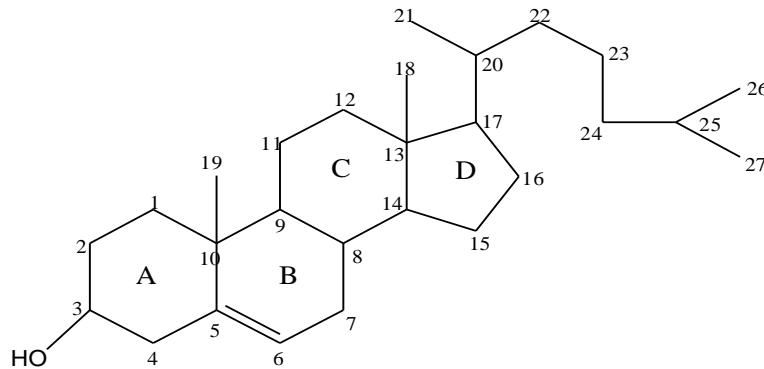
يأتي عن طريق الأغذية التي نتناولها و التي يكون مصدرها حيوانيا مثل: أصفر البيض، اللحوم، و يعتبر المصدر الغذائي مصدرا إضافيا، فالكوليسترول المصنع من طرف الكبد يكفي احتياجات الجسم [23,21].

I. 4.2. التركيب الكيميائي للكولستيرول:

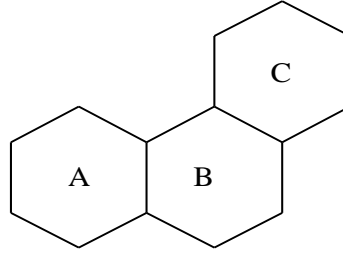
يتكون جزيء الكولستيرول (الشكل (I-25)) من 27 ذرة كربون مرتبة في نواة كحولية (نواة الستيرول) تتألف من أربع حلقات A، B، C، D، من بين الحلقات الأربع نواة الفينانثرين الموضحة في الشكل (I-26) (اذ تحتوي على رابطة مزدوجة بين الكربون $C_5 = C_6$) المرتبطة مع حلقة خماسية مشبعة في الموضعين رقم 13 و 14.

كما تحتوي الجزيئة على مجموعات جانبية ; مجموعة الهيدروكسيل OH في الموضع رقم 3 و على مجموعتي ميثيل CH_3 في الموضعين رقم 18 و 19، كما تحتوي الجزيئة على سلسلة جانبية متصلة بذرة الكربون رقم 17 و تتمثل في 1,5diméthyl hexyl.

ويتضح من الشكل البنائي لجزيئة الكولستيرول أن الحلقات المكونة له ليست حلقات عطرية فكلها مشبعة عدا الحلقة B التي تحتوي على الرابطة الثنائية [21].



الشكل (I-25): الصيغة الكيميائية المفصلة للكولستيرول ($C_{27}H_{46}O=386.67 \text{ g/mol}$).



الشكل (I-26): جزيء الفينانثرين.

5.2.I. تواجد الكولستيرول في الجسم:

يتواجد الكولستيرول في كل خلية من خلايا الجسم، و يكون جزءا من نواة الخلية، كما يتواجد بكميات كبيرة في المرارة و يعرف باسم ستيرول المرارة، و يتواجد ايضا في دهن النسيج العصبي و في دهن الجلد و ايضا يتواجد بتركيز عال في الدماغ [25,24,23].

6.2.I. دور و أهمية الكوليسترول:

للكولستيرول أهمية حيوية كبيرة تتمثل:

- ✓ يدخل في تركيب الأغشية البلازمية المغلفة للخلايا بصورة رئيسة، لذلك تقوم الخلايا بتصنيعه لتعويض النقص اذ لم يحصل عليه الجسم من المصدر الخارجي.
- ✓ يعتبر مصدرا أساسيا لتكوين الستيرويدات مثل الهرمونات الجنسية (Progesterone، Testosterone، Estrogene)، فيتامين د (و ذلك بتحويل الكولستيرول الموجود تحت الجلد بواسطة أشعة الشمس الى مركب له خواص فيتامين د) و أحماض الصفراء و كل مركب من هذه المركبات له دور رئيس في العمليات الحيوية التي تحدث في الكائن الحي فمثلا نقص تكون أحماض الصفراء ينتج عنه صعوبة في هضم و امتصاص الدهون، أما فيتامين د.
- ✓ يدخل في تركيب البروتينات الدهنية الموجودة في الدم والتي وظيفتها نقل الدهون المختلفة من الدم لأعضاء الجسم المختلفة سواء لأكسدها للحصول على الطاقة أم لتخزينها في بعض الخلايا كالخلايا الدهنية.
- ✓ بما أن الكولستيرول هو أحد المكونات الأساسية لمختلف أنواع الأنسجة و خاصة العصبية فهو يساعد في انتقال التيارات العصبية و بدونها لا تتمكن الخلايا العصبية من الإثارة الحسية مما ينتج عن ذلك فقدان القدرة الحركية و الكلام [21].

7.2.I. أنواع الكولستيرول:

تنتقل دهون الدم بين مختلف أنحاء الجسم و الكولستيرول يعتبر أهم أنواع هذه الدهون حيث أنه لا يتواجد بشكله النقي داخل الدم بل يكون مرتبطاً مع بروتينات مكونة جزيئات كبيرة قابلة للذوبان في الدم تسمى ليبوبروتين.

الليوبروتين يحمل الكولستيرول من مكان الى آخر في الجسم، و هناك نوعان من الليوبروتين يتميز كل منهما بكثافة و كمية البروتين الذي يحمله و ينقله من الكبد خلال الدورة الدموية لمختلف خلايا الجسم [14,23,26].

1.7.2.I. ليبوبروتين منخفض الكثافة:

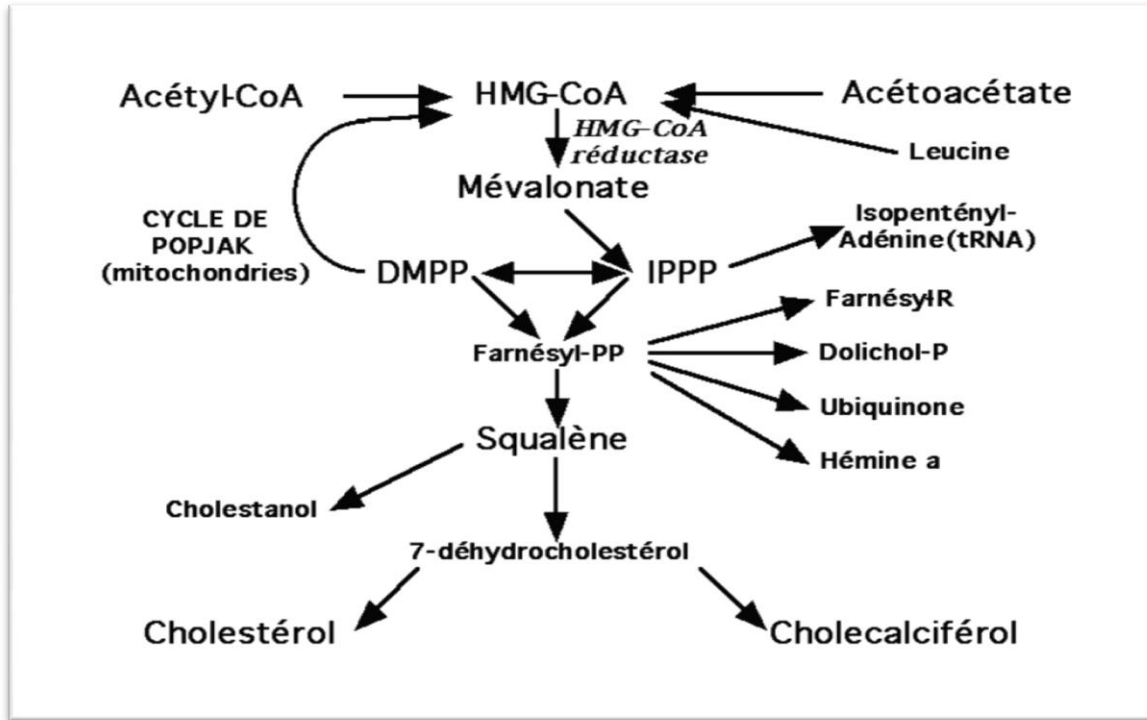
و يطلق عليه الكولستيرول الضار و يرمز له بالرمز LDL و يحتوي على نسبة كبيرة من الدهون و تكون جزيئاته كبيرة جدا و تنتقل بواسطة كافة منخفضة من البروتين بحيث تترسب على الجدران الداخلية للشرايين، و الذي يؤدي على المدى الطويل الى انسداد أو ضيق أو تصلب الشرايين و الوظيفة الأساسية له هو حمل الكولستيرول من الكبد الى الأنسجة الطرفية بما في ذلك جدران الأوعية.

2.7.2.I. ليبوبروتين عالي الكثافة:

و يرمز له بالرمز HDL و يطلق عليه الكولستيرول النافع أو المفيد و يحتوي على نسبة قليلة من الدهون و تكون جزيئاته صغيرة جدا، و ينتقل بواسطة كثافة عالية من البروتين بحيث يجري مع الدورة الدموية و لا يترسب في جدران الشرايين، و يقاوم التصاق الكولستيرول الضار بجدران الخلايا و يقلل من مستواه بالدم و الوظيفة الأساسية له حمل الكولستيرول من الأنسجة الطرفية بما في ذلك جدران الشرايين الى الكبد [26].

8.2.I. آلية اصطناع الكولستيرول عند الكائن الحي (انسان، حيوان):

تعد ميكانيكية تصنيع الكولستيرول معقدة بعض الشيء مقارنة بأي عملية بناء حيوي أخرى، حيث تعتمد على وجود أنزيمات متخصصة تعمل بنظام دقيق و تتأثر بحالة الكائن من ذلك نوعية الغذاء الذي يتناوله أو الحالة الصحية و غيرها من العوامل الأخرى المتعددة [21,27].



الشكل (27-1): آلية اصطناع الكولستيرول.

يتم اصناع الكولستيرول على مستوى سيتوبلازم الخلايا (خاصة في الأمعاء و الكبد) انطلاقا من جزيئة HMG-CoA و هذا الأخير ناتج من تكاثف ثلاث جزيئات من Acetyl-CoA. الأحماض الدهنية ذات السلاسل القصيرة C₈ و الليسين تعتبر ركائز جيدة من أجل اصطناع الكولستيرول. مرحلة التحرير هي تحول جزيئة HMG-CoA الى mévalonate بواسطة الانزيم المرجع HMG-CoA، وهذا الأخير بدوره مصدر لـ DMPP، IPPP. في النسيج العصبي يعاد تصنيع جزيئات HMG-CoA انطلاقا من DMPP (cycle de POPJAK). المراحل الوسيطة للتصنيع تكون عند الوصول الى farnésyl pyrophosphate الناتج من اصطناع جذور isopentényl و farnésyl و isoprénoides. انطلاقا من squalène تكون بداية اصطناع الكولستيرول.

I. 9.2. ارتفاع تركيز الكولستيرول في الدم:

عندما ترتفع نسبة الكولستيرول في الدورة الدموية ينتج عنه الكثير من الأمراض أولهم مرض تصلب الشرايين و في هذا المرض يترسب الكولستيرول في جدران بعض الشرايين (الشكل (I-28)) مما يعيق تدفق الدم، و بالتالي يتكون ما يعرف بالجلطة أو التخثر فيسد الشرايين مما قد ينتج عنه السكتة القلبية أو

الدماغية و تعد جزيئات البروتينات الدهنية المنخفضة الكثافة الموجودة في الدورة الدموية من الأسباب الرئيسية لانسداد هذه الشرايين، حيث كلما ارتفعت نسبة هذه البروتينات ازدادت فرص التعرض لهذا المرض [21].



الشكل (28-1): شكل ترسب الكوليستيرول على جدران الخلايا.

I. 10.2. الأسباب الرئيسية لارتفاع نسبة الكوليستيرول:

(1) زيادة تناول الدهون المشبعة:

يعتبر الإفراط في تناول الأغذية بالدهون المشبعة والموجودة في الدهون الحيوانية والزيوت من أهم الأسباب المؤدية لارتفاع نسبة الكوليستيرول و يرجع ذلك الى أنها تقلل من مقدرة الجسم على التخلص من الكوليستيرول مما يؤدي الى ارتفاعه.

(2) العوامل الوراثية:

قد يكون ارتفاع كوليستيرول الدم ناتج عن الأمراض الوراثية، حيث يتم توارث هذا الخلل بين أفراد العائلة الواحدة لذا يمكن الكشف عنه مبكرا في سن الطفولة و أن إهمال أو تأخير العلاج قد يؤدي الى حدوث الوفاة بنوبة قلبية قبل سن الخمسين .

(3) السمنة:

تعتبر السمنة من الأسباب الرئيسية التي تؤدي الى ارتفاع الكوليستيرول و يرجع ذلك الى الإفراط في تناول الأغذية الغنية بالدهون المحتوية على نسب عالية من الكوليستيرول.

زيادة معدل وزن الجسم بنسبة 7.3% تؤدي الى زيادة نسبة الكوليستيرول الكلي بمقدار يتراوح بين 2.5-3% [28,10].

11.2.I. تخفيض تركيز الكولستيرول:

تعد النسب المثلى لتركيز الكولستيرول في الدم في حدود 170-180 mg/100 ml للأشخاص الذين تتراوح أعمارهم ما بين 20 الى 30 سنة وهذه النسبة تزيد مع زيادة السن فنجد أن الأشخاص الذين تتراوح أعمارهم ما بين 40 الى 45 سنة يكون تركيز الكولستيرول في حدود 200-220mg/100ml أما اذا زادت النسبة عن 220 mg/100ml فتعتبر هذه الحالة مؤشرا لخطر الإصابة بتصلب الشرايين.

للمحافظة على هذه النسب يجب تحديد نسبة الكولستيرول و الدهون المشبعة في الغذاء مع زيادة نسبة السكريات المعقدة مثل الكلايوجين لكي تقوم السكريات بدور التعويض عن السعرات الناتجة عن نقص الدهون، فالدهون المشبعة ذات المصدر الحيواني مثل اللحوم الحمراء و المصدر النباتي مثل زيت جوز الهند اتضح من خلال الدراسات أنها تتسبب في زيادة تركيز الكولستيرول و البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة.

أفضل طريقة لتخفيض نسبة الكولستيرول في الدم هي تحديد نوعية الغذاء اليومي لأنها طريقة آمنة و فعالة و غالبا ما تكون هي العلاج الوحيد الفعال، كما أنها تزيد من فعالية بعض الأدوية المستخدمة لتخفيض نسبة الكولستيرول في الدم، فالكولستيرول يمكن أن ينخفض من الجسم بعدة طرق أهمها هو تحول الكولسترول كليا أو نسبة كبيرة منه في الكبد الى الأحماض الصفراء التي تفرز الى الأمعاء الدقيقة لكي تساعد في عملية هضم الأطعمة الدهنية، غير أن هذه الأحماض الصفراوية لا يتخلص منها الجسم بسهولة اذ يعاد معظمها عن طريق الدم الى الكبد مرة أخرى لتقوم بتحويلها الى الأمعاء الدقيقة فتعاد الدورة مرة أخرى، و قد دلت الأبحاث على أن أي اعاقه لهذه الدورة سوف يحث الكبد على تحويل المزيد من الكولستيرول الى أحماض الصفراء، بمعنى أنه سيزيد من حاجة الكبد لمزيد من الكولستيرول مما يحث خلايا الكبد على تصنيع مستقبلات أكثر و بالتالي تخفض نسبة الكولستيرول في الدورة الدموية [21].

نلخص الطرق المناسبة لمنع زيادة تركيز الكولستيرول في الدم و بالتالي منع حدوث المضاعفات الهامة كالتأثير على الدورة الدموية من خلال انسداد الشرايين في ما يلي:

- 1- تناول غذاء يحتوي على نسب معتدلة من الدهون الحيوانية.
- 2- تشجيع الأشخاص الذين لعائلاتهم تاريخ السكتة القلبية أو الدماغية ولهم قابلية ارتفاع نسبة الكولستيرول في الدم على تناول أطعمة محتوية على نسبة قليلة جدا من الكولستيرول والدهون المشبعة الحيوانية.
- 3- الإعتماد على الزيوت النباتية لعدم احتوائها على كولستيرول.

- 4- ممارسة التمارين الرياضية و التي تؤدي الى تخفيض نسبة الدهون منخفضة الكثافة و كذلك الدهون الثلاثية، كما أنها تؤدي الى ارتفاع مستوى الدهون عالية الكثافة [10].
- 5- قد يكون العلاج بواسطة بعض الأدوية و لكن يجب استعمالها تحت اشراف طبي [10,5].

خلاصة:

في ختام هذا الفصل نكون قد تعرفنا على مدى أهمية الدهون و خاصة الكولستيرول و الذي كان محل دراستنا، و في الفصل الموالي سنتطرق الى مختلف طرق الفصل الكروماتوغرافية و سنسلط الضوء أكثر على التقنية المتطورة المطبقة في شتى المجالات و خاصة في مجال تحليل الأغذية ألا و هي الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC.

المراجع

المراجع باللغة العربية

- [1] خضرة عزري. «دراسة الليبيدات و الفينولات في بعض أنواع التمر المحلي». مذكرة ماجستير، جامعة ورقلة، 2013.
- [2] أ.د. سامي المظفر، «أساسيات الكيمياء الحياتية». دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة.
- [4] ابراهيم حسن و عاطف أبو عرب : «تحليل الأغذية». دار الفجر للنشر و التوزيع ، 2002م.
- [5] د. راشد العويش ، د. تيسير العاصي، « ماذا يجب ان تعرف عن الكوليسترول »، جمعية القلب الكويتية الطبعة السادسة 2014 .
- [8] فؤاد عبد العزيز أحمد الشيخ ، «صناعة الزيوت و الدهون» ، دار النشر للجامعات المصرية الطبعة الأولى 1993 .
- [10] د. ماهر عبد اللطيف راشد، « كتاب الكوليسترول المتهم البريء في تصلب الشرايين» ، دار النشر للجامعات مصر، الطبعة الأولى، أبريل 1999.
- [16] مصطفى بوقوادة. «دراسة فيتوكيميائية لليبيدات و الفينولات في بعض أنواع نوى التمر المحلي». مذكرة ماجستير، جامعة ورقلة 2007.
- [17] د.رضوان صدقي فرج، كيمياء الليبيدات، مركز النشر لجامعة القاهرة 1991.
- [18] عقون علي ، حمي الصادق . «تتمين ثلاثة أنواع لزيت نبات البطم». مشروع نهاية السنة ، جامعة ورقلة ، جوان 1997.
- [19] حسن الحازمي: المنتجات الطبيعية. دار الخريجي للنشر و التوزيع، 2001م.
- [21] د. عبد العزيز أحمد الجعفري، «الكيمياء الحيوية» ، مجلة العلوم والتقنية، الكوليسترول ص29-32 العدد التاسع محرم 1410هـ/1989م.
- [22] أولف رامسي: «الكوليستيرول و الحد من مخاطره». الدار العربية للعلوم، 1992م.
- [25] محمد كمال: أسس الكيمياء الحيوية. دار النهضة العربية، 1966م.
- [26] مصطفى حيات: «الكوليستيرول و أمراض العصر» . مؤسسة الكويت للتقدم العلمي، 1996م.

[28] «ماذا تعرف عن الكولسترول» ، مملكة البحرين، وزارة الصحة، إدارة الصحة العامة، قسم التغذية 2006.

<http://www.moh.gov.bh/ExternalWebsites/arabic/Nutrition/PDF/Nutrition/Colestrol.pdf> ,26-11-2015

المراجع باللغة الأجنبية

- [3] Pr.TOUITO Y. Biochimie : « structure des glucides et lipides ». Faculté de médecine, Université Pierre et Marie Curie, 2005 – 2006.
- [6] www.eufic.org, 04-02-2016
- [7] Dr.KOOLMAN. «Color Atlas of Biochemistry». 2nd edition © 2005 Thieme All rights reserved. Usage subject to terms and conditions of license.
- [9] Dr.BOUAZDI., Pr. CHICOUCHE. « Structure des lipides », biochimie , 1^{ère} Année de médecine dentaire.
- [11] Hamidi A. « Etude phytochimique et activité biologique de la plante Limoniastrum guyonianum ». Mémoire de magister, Université Kasdi Merbah ouargla 2012.
- [12] Pr.VERONIQUE D. « Structure des lipides », Université de Rennes I, Faculte de Medecine , Departement de biochimie et Biologie Moléculaire, Année Universitaire 2011-2012.
- [13] Isabelle Hininger-Favier, « Les lipides et dérivés ». Université Joseph Fourier de Grenoble, Année universitaire 2011/2012.
- [14] Serge Weinman et Pierre Méhul, « Toute la biochimie » , Dunod, Paris, 2004.
- [15] Saïd BERRADA, « biochimie Appliquée dans les filières sbssa ». PLP Biotechnologies SE Lycée Simone Well, Académie de MONTPELLIER Académie de DIJON, Journées des 5 et 6 Mai 2009.
- [20] Pr. A. Raisonier, « Lipides et lipoprotéines », Objectifs au cours de Biochimie PCEM2, Biochimie Métabolique et Régulations C1 ,Faculté de médecine, Université Pierre et Marie Curie, 2009 – 2010.
- [23] Dr.Pierre Ambrosi, « Cholestérol », Larousse, Paris 2005.

[24] Uffe Ravnskov, M.D., The cholesterol Myths. New Trends-Washington,2000.

[27] Pr. A. Raisonnier, « Lipides et lipoprotéines », Objectifs au cours de Biochimie PCEM2, Biochimie Métabolique et Régulations, Faculté de médecine, Université Paris-VI, 2003 – 2004.

الفصل الثاني

طرق الفصل الكروماتوغرافية

تمهيد:

أستعملت مختلف أنواع الطرق الكروماتوغرافية منذ حوالي 50 عاما و أثبتت منذ ذلك الوقت أنها ذات قيمة تحليلية متميزة في التطبيقات التحليلية [1]. في حين تطورت الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء أواخر سنة 1960م و بداية 1970م و في وقتنا الحاضر تعتبر من التقنيات المتطورة المطبقة في شتى المجالات من أجل فصل و تنقية المركبات بما في ذلك تحليل الأغذية [2]. و لهذا أختيرت هذه التقنية محلا للدراسة لما تتميز به من سرعة في الفصل على عكس الطرق الأخرى التي تستغرق وقتا أكبر، و في هذا الفصل سنقوم بدراسة مختلف الطرق الكروماتوغرافية عموما و سنخصص الدراسة حول الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC [3].

1.II. عموميات حول الكروماتوغرافيا:**1.1.II. تاريخ الكروماتوغرافيا:**

تمكن العالم النباتي الروسي Michel Tswett سنة 1906 من اكتشاف الطرق الكروماتوغرافية عندما قام بفصل عصارة نبات (مادة اليخضور) على عمود معبأ بـ كربونات الكالسيوم CaCO_3 ، حيث مرر على هذا العمود محلولاً من الايثر البترولي $\text{H}_5\text{C}_2\text{-O-C}_2\text{H}_5$ المحتوي على مواد النبات و لاحظ أن المواد قد انفصلت الى طبقات لونية مختلفة، و قد أطلق هذا العالم اسم الكروماتوغرافيا على هذا النوع من الفصل، و يتركب هذا الإسم من عبارات يونانية وهي: chromo و تعني لون، و graphia و تعني شكل. كما تمكن العالم مارتن في بداية عام 1940 من وضع أسس نظرية كروماتوغرافيا السائل و كروماتوغرافيا الغاز و حصل على جائزة نوبل في الكيمياء عام 1952م.

الكروماتوغرافيا تشبه الى حد بعيد التقطير التجزيئي و الذي يعتمد على التحرك النسبي لطورين، و لكن في الكروماتوغرافيا نجد أن أحد الطورين يكون ثابتا و يعرف بالطور الساكن la Phase stationnaire بينما الطور الآخر يكون متحركا و يعرف بالطور المتحرك la Phase mobile [4].

2.1.II. تعريف و مبدأ الكروماتوغرافيا:

الكروماتوغرافيا هي طريقة تحليل فيزيوكيميائية لفصل و تنقية مزيج من المكونات سائلة أو غازية، و تهدف الى تحديد و تقدير مكونات المزيج المتجانس، و تعتمد أساسا على مبدأ توزيع مكونات المزيج بصورة مختلفة بين طورين (أحدهما ساكن أو ثابت و الآخر متحرك)، حيث تنتقل مكونات المزيج على الطور الساكن بإنسياب الطور المتحرك خلاله و يتم الفصل نتيجة لإختلاف قوى التجاذب بين المواد في

المزيج و الطورين مما يؤدي الى الإختلاف في سرعة هجرة المكونات و من ثم الى إختلاف مواقعها على الطور الساكن مع مرور الزمن [6,5].

3.1.II. طبيعة الأطوار:

1.3.1.II. الطور الساكن la Phase stationnaire:

يكون الطور الساكن صلب S مثل السيليس أو الألومينا و يكون معبأ داخل عمود (كروماتوغرافيا عالية الأداء HPLC)، أو مفرد على طبقة رقيقة (دعامة) من الزجاج، الألمنيوم أو ورق مصنوع من البلاستيك (كروماتوغرافيا الورق و الطبقة الرقيقة).

كما يمكن أن يكون سائل L على دعامة صلبة (كروماتوغرافيا الورق) حيث يكون على شكل ماء ممتز على جزيئات السيليلوز.

2.3.1.II. الطور المتحرك la Phase mobile:

ينتقل الطور المتحرك عند اتصاله بالطور الساكن و يكون غاز مثل: كروماتوغرافيا الغاز، أو سائل (مذيب واحد أو مزيج من المذيبات) مثل: كروماتوغرافيا الورق، الطبقة الرقيقة و الأعمدة [7].

4.1.II. تصنيف الكروماتوغرافيا:

يمكن تصنيف الكروماتوغرافيا الى تقنيات مختلفة منها [8]:

- 1- كروماتوغرافيا الورق (CP).
- 2- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM).
- 3- كروماتوغرافيا الأعمدة وتشمل:
 - ✓ كروماتوغرافيا السائل ذو الكفاءة العالية (HPLC).
 - ✓ كروماتوغرافيا الغاز (G.C).
 - ✓ كروماتوغرافيا الأيونات (I.C).

5.1.II. تصنيف التقنيات الكروماتوغرافية:

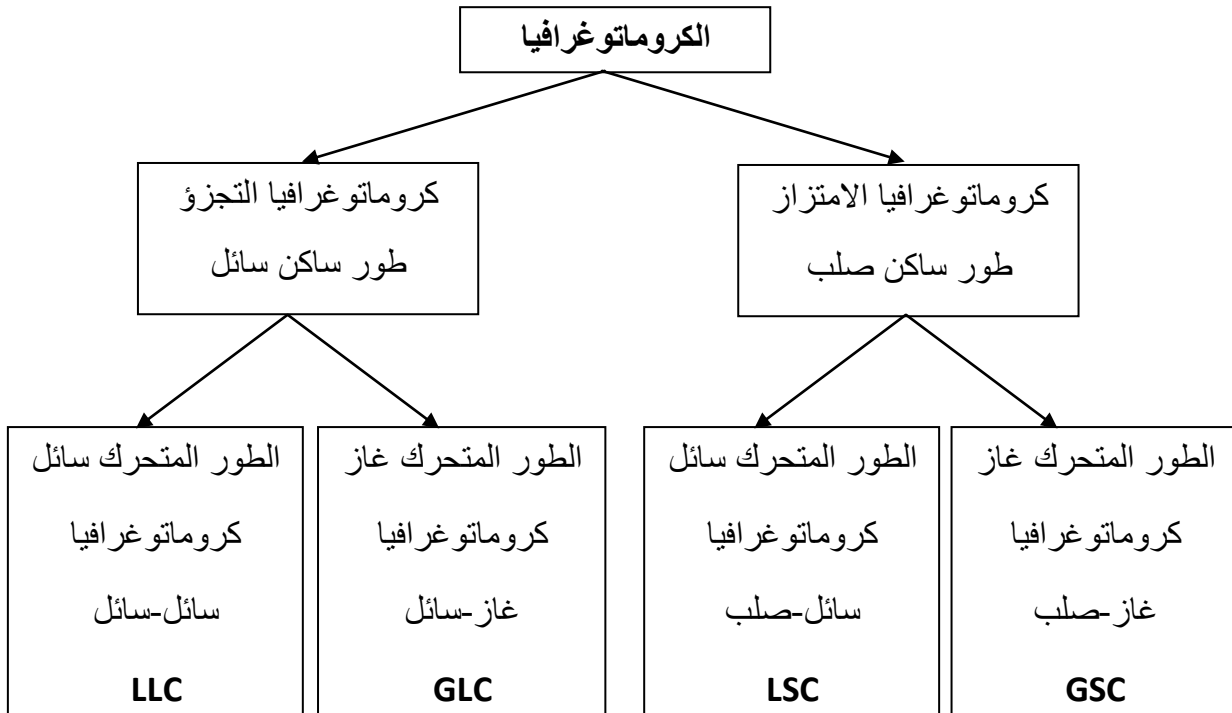
يمكن تصنيف التقنيات الكروماتوغرافية الى ثلاث أقسام مختلفة وهي:

1.5.1.II. تصنيف حسب الطبيعة الفيزيائية للطورين:

في هذا التصنيف يكون لدينا:

- الطور المتحرك يكون مائع فهو اذن سائل L أو غاز G أو مائع جد حرج FS.
- الطور الساكن يكون سائل L أو صلب S [8].

ترتيب هذه الإمكانيات تؤدي إلى إمكانيات كروماتوغرافية مختلفة نلخصها في المخطط التالي [9]:



الشكل (I-II): يوضح تصنيف مختلف التقنيات الكروماتوغرافية.

الكروماتوغرافيا جد حرجة FSC هي حالة وسطية بين LC وGC، و الموائع جد حرجة تملك خواص عند الحديد السائل و الغاز [10].

2.5.1.II. تصنيف حسب الظاهرة الكروماتوغرافية:

الظواهر الكروماتوغرافية التي تحدث خلال عملية الفصل تتعلق بطبيعة الطور الثابت و لهذا نميز مايلي:

✓ كروماتوغرافيا الإدمصاص: Chromatographie d'adsorption

في هذه الظاهرة يكون الطور الساكن مادة صلبة (s)، و تتضح هذه الظاهرة جليا من خلال الفصل الكروماتوغرافي الكلاسيكي على الأعمدة المعبأة أو على الطبقة الرقيقة للمركبات الجزيئية، و يعتمد مبدأ الفصل أساسا على الاختلاف في القطبية بين الطورين (المتحرك ، الساكن).

❖ بعض المواد المستعملة بكثرة للطورين:

كطور ساكن: هلام السيليكا، الألومينا، السليلوز.

كطور متحرك: الإيثير البترولي، الإيثانول، الميثانول، الماء [7,11].

✓ كروماتوغرافيا التوزيع: Chromatographie de partage

في هذه الظاهرة يكون الطور المتحرك عبارة عن سائل أو غاز، أما الطور الساكن فيكون سائل موضوع على دعامة خاملة و يكون غير قابل للمزج مع الطور المتحرك، و تعتمد هذه الظاهرة أساسا على الإختلاف في ذوبانية المواد و نسبة توزع المواد المراد فصلها بين الطورين، كما أنه قطبية الطورين تلعب دورا مهما بحيث يكون الطور الساكن قليل أو عديم القطبية، و الطور المتحرك يكون قطبي مثل الماء أو مزيج بين الماء و الميثانول [7].

✓ كروماتوغرافيا الإقصاء: Chromatographie d'exclusion

تم اكتشاف هذا النوع من الكروماتوغرافيا سنة 1950م من طرف العالمان Flodin و Porath، و في هذه الطريقة يكون الطور الساكن مسامي حيث يعبأ العمود بمادة هلامية gel يحتوي جزيئها الكبير جدا على تركيب يشبه الغربال و عند إمرار المواد المراد فصلها من خلالها يتم فصلها بناء على حجم جزيئاتها بطريقة تشبه عمل الغربال تماما، حيث تسمح للجزيئات ذات الأحجام الصغيرة بالمرور أو الإنتشار خلالها، أما الجزيئات ذات الأحجام الأكبر فلا يسمح لها بالمرور من خلال المسام و بالتالي تمر بسرعة خلال العمود و تخرج منه أولا دون أي إعاقة [12,13].

✓ كروماتوغرافيا التبادل الأيوني: Chromatographie ionique

يتم في هذه الظاهرة تبادل أيونات مادة صلبة غير قابلة للذوبان بأيونات أخرى لها نفس الشحنة و موجودة في الوسط المحيط، و يكون الطور الساكن حامل لمجموعات وظيفية حمضية أو أساسية خاصة بفصل المركبات الأيونية [8,14].

II.3.5.1. تصنيف حسب الطرق المستعملة:

على حسب صنع الطور الساكن نميز:

✓ كروماتوغرافيا العمود: يكون الطور الساكن محتوى داخل عمود اسطواناني من الزجاج أو معدن مثل CPG.

✓ كروماتوغرافيا الورق: يمثل الماء الممتز على جزيئات السيليلوز في الورق الطور الساكن بينما الورق كدعامة صلبة.

✓ كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM: الطور الساكن يكون مفرغ على سطح مستو (زجاج، ورق ألومنيوم، مادة بلاستيكية) و يغطي بطبقة رقيقة سمكها بين 0.2-0.3مم من هلام السيليلوز، سليلوز، الألومينا [8].

6.1.II. أنواع الطرق الكروماتوغرافية:

يعتمد تصنيف الطرق الكروماتوغرافية على نوع الطور المتحرك و الطور الساكن، كما يمكن تقسيمها بناء على ميكانيكية أو كيفية توزيع المواد المراد فصلها بين الطورين.

1.6.1.II الكروماتوغرافيا السائلة-الصلبة LSC:

تم اكتشاف هذا النوع من الكروماتوغرافيا من قبل العالم Tswett في سنة 1906م، و في هذا النوع الطور الساكن يتكون من مادة صلبة مثل هلام السيليكا أو الألومينا حيث تعبأ المادة الصلبة في عمود يمر من خلاله الطور المتحرك الذي هو عبارة عن سائل.

ميكانيكية توزيع المواد بين الطورين الساكن و المتحرك تعتمد على مدى قوة امتزاز المادة على سطح الطور الساكن الصلب، بحيث أن المادة التي تمتز بقوة أي تتأخر (تمكث مدة أطول في العمود)، بينما المادة ذات الإمتزاز الأقل تخرج من العمود في وقت مبكر، و هكذا يتم فصل المواد عن بعضها.

- جميع الطرق الكروماتوغرافية التي يكون فيها الطور الساكن عبارة على مادة صلبة تعتمد على ظاهرة الإمتزاز و لهذا تسمى بالطرق الكروماتوغرافية الإمتزازية.

2.6.1.II الكروماتوغرافيا السائلة-السائلة LLC:

تم اكتشاف هذا النوع من الكروماتوغرافيا عام 1941م من طرف العالمان Martin و Synge و نالا على أثره جائزة نوبل.

يتكون الطور الساكن من طبقة رقيقة من سائل أو من خليط من السوائل مثبتة على سطح مادة صلبة مسامية و خاملة مثل هلام السيليكا أو مسحوق السليلوز أو بعض البوليمرات مثل البولستيرين أو التفلون، أما الطور المتحرك فهو عبارة عن سائل آخر لا يذوب في الطور الثابت.

فصل المواد عن بعضها في هذه الطريقة يعتمد على مقدار ذوبانية المادة في الطور الساكن حيث أن المادة التي تذوب بشكل أكبر تتأخر أكثر و على العكس من ذلك المادة التي لا تذوب في الطور الساكن تخرج من العمود في وقت مبكر و بسرعة، و تسمى هذه الطرق بالطرق الكروماتوغرافية الذوبانية التجزيئية.

3.6.1.II الكروماتوغرافيا الغازية-الصلبة GSC:

استخدمت هذه الطريقة قبل عام 1800م لتنقية الغازات و لكنها لم تصبح شائعة و معروفة إلا في عام 1940م عندما وصفت تفصيليا بواسطة العلماء Hesse، Philips و Claesson و قد كان هذا النوع يعاني

من عدم توفر المواد الصلبة، و لكن البحث المستمر في هذا المجال أثمر عن تحضير أنواع جديدة من المواد الصلبة المناسبة للإستعمال كطور ساكن و بالتالي زادت إمكانيات تطبيقها و استخدامها، و تعتبر هذه الطريقة من الطرق الكروماتوغرافية الإمتزازية [12,13].

II.4.6.1. الكروماتوغرافيا الغازية-السائلة GLC:

تعتبر هذه الطريقة من أكثر الطرق الكروماتوغرافية استخداما، حيث أحدثت ثورة في مجال الكيمياء العضوية منذ أن أدخلها العالمان James و Martin عام 1952م، و مع بداية العام 1955 تم تصنيع الجهاز تجريبيا (جهاز CPG).

يمكن بهذه الطريقة فصل و اكتشاف كميات صغيرة جدا تصل في بعض الحالات الى 10-15g، و يكون فيها الطور المتحرك عبارة عن غاز خامل مثل النيتروجين N_2 أو الهيليوم He و الذي نسميه أحيانا بالغاز الحامل لأنه يحمل مكونات العينة المراد فصلها، أما الطور الثابت فهو عبارة عن طبقة رقيقة من سائل مثبت على دعامة صلبة و لهذا تعتبر هذه الطريقة من الطرق الكروماتوغرافية التجزيئية [15].

II.5.6.1. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني IEC:

هذا النوع من الكروماتوغرافيا تم اكتشافه عام 1940م من طرف العالمان Urey و Taylo و تعتبر هذه الطريقة نوع من الكروماتوغرافيا السائلة-الصلبة و يختص لفصل الأيونات، حيث أن الطور المتحرك سائل و الطور الساكن صلب، إلا أن ميكانيكية التوزيع لا تعتمد على الامتزاز و إنما تعتمد على التبادل الأيوني، حيث تستبدل المكونات الأيونية في العينة بأيونات لها نفس الشحنة مرتبطة بمسحوق المادة الصلبة المألثة لعمود الفصل، و هذا الاستبدال الأيوني ينتج عنه إعاقة لبعض مكونات العينة حيث يسهل فصلها [16].

II.6.6.1. الكروماتوغرافيا المستوية Chromatographie Planaire:

في هذا النوع من الكروماتوغرافيا يتحرك الطور المتحرك على سطح مستو بدلا من العمود، و تستخدم هذه الطرق غالبا للتحليل النوعي و هناك نوعان:

✓ كروماتوغرافيا الورقة CP:

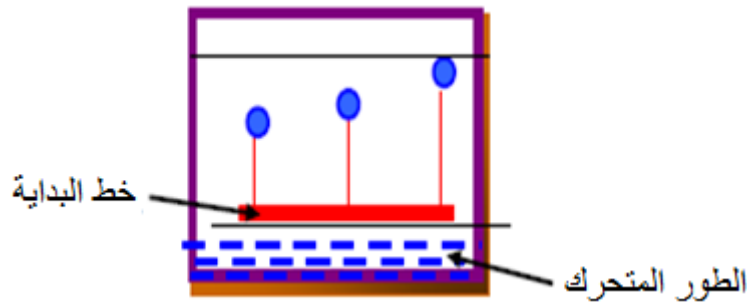
في هذا النوع من التحليل يعمل الورق كدعامة للطور الساكن السائل الموجود في مادة السليلوز، و بما أن الطور الساكن سائل فهي تصنف ضمن أنواع كروماتوغرافيا التجزؤ (الكروماتوغرافيا السائلة-السائلة).

عند وضع بقعة من محلول العينة (المادة المراد فصلها) على حافة هذه الورقة (على بعد 2 سم) و بعد جفاف العينة و السماح للطور المتحرك بالانتقال من خلال الورقة بالخاصية الشعرية مارا بالعينة، فإن العينة توزع نفسها بين الطورين اعتمادا على معامل التجزؤ و على هذا يتم الفصل [17].

يغطى حوض التحليل للتأكد من ثباتية درجة الحرارة للطور المتحرك و بالتالي حالة الإتزان، و يتم الفصل للعينات بعدة تقنيات نذكر منها التقنية الأكثر استخداما في المخابر و هي:

• التقنية الصاعدة:

هذه التقنية يمكننا تطبيقها لكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة أيضا. في هذه التقنية يوضع الطور المتحرك في قاع حوض التحليل و يتحرك الى أعلى الورقة بالخاصية الشعرية كما في الشكل الموالي [7]:



الشكل (II-2): يوضح التقنية الصاعدة.

✓ كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM:

الطور الساكن يكون عبارة عن طبقة رقيقة من مادة امتزاز ناعمة مطلية و مثبتة على قطعة من الزجاج أو الألمنيوم أو شريحة بلاستيكية.

هذه الطريقة تشبه الكروماتوغرافيا الورقة حيث أن الطور الساكن يكون صلبا و هي عبارة عن طبقة رقيقة من مادة امتزاز ناعمة مطلية و مثبتة على صفيحة من الزجاج أو الألمنيوم، وهناك العديد من المواد التي يمكن استخدامها كطبقة رقيقة منها: الألومينا، السليكا، مسحوق السليلوز $C_6H_{10}O_5$.

تتوقف عملية التظهير في هذه الطرق قبل وصول المواد المراد فصلها و الطور المتحرك الى الحافة العلوية للسطح المستوي المستخدم، و يستخدم مصطلح R_f معامل الإعاقة كوسيلة مهمة للتحليل النوعي.

$$R_f = \frac{\text{المسافة التي تتحركها المادة المراد فصلها من نقطة البداية}}{\text{المسافة التي يتحركها الطور المتحرك من نقطة البداية}} \quad (1. II)$$

وهذه التقنية من أكثر الطرق إنتشارا و خاصة في عمليات الفصل السريع و يرجع ذلك للآتي [18]:

- بساطة الطريقة و عدم الحاجة الى أجهزة معقدة.

- إمكانية الوصول الى فصل انتقائي باستخدام كواشف خاصة.
- إمكانية الوصول الى جودة الفصل نفسها التي تعطيها الطرق الكروماتوغرافية الأخرى.

7.1.II. مزايا الطرق الكروماتوغرافية عامة على طرق الفصل الأخرى:

- يمكننا إنجاز الفصل بالطرق الكروماتوغرافية بكفاءة عالية عندما تعجز الطرق الأخرى في فصل المواد المعقدة، و سبب ذلك أن أي فرق في قوى التجزؤ أو الإمتزاز يتضاعف كثيرا عند مرور العينة داخل النظام الكروماتوغرافي و كلما كانت المضاعفة عالية كانت كفاءة الفصل عالية.
- لا تتسبب الطرق الكروماتوغرافية في تفكك المواد المراد فصلها بمعنى أن المادة بعد فصلها يمكن الحصول عليها في حالتها الأصلية.
- استخدام كميات قليلة جدا من العينة لإنجاز الفصل (عدة ميكروليترات).
- التكلفة المنخفضة و بخاصة في حالة كروماتوغرافيا الورقة و الطبقة الرقيقة [19].

8.1.II. اختيار الطريقة المناسبة لفصل مادة ما:

حتى و لو كانت الطريقة التي سوف تستخدم منطقية مثل فصل الغازات بكروماتوغرافيا الغاز، يتم اختيار الطريقة المناسبة بطريقة تجريبية. الجدول الموالي يوضح قائمة ارشادية تقريبية [19]:

جدول (I-II): يوضح قائمة ارشادية لإختيار الطريقة الكروماتوغرافية المناسبة لفصل مادة ما.

طبيعة المواد المراد فصلها	الطريقة المناسبة
مواد متشابهة في الخواص الكيميائية	كروماتوغرافيا التجزؤ
مواد مختلفة في الخواص الكيميائية	كروماتوغرافيا الامتزاز
مواد متطايرة	كروماتوغرافيا الغاز
مواد غير متطايرة	كروماتوغرافيا السائل ذو الكفاءة العالية
مواد متآينة وغير عضوية	كروماتوغرافيا التبادل الأيوني أو الكروماتوغرافيا المستوية
فصل المواد المتآينة من غير المتآينة	كروماتوغرافيا التبادل الايوني
المواد البيولوجية والمركبات ذات الأوزان الجزيئية العالية	كروماتوغرافيا الترشيح بالجل

بعد القيام بدراسة عامة حول طرق الفصل الكروماتوغرافية، سنخصص الدراسة في الجزء الموالي حول الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC.

2.II. الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC:

فكر الباحثون في تطوير تقنية الكروماتوغرافيا السائلة على الأعمدة الكلاسيكية و ذلك لأن عملية الفصل و التحليل بواسطتها تستغرق عدة ساعات، حيث توصلوا الى تقنية عالية الجودة و التي تسمى بكروماتوغرافيا السائلة ذات الضغط العالي أو الكفاءة العالية، و تم هذا التطوير بإدخال نظام جديد للحقن (الحقن بواسطة الصمام) و ادخال مضخات حديثة لضخ الطور المتحرك بمعدل ثابت، كما تم ادخال كواشف حديثة للكشف على المواد لحظة خروجها من العمود و عليه نجد أن الفصل و التحليل يتم في دقائق معدودة [20].

1.2.II. دراسة نظرية للكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء:

تسمح الكروماتوغرافيا السائلة بتحقيق تحاليل لم يتم تحقيقها سابقا مع تقنيات الطبقة الرقيقة، أو بإستخدام كروماتوغرافيا الطور الغازي، و في الأصل تقوم الكروماتوغرافيا السائلة على أعمدة الزجاج (حاوية للطور الساكن) و السائل الذي يمر بالعمود يكون ذو ضغط منخفض، و من أجل الزيادة في تدفقه طبق عليها ضغط مرتفع و لهذا سميت بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC [6].

2.2.II. المبدأ:

يعتمد مبدأ الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي على حدوث عدة ظواهر (الإدمصاص، التبادل الأيوني)، حيث يكون الطور المتحرك سائل يمر عبر عمود معبأ بالطور الساكن والذي يكون من مادة صلبة مثل السيليس [6].

✓ في لحظة أولية يتم حقن خليط مراد فصله داخل العمود ويدفع بالطور المتحرك، ويتم فصل المزيج حسب زمن الاستبقاء

3.2.II. نظام الفصل بالمذيبات:

1.3.2.II. الفصل بنظام مذيب ثابت: Système isocratique

في هذا النظام يتم الفصل بإستخدام طور متحرك من مذيب واحد فقط أو نسبة ثابتة لمزيج من المذيبات لا تتغير طوال عملية التحليل.

II.2.3.2. الفصل بنظام مذيبات بنسب متغيرة: Système gradient

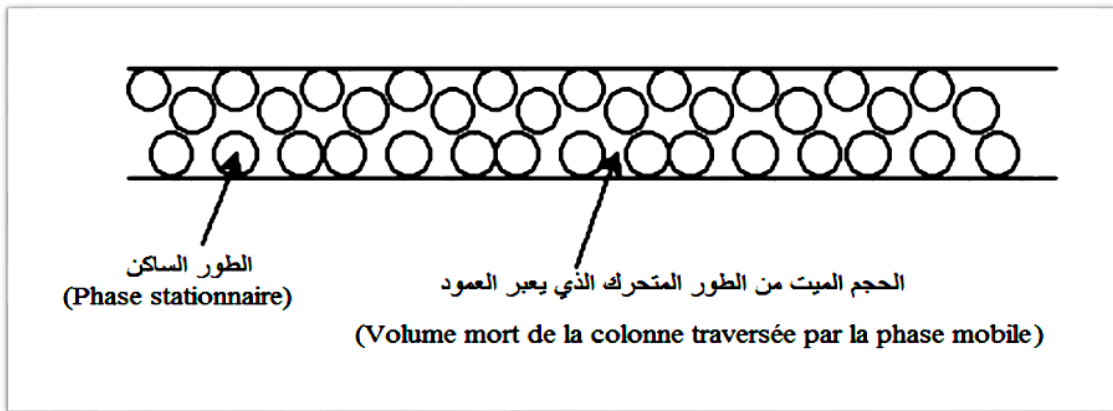
في هذا النظام يتم الفصل باستخدام مذيبين أو مجموعة من المذيبات تتغير نسبتها الى بعضها بمرور زمن التحليل، و هذا النظام مفيد جدا حالة فصل خليط من المركبات التي تختلف عن بعضها في خصائصها الطبيعية، حيث يتم تغيير نظام المذيب من خليط ضعيف القطبية الى خليط عالي القطبية أو العكس ليعطي فرصة للمركبات المختلفة أن تخرج بالكامل و تفصل في زمن قصير [21].

II.4.2. مفاهيم أساسية:

II.1.4.2. الأطوار:

✓ الطور الساكن و الطور المتحرك:

أطوار صلبة عادية: و تمثل الطور الساكن و هي عبارة على دعامة صلبة مغلفة بمادة هلامية مثل: gel de silice و في هذه الحالة يكون الطور المتحرك غير قطبي أو قليل القطبية. اذا كانت المادة الصلبة غير طبيعية (طور معاكس) بمعنى يكون العمود يحتوي على مادة غير قطبية و بالتالي يكون الطور المتحرك قطبي مثل: الماء، الكحول [6].



الشكل (II-3): يوضح عمود الفصل.

II.2.4.2. مفهوم الزمن و الحجم:

✓ زمن المكوث:

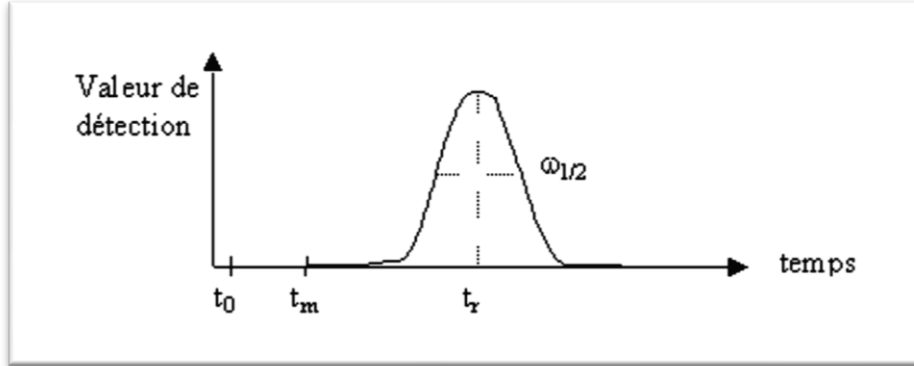
يسمى الزمن اللازم للمادة لكي تمر عبر طول العمود L أي الزمن المستغرق من بدء مرور الطور المتحرك و حتى خروج المادة من العمود بزمن المكوث أو الاستبقاء و يرمز له بالرمز t_r [6].

$$t_r = \frac{L}{r} = \frac{L}{u} (1 + K) = t_m (1 + K) \quad (2. II)$$

t_m : الزمن المستغرق لمرور الطور المتحرك دون خروج المادة.

K : معامل السعة. u : سرعة الطور المتحرك.

t_0 : زمن بداية الحقن. L : طول العمود.



الشكل (4-II): كروماتوغرام يبين الزمن و عرض القمة.

✓ حجم المكوث:

يعرف حجم المكوث بأنه حجم الطور المتحرك اللازم لتمرير و إخراج المادة من العمود، و اذا كان معدل تدفق الطور المتحرك f بوحدة الحجم ثابتا يمكن حساب حجم المكوث V_r [6].

$$V_r = t_r \times f \quad (3. II)$$

و بالتعويض على قيمة t_r في المعادلة (2.I) نجد:

$$V_r = t_m(1 + K)f \quad (4. II)$$

و لكن لدينا:

$$V_m = t_m \times f \quad (5. II)$$

و عليه تصبح العلاقة (3.II.) من الشكل:

$$V_r = V_m(1 + K) \quad (6. II)$$

3.4.2.II. معامل التوزيع:

يعتمد توزيع جزيئات المادة بين الطورين على معامل التوزيع و الذي يرمز له بالرمز D .

ويعطى معامل التوزيع D كالتالي [6]:

$$D = \frac{C_s}{C_m} \quad (7. II)$$

C_s : تركيز المادة في الطور الساكن.

C_m : تركيز المادة في الطور المتحرك.

إذا كانت قيمة معامل التوزيع كبيرة فإن أغلب جزيئات المادة توجد في الطور الساكن و لهذا فان المادة تمكث مدة أطول في العمود و العكس صحيح، و أن الجزء من الزمن الكلي الذي يقضيه جزيء المادة في الطور المتحرك t يتناسب طرديا مع الجزء من الكمية الكلية من تلك المادة الموجودة في الطور المتحرك كالتالي [23,22]:

$$t = \frac{\text{عدد الجزيئات في الطور المتحرك}}{\text{العدد الكلي للجزيئات}} = \frac{C_m V_m}{C_m V_m + C_s V_s} \quad (8. II)$$

$$t = \frac{1}{1 + D \frac{V_s}{V_m}} = \frac{1}{1 + K} \quad (9. II)$$

حيث أن K معامل السعة و يمثل النسبة بين كمية المادة في الطور الساكن φ_s ، و كمية المادة في الطور المتحرك φ_m .

V_s : حجم الطور الساكن.

V_m : حجم الطور المتحرك أو الحجم الميت.

4.4.2.II مفهوم الفعالية:

تتعلق فعالية الفصل بطول السن، و كلما تحصلنا على عدد الأسنان كبير كانت فعالية الفصل أكبر. تقاس الفعالية عن طريق [6]:

✓ حساب عدد الطبقات النظرية N_{th} :

كلما كان عدد الطبقات النظرية كبيرة كان الفصل جيد.

$$N_{th} = 5.54 \left(\frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right)^2 \quad (10. II)$$

t_r : زمن المكوث.

$\omega_{1/2}$: عرض نصف القمة.

كما يمكن حسابها أيضا بالعلاقة التالية:

$$N = 16(t_r/\omega)^2 \quad (11. II)$$

✓ سمك الطبقة :

تتناسب كفاءة عمل العمود طرديا مع زيادة عدد الصفائح النظرية و بالتالي نقصان سمك الطبقة.

$$HEPT = \frac{L}{N_{th}} \quad (12. II)$$

L: طول العمود.

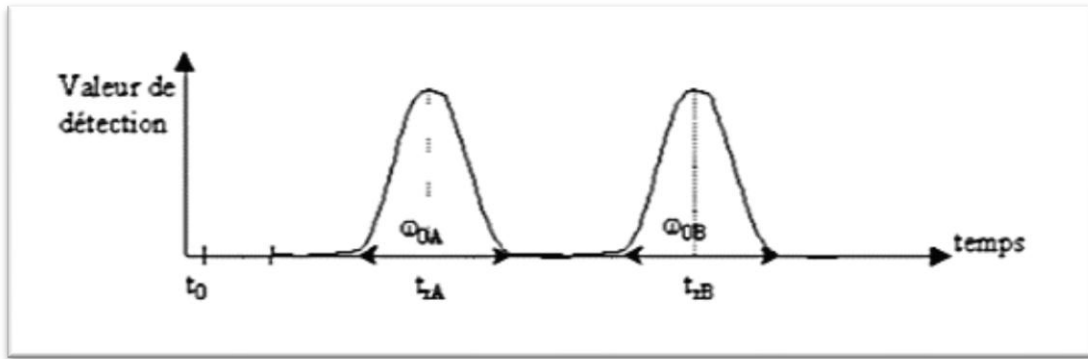
N_{th} : عدد الطبقات النظرية.

5.4.2.II. جودة الفصل:

تحدد جودة الفصل بعامل الإنتقائية α و درجة الفصل R [6].

✓ معامل الإنتقائية α : يكون دائما أكبر من 1 لأننا نختار $t'_{rB} > t'_{rA}$.

$$\alpha = \frac{t'_{rB}}{t'_{rA}} \quad (13. II)$$



الشكل (5-II): كروماتوغرام ذو قمتين.

✓ درجة الفصل R:

لمعرفة درجة فصل العمود نحسب المعامل R و يعرف بالمعادلة التالية:

$$R = \frac{t'_{rB} - t'_{rA}}{(\omega_{0B} - \omega_{0A})} \quad (14. II)$$

إذا كان لدينا:

$R < 1$: فصل رديء.

$1 < R < 1,4$: فصل مقبول.

$1,4 < R < 1,6$: فصل جيد.

$R > 1,6$: فصل ممتاز.

5.2.II. الظواهر الكروماتوغرافية التي تحدث خلال عملية الفصل:

هناك العديد من الظواهر الكروماتوغرافية التي تحدث خلال عملية الفصل في الكروماتوغرافيا السائلة

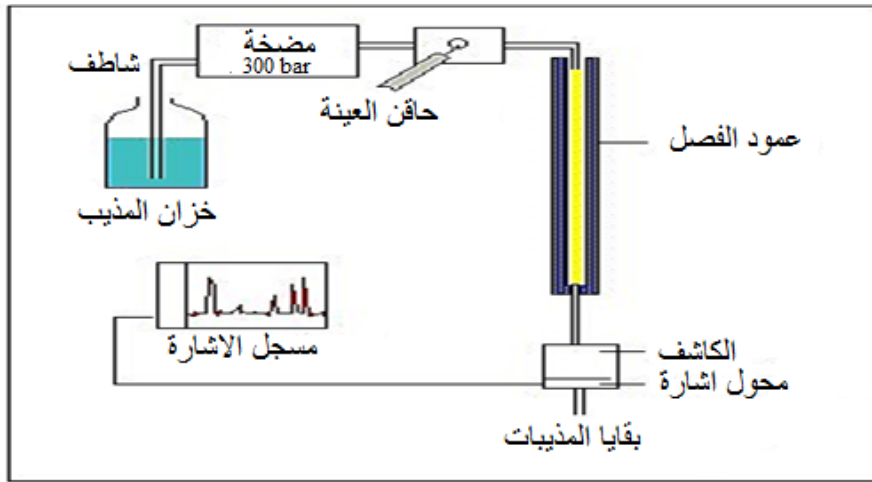
و هي [6]:

- ظاهرة الإدمصاص.
- ظاهرة التوزيع (تحدث بنسبة 80%).
- ظاهرة التبادل الأيوني.
- ظاهرة الإقصاء.

6.2.II. جهاز التحليل الكروماتوغرافي HPLC:

1.6.2.II. مكونات جهاز التحليل الكروماتوغرافي HPLC:

ان متطلبات جهاز التحليل الكروماتوغرافي بالسائل بسيطة حيث تتطلب خزان للمذيب و مضخة لسحب المذيب من الخزان و دفعه خلال العمود كما تتطلب حاقن لإدخال العينة المراد تحليلها و عمود لإجراء الفصل و أخيرا كاشف و مسجل لكشف المركبات المراد تحليلها و تسجيل النتائج المتحصل عليها، و معظم مكونات الجهاز مصنعة من مواد صلبة أو من التيفلون و ذلك لتجنب تأثير المذيبات المستخدمة على مكونات الجهاز. و يستعرض الشكل التخطيطي التالي ترتيب مكونات جهاز الـ HPLC:



الشكل (6-II): رسم تخطيطي لجهاز التحليل الكروماتوغرافي بالسائل HPLC.

1- الخزان (الطور المتحرك):

خزان الطور المتحرك مكون من خزانين (أي أنه يمكن استعمال مذيب واحد أو اثنين كطور متحرك) مصنوعين من الزجاج و متوسط سعتهما 2.5L، و اختيار نوع المذيب المستخدم في عملية الفصل الكروماتوغرافي تعتمد على طبيعة العينة المراد تحليلها، و تعتمد أيضا على نظام الفصل المستخدم في الجهاز هل هو النظام العادي أم النظام المعكوس [21].

❖ شروط اختيار المذيب كطور متحرك:

- ✓ يجب أن يكون المذيب المستخدم كطور متحرك لإزاحة المركبات المراد فصلها على درجة عالية من النقاوة لإمكانية تكرار النتائج المتحصل عليها.
- ✓ كما يجب أن يكون المذيب خاليا من الجزيئات الغير ذائبة و لذلك يجب ترشيحه باستخدام مرشح دقيق المسام للتخلص من الجزيئات حتى لا تسد العمود أو تعيق سريان الوجه المتحرك أو تتفاعل مع المادة المراد تحليلها.
- ✓ أن لا يخرج المكونات من العمود بسرعة لأن ذلك لن يؤدي الى فصلها [25,24,12].

2- المضخات:

من المعروف أن الفرق بين أعمدة التحليل الكروماتوغرافي المفتوحة و الأخرى المستخدمة في جهاز HPLC هو أن هذه الأخيرة يكون فيها حبيبات المادة المدعمة للطور الساكن صغيرة جدا لزيادة كفاءتها في الفصل، كما أنه تكون معبأة تحت ضغط عالي جدا، و لذلك لا يمكن أن يمر المذيب المستخدم في عملية الإزاحة من خلال هذه الأعمدة بدون عملية سحب أو ضخ بواسطة مضخة و تحت تفريغ أيضا، و قد وجد أنه عندما تكون حجم حبيبات المادة الصلبة المألثة للعمود في حدود 3-10 ميكرون و معدل سريان الطور المتحرك المطلوب في حدود 0.1-10 ml/min فإننا نحتاج الى مضخة تعمل تفريغ حتى 400bar.

3- وحدة الحقن:

يتم فيها حقن العينات المراد فصلها بواسطة ابرة خاصة ذات حجم 25µL، تقوم وحدة الحقن بتأمين حجم حقن ثابت حيث يخرج الفائض منها الى الخارج.

يوجد خمسة أنظمة لحقن العينات في التحليل الكروماتوغرافي بالسائل و هي [21]:

- نظام الحقن أثناء سريا المذيب.
- نظام الحقن عند توقف سريان المذيب.
- نظام الحقن من خلال الصمام.
- نظام الحقن من خلال سدادة.
- نظام الحقن من خلال سرنجة ليس بها سدادة.

4- الأعمدة (الطور الساكن):

يعتبر العمود القلب النابض في الجهاز حيث تتم على مستواه عملية الفصل و يكون مثبت داخل فرن مغلق معبأ من الداخل بحبيبات المادة الصلبة، و هو الذي يعيق الحركة و يعمل على فصل مكونات الخليط، فنظرا لوظيفته الأساسية في الفصل هناك بعض الإحتياطات اللازم مراعاتها عند اختيار الطور الثابت و المتمثلة في [26,21]:

✓ عدم ذوبانه في المذيبات التي تتدفق من خلال العمود.

✓ عدم تفاعله كيميائيا مع هذه المذيبات أو مع مكونات الخليط المراد فصله.

✓ أن يكون له فعالية امتزاز جيدة.

✓ مساحة سطح حبيباته كبيرة بالنسبة لحجمها.

فقد أمكن التوصل الى أفضل الشروط لتعبئة المواد الصلبة في العمود و هي أن تكون حبيبات المادة المكونة للطور الثابت صغيرة من حجم الميكررون التي تؤمن للعمود كفاءة فصل عالية [25,24].

5- الفرن:

معظم عمليات الفصل باستخدام جهاز التحليل الكروماتوغرافي بالسائل تتم عند درجة حرارة المخبر، و لكن بعض عمليات التحليل و خاصة عند تحليل المواد ذات الوزن الجزيئي العالي مثل الستيرويدات فيتم تحسين فصلها برفع درجة حرارة العمود و ذلك لزيادة كفاءة الفصل، و يتم التحكم في درجة حرارة العمود بأكثر من طريقة كاستخدام فرن يعطي هواء ساخن.

6- الكشاف:

العامل المحدد لاختيار نوع الكشاف المستخدم هو مدى حاجتنا الى حساسية و ثبات المركبات عند ظروف التحليل المستخدمة و امكانية تكرار النتائج، و يستخدم كشافات تعتمد على أساس الاستجابة الاختيارية للمادة المراد تحليلها دون الاستجابة لمادة الطور المتحرك.

7- نظام التفريغ:

يشترط في نقاوة المذيب أن يكون خالي من الشوائب لذلك تكون الخزانات في العادة مزودة ببعض الوسائل التي تساعد على التخلص من الغازات الذائبة في المحاليل تظهر على شكل فقاعات هوائية وهذه تتسبب في ظهور اشارات تحليلية غير مرغوب فيها.

8- أنظمة التحكم و التسجيل:

تعتبر هذه الأنظمة من المكونات الجانبية و التي تتواجد في الأجهزة الحديثة، حيث تحتوي على مكون خارجي يحتوي على بعض المعدات مثل الحاسوب الآلي و وظيفتها الأساسية التحكم و السيطرة على تثبيت الشروط اللازمة للحصول على النتائج المرغوب فيها مثل: (سرعة السريان، الضغط، معدل

التدفق)، و تسجيل النتائج بأخذ الاشارة من الكاشف لإعطاء كروماتوغرام يستخدم لتحديد زمن المكوث لكل مركب و كمية العينة [21].

خلاصة:

تم التطرق في هذا الفصل الى مختلف الطرق الكروماتوغرافية عامة و خصصت الدراسة حول الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC و هي الطريقة التي تمت بواسطتها دراسة هذا الموضوع و في الفصل الموالي و هو الفصل العملي سنقوم بتطبيق هذه التقنية الحديثة تحت ظروف و شروط تجريبية مدروسة.

المراجع

المراجع باللغة العربية

[1] حسان أمين و حسن الحازمي : «الكيمياء العضوية العملية» . مطابع جامعة الملك سعود ، 1987م.

[12] عبد الغني حمزة و محمد أحمد آشي و عبد الفتاح بسطاوي و عبد العزيز السباعي و توفيق عميرة : «الكيمياء التحليلية بعض الأسس النظرية لطرق التحليل الآلي» مطابع جامعة الملك عبد العزيز - جدة ، 1986م .

[21] الأستاذ الدكتور أحمد خميس محمد سلامة، «أجهزة التحليل الطيفي و الكروماتوغرافي» ، قسم كيمياء المبيدات بجامعة الإسكندرية ، 2006.

[22] محمد الحوراني : «الكيمياء التحليلية أسسها و مبادئها» دار الضياء للنشر و التوزيع ، 2002م.

[26] حسان أمين و حسن الحازمي : «الكيمياء العضوية العملية» . مطابع جامعة الملك سعود ، 1987م.

المراجع باللغة الأجنبية

- [2] SETTLE F., BROWN PH., DE ANTONOIS K., HALL P «Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry", "High Performance Liquid Chromatography». 1997.
- [3] Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, John W. Dolan, Introduction to modern liquid chromatography, Printed in the United States of America, 2010, ISBN 978-0-470-16754-0 (cloth).
- [4] www.waters.com,05-01-2016
- [5] <http://www.people.umass.edu/~mcclemen/581Carbohydrates.html>,24-04-2013
- [6] <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9>,26-11-2015
- [7] Edith ANTONOT ., Robert MARCHAL, «chromatographie», Lycée Louis Vincent – METZ, 1998.
- [8] V. JACOB, «Principes généraux de la chromatographie», IUT de Chimie de Grenoble 2009.
- [9] Marie Paule Bassez, « La chromatographie en phase liquide CLP »
<http://chemphys.ustrasbg.fr/mpb>,06-04-2016
- [10] Dr Thierry BRIERE, «cours de chromatographie liquide», Département de Chimie, Université de La Réunion.
- [11] S.Suzanne Nielsen, «Food Analysis», Purdue University, West Lafayette Indiana, 2003.
- [13] Csaba Horvath, «High Performance Liquid Chromatography». Academic Press-New York,1980.

[14] Day-Lewis, C.M.J.; Schaffler, K.J. HPLC of Sugars: The Analytical Technique for the 1990's?, Proceed-ings of the Fourth African Sugar Technologists Association, Durban, Natal, South Africa, 1990.

[15] Jayaprakasha GK, Jena BS, Negi PS, Sakhariah KK Evaluation of Antioxidant Activities and Antimutagenicity of Termic Oil: A Byproduct from Curcumin Production. Z Naturforsch 57c,(2002).

[16] CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. Détermination des anions: méthode par chromatographie ionique, MA. 300 – Ions 1.3, Rév. 3, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, 2014.

[17] D. Keilin .; E. F. Hartree ., S. M. Partridge, With A Note By R. G. Westall, Filter-Paper Partition Chromatography Of Sugars, General Description And Application To The Qualitative Analysis Of Sugars In Apple Juice, Egg White And Foetal Blood Of Sheep, Low Temperature Station For Research In Biochemistry And Biophysics, University Of Cambridge (Received 9 June 1947).

[18] Richard D.Fell, «The Qualitative And Quantitative Analysis Of Insect Hemolymph Sugars By High Performance Thin-Layer Chromatography», Camp.Biochem .PHysiol. No.4, 1990, Printeidn G Reatb Retain.

[19] <http://www.makktaba.com/2013/02/Book-chromatographic-methods.html>, 05-01-2016

[20] Francis Rouessac, Annick Rouessac avec la collaboration de Daniel Cruché, «Analyse chimique», Méthodes et techniques instrumentales modernes, Cours et exercices corrigés, Dunod, Paris, 2004.

[23] Robert L. Pecsok L. Donald shields, Thomas Cairns, Jan G. Mc William, Modern Methods of Chemical Analysis. John Wiley and Sons- New York, 1976.

[24] Hamilton R. J., Sewell P. A., Introduction To High Performance Liquid Chromatography. Chapman And Hall, London, 1982.

[25] Sandie Lindsay, «High Performance Liquid Chromatography». John Wiley And Sons, New York, 1992.

الجزء العلى

الفصل الثالث

التقدير الكيفي و الكمي

لكولستيرول

تمهيد :

ان اختيار أنسب الطرق لتحليل مركب معين أو خليط من المركبات بواسطة جهاز التحليل الكروماتوغرافي بالسائل عملية معقدة و ليست بسيطة، حيث أنها تعتمد على عدة عوامل مثل قطبية المركبات و حالة التآين. و يتميز جهاز الـ HPLC بمرونة كبيرة جدا حيث يمكن استخدام طرق فصل مختلفة على نفس الجهاز بمجرد تغيير العمود (الطور الساكن) أو تغيير كل من العمود و الطور المتحرك. و في هذا الفصل سنقوم بالتقدير الكيفي و الكمي للكولستيرول في العينات التالية: زيت تجاري، زبدة تجارية، زبدة معز، لحم خروف، بلازما الدم .

1.III. دراسة الظروف المؤثرة على تقدير الكولستيرول:

قبل القيام بالتقدير الكيفي و الكمي للكولستيرول في العينات المختارة من أجل التحليل لابد من دراسة الظروف المؤثرة على تقديره و المتمثلة في: درجة الحرارة، تركيب الطور المتحرك، طول موجة المقدر و سرعة تدفق الطور المتحرك، و يكون ذلك باستخدام الجهازين; جهاز الفصل الكروماتوغرافي ذو الأداء العالي HPLC و جهاز الأشعة فوق بنفسجية Spectrophotomete.UV-visible . و قد تمت دراسة كل هذه الظروف دراسة وافية و مستفيضة سابقا و تم تحديد أفضل الظروف التي يجب استخدامها و كانت كالتالي:

درجة الحرارة: 30 درجة مئوية.

الطور المتحرك: 100 % ميثانول.

الطول الموجي: $\lambda=210$ nm .

معدل تدفق الطور المتحرك: 2 ml/min .

2.III. التقدير الكيفي:

قمنا بالتقدير الكيفي للكولستيرول بالطريقتين التاليتين:

1- تجارب لونية:

✓ تفاعل ليبرمان – بيرخارد.

✓ تفاعل سالكوسكي.

2- استخدام جهاز Spectrophotometre UV-visible من أجل تحديد الطول الموجي λ .

✓ الأجهزة، المحاليل و الأدوات المستخدمة :

- كوليستيرول نقي $C_{27}H_{46}O$.
- حمض الكبريت المركز H_2SO_4 .
- حمض الخل المركز CH_3COOH .
- محلول الدهن خاص بكل عينة.
- جهاز المبخر الدوار.
- فرن تجفيف.
- فرن كهربائي، محرك مغناطيسي لإتمام عملية الخلط.
- ميزان حساس.
- استخدام جهاز Spectrophotometre UV-visible
- أنابيب اختبار، كأس بيشر، أنبوب مدرج، قمع، ورق ترشيح.

1.2.III. التجارب اللونية:

1.1.2.III. تفاعل ليبرمان – بيرخارد:

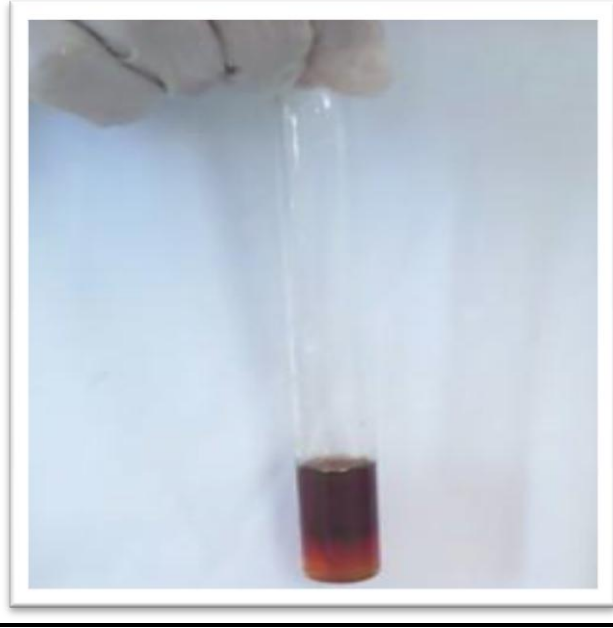
هذا التفاعل يتم بأخذ 3ml من محلول الدهن و وضعها في أنبوبة اختبار و إضافة 10 قطرات من حمض الخل المركز CH_3COOH ، ثم يضاف 3ml من حمض الكبريتيك المركز H_2SO_4 فإذا ظهر لون أحمر ما يلبث أن يتقلب إلى اللون الأخضر المزرق دل ذلك على وجود الكوليستيرول.



الشكل (1-III): توضح تفاعل ليبرمان-بيرخارد لعينة الزبدة التجارية.

2.1.2.III. تفاعل سالكوسكي:

هذا التفاعل يتم بأخذ 3ml من محلول الكولستيرول و وضعها في أنبوبة اختبار و إضافة 10 قطرات من حمض الخل المركز CH_3COOH ، ثم 3ml من حمض الكبريتيك المركز H_2SO_4 ، ثم يتم تعريض المحلول بهدوء للحرارة عند $80-90^\circ\text{C}$ مدة من 3 الى 5 دقائق، فإذا تكون لون أحمر ثابت دل ذلك على وجود الكولستيرول.



الشكل (2-III): توضح تفاعل سالكوسكي لعينة زبدة الماعز.

2.2.III. استخدام جهاز Spectrophotometre UV-visible

نقوم بتحضير العينات و ذلك بمعالجتها معالجة كيميائية.

1.2.2.III. تحضير عينات الدراسة:**1- عينة المحلول القياسي:**

من أجل تحديد الطول الموجي الأعظمي λ_{max} للكولستيرول قمنا بالتالي:

1- تحضير محلول قياسي انطلاقا من الكولستيرول النقي ذو تركيز $C=16.667\text{mg/dl}$

2- تمرير العينة في جهاز Spectrophotometre UV-visible

3- وجد أن الطول الموجي الأعظمي $\lambda_{\text{max}}=210\text{ nm}$



الشكل (3-III): قارورة الكولستيرول القياسي.

2- عينتي الزبدة:

أخذنا من أجل القيام بهذه التجربة عينتين من الزبدة ; زبدة من أصل حيواني (زبدة ماعز)، و النوع الآخر من أصل نباتي (زبدة صول)، و تمت معالجة هذه العينات المختارة معالجة كيميائية بالشكل التالي:

أزبدة تجارية:

1-تم اذابة كمية من الزبدة (A) بواسطة الحرارة ($30C^{\circ}$)، ثم قمنا بتبريدها فنلاحظ انفصال الماء على الدهن.

2-وزن كمية 1.05 غ من A و تم إذابتها في 10 مل من الميثانول.

3-وضع المزيج تحت الخلط و تحت درجة حرارة ($30C^{\circ}$) لمدة 3 ساعات.

4-نترك المزيج يرتاح حتى الحصول على طبقتين.

5-نقوم بفصل المزيج و من ثم نأخذ كمية من الطبقة العلوية (تمثل العينة المراد تحليلها).

6- نمرر العينة في الجهاز Spectrophotometre UV-visible

ب-زبدة الماعز:



- 1-قمنا بمزج كمية من زبدة الماعز الذائبة مع حجم من الماء المقطر (عملية غسيل للعينة).
- 2-وضع المزيج في قمع فصل، نتخلص من الطبقة المائية و نأخذ الطبقة الدهنية ثم نقوم بتبريدها.
- 3-نزن كتلة 1 غ من الدهن و إذابته في 10 مل من الميثانول.
- 4-وضع المزيج تحت الخلط و تحت درجة حرارة (30C°) لمدة 3 ساعات.

الشكل (4.III): زبدة الماعز.

5-نتترك المزيج يرتاح حتى الحصول على طبقتين.

6-نقوم بفصل المزيج و نأخذ كمية من الطبقة العلوية (تمثل العينة المراد تحليلها).

7-نقوم بأخذ عينة ونمررها عبر جهاز Spectrophotometre UV-visible

3- زيت تجاري:

أخذنا من أجل القيام بهذه التجربة عينة من زيت ايليو و تم تحضير العينة على النحو التالي:

- 1-قمنا بمزج 5 مل من الزيت مع 15 مل من الميثانول.
- 2-ترك المزيج تحت الخلط و تحت درجة حرارة تقدر بـ (30C°) لمدة 3 ساعات.
- 3-نقوم بفصل المزيج المتحصل عليه و من ثم نأخذ كمية من الطبقة العلوية (تمثل العينة المراد تحليلها).
- 4-نمرر العينة في جهاز Spectrophotometre UV-visible

4- عينة اللحم:

من أجل القيام بهذه التجربة نأخذ عينة من لحم الخروف الطازج و تم تحضير العينة تبعا للخطوات التالية:

- 1-وزن 25 غ من اللحم الطازج و فرمه بواسطة خلاط كهربائي.
- 2-إضافة 50 مل من الميثانول للحم المفروم.
- 3-خلط المزيج لمدة 24 ساعة و تحت درجة حرارة تقدر بـ 30C° لمدة نصف ساعة.

4- نقوم بترشيح العينة.

5- نأخذ كمية من الرشاحة ونمررها في جهاز Spectrophotometre UV-visible.



الشكل (5.III): لحم الخروف.

3.2.2.III. ملخص النتائج المتحصل عليها:

جدول (1-III): يوضح نتائج متحصل عليها لعينات الدراسة.

الامتصاصية	الطول الموجي λ (nm)	الطول الموجي ، الامتصاصية عينات الدراسة
0.96	210	كولستيرول نقي
0.741	210	زبدة صول
0.408	210	زبدة الماعز
1.585	210	زيت ايليو
1.807	210	لحم الخروف

من خلال الجدول (1.III) المبين أعلاه نلاحظ وجود امتصاصية عند الطول الموجي $\lambda=210\text{nm}$ و لو اختلفت قيمه في حدود [1.807-0.741] و بالتالي نستنتج بأن عينات الدراسة تحتوي على الكولستيرول.

3.III. التقدير الكمي:

بعد ملاحظة وجود الكولستيرول في عينات الدراسة و ذلك من خلال التجارب اللونية و التأكد بواسطة جهاز Spectrophotometre UV-visible، قمنا بالتحليل الكمي و كان ذلك بإستخدام جهاز الفصل الكروماتوغرافي السائل ذو الكفاءة العالية HPLC و تمت هذه الدراسة في مخبر الموارد الصحراوية ترقيتها و تكنولوجيتها (VTRS) المتواجد بجامعة الشهيد حمه لخضر بالوادي.

1.3.III. مكونات جهاز الفصل الكروماتوغرافي السائل ذو الكفاءة العالية HPLC :

✓ جهاز HPLC الذي أستعمل من أجل الدراسة هو من تصنيع شركة SHIMADZU و يتكون من الوحدات التالية:

✓ نظام التفريغ (طارد الغازات): نظام التفريغ من النوع DGU-20A₃

✓ المضخة: مضخة ميتانول نوعها LC-10AT

✓ العمود: عمود من النوع ODSVP C18

✓ الكاشف: كاشف الأشعة فوق البنفسجية (UV) و تصل حساسيته إلى ما يقارب $10^{-6}M$ ، وهو ذو طول موجة ثابت أي أنه لا يحدد بنفسه الطول الموجة المخصصة للعينة المراد فصلها و هو

من نوع SPD-20A

2.3.III. طريقة عمل جهاز HPLC:

يتلخص العمل على جهاز الـ HPLC بحقن حجم $20\mu l$ من العينة المذابة في المذيب المناسب و المتمثل في الميتانول CH_3OH و هو الطور المتحرك الموجود بخزان خاص بالجهاز، و يمر المذيب بواسطة مضخة في عمود معبأ بالطور الساكن، و من ثم إلى الكاشف و المسجل لكشف المركبات المطلوب تحليلها و تسجيل النتائج المتحصل عليها.

3.3.III. تحضير عينات الدراسة:**✓ الأجهزة و الأدوات المستعملة:**

تم تجهيز جميع الأجهزة و الأدوات اللازمة للقيام بهذا العمل و هي كالتالي:

- 1- جهاز الـ HPLC.
- 2- جهاز التبخير الدوار Rotavapeur.
- 3- فرن تجفيف.
- 4- محرك مغناطيسي لإتمام عملية الخلط.
- 5- ميزان حساس.
- 6- كأس بيشر، أنبوب مدرج، قمع، ورق ترشيح.
- 7- ابرة دقيقة للحقن حجمها 20µl.

✓ الكواشف و المحاليل:

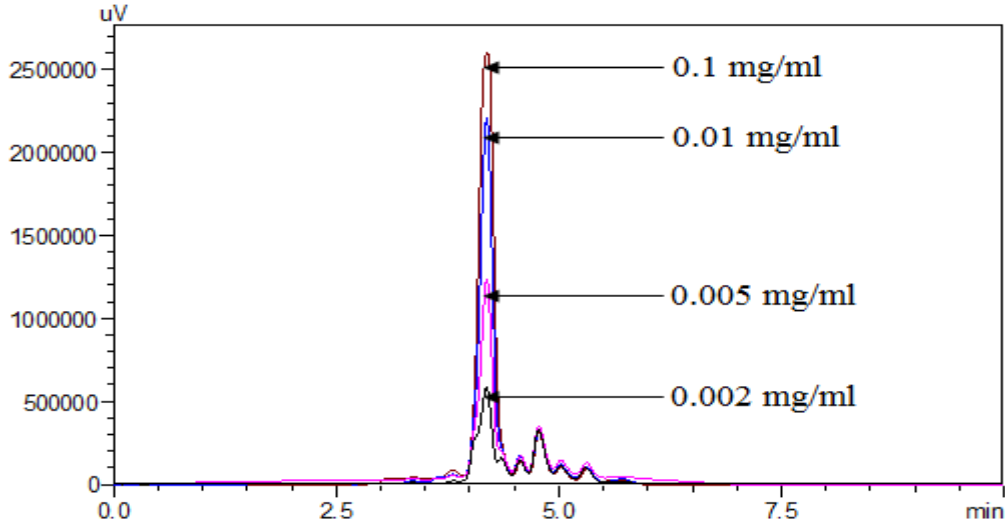
- 1- كولستيرول نقي $C_{27}H_{46}O$.
- 2- ميثانول CH_3OH ذو نقاوة 99.8%.
- 3- ماء مقطر.

1.3.3.III. عينة المحلول القياسي للكولستيرول:

تم تحضير أربعة محاليل قياسية للكولستيرول النقي بتركيزات مختلفة (0.002، 0.005، 0.01، 0.1 مغ/مل) و بعد ذلك تم حقن حجم 20µl من هذه المحاليل في جهاز الـ HPLC كل على حدى و تحت الظروف المثالية التي تم التوصل اليها سابقا و هي درجة حرارة 30C° و معدل تدفق 1ml/min و طول موجي 210nm و طور متحرك 100% ميثانول.

1.1.3.3.III. النتائج و المناقشة:

بعد حقن المحاليل القياسية في جهاز HPLC تم التوصل الى النتائج الموضحة في الشكلين (6.III) و (7.III) و في الجدول (2.III).



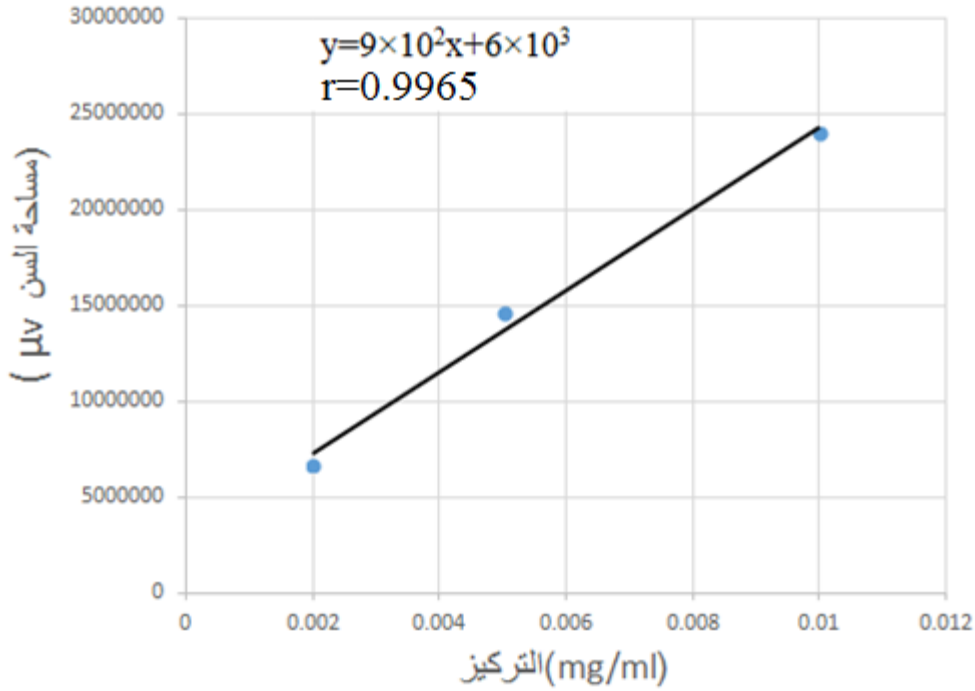
الشكل (6.III) : الكروماتوغرام الناتج عن حقن العينات القياسية بتركيز مختلفة.

يوضح الشكل (6.III) المبين أعلاه نتيجة حقن المحاليل القياسية الأربعة المختلفة في التركيز و الذي يتراوح في المدى [0.002-0.1mg/ml] حيث نلاحظ وجود تناسب طردي بين مساحة السن و تركيز المحلول القياسي ، كما استطعنا تحديد زمن الحجز الدقيق t_r للكولستيرول من خلال مختلف النتائج الموجودة في الملحق و الجدول التالي يلخص هذه النتائج:

الجدول (2.III) :مساحات القمم لتركيز مختلفة للمحاليل القياسية.

التركيز mg/ml	مساحة السن μv	زمن الحجز t_r (min)
0.002	6712910	4.183
0.005	14595234	4.187
0.01	23977619	4.186
0.1	32627279	4.190

• رسم المنحنى القياسي للكولستيرول النقي:



الشكل (7.III): المنحنى القياسي عند أفضل الظروف.

يمثل الشكل (7.III) المنحنى القياسي للكولستيرول عند أفضل الظروف التجريبية و هو عبارة على خط مستقيم معادلته كالتالي:

$$y = 9 \times 10^2 x + 6 \times 10^3 \quad (1. III)$$

حيث :

x : تركيز الكولستيرول في العينة.

y : مساحة السن الخاصة بالعينة.

2.3.3.III. تطبيق الطريقة المقترحة على عينات الدراسة:

بعد تحديد زمن الحجز t_r للكولستيرول و الحصول على منحنى قياسي جيد أصبح بالإمكان تطبيق هذه الطريقة على بعض العينات . لذا تم اختيار بعض الأطعمة المحتوية على الكولستيرول و هي: زبدة صول زيت ايليو، زبدة الماعز، لحم خروف. و أيضا تم تطبيق هذه التقنية على عينة من بلازما الدم سبق و أن تم تحليلها باستخدام تقنية التحليل الآلي بمخبر للتحاليل الطبية لصيدلية، و ذلك لتقدير محتواها من الكولستيرول و مقارنته بالطريقة المستعملة في هذا البحث.

III.3.3.1. تحضير العينات:

1. عيني الزبدة:

يتم تحضير العينتين بنفس طريقة التحضير من أجل التحليل الكيفي و لكن الإختلاف كان فقط في كتلة الزبدة (5غ) و حجم الميثانول (4مل) المذابة فيه العينة ثم تم أخذ 20µl و حقنها في جهاز الـ HPLC.

2. عينة الزيت التجاري:

هذه العينة نفسها العينة التي حضرت من أجل التحليل الكيفي.

3. عينة اللحم:

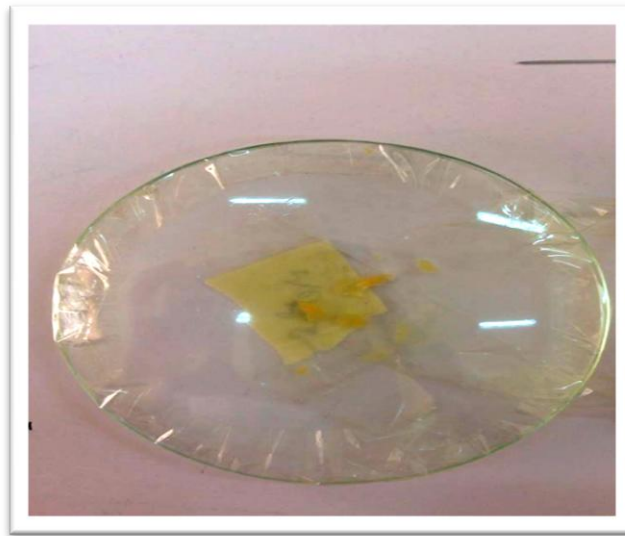
إضافة الى الخطوات الأربعة الأولى من تحضير عينة الأشعة فوق بنفسجية نكمل تحضير العينة بالخطوات التالية:

1-تجفيف المستخلص بواسطة جهاز المبخر الدوراني و الذي يتميز بكفاءته في تركيز الأحجام الكبيرة لمستخلص عينة اللحم المستخدمة و عند درجة حرارة 65°C و ذلك باستخدام حمام مائي بمنظم حراري، إضافة الى عدم إمكانية حدوث تلوث للعينة أثناء التجفيف باستخدام جهاز المبخر الدوراني.

2-أخذ 0.03غ من العينة المجففة و تمت اذابتها في 6مل من الميثانول تحت الخلط و درجة حرارة 30°C.

3-نقوم بترشيح المزيج ومن ثم الحصول على العينة.

4-أخذ 20µl و حقنها في جهاز الـ HPLC .



الشكل (III.8): مستخلص لحم الخروف.

4. بلازما الدم:

تم التنسيق مع مسؤول مخبر التحاليل الطبية لصيدلية الاحسان ببلدية الدبيلة ولاية الوادي للحصول على عينة الدم، و تم تزويدنا بعينة من البلازما الجاهزة و التي سبق و أن تم تحليلها لديهم لقياس تركيز الكولستيرول فيها و ذلك باستخدام جهاز التحليل الآلي (PRIM-SECOMAM).

و قد قمنا بتحضير هاته العينة هنا بالجامعة بحيث يمكن تحليلها بواسطة جهاز الـ HPLC و ذلك لمقارنة نتائجنا مع النتائج المتحصل عليها بواسطة جهاز (PRIM-SECOMAM)، و من ثم إمكانية تقييم طريقتنا المستخدمة في التحليل و إمكانية تطبيقها و ذلك بإجراء حسابات احصائية تبين ذلك.

يتم معالجة العينة معالجة كيميائية كالتالي:

1. أخذ 0.5 مل من عينة البلازما.

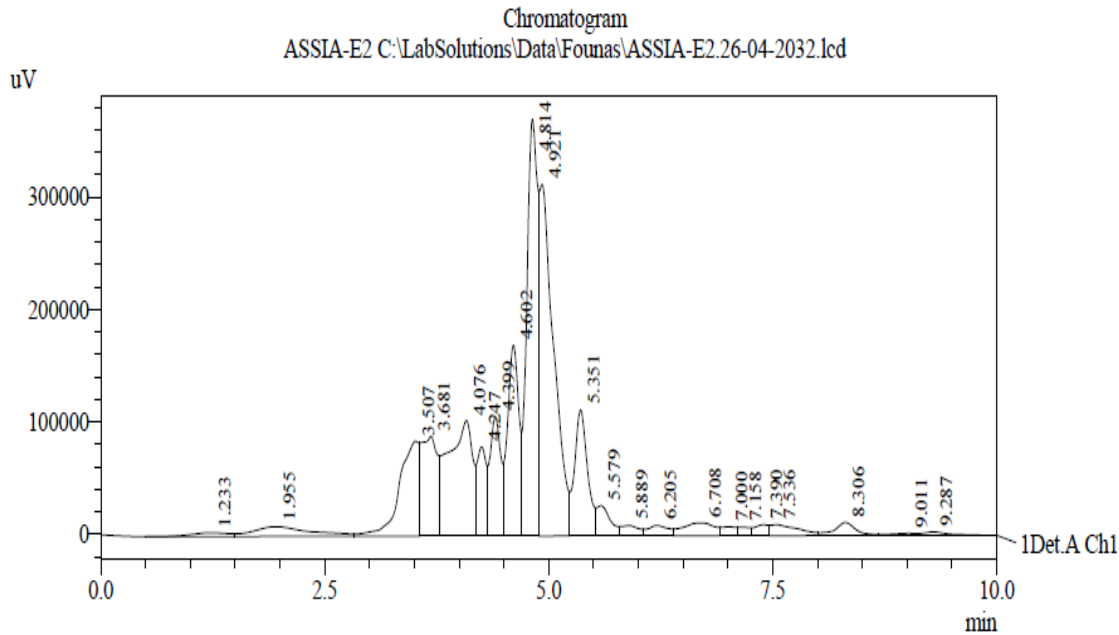
2. إضافة 1 مل من الميثانول.

3. سحب 20 µl من محلول العينة و حقنها في جهاز الـ HPLC .

4.III. النتائج و المناقشة:

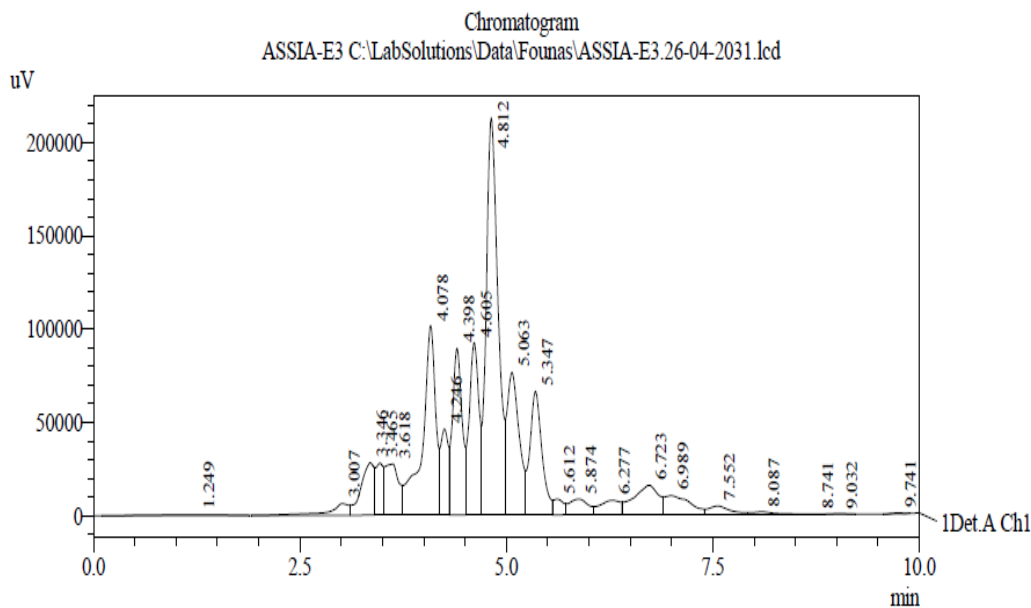
بعد حقن حجم 20 µl من العينات المحضرة تم الحصول على كروماتوغرام خاص بكل عينة وهم كالتالي:

1. زبدة تجارية:



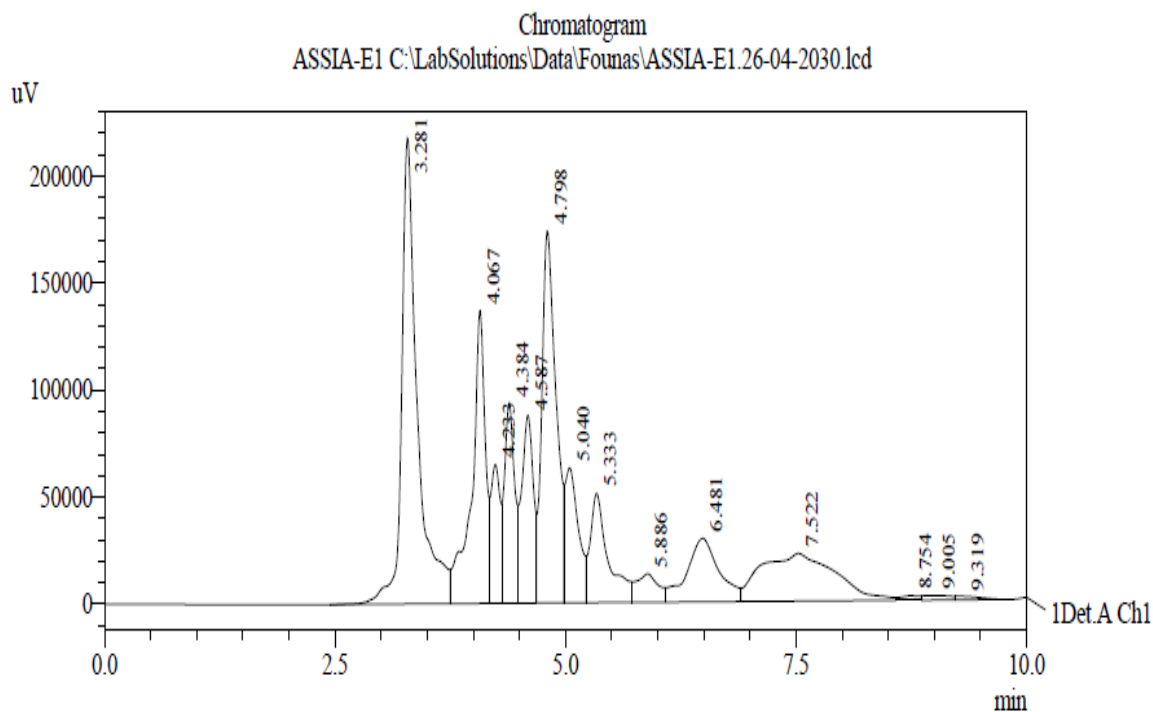
الشكل (9.III): كروماتوغرام عينة الزبدة التجارية.

2. زبدة الماعز:



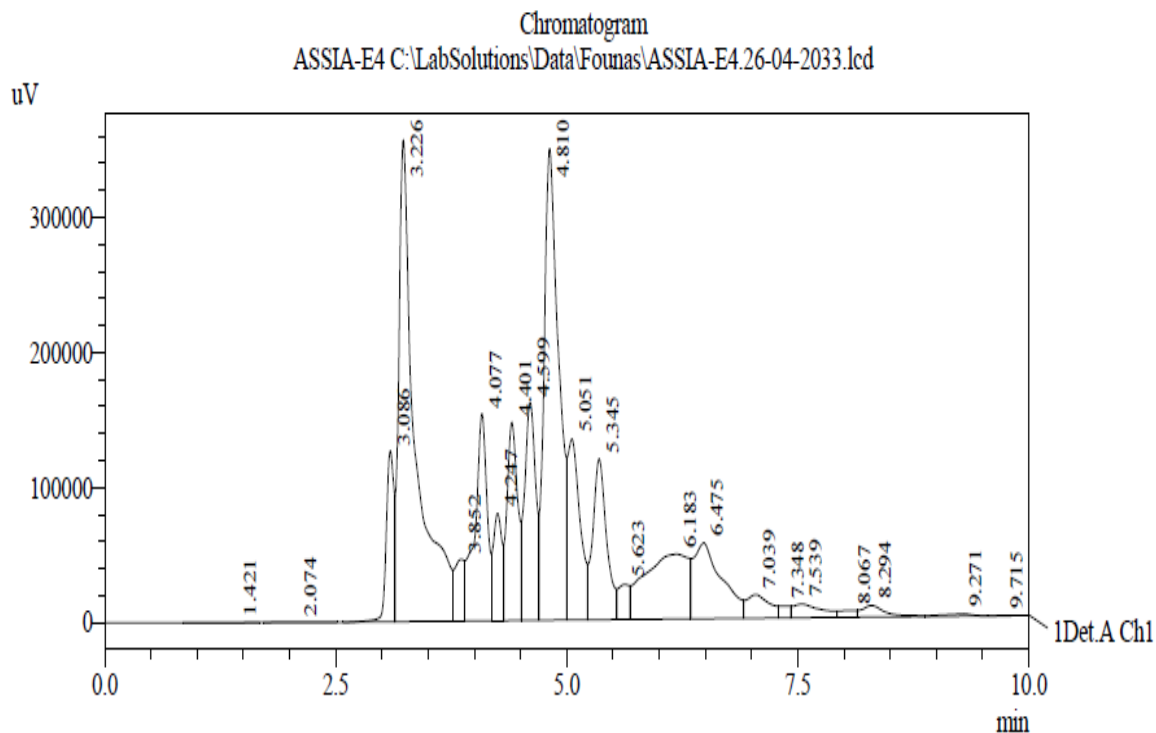
الشكل (10.III): كروماتوغرام عينة زبدة الماعز.

3. عينة الزيت التجاري:



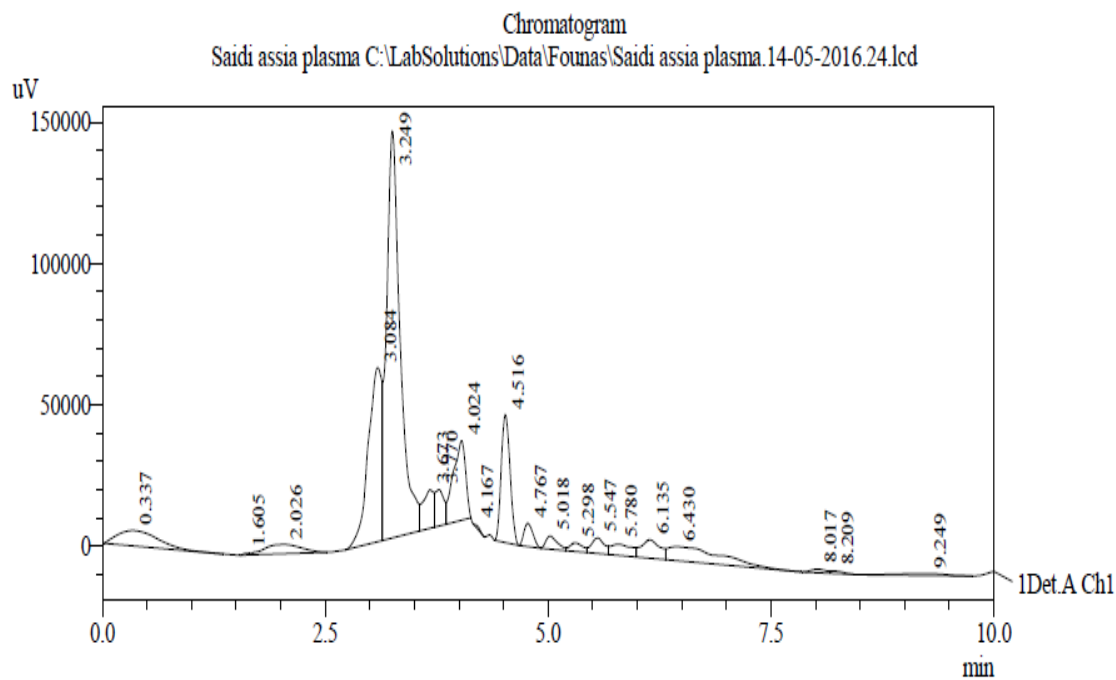
الشكل (11.III): كروماتوغرام عينة الزيت التجاري.

4. عينة اللحم:



الشكل (III.12): كروماتوغرام عينة اللحم.

5. عينة بلازما الدم:



الشكل (III.13): كروماتوغرام عينة بلازما الدم.

من خلال النتائج المتحصل عليها من جهاز الـ HPLC نلاحظ وجود الكولستيرول في جميع العينات المدروسة، حيث تم ايجاد t_r للعينات من خلال تحديد t_r الأقرب لقيم t_r المحاليل القياسية و بالتالي تحديد مساحة السن و منه امكانية حساب تركيز الكولستيرول في العينة من خلال التعويض في معادلة المنحنى القياسي للكولستيرول.

5.III. حساب تركيز و كتلة الكولستيرول في عينات الدراسة:

1.5.III. حساب التركيز:

حساب تركيز العينة التي حقنت في جهاز HPLC يكون انطلاقا من معادلة الخط المستقيم الخاصة بالمحلول القياسي (المعادلة (1.III))

1. زيت تجاري:

$$y = 449139 \mu v \text{ لدينا}$$

بالتعويض في معادلة الخط المستقيم نحصل على: $x_1 = 0.4923 \text{ g/l}$

2. زبدة تجارية:

$$y = 569683 \mu v \text{ لدينا}$$

بالتعويض في معادلة الخط المستقيم نتحصل على: $x_2 = 626 \text{ mg/g}$

3. زبدة الماعز:

$$y = 289141 \mu v \text{ لدينا}$$

بالتعويض في معادلة الخط المستقيم نتحصل على: $x_3 = 314.6 \text{ mg/g}$

4. لحم الخروف:

$$y = 528908 \mu v \text{ لدينا}$$

بالتعويض في معادلة الخط المستقيم نتحصل على: $x_4 = 581 \text{ mg/g}$

5. بلازما الدم:

$$y = 2127 \mu v \text{ لدينا}$$

بالتعويض في معادلة الخط المستقيم نتحصل على: $x_5 = 2.29 \text{ g/l}$

2.5.III. حساب الكتلة:

باستعمال أحد الطرق المستعملة في التحليل الكمي "طريقة المقارنة" نقوم بحساب كتلة الكولستيرول الموجودة في العينات و علاقتها كالتالي:

$$m_i = \frac{m_e A_i}{A_e} \quad (2. III)$$

حيث أن:

m_i : كتلة الكولستيرول في العينة.

m_e : كتلة الكولستيرول النقي تساوي 0.0897g

A_i : مساحة السن للعينة.

A_e : مساحة السن للكولستيرول النقي تساوي 32627279 μv

ملاحظة: تطبق العلاقة (2.III) في حساب كتلة الكولستيرول في جميع عينات الدراسة.

1. زبدة تجارية:

لدينا: $A_i=569683\mu v$ و بتطبيق القانون (2.III) نجد $m_i=0.00157g$

$$20\mu l \longrightarrow 0.00157g$$

$$4000\mu l \longrightarrow m_1$$

$$m_1=0.314g$$

$$5g \longrightarrow 0.314$$

$$100g \longrightarrow m_2$$

$$m_2=6.28g$$

2. زبدة الماعز: $m_i=0.00079g$

$$0.00079g \longrightarrow 20\mu l$$

$$m_3 \longrightarrow 4000\mu l$$

$$m_3=0.158g$$

$$0.158g \longrightarrow 5g$$

$$m_4 \longrightarrow 100g$$

$$m_4=3.16g$$

3. زيت تجاري: $m_i=0.00123g$

$$0.00123g \longrightarrow 20 \mu l$$

$$m_5 \longrightarrow 15000 \mu l$$

$$m_5=0.9225g$$

$$0.9225g \longrightarrow 28.134g$$

$$m_6 \longrightarrow 100g$$

$$m_6=3.2789g$$

4. لحم الخروف: $m_i=0.00145g$

$$0.00145g \longrightarrow 20\mu l$$

$$m_7 \longrightarrow 6000\mu l$$

$$m_7=0.435g$$

$$0.425g \longrightarrow 10.714g$$

$$m_8 \longrightarrow 100g$$

$$m_8=4.06011g$$

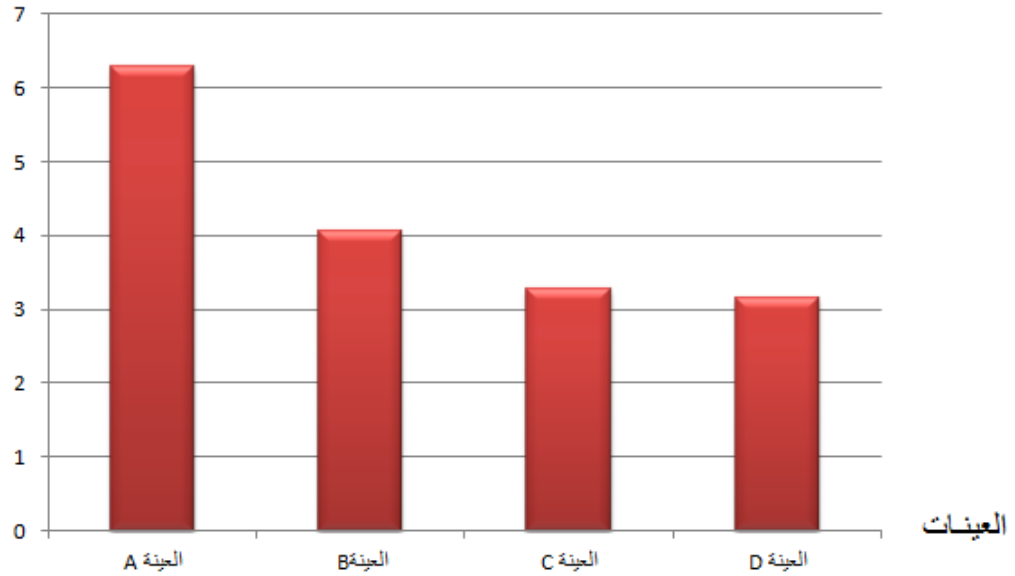
مناقشة النتائج:

نلخص النتائج المتحصل عليها في الجدول أدناه.

الجدول (3.III): ملخص النتائج المتحصل عليها.

التركيز	كتلة الكولستيرول g/100g	مساحة السن μv	زمن الحجز t_r (min)	العينة
626 mg/g	6.28	569683	4.247	زبدة تجارية
314.6 mg/g	3.16	289141	4.246	زبدة الماعز
0.4923 g/l	3.2789	449139	4.233	زيت تجاري
581 mg/g	4.0601	528908	4.247	لحم الخروف
2.29 g/l	/	2127	4.167	بلازما الدم

كتلة الكولستيرول (غ)



شكل (14.III): مخطط يوضح ملخص نتائج العينات.

من خلال النتائج الملخصة في الجدول (3.III) و من خلال المخطط التوضيحي الشكل (14.III) نلاحظ أن أعلى نسبة للكولستيرول الموجودة في 100 غ من العينات سجلت عند عينة الزبدة التجارية و قدرت بـ 6.28 غ و يليها لحم الخروف بنسبة 4.06 غ، و تليها العينتين؛ الزيت التجاري و زبدة الماعز على الترتيب 3.2789 غ ، 3.16 غ .

5. نتائج بلازما الدم:

النتيجة المتحصل عليها بواسطة جهاز الـ HPLC تقدر بـ 2.29g/l، أما بواسطة التحليل الآلي (-) PRIM-SECOMAM فكانت 1.58g/l (ملحق) و بمقارنة النتيجةين نلاحظ وجود فرق نوعا ما بين القيمتين و من هنا لا يمكننا الحكم بمدى كفاءة الطريقة المستخدمة.

خلاصة عامة

خلاصة عامة

بغرض تقدير الكولستيرول في عينات مختلفة من الأطعمة و الدهون و بلازما الدم قمنا باستخدام الأجهزة الحديثة المستعملة في التقدير الكيفي و الكمي .

بداية العمل كانت بإجراء تقدير كيفي عن طريق تحقيق تفاعلات لونية (تفاعل ليبرمان – بيرخارد و تفاعل سالكوسكي) و كانت النتيجة ايجابية. و الخطوة الثانية للتأكد من وجود الكولستيرول في العينات استخدمنا جهاز الأشعة فوق البنفسجية-المرئية قمنا بتحضير محاليل قياسية من الكولستيرول النقي بتركيز مختلفة من أجل الحصول على الطول الموجي الأعظمي ($\lambda_{max}=210nm$) التي يمتص عندها الكولستيرول ، يليها تمرير عينات الدراسة و كانت جميع العينات تمتص عندها و هذا ما يؤكد وجود الكولستيرول.

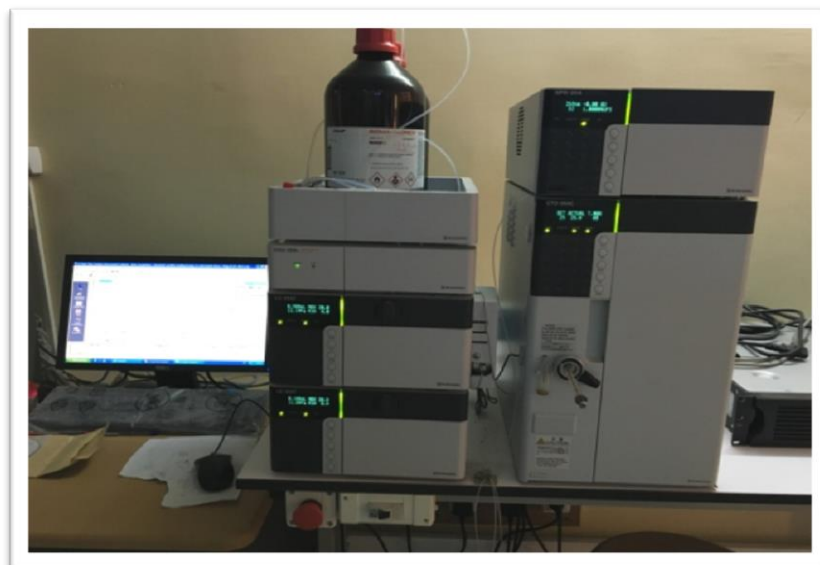
بعد التأكد من وجود الكولستيرول في العينات قمنا بالتحليل الكمي باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC و ذلك لما يتميز به من دقة و سرعة و بساطة في الفصل، حيث تم أولاً تحضير محاليل للكولستيرول النقي لتحديد زمن المكوث بدقة في حدود 4.18min ، و رسم المنحنى القياسي بدلالة التركيز.

و باستخدام أحد طرق التحليل الكمي و هي طريقة المقارنة كانت النتائج المتحصل عليها تدل على أن أعلى نسبة من الكولستيرول كانت في عينة الزبدة التجارية و قدرت بـ 6.28 غ و أقل نسبة كانت عند عينة زبدة الماعز و قدرت بـ 3.16 غ . أما عينة بلازما الدم فقد تم تقدير التركيز وكان 1.58 غ/ل و هذه القيمة تختلف من التي سجلت بواسطة جهاز التحليل الكروماتوغرافي HPLC. و من خلال النتائج وجد أن الزبدة التجارية تحوي كتلة مضاعفة من الكولستيرول مقارنة بالزبدة الطبيعية (زبدة الماعز).

و لدراسة موسعة في هذا الموضوع و للحصول على نتائج أفضل يتطلب توفير مدة زمنية أطول و مواد كيميائية ذات نقاوة عالية.

الملاحق

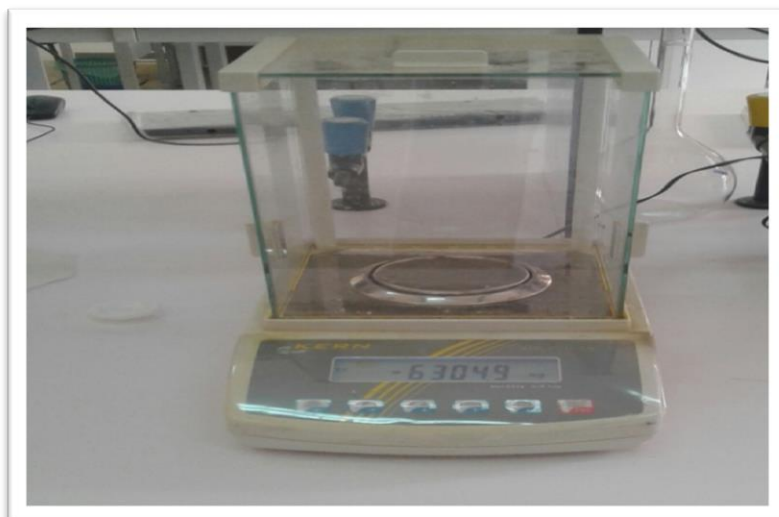
ملحق



جهاز الـ HPLC



جهاز المبخر الدوار



ميزان حساس



جهاز UV-visible spectrophotometer



فرن كهربائي



مسخن

ملحق العينات المدروسة

لحم خروف:

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.421	2582	97	0.013	0.005
2	2.074	6704	249	0.033	0.013
3	3.086	745122	126607	3.678	6.827
4	3.226	4499281	356495	22.211	19.223
5	3.852	323414	45702	1.597	2.464
6	4.077	1446373	153498	7.140	8.277
7	4.247	528908	79496	2.611	4.287
8	4.401	1194942	146736	5.899	7.912
9	4.599	1350311	161240	6.666	8.694
10	4.810	3849370	349035	19.002	18.820
11	5.051	1238292	133930	6.113	7.222
12	5.345	1245760	119212	6.150	6.428
13	5.623	211737	25973	1.045	1.400
14	6.183	1580970	47909	7.804	2.583
15	6.475	1188442	56178	5.867	3.029
16	7.039	300596	17426	1.484	0.940
17	7.348	69572	8829	0.343	0.476
18	7.539	218168	10115	1.077	0.545
19	8.067	64272	5205	0.317	0.281
20	8.294	152367	8618	0.752	0.465
21	9.271	38792	1841	0.191	0.099
22	9.715	1366	160	0.007	0.009
Total		20257340	1854550	100.000	100.000

زبدة الماعز:

Detector A Ch1 210nm		PeakTable		زبدة الماعز	
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.249	18628	361	0.221	0.043
2	3.007	103603	6248	1.230	0.751
3	3.346	312423	28115	3.709	3.378
4	3.465	173355	27836	2.058	3.345
5	3.618	314725	27483	3.736	3.302
6	4.078	1153187	101565	13.690	12.203
7	4.246	289141	46149	3.432	5.545
8	4.398	730062	89384	8.667	10.740
9	4.605	763731	92387	9.067	11.100
10	4.812	2098782	212839	24.915	25.573
11	5.063	787784	76399	9.352	9.179
12	5.347	672385	66208	7.982	7.955
13	5.612	74026	8410	0.879	1.011
14	5.874	133218	8386	1.581	1.008
15	6.277	131553	7709	1.562	0.926
16	6.723	333084	15771	3.954	1.895
17	6.989	214519	10174	2.547	1.222
18	7.552	83662	4583	0.993	0.551
19	8.087	26875	1410	0.319	0.169
20	8.741	1550	172	0.018	0.021
21	9.032	3002	276	0.036	0.033
22	9.741	4361	417	0.052	0.050
Total		8423656	832282	100.000	100.000

زيت تجاري:

Detector A Ch1 210nm		PeakTable		زيت تجاري	
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.281	2611994	217936	22.797	22.702
2	4.067	1412414	136792	12.327	14.250
3	4.233	449139	64754	3.920	6.745
4	4.384	716665	93587	6.255	9.749
5	4.587	772219	87804	6.740	9.147
6	4.798	1879375	173864	16.403	18.111
7	5.040	631861	63107	5.515	6.574
8	5.333	688818	50980	6.012	5.311
9	5.886	221141	13245	1.930	1.380
10	6.481	723259	29650	6.312	3.089
11	7.522	1246367	22193	10.878	2.312
12	8.754	30123	2124	0.263	0.221
13	9.005	43541	2253	0.380	0.235
14	9.319	30846	1681	0.269	0.175
Total		11457762	959970	100.000	100.000

زبدة تجارية:

Detector A Ch1 210nm		PeakTable		زبدة تجارية	
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.233	94843	3334	0.554	0.215
2	1.955	384565	8667	2.245	0.560
3	3.507	1291003	84467	7.537	5.454
4	3.681	1104158	88844	6.446	5.737
5	4.076	1941973	102997	11.337	6.650
6	4.247	569683	79415	3.326	5.128
7	4.399	880653	106022	5.141	6.846
8	4.602	1528853	169915	8.925	10.971
9	4.814	3162652	371311	18.463	23.975
10	4.921	3423050	313229	19.983	20.225
11	5.351	1141031	112265	6.661	7.249
12	5.579	284369	27042	1.660	1.746
13	5.889	124811	9092	0.729	0.587
14	6.205	147769	9236	0.863	0.596
15	6.708	283008	11468	1.652	0.740
16	7.000	88226	7945	0.515	0.513
17	7.158	69598	7539	0.406	0.487
18	7.390	104997	9696	0.613	0.626
19	7.536	214088	9796	1.250	0.632
20	8.306	192266	11566	1.122	0.747
21	9.011	35099	1772	0.205	0.114
22	9.287	62864	3118	0.367	0.201
Total		17129560	1548733	100.000	100.000

بلازما الدم:

PeakTable

Detector A Ch1 210nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.337	174938	5416	4.537	1.529
2	1.605	2211	588	0.057	0.166
3	2.026	93557	3262	2.426	0.921
4	3.084	657529	61552	17.053	17.373
5	3.249	1522746	143915	39.492	40.619
6	3.673	117764	13610	3.054	3.841
7	3.770	88009	12878	2.282	3.635
8	4.024	273744	28154	7.099	7.946
9	4.167	2127	63	0.055	0.018
10	4.516	312371	45238	8.101	12.768
11	4.767	57953	8213	1.503	2.318
12	5.018	41984	4604	1.089	1.299
13	5.298	30422	3071	0.789	0.867
14	5.547	54837	5525	1.422	1.559
15	5.780	65899	3914	1.709	1.105
16	6.135	94664	6527	2.455	1.842
17	6.430	219239	4956	5.686	1.399
18	8.017	14512	1280	0.376	0.361
19	8.209	7756	821	0.201	0.232
20	9.249	23604	723	0.612	0.204
Total		3855865	354307	100.000	100.000



LABORATOIRE DES ANALYSES MEDICALES

صيدلية الإحسان - سيدي عبد القسي

DEBILA- EL OUED TEL: 032.20.91.06

Nom : ~~MAROUA MCHIA (D)~~

EL-OUED Le : 15-05-2016

BIOCHIMIE

	Résultats	Normes
Cholestérol total	1.58	1.50 à 2.20 g/l

Le Pharmacien

ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو تقدير الكولستيرول في بعض الأطعمة و المتمثلة في زبدة تجارية، زبدة ماعز، زيت تجاري، لحم خروف، و أيضا في بلازما الدم . تمت عملية التقدير بطريقتين أحدهما كيفية و هي الخطوة الأولى من أجل التأكد من وجود الكولستيرول في عينات الدراسة و كان ذلك عن طريق اجراء بعض التفاعلات اللونية كما تم استعمال جهاز الأشعة فوق البنفسجية المرئية، و الطريقة الأخرى طريقة كمية و كانت باستعمال جهاز الفصل الكروماتوغرافي السائل ذو الأداء العالي HPLC .

كان التقدير بحساب كتلة الكولستيرول في العينات حيث سجلت أعلى نسبة له في عينة الزبدة التجارية و كانت 6.28 غ ، و سجلت باقي النسب في العينات; لحم خروف، زيت تجاري، زبدة الماعز، و كانت على الترتيب: 4.06 غ ، 3.27 غ ، 3.16 غ .

تعتبر هذه الطريقة طريقة حديثة و سهلة و قليلة التكلفة و لها دقة عالية في الفصل لذا ينصح باجرائها بشكل دائم و مستمر.

الكلمات المفتاحية: الكولستيرول – الدهون - الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC – بلازما الدم.