جامعة الملك سعود
كلية العلوم
قسم الكيمياء

تقدير الكوليسترول في الأطعمة والدهون وبلازما الدم بواسطة الكروماتوجرافيا السائلة ذات الأداء العالي

Determination of Cholesterol in Food, Fat and Blood Plasma Using High Performance Liquid Chromatography

قدمت هذه الرسالة استكمالا لمتطلبات درجة الماجستير
في قسم الكيمياء كلية العلوم جامعة الملك سعود.

إعداد

الطالبة / نايفة بنت مشعل الشعلان

إشراف

الدكتورة/ فاتن خالد شومان

إشراف مساعد

الدكتور/ محمد أبو الحسن عبد الله

١٤٢٥هـ - ٢٠٠٤م

الفصل الأول

الكوليسترول

Chapter one

Cholesterol

١- مقدمه Introduction

١-١ الدهون: Fats

ظلت الدهون عنصراً أساسياً في غذاء البشر منذ أن بُدأ في استهلاك اللحوم منذ أكثر من مليوني عام[1]. وبصفة عامة تستعمل كلمة الدهن *fat* للدلالة على المادة التي لا تذوب في الماء ولها خواص شمعية الملمس وتكون صلبه في درجة حرارة الغرفة لاحتوائها على نسبة عالية من الأحماض الدهنية المشبعة. أما الأحماض الدهنية غير المشبعة فهي الزيوت وهي سائلة في درجة حرارة الغرفة[2]. وتمثل الدهون عازلاً لأعضاء الجسم الداخلية كما أنها مصدراً للطاقة حيث أن الجرام الواحد منها يمد جسم الإنسان بمقدار من الطاقة (٩ كالوري/جم) أي تقريباً ضعف الطاقة الناتجة من جرام واحد من الكربوهيدرات أو البروتين. أيضاً تعطي الشكل الخارجي المميز لأجسامنا وتكون الدهون جزءاً من غشاء كل خلية من خلايا الجسم كما أن بعض الأعضاء والأنسجة مثل القلب لابد لها من حرق الدهون لتقوم بوظيفتها كما ينبغي وبالإضافة إلى ذلك فإن الدهون تساعد على التمثيل الغذائي للكالسيوم وفيتامينات أ ، د ، هـ[3].

١-٢ أنواع الدهون: Types of Fats

أ) الدهون المشبعة:

أكـثر ما نجدها في المصادر الحيوانية مثل السمن والزبد والقشدة واللحم والدجـاج والحليـب ومشتقاته. ويمكن أن نجدها أيضاً في بعض المصادر النباتية كزيـت النخـيل وزيـت جوز الهند وغالباً ما تكون هذه الدهون صلبه في درجة حرارة الغرفة.

ب) الدهون غير المشبعة:

تكون سائلة في درجة حرارة الغرفة ولها تأثير جيد على الجسم من حيث أنها تقلل من الإصابة بأمراض القلب والشرايين وهناك نوعان منها:

١- **الدهـون غـير المشبعة الأحادية:** وهي الدهون التي تحتوي على رابطة ثنائية واحدة، ونجدها في زيت الزيتون وزبدة الفول السوداني وبعض أنواع المكسرات.

٢- **الدهـون غير المشبعة المتعددة:** وهي الدهون التي تحتوي على أكثر من رابطة ثنائية، وتوجد في النباتات وزيوتها[4].

١-٣ الشحوم: Lipids

تعتـبر الشحوم أحد المركبات العضوية الثلاث الأساسية المكونة للكائنات الحـية وتحـتوي تقريباً كل الكائنات الحية على البروتينيات – الكربوهيدرات – والشحوم، وتختلف نسب هذه المكونات تبعاً لنوع الكائن الحي. وفي عام ١٩٤٣م أطلق العالم *Bloor* اصطلاح *Lipids* على الشحوم والزيوت[5]. وفي عام ١٩٨٢م عـرف *Christie* الشحوم بأنها منتجات طبيعية واسعة الانتشار وتشمل الأحماض الدهنية ومشتقاتها والاستيرولات وأحماض الصفراء. وتعرف أيضاً بأنها المركبات التـي لا تـذوب فـي المـاء وتذوب في المذيبات العضوية مثل الإيثر – الإيثر البترولي – الأسيتون – الكلوروفورم - البنزين – الكحول[6].

١-٤ أقسام الشحوم: Sections of Lipids

(١) الأحماض الدهنية *Fatty acids* وتشمل:

- أحماض دهنية مشبعة.
- أحماض دهنية أحادية غير مشبعة.
- أحماض دهنية عديدة غير مشبعة.

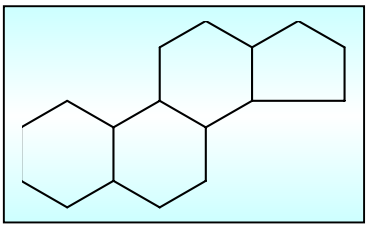
(٢) الجليسريدات *Glycerids*.

(٣) المواد غير الجلسريدية والتي تتضمن:

- الاستيرولات *Sterols*.
- الفوسفوليبيدات *Phospholipids*.
- التربينات *Terpenes*.
- الشموع *Waxes*.
- اللايبوبروتينيات *Lipoproteins*[7].

١-٥ الاستيرولات: Sterols

هي عبارة عن مركبات أليفاتية عالية الوزن الجزيئي تتضمن جزيئاتها نواة الستيرول المميزة بأربع حلقات متصلة : ثلاث حلقات منها سداسية والحلقة الرابعة خماسية كما في الشكل (١-١) وأهم أنواع الاستيرولات هو الكوليسترول *Cholesterol*[8]. وتنتشر الاستيرولات على نطاق واسع في كل من المملكة الحيوانية والمملكة النباتية، وتنقسم إلى نوعين هما إستيرولات نباتية وإستيرولات حيوانية حسب مصدر استخلاصها ومع ذلك لا يمكن وضع حد فاصل بين هذين النوعين حيث يمكن تحويل الستيرولات الحيوانية إلى إستيرولات نباتية[9].



شكل (١ - ١)

نواة الستيرول Sterol Nucleus

١-٦ الكوليسترول: Cholesterol

يـنظر الكثيرون للكوليسترول على أنه تلك المادة الضارة التي تتسبب في حـدوث تصلب الشـرايين وتؤدي إلى حدوث أمراض خطيرة للإنسـان، وهـذا هـو الجانـب المظلم من الحقيقة؛ إذ يتواجد الكوليسترول بشكل طبيعي في جسم الإنسان[10].

والكوليسترول نوع من الدهون التي نأكلها وهو مفيد للجسم إذ يساعد على القـيام بـبعض الوظـائف الحيوية، لكنه يعتبر مُضرا إذا ارتفع مستواه في جسم الإنسان عن المعدل الطبيعي (5 mM/L) لفترة طويلة؛ إذ يمكن أن يتسبب في تصلب الشـرايين والذبحـة الصدرية[11]. والكوليسترول مادة دهنية أو شحميه صفراء اللـون يتواجد بطبيعته في جميع خلايا الجسم. ويعتبر الكوليسترول واحدا من أهم الشحوم *Lipids* الحيوانية وهو يتخذ من الناحية الطبيعية شكل مواد دهنية[12].

١-٧ اكتشاف الكوليسترول: The Discovery of Cholesterol

في عام ١٩١٣م لاحظ العالم الروسي *Anichkov* وجود انسداد في الأوعية الدموية للأرانب التي تم تغذيتها بوجبات غذائية عالية الكوليسترول[13]. وقد تمكن العالمان *Wieland* و *Windows* من التعرف على الشكل البنائي للكوليسترول عام ١٩٣٠م، ثم تطورت البحوث والدراسات في التعرف على الشكل البنائي للكوليسترول إلى أن تم التوصل إلى الشكل البنائي الكامل للكوليسترول عام ١٩٣٢م.

وفي عام ١٩٤٢م قام العالمان *Block and Rittenberg* بدراسة التركيب الكيميائي للكوليسترول حيث توصلا إلى وجود الكوليسترول في شكل ثلاث حلقات سداسية إحداهما غير مشبعة مرتبطة بحلقة خماسية تحتوي على سلسلة جانبية كما في الشكل (١-٢)[14].

١-٨ مصادر الكوليسترول: Sources of cholesterol

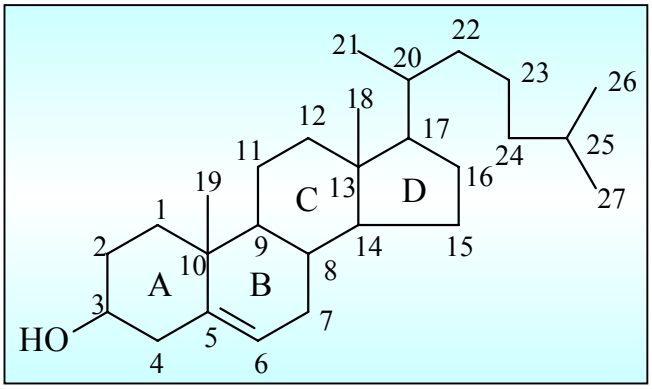
المصـدر الأول: يصنع عن طريق الكبد وبنسبة ٨٠% من إجمالي الكوليسترول في الجسم، (حيث أن أجسامنا تنتج بين ٥٠٠ – ١٠٠٠ ملجم من الكوليسترول كل يوم وذلك لأن كل خلية بالجسم لها القدرة على تصنيعه).

المصـدر الثانـي: يأتـي عن طريق الأغذية التي نتناولها والتي يكون مصدرها حيوانـياً. فيعتـبر المصـدر الغذائي مصدراً إضافياً؛ فالكوليسترول المصنع عن طريق الجسم يكفي احتياجات الإنسان[15].

١-٩ التركيب الكيميائي للكوليسترول:

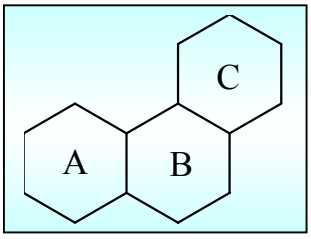
The Chemical Structure of Cholesterol

يـتكون جـزيء الكوليسترول كما في الشكل (١-٢) من ٢٧ ذرة كربون مرتـبة في نواة كحولية تتألف من أربع حلقات وذيل. والكوليسترول يحتوي على نـواة مشبعة من الفينانثرين كما في الشكل (١-٣) (فيما عدا الرابطة الثنائية بين $C_5 = C_6$) مرتبطة مع حلقة خماسية مشبعة في الموضعين رقم 13 ورقم 14. كما تحـتوي على مجموعات جانبية موضحة من الرمز البنائي للكوليسترول كما في الشـكل (١-٢). بصفة عامة فإن جميع الاستيرولات يكون لها نفس النظام الحلقي وكلهـا تحتوي على مجموعة OH في الموضع رقم 3 وعلى مجموعتي ميثيل في الموضعين رقم 18 ورقم 19. كما تحتوي على سلسلة جانبية متصلة بذرة كربون رقم 17. ويتضح من الرمز البنائي للكوليسترول أن الحلقات ليست حلقات عطرية فكلهـا مشـبعة عدا الحلقة (B) والتي تحتوي على رابطة ثنائية بين ذرتي كربون رقم 5 ورقم 6.



شكل (١-٢)

الكوليسترول Cholesterol ($C_{27}H_{46}O$ = 386.67 g/mol)



شكل (١-٣)

الفينانثرين Phenanthrene

١-١٠ وجوده: Occurrence

يوجـد الكوليسـترول في كل خلية من خلايا الجسم ويكون جزءاً من نواة الخلـية حيث يوجد بكميات كبيرة في المرارة ويعرف باسـم سـتيرول المرارة *Bile sterol* ويوجد أيضاً في دهن النسيج العصبي وفي دهن الجلد وأيضاً يتواجد بتركيز عالٍ في الدماغ[16,17].

١-١١ أنواع الكوليسترول: Kinds of Cholesterol

تنتقل دهون الدم بين مختلف أنحاء الجسم، والكوليسترول يعتبر أهم أنواع الدهون التي يحملها الدم حيث أنها لا تذوب في الدم وإنما تتحد مع مواد بروتينية مكونـة جزيـئات قابلـة للذوبان في الدم تسمى ليبوبروتين. والليبوبروتين يحمل الكوليسترول من مكان إلى آخر في الجسم، وهناك نوعان من الليبوبروتين يتميز كل منهما بكثافة وكمية البروتين الذي يحمله وينقله من الكبد خلال الدورة الدموية لمختلف الخلايا في الجسم.

١) الليبوبروتين منخفض الكثافة: Low – Density Lipoprotein

ويطلـق عليه الكوليسترول الضار. ويرمز له بالرمز LDL ويحتوي على نسـبة كبيرة من الدهون وتكون جزيئاته كبيرة جداً وتنتقل بواسطة كثافة منخفضة مـن البروتيـن بحيث تترسب على الجدران الداخلية للشرايين، والذي يؤدي على المدى الطويل إلى انسداد أو ضيق أو تصلب الشرايين والمهمة الأساسية له حمل الكوليسترول من الكبد إلى الأنسجة الطرفية بما في ذلك جدران الأوعية.

٢) الليبوبروتين عالي الكثافة: High – Density Lipoprotein

ويرمـز له بالرمـز HDL ويطلق عليه الكوليسترول المفيد ويحتوي على نسبة قليلة من الدهون وتكون جزيئاته صغيرة جداً وينتقل بواسطة كثافة عالية من

البروتيـن بحيث يجري مع الدورة الدموية ولا يترسب في جدران الشرايين. وهو يقاوم التصاق النوع منخفض الكثافة ويقلل من مستواه بالدم. والمهمة الأساسية له حمـ ـل الكوليسترول من الأنسـجة الطرفية بما في ذلك جدران الشـرايين إلى الكبد[18].

١-١٢ فوائد الكوليسترول: Advantages of Cholesterol

للكوليسترول فوائد كثيرة للجسم أهمها مساعدة الجهاز الهضمي في عملية الهضـم والامتصـاص للمـواد الدهنـية. ويدخـل فـي إنتاج هرمونات الجنس *Progesterone* والـ *Estrogen* والـ *Testosterone*. ويدخل في تكوين فيتامين (د) وذلـك بـتحويل الكوليسترول الموجود تحت الجلد بواسطة أشعة الشمس إلى مركب له خواص فيتامين (د) وهو الفيتامين المانع للكساح. وبما أن الكوليسترول هو أحد المكونات الأساسية لمختلف أنواع الأنسجة و بخاصة العصبية فهو يساعد في انتقال التيارات العصبية وبدونه لا تتمكن الخلايا العصبية من الإثارة الحسية ممـا ينـتج عـن ذلك فقدان القدرة الحركية والكلام كذلك يدخل الكوليسترول في تكويـن Cholic acid في الكبد الذي يؤدي بدوره إلى إفراز العصارة الصفراوية. ويحـتاج الجسم إلى الصفراء لتفتيت الدهون حتى يسهل عمل الإنزيمات فيها ويتم امتصاصها[19,20].

١-١٣ الكشف عن الكوليسترول وتقديره:

Detection and Determination of Cholesterol

يتم الكشف عن الكوليسترول من خلال تجارب لونية وهي:

أ) تفاعل ليبرمان - بيرخارد: Liebermann – Burchard

هـذا الـتفاعل يـتم بأخذ 3ml من محلول الكوليسترول أو محلول الدهن ووضـعها فـي أنـبوبة اختـبار وإضـافة 10 قطرات من حمض الخل المركز (CH_3COOH) ثـم يضاف 3ml من حمض الكبريتيك المركز (H_2SO_4) فإذا ظهر لـون أحمـر مـا يلبث أن ينقلب إلى اللون الأخضر المزرق دل ذلك على وجود الكوليسترول[21].

ب) تفاعل سالكوسكي: Salkowski Reaction

وذلـك بـأخذ 3ml مـن محلول الكوليسترول ووضعها في أنبوبة اختبار وإضـافة 10 قطـرات من حمض الخل المركـز (CH_3COOH) عليها، ثم 3ml من حمض الكبريتيك المركـز (H_2SO_4)، ثم يتم تعريض المحلـول بهدوء للهب عـند 80-90°C لمدة 3-5 min فإذا تكون لون أحمـر ثابت دل ذلك على وجـود الكوليسترول[21].

بالإضـافة إلـى هـذا تـم استخلاص الكوليسترول في المعامل باستخدام الأسـيتون كمذيـب. حيـث يـتم إضافة 200ml أسيتون إلى 50g من مخ العجل

ويوضـع في خلاط كهربائي ثم يترك لمدة 5min ثم يرشح المعلق في قمع بوخنر وتأخذ المادة المترسبة وتمزج بـ 100ml أسيتون ويوضع في الخلاط مرة أخرى ويـترك لمدة 5min ثم يرشح العالق وتضاف الرشاحة الأولى إلى الثانية ثم يبخر الأسـيتون مـن الرشاحة تحت ضغط شفاط مائي وباستخدام حمام بخار ثم يبرد الدورق ويجمع الكوليسترول الذي يترسب بترشيحه في قمع بوخنر ثم يبلور الناتج بواسطة الإيثانول ومن ثم يتم اختبار هذه البلورات بالاختبارات اللونية السابقة[22].

ومـن خلال بحثنا عن النشرات والدراسات التي تمت لتقدير الكوليسترول وجـد أنـه يوجـد العديـد من الطرق ذات الحساسية العالية لتقدير الكوليسترول بكميات صغيرة جداً. حيث قام العالم *Doshi* وزملاؤه[23] بتقدير الكوليسترول في الدم عن طريق اسـتخدام إنزيم horseradish peroxidase كحافز لتفاعل H_2O_2 الناتج عن أكسدة الكوليسترول مع 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone يتـبع ذلـك بـ diazotization مع صبغات الانيلين الثابتة في جزئيات السيليكا. وكان الانحراف المعياري النسبي لهذه الطريقة في المدى 4.82% – 2.11.

أيضـا قام العالم *Harris* مع زملائه[24] بتقدير الكوليسترول عالي الكثافة HDL-C في البلازما. باسـتخدام Tungstophosphoric acid/Mg^{2+}؛ حيث يحدث

ترسّب للكوليسترول ثم يُقاس باستخدام التشخيص الإنزيمي *Enzyme Diagnostics* وكان الانحراف المعياري النسبي أقل من 4.9%.

أيضاً قام العالم *Maitra* وزملاؤه[25] بالتحليل المباشر للكوليسترول منخفض الكثافة LDL-C باستخدام التشخيص الأنزيمي الجيني (*Enzyme Diagnostics*) وقد أعطـ ـت هـ ـذه الطريقة انحراف معياري نسـ ـبي RSD أقل من 4.5% عند تركيز 0.9-2.26 g/L للكوليسترول المنخفض الكثافة LDL-C.

كذلـ ـك اسـ ـتخدم العالم *Huang* وزملاؤه[26] طريقتين متجانسـ ـتين لقياس الكوليسترول مرتفع الكثافة HDL-C في بلازما الدم.

الأولى تسمي PEG-modified (**p**oly**e**thylene **g**lycol-modified)

والثانية تسمى PPD (polyanion – polymer / detergent).

وكان منحنى التعيير القياسي للطريقتين خطيا حتى تركيز 1200mg/L و 1500mg/Lعلى التوالي.أما بالنسبة للانحراف المعياري النسبي RSD فقد كانت أقل من 1.2% وأقل من 4.07% على التوالي.

كذلك قام العالم *Hansen* وزملاؤه[27] بعملية فصل بروتينيات الدهون في بلازما الإنسان باستخدام طريقة التقطير الجزئي **F**low **F**ield-flow **F**ractionation (FFF).

حيث أن جزيئات HDL و LDL تنفصل في أقل من 10-20min وحجم العينة يكون 10µL هذه الطريقة قد تكون مفيدة للعيادات والأهداف التشخيصية.

أيضا قام العالم *Henrion* وزملاؤه[28] بتقدير الكوليسترول بواسطة الكروماتوجرافيا الغازية وطيف الكتلة (GC-MS) وباستخدام مصل قياسي كأداة لضبط وتحكم عملية تحديد الكوليسترول وأعطت الطريقة انحرافاً معيارياً نسبياً RSD أقل من 0.48%.

وقد قام العالم *Sugiuchi* مع زملائه[29] بتقدير الكوليسترول منخفض الكثافة LDL-C باستخدام الكروماتوجرافي المنخلية مع (polyoxyethylene POE-POP – polyoxypropylene) الذي ظهر أنه يزيل الدهون من LDL-C ومع α-cyclodextrin sulfate الذي ظهر أنه يقلل نشاط الكوليسترول. ولقد أعطى منحنى التعيير القياسي خطاً مستقيماً حتى تركيز 15.5mM وكان حد الكشف 5µM. والانحراف المعياري النسبي 0.25-1.43 % و 0.88 – 2.29% على التوالي.

كما قام العالمان *Salvador* و *Pinerio-Avila*[30] بتقدير الكوليسترول في الدهون الحيوانية باستخدام الحقن السرياني (*flow–injection*). حيث تم تذويب العينة في محلول 1.0mM من *p*-anisidine في تولوين مشبع مع 0.lM محلول

الفوسفات المنظم والذي له pH = 7 و تم القياس عند طول موجي 458nm. ولقد كان حد الكشف 1µM. وكان الانحراف المعياري النسبي (RSD) 1.8%.

وقد قام العالم *Simo* وزملاؤه[31] بتقدير الكوليسترول عالي الكثافة HDL-C باستخدام الاختبار المتجانس بوجود كواشف تجارية وجهاز محلل أتوماتيكي ILab900 (*Instrumentation laboratories*) حيث يتم وضع 2µL من البلازما مع 210µL من خليط مكون من polyanions, polymers وذلك لحجز جزيئات الليبوبروتين (B) الذي يحتوي على جزيئات بروتين الدهون. وكان منحنى التعيير القياسي خطيا، وحـد الكشـف لـ HDL-C هو 0.1M والانحراف المعياري النسبي RSD أقل من 7.1.

كذلـك قـام العالم *Artiss* وزملاؤه[32] بتقدير الكوليسترول العالي الكثافة HDL-C والكوليسـترول المنخفض الكثافة LDL-C باستخدام كاشف ذي حساسية عالـية. حيث تم خلط 250µL من المصل لتقدير HDL-C مع 250µL من كاشف *Magnesium/ Dextrane sulfate* حيث يترك لمدة 10min ثم يوضـع في جهـاز الطرد المركزي لمدة 5min ومن ثم ينقل إلى جهاز التحليل الذاتي.

أما بالنسبة لـ LDL-C فيتم أخذ 30µL من المصل ويضاف إليها 200µL من الكاشف وتعامل بنفس الطريقة. ومن ثم قياس الامتصاصية للنواتج الملونة

عند أطوال الموجات 700 nm, 510 nm على التوالي. ولقد أعطى المنحنى القياسي خطاً مستقيماً عند تركيز 0.106 - 2 mM من الكاشف وكان الانحراف المعياري النسبي 0.8 - 1.5% RSD و 3.5 - 4.7% على التوالي.

وقـام العالم *Tada* وزملاؤه[33] بتقدير الكوليسترول في الخلايا اللمفاوية (*Lymphocytes*) بواسـطة التألـق (*fluorimetry*) باسـتخـدام محلـول منظـم Tricine-NaOH ذي تركيز 0.2M وعند pH=7.5 ويحتوي على 0.4% من X-100 Triton ولقد تم القياس عند طول موجة إثارة λ_{ex} = 340 nm وطول موجة التألق λ_{em} = 450 nm. وكان حـد الكشـف 2.57µmol والانحراف المعياري النسـبي 3.73% RSD.

أيضاً قام العالم *Arranz-Pena* مع زملائه[34] بتقدير الكوليسترول عالي الكثافة HDL-C بطريقة الترسـيب باسـتخدام كاشـف Phosphotungstic acid/$MgCl_2$ وطريقة الطرد المركزي (*Ultracentrifugation Method*) ولقد أعطت هذه الطريقة انحرافاً معيارياً نسبياً RSD في المدى 3.3-5.5%.

كذلـك قـام العالم *Sandhoff* وزملاؤه[35] بتقدير الكوليسترول في الخلايا باستخدام *Nano-electrospray Tandem Mass Spectrometry* مع مقدر طيف الكتلة

حيـث تـم استعمال (sulfur trioxide pyridine) لاستخلاص الكوليسترول. وكان منحنى التعيير القياسي خطياً من 10 pmol إلى 300 pmol.

وكذلك قام *Araujo* وزملاؤه[36] بتقدير الكوليسترول في المصل بواسطة التحليل المستمر المتقطع بالهواء (MSFS) (***M**ono-**S**egmented **F**low-**A**nalysis*) وباستخدام مقدر طيفي وكاشف إنزيمي في محلول منظم تركيزه phosphate 0.5M عند pH = 7 وسرعة تدفق 0.35ml/min. وكان منحنى التعيير القياسي خطياً حتى تركيز 10.3mM من المصل والانحراف المعياري النسبي 3.0% RSD .

أيضاً قام العالم *Nakaminami* وزملاؤه[37] بتقدير الكوليسترول في المصل بواسـطة المعايرات التيارية *Amperometric Titration* وباسـتخدام أقطـاب من الذهـب وكاشـف thionine ذي تركيز 1.5mM ومحلول منظم من الفوسفات عند pH=7 يحـتوي على 45% من ٢-بروبانول وكانت النتائج التي تم الحصول عليها متفقة مع النتائج التي تم الحصول عليها بطريقة طيفية *Spectrophotometry*.

وكذلك قام العالم *Kan-Zhi* وزملاؤه[38] بتقدير الكوليسترول منخفض الكثافة LDL-C والكوليسترول المرتفع الكثافة HDL-C في البلازما بواسطة الأشعة تحت الحمـراء. وذلـك بتجفـيف العينة على لوح شفاف ووضعها في جهاز الـ (IR) باسـتخدام فلوريد الباريوم؛ حيث ظهرت الأطياف الخاصة بـ LDL-C في المدى

الطيفـ ـي $1700\text{-}1800\ cm^{-1}$ و $2800\text{-}3000\ cm^{-1}$ وطيف HDL-C فـي المـدى $800\text{-}1500\ cm^{-1}$ و $1700\text{-}1800\ cm^{-1}$ و $2800\text{-}3500\ cm^{-1}$.

وقد قام العالم *Zarzycki* وآخرون[39] بفصل الكوليسترول والأحماض الصفراء باستخدام كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة (*TLC*). حيث استعملوا خليطا من الميثانول – المـاء بنسب من صفر إلى 100% ميثانول كطور متحرك عند درجات حرارة مـن 5^oC إلـى 6^oC. وكانـت تـرش الألواح بـ 1% محلول حمض الفوسفو موليبديك في ٢–بروبانول وتسخن عند درجة حرارة 120^oC لمدة 5-10min وبعد ذلـك تظهـر المواد على هيئة نقاط كحلية اللون على خلفية صفراء. ووجدوا أن هناك عاملين مهمين يؤثران في سير الكروماتوجرافيا هما درجة الحرارة وتركيب الطور المتحرك.

كمـا قام العالم *Naeemi* وآخرون[40] بتحسين طريقة تقدير الكوليسترول فـي المـواد الغذائـيـة المصنعـة باسـتعمال الكروماتوجـرافيا الغازيـة *Gas Chromatography* (GC). ومـدة التحليل 45min وباستخدام عمود السيليكا (30×0.32mm) والطـور المـتحرك المسـتخدم هـو غاز الهليوم وبمعدل تدفق 1.5ml/min ودرجـة حرارة الفرن من 180^oC إلى 280^oC. وكان حد الكشف 5µg كوليسترول لكل 1g من العينة. وتعتبر هذه الطريقة سريعة وبسيطة ودقيقة.

وأيضـا قام العالمان *Addis* و *Park*[41] بتقدير نواتج أكسدة الكوليسترول فـي بعض منتجات اللحوم بواسطة كروماتوجرافيا الغاز (GC) وباستخدام عمود السيليكا ومقدر طيف الكتلة وعند درجة حرارة من 180°C إلى 250°C مع ارتفاع 3°C كل دقيقة. وزمن فصل 25 min وكان حد الكشف 10 ppm.

ولقد قام العالمان *Appelquist* و *Nourooz-Zaden*[42] بفصل نواتج أكسدة الكوليسترول COPs باستخدام تقنية كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) من الحليب الجاف وكان الطور المتحرك تولوين – ميثانول بنسبة (5:1). ومن ثم ترش الألواح بـ ٢,١– ثنائي كلورو فلوراسين ويستعمل UV عند 365nm ثم يتم حك العينة وإزالتها ومن ثم إذابتها في محلول قياسي وتحليلها بواسطة (GC- MS).

فقد قام العالم *Rongzhen* وآخرون[43] معه بتطوير طريقة تقدير الكوليسترول في البيض بواسطة جهاز HPLC حيث استخلصوا الكوليسترول بواسطة إيثيل إيثر والإيثر البترولي باستخدام عمود الطور العكسي ODS (15cm×0.46mm, 5-6 µm). وطـور مـتحرك عبارة عن اسيتونيتريل:٢-بروبانول بنسبة (4:1) وبمعدل تدفق 0.6ml/min وكان حد الكشف عند 0.02g/L.

كذلك قام العالم *Emara*[44] تقدير الكوليسترول في البيض بواسطة HPLC وباستخدام عمودين الأول RP–18 (20×4.6mm, 20µm) والثاني عمود الطور

العكسي ODS (250×4.6mm, 5 µm). وطور متحرك عبارة عن أسيتونيتريل – أيزوبروبانـول – محلـول منظـم من الفوسـفات له pH تسـاوي 4 بنسـبة (40:50:10 v/v) وكانت نسبة تنقية الكوليسترول من 97.7 إلى 100% وزمن استبقاء 8.41min و 8.43 وتعتبر هذه الطريقة دقيقة وسريعة.

كذلـك قـام العالم *Tsuruta* وآخرون[45] بتقديـر الكوليسـترول فـي عينـة مصـل الـدم بواسـطة HPLC وباسـتخدام كـاشـف خـاص هـو 3-(5,6-methylenedioxy-2-phthalimidyl) benzoyl acid الذي يتفاعل مع الكوليسترول عند درجة حرارة 140°C لمدة 10min ويتم الفصل باستخدام عمود الطور العكسي T_m ODS–80 (15cm×3.2mm) وطور متحرك أسيتونيتريل – إيثانول – ماء بنسبة (7:5:35:60 v/v) وكان حد الكشف للكوليسترول 50-45 pmol حيث أن قيمة الكوليسترول الطبيعي في مصل الإنسان 212-135 mg/dI.

أيضاً قام العالم *Sion* وآخرون[46] بتقدير الكوليسترول وكبريتات الكوليسترول في المصل والبلازما بواسـطة HPLC وباسـتخدام عمـود الطـور العكسـي 5 µm, ODS2. وطور متحرك عبارة عن كلوروفورم – ميثانول وكلوروفورم – ميثانول – ماء وبمعدل تدفق 0.25ml/min، وباستخدام مقدر تشتيت الضوء للكتلة. وكان حد الكشف للكوليسترول 64 pmol. وتتميز هذه الطريقة بأنها بسيطة

وسريعة ودقيقة. وكانت كمية الكوليسترول المستخدمة في التقدير بواسطة HPLC أقل من الكمية المستخدمة بالطريقتين *Colorimetric, Enzymatic*.

قـام العالم *Nightingale* ومعه آخـرون[47] بتنقيـة الأحماض الدهنيـة والكوليسـترول المأخوذة من الأنسـجة بواسـطة HPLC وباسـتخدام عمـود Waters amino (10m particle size, 30cm×0.46mm) وطـور متحرك عبارة عن هكسان–ايزوبروبانول بنسبة (98:2) وبمعدل تدفق 1ml/min. ولقد استخلص الكوليسترول من العمود في زمن بين 7 min, 6 min.

قام العالم *Fazeli*[48] بتقدير أكاسيد الكوليسترول في المواد الغذائية المصنعة بواسـطة HPLC وباستخدام مقدر طيف الكتلة. حيث استخدم عمود كربون–١٨ (C18) (250mm×4.6mm, 5 µm) وطور متحرك عبارة عن أسيتونيتريل – ميثانول بنسبة (60:40) وعند درجة حرارة 25°C وبمعدل تدفق 1ml/min. بهذه الطريقة تـم التعرف على سبعة أكاسيد للكوليسترول موجودة في أنواع مختلفة من الغذاء مثل الزبد والبيض واللبن واللحوم ومنتجاتها.

أيضاً قام العالم *King* وزملاؤه[49] بنفس التجربة ولاحظوا أن التخزين والتسـخين تزيد من أكسدة الكوليسترول وان معظم نواتج الفحص وضحت أن

25–hydroxy cholesterol و triol هي مواد سامة، وكان حد الكشف في الزبد بين 15-20 ng/g. ونسبة الانحراف المعياري النسبي 0.036-0.089% RSD.

كذلك قام العالم *Laakso* وآخرون[50] بتقدير الدهون في البلازما بواسطة HPLC ومقدر تشتت الضوء بالبخار(ELSD). ولقد أظهرت هذه الطريقة تقدير الكوليسترول الحر FC وأسترات الكوليسترول CEs والجليسريدات الثلاثية TGs في البلازما باستخدام عمود S3W (3 µm, 100×4.6mm) وطور متحرك متكون من هكسان – رباعي هيدروفيوران بنسبة (99:1 v/v) و ٢–بروبانول – كلوروفورم بنسبة (4:1) و ٢–بروبانول – ماء بنسبة (1:1) وبمعدل تدفق 2ml/min وعند درجة حرارة 40°C. وكان الانحراف المعياري النسبي RSD للكوليسترول الحر FC 4.1, 4.5 %.

كما قام العالم *Stump* وآخرون[51] بتقدير الكوليسترول في خلايا الدم الحمراء والبلازما بواسطة HPLC ومقدر الامتصاص للأشعة فوق البنفسجية (UV) وباستخدام عمود الطور العكسي ODS (25cm×4.6mm, 5 µm) وحامي للعمود (5cm×4.6mm) والطور المتحرك عبارة عن ميثانول – ماء بنسبة (96:4) وبمعدل تدفق 1.05ml/min عند درجة حرارة 30°C وطول موجة امتصاص

215nm. وكان زمن الاستبقاء 15.9min وأعلى امتصاص عند أقل من 210nm. وكانت نسبة الاسترجاع للكوليسترول 3.4±95%.

قـام العالمـان *Spanos* و *Schwartz*[52] بتقدير الكوليسترول في الحليب كـامل الدسم بواسطة HPLC ومقدر تشتيت الضوء بالبخار (ELSD) وباستخدام عمـود الطـور العكسي كربون–١٨ (C18) وباستخدام ثلاثة أنظمة من المذيبات كطور متحرك وبمعدل تدفق 0.7ml/min.

النظام الأول: يتكون من 75 % اسيتون في اسيتونيتريل.

الـنظام الثاني: يتكون من مذيب A وهو عبارة عن أسيتونيتريل – أسيتون بنسبة (1:1). ومذيب B عبارة عن أسيتون – ميثيل رباعي بيوتيل إيثر بنسبة (75:25).

النظام الثالث: يتكون من مذيب A بروبونيتريل – أسيتونيتريل بنسبة (1:1) ومذيب B وهو عبارة عن بروبونيتريل – إيثانول – هكسان بنسبة (45:45:10) ولقد كان حد الكشف أقل من 1 µg .وكذلك استعملوا مقدرات إنزيمية لتقدير الكوليسترول في الحليب.

كمـا قام العالم *Osada* وآخرون[53] بدراسـة فصل مشـتقات أكسـدة الكوليسـترول باستخدام HPLC ومقدر امتصاص الأشعة فوق البنفسجية ومقدر تشـتيت الضوء بالبخار (ELSD). وباستعمال عمود الطور العكسي كربون–١٨

(C18) (20×0.46cm) وطـور متحرك عبارة عن ميثانول–أسيتونيتريل (60:4) وبمعـدل تدفق 1ml/min. ووجدوا أن عشر مشتقات أكسدة للكوليسترول ظهرت فـي مـنطقة طيف جهاز UV في المدى بين (205-280 nm) بينما ظهرت ثلاثة أنـواع من المشتقات بمقدر ELSD وكان معدل التدفق 40ml/min وكان أقل حد للكشف عن الاستيرولات من 100-500ng.

كذلك قام العالم *Csiky*[54] باستعمال HPLC في تقدير ستاً من نواتج أكسدة الكوليسترول وباستخدام هكسان – بروبانول أو هكسان – بيوتانول كطور متحرك وكان زمن الفصل 30min عند طول موجي 206 nm.

وأيضاً قـام العالمان *Smith, Ansari*[55] بتقدير عشـرة نواتج من أكسدة الكوليسترول باستعمال هكسان – أيزوبروبانول بنسبة (24:1) أو أسيتونيتريل – ماء بنسبة (9:1) وقياس الامتصاص عند طول موجة 212nm وزمن الفصل 60min. وكان حد الكشف 40ppb.

وكذلـك قـدر *Finocchiaro* و *Richarson*[56] الكوليسترول في الأجبان والـزبد باستخدام عمود كربون–١٨ (C18) مع أسيتونيتريل – ماء بنسبة (9:1) كطور متحرك باستخدام مقدر معامل الانكسار ***R****efractive* ***I****ndex* (RI) وكان حد الكشف 3ppm.

الفصل الثاني

الكروماتوجرافيا

Chapter Two

Chromatography

٢-١ مقدمة: Introduction

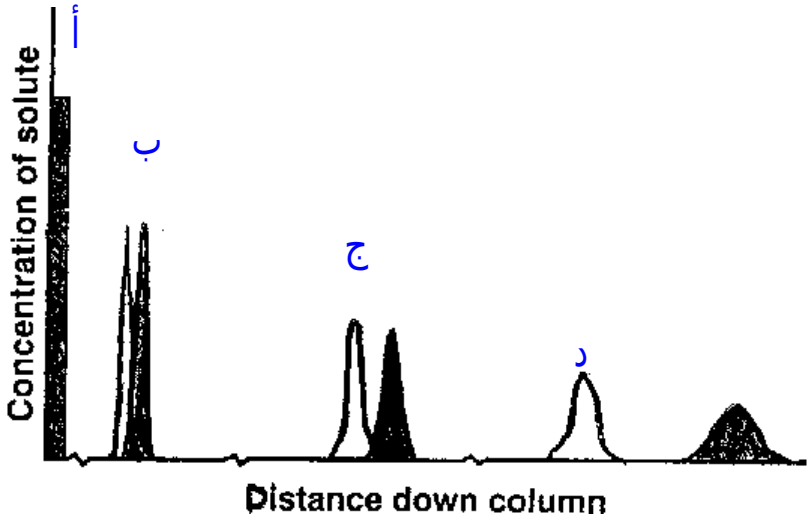
تمكـن العـالم الروسي *Tswett* في العام ١٩٠٦م من فصل أصباغ نباتية باستخدام عمود كروماتوجرافي مملوء بكربونات الكالسيوم و باستخدام محلول من الإيـثر البترولي، ولاحظ انفصال المواد إلى خطوط لونية مختلفة أطلق *Tswett* علـى هذا الأسلوب اسم الكروماتوجرافيا (*Chromatography*) والتي تعني باللغة الإغريقية "الرسم بالألوان".

فتحـت تجـارب *Tswett* هـذه عهداً جديداً لتقنيات هامة جداً من تقنيات التحليل الكيميائي يطلق عليه التحليل الكروماتوجرافي.

وجمـيع طـرق الفصل الكروماتوجرافية ترتكز على مبدأ توزيع مكونات المخلـوط بصـورة مختلفة بين طورين، طور ثابت وطور متحرك، حيث تنتقل مكونات المخلوط على الطور الثابت بانسياب الطور المتحرك خلاله ويتم الفصل نتـيجة لاختلاف قوى التجاذب بين المواد في المخلوط والطورين مما يؤدي إلى اخـتلاف فـي سرعة هجرة المكونات ومن ثم إلى اختلاف مواقعها على الطور الثابـت مع مرور الزمن. والطور المتحرك هو الذي يزود المكونات بقوة الدفع والحركة، وهو إما أن يكون سائلاً وإما أن يكون غازياً.

أمـا الطـور الثابت فهو الذي يعوق الحركة ويعمل على فصل المكونات وهو إما أن يكون صلباً ناعماً وإما أن يكون حبيبات صلبه مغلفة بطبقة رقيقة من سائل ما. تعتبر قدرة الطرق الكروماتوجرافية على الفصل جيدة جداً حيث يمكن فصـل محـتويات عينة تحتوي على عشرات المواد بشكل تام في خلال دقائق، ويمكـن بواسـطة تلك الطرق فصل المركبات العضوية المتشابهة في التركيب وكذلـك المركبات غير العضوية المتشابهة في الخواص الكيميائية مثلاً، وهو ما يصعب تحقيقه في طرق تحليلية أخرى.

الشكل (٢-١) عبارة عن تجربة فصل كروماتوجرافيا مطابقة لعملية الفصل التـي قـام بها العالم *Tswett*، حيث أن شكل العمود يكون تبعاً للحالة الفيزيائية للطورين المتحرك والثابت. توضع العينة المراد فصلها في أعلى العمود وتظهر كموجـة ضـيقة كما هو موضح في الشكل (٢-١-أ) فعندما تمر العينة لأسفل العمـود بواسـطة الطور المتحرك نجد أن المذاب يبدأ في الحركة لأسفل ثم تبدأ عملـية الفصـل كما هو موضح في الشكل (٢-١-ب-ج) وإذا كان هناك تداخل نجده بعد فترة ينفصل كما هو في الشكل (٢-١- د)[57].



الشكل (٢-١)

تجربة فصل خليط من محلولين على عمود كروماتوجرافي

٢-٢ أنواع الطرق الكروماتوجرافية:

تصـنيف الطرق الكروماتوجرافية يعتمد على نوع الطور المتحرك ونوع الطـور الثابت، كما يمكن تقسيم الطرق الكروماتوجرافية بناءً على ميكانيكية أو كيفية توزيع المواد المراد فصلها بين الطورين.

*** الكروماتوجرافيا السائلة - الصلبة:** Liquid–Solid Chromatography (L-SC)

لقـد تم اكتشاف هذا النوع من الكروماتوجرافيا من قبل العالم *Tswett* في عام ١٩٠٦م. يتكون الطور الثابت من مادة صلبه مثل هلام السيليكا (*Silica gel*) أو الألوميـنا (*Alumina*) وتعبأ المادة الصلبة في عمـود يمر من خلاله الطـور المـتحرك الـذي هو عبارة عن سائل. إن ميكانيكية توزيع المواد بين الطورين الثابت والمتحرك تعتمد على مدى قوة امتزاز (التصاق) المادة على سطح الطور الثابـت الصـلب بحيث أن المادة التي تمتز بقوة تتأخر (أي تمكث مدة أطول في العمود). بينما المادة ذات الامتزاز الأقل تخرج من العمود في وقت مبكر وهكذا يـتم فصـل المواد عن بعضها. وجميع الطرق الكروماتوجرافية التي يكون فيها الطـور الثابـت عبارة عن مادة صلبة تعتمد على الامتزاز ولهذا تسمى بالطرق الكروماتوجرافية الامتزازية. (*Adsorption Chromatography*) ويلاحظ أن هذا النوع من الكروماتوجرافيا قليل التطبيق نسبياً نظراً لقلة المواد التي تصلح كطور ثابت.

*** الكروماتوجرافيا السائلة - السائلة:** Liquid-Liquid Chromatography (L-LC)

هذا النوع من الكروماتوجرافيا تم اكتشافه عام ١٩٤١ م بواسطة العالمان *Martin* و *Synge* ونالا على أثره جائزة نوبل. يتكون الطور الثابت هنا من طبقة رقـيقة مـن سائل أو من خليط من السوائل مثبته على سطح مادة صلبة مسامية وخاملـة مـثل هـلام السـيليكا أو مسحوق السليلوز أو بعض البوليمرات مثل البوليسـتيرين (*polystyrene*) أو الـتفلون. أما الطور المتحرك فعبارة عن سائل آخـر لا يـذوب في الطور الثابت. وحيث أن فصل المواد عن بعضها في هذه الطـريقة يعـتمد على مقدار ذوبان المادة في الطور الثابت بحيث أن المادة التي تـذوب بشـكل أكبر تتأخر أكثر وعلى العكس من ذلك المادة التي لا تذوب في الطـور الثابـت تخرج من العمود في وقت مبكر وبسرعة، وتسمى هذه الطرق بالطـرق الكروماتوجرافية الذوبانية التجزيئية (*Partition Chromatography*).

وهذا النوع من الكروماتوجرافيا واسع التطبيق حيث أنه يمكن استخدام العديد من السوائل كطور ثابت.

*** الكروماتوجرافيا الغازية - الصلبة:** Gas-Solid Chromatography (G-SC)

اسـتخدمت هذه الطريقة قبل عام ١٨٠٠م لتنقية الغازات ولكنها لم تصبح شـائعة ومعـروفة إلا فـي عام ١٩٤٠م عندما وصفت تفصيلياً بواسطة العلماء

Hesse و *Claesson* و *Philips* وقد كان هذا النوع يعاني من قلة المواد الصلبة، ولكـن البحث المستمر في هذا المجال أثمر عن تحضير أنواع جديدة من المواد الصـلبة المناسـبة للاستعمال كطور ثابت وبالتالي زادت من إمكانيات تطبيقها واستخدامها. وتعتبر هذه الطريقة من الطرق الكروماتوجرافية الامتزازية.

*** الكروماتوجرافيا الغازية - السائلة:** Gas–Liquid Chromatography (G-LC)

تعتبر هذه الطريقة من أكثر الطرق الكروماتوجرافية استخداماً حيث أحدثت ثـورة في مجال الكيمياء العضوية منذ أن أدخلها العالمان *James* و *Martin* عام ١٩٥٢م. إذ يمكن بواسطتها فصل واكتشاف كميات صغيرة جداً تصل في بعض الحالات إلى $10^{-15}g$ والطور المتحرك هنا عبارة عن غاز. أما الطور الثابت فهو عبارة عن طبقة رقيقة من سائل مثبت على دعامة صلبة ولهذا تعتبر هذه الطريقة من الطرق الكروماتوجرافية التجزيئية.

*** كروماتوجرافيا التبادل الأيوني:** Ion–Exchange Chromatography

هـذا النوع من الكروماتوجرافيا تم اكتشافه عام ١٩٤٠م بواسطة العالمان *Taylor* و *Urey* وتعتـبر هذه الطريقة نوع من الكروماتوجرافيا السائلة–الصلبة حيث أن الطور المتحرك سائل والطور الثابت صلب، إلا أن ميكانيكية التوزيع لا تعـتمد علـى الامتزاز وإنما تعتمد على التبادل الأيوني حيث تستبدل المكونات

الأيونية في العينة بأيونات لها نفس الشحنة مرتبطة بمسحوق المادة الصلبة المالئة لعمود الفصل وهذا الاستبدال الأيوني ينتج عنه إعاقة لبعض مكونات العينة حيث يسهل فصلها. هذا النوع من الكروماتوجرافيا خاص لفصل الأيونات.

*** الكروماتوجرافيا المستوية:** Plane Chromatography

يُفـرد الطـور الثابت هنا على لـوح من الزجاج أو قطعة من الـورق. تسـمى الطـريقة التـي يسـتخدم فيها قطعة الورق بالكروماتوجرافيا الورقية (*Paper Chromatography*) وهي نوع خاص من الكروماتوجرافيا السائلة-السائلة حيـث أن الطور الثابت عبارة عن طبقة رقيقة من الماء أو أي سائل أخر ممتز علـى سطح الورقة المصنوعة من السليلوز. أما الطور المتحرك فهو عبارة عن سائل آخر وتمتاز هذه الطريقة ببسـاطتها؛ حيث توضع العينة على هيئة نقطـة (بقعة) من المحلول عند أحد أركان الورقة وبعد جفاف العينة يسمح لحافة الورقة بملامسة مذيب عضوي (الطور المتحرك) فينتشر المذيب بخاصية الورقة الشعرية ويمـر علـى العينـة ويحمـل مكوناتها في طريقه بسرعات متفاوتة تبعاً لنسب توزيعها.

أما النوع الثاني فيسـمى بالكروماتوجرافيا ذات الطبقة الرقيقة (TLC) ***Thin Layer Chromatography*** هذا النوع من الكروماتوجرافيا وضع من قبل الباحثين الروسيين *Izmailov* و *Schrieber* عام ١٩٣٨م وهي تشبه الكروماتوجرافيا

الورقية باستثناء استبدال الورقة بلوح زجاجي مغطى بطبقة رقيقة من الألومينا Al_2O_3 أو هلام السيليكا أو أي مواد صلبة أخرى مناسبة. وهذه الطريقة أفضل تكرارية ودقة من الورقية.

*** الكروماتوجرافيا المنخلية:** Gel Chromatography

تم اكتشاف هذا النوع عام ١٩٥٠م بواسطة العالمان *Flodin* و *Porath* وفي هـذه الطـريقة يعـبأ العمود بمادة هلامية (*gel*) يحتوي جزيئها الكبير جداً على تركيب يشبه المنخل وعند إمرار المواد المراد فصلها من خلالها يتم فصلها بناءً علـى حجم جزيئاتها بطريقه تشبه عمل المنخل تماماً حيث يسمح للجزيئات ذات الأحجام الصغيرة بالمرور أو الانتشار خلالها، أما الجزيئات ذات الأحجام الأكبر فـلا يسـمح لهـا بالمرور من خلال المسام وبالتالي تمر بسرعة خلال العمود وتخرج منه أولاً دون أي إعاقة[58,59].

وقـد استعملت مختلف أنواع الكروماتوجرافيا بصورة واسعة منذ حوالي خمسـين عاماً وأثبتت منذ ذلك الوقت أنها ذات قيمة تحليلية متميزة في التطبيقات التحليلـية ومازال مصطلح الكروماتوجرافيا الأصلي باقياً ونلاحظ أنه في جميع أنواع الكروماتوجرافيا يعتمد نجاح الفصل والتحليل الكيميائي على اختيار الطور الثابـت المناسب للعينة المراد فصلها وكذلك على اختيار الطور المتحرك الملائم لهذه العينة.

٢-٣ الطور الثابت الصلب: Solid – Stationary Phase

وهـو عبارة عن مادة قطبية ذات خواص امتزازية جيدة وتعتبر الألومينا وهـلام السـيليكا مـن أكثر المواد استخداماً على الرغم من أن هناك العديد من المواد التي يمكن استخدامها كطور ثابت كما في الجدول (٢-١) وتتميز الألومينا بأنهـا أكـثر قطبـية وبالتالي أكثر فعالية لهذا تستخدم في فصل المركبات ذات القطبـية المنخفضة. أما المركبات التي تتمتع بقطبية عالية فتكون الألومينا غير مناسـبة لفصلها لأنها تُمتز بشدة على سطحها ومن ثم يصعب تخليصها بواسطة المذيب.

يسـتخدم جل السيليكا ذات الفعالية الضعيفة في فصل المركبات التي تتمتع بقطبية عالية ومن الاحتياطات التي يجب مراعاتها عند اختيار الطور الثابت:

١) عدم ذوبانه في المذيبات التي تتدفق من خلال العمود.

٢) عدم تفاعله كيميائياً مع هذه المذيبات أو مع مكونات الخليط المراد فصله.

٣) أن يكون له فعالية امتزاز جيدة حيث تعتمد هذه الخاصية على تكوينه الكيميائي وطبيعته الفيزيائية.

٤) مساحة سطح حبيباته كبيرة بالنسبة لحجمها[60].

جدول (٢-١)

بعض مواد الامتزاز الصلبة المستخدمة كطور ثابت في عمود الفصل الكروماتوجرافي[60].

ألومينا	Al_2O_3
الفحم النباتي	C
فلورسيل	Mg/SiO_2 (anhydrous)
هلام السيليكا	SiO_2
كربونات الماغنسيوم	$MgCO_3$
كربونات الكالسيوم	$CaCO_3$
مسحوق التلك	Mg/SiO_2 (hydrous)
السكروز	$C_{12}H_{22}O_{11}$
النشا	$(C_6H_{12}O_6)_n$

٢-٤ الطور المتحرك: Liquid – Mobile Phase

يستخدم في بعض الحالات مذيب واحد لفصل كل مكونات الخليط، وأحياناً يستخدم خليط من مذيبات مختلفة لتخليص هذه المكونات. ويبدأ التخليص (*Elution*) عادة بمذيب غير قطبي (*nonpolar*) لتخليص المركبات غير القطبية من العمود ثم تزداد درجة قطبية المذيب بالتدريج لتخليص المركبات ذات القطبية الأعلى من العمود. وبصورة عامة تتحرك المركبات غير القطبية خلال العمود بصورة أسرع من المركبات القطبية. هذا ويعتبر الوزن الجزيئي عاملاً مهماً جداً في تحديد عملية التخليص لذا فإن المركب غير القطبي ذا الوزن الجزيئي الكبير سيتحرك خلال العمود بصورة أبطأ من مركب غير قطبي وزنه الجزيئي صغير ومن المحتمل أن يخرج من العمود مع بعض المركبات القطبية. ويشترط في المذيب المستخدم كطور متحرك:

١. أن لا يخرج المكونات من العمود بسرعة لأن ذلك لن يؤدي إلى فصلها.

٢. أن لا تكون سرعة التخريج بطيئة لأن ذلك يؤدي إلى الحصول على أزمنة استبقاء طويلة وتسبب تعريض السن.

٣. أن يكـون المذيب خالياً تماماً من كل الشوائب التي لها درجة استقطاب تفوق درجة استقطابه. مثل وجود الماء أو الأحماض أو الكحولات في الكلوروفورم أو وجود مركبات عضوية.

٤. يجـب عـدم اسـتخدام بعض المذيبات التي تتأثر كيميائياً عند استخدامها مع بعـض المـواد الصـلبة التي لها خاصية امتزاز، مثل الأسيتون الذي يتبلمر بواسطة الألومينا القاعدية.

يوضح الجدول (٢-٢) أكثر المذيبات استخداماً[61].

الجدول (٢-٢)

المذيبات العضوية المستخدمة كأطوار متحركة في الفصل الكروماتوجرافي.

*** رتبت هذه المذيبات تبعاً للزيادة في قوة تخليصها لمكونات العمود[61].**

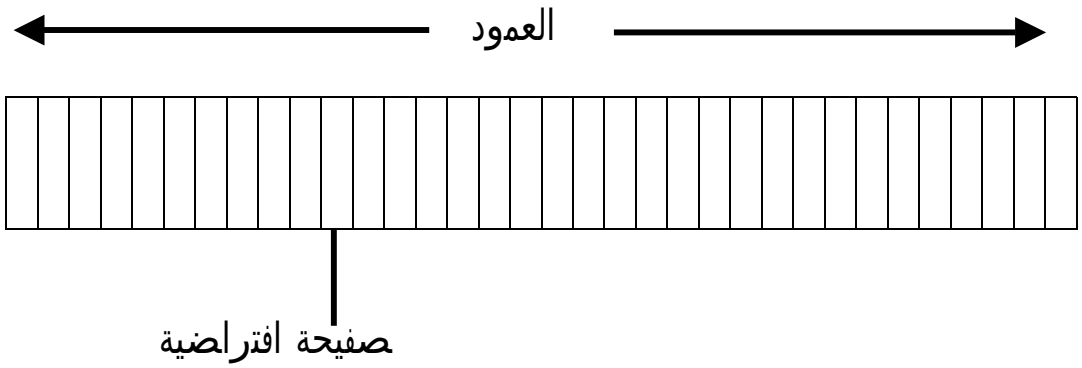
إيثر بترولي	بيريدين
هكسان حلقي	أسيتون
رباعي كلوريد الكربون	كحول إيثيلي
بنزين	كحول ميثيلي
كلوروفورم	ماء
خلات الإيثيل	

٢-٥ الأسس النظرية لطرق الفصل الكروماتوجرافي:

أ ـ نظرية الفصل الكروماتوجرافي.

هـناك نظريـتان في وصف عملية الفصل الكروماتوجرافي، وتكمل كلا النظريتين بعضهما بعضاً في تفسير ظواهر الكروماتوجرافيا المختلفة.

- **النظرية الأولى:** نموذج الصفائح النظرية (Theoretical plate model)



الشكل(٢-٢)

يبيـن الشـكل (٢- ٢) رسـماً توضيحياً لنموذج الصفائح النظرية والتي تصور العمود الكروماتوجرافي على أنه يحتوي عدداً كبيراً من الصفائح وتحدث اتزانات منفصلة بين هذه الصفائح والطور المتحرك. وتجدر الإشارة إلى أن هذه الصـفائح ليس لها وجود حقيقي ولكنها تصور خيالي ويساعد على تفسير عمل العمـود وكفاءتـه؛ حيث أن كفاءة عمـل العمود تتناسـب طردياً مع زيادة عدد الصـفائح النظرية. وإذا رمزنا إلى عدد الصفائح النظرية بالرمز N وإلى طول

عمـود الفصـل بالرمز L لأصبح الارتفاع (السمك) الذي يعادل صفيحة نظرية واحدة (*Height Equivalent to Theoretical Plate*, HETP).

$$HETP = \frac{L}{N}$$

ويمكن حساب عدد الصفائح النظرية التي يحتويها عمود ما من المعادلة:

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2$$

حيـث أن t_R هو زمن الاستبقاء وw هو عرض السن مقاساً عند منتصف قاعدته كما في الشكل (٢- ٣).

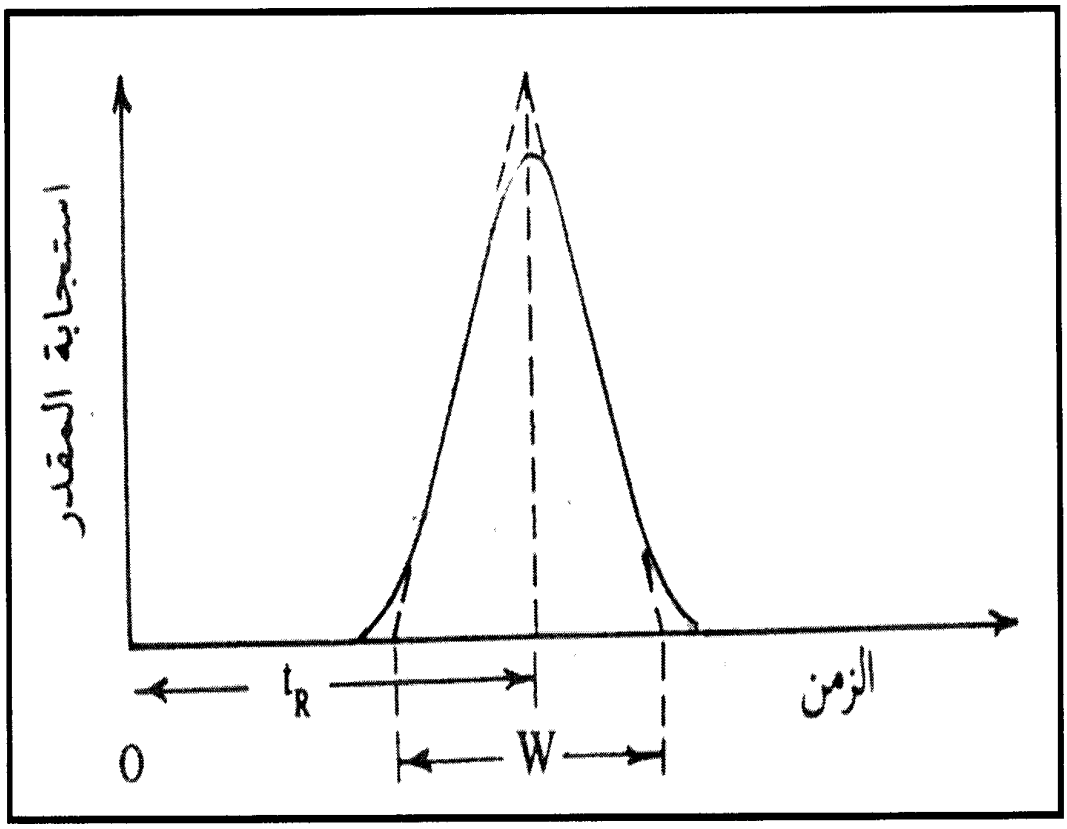
- النظرية الثانية: نظرية معدل السرعة The Rate Theory

وهـي تعني وصف الزمن اللازم للوصول إلى اتزان. وفقاً لهذه النظرية فـإن العوامل التي تؤثر في عرض السـن نجدها ملخصة في معادلة فان ديمتر (*van Deemter equation*):

$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cu$$

حيث HETP هو ارتفاع (سمك) الصفيحة النظرية.

u معـدل سـرعة جريان الطور المتحرك و A و B و C معاملات تصف آلية سريان جزيئات المادة المدروسة أثناء عبورها للعمود وهي:



شكل (٢-٣)

طريقة قياس عرض السن.

١) الانتشار العشوائي: Eddy Diffusion (A)

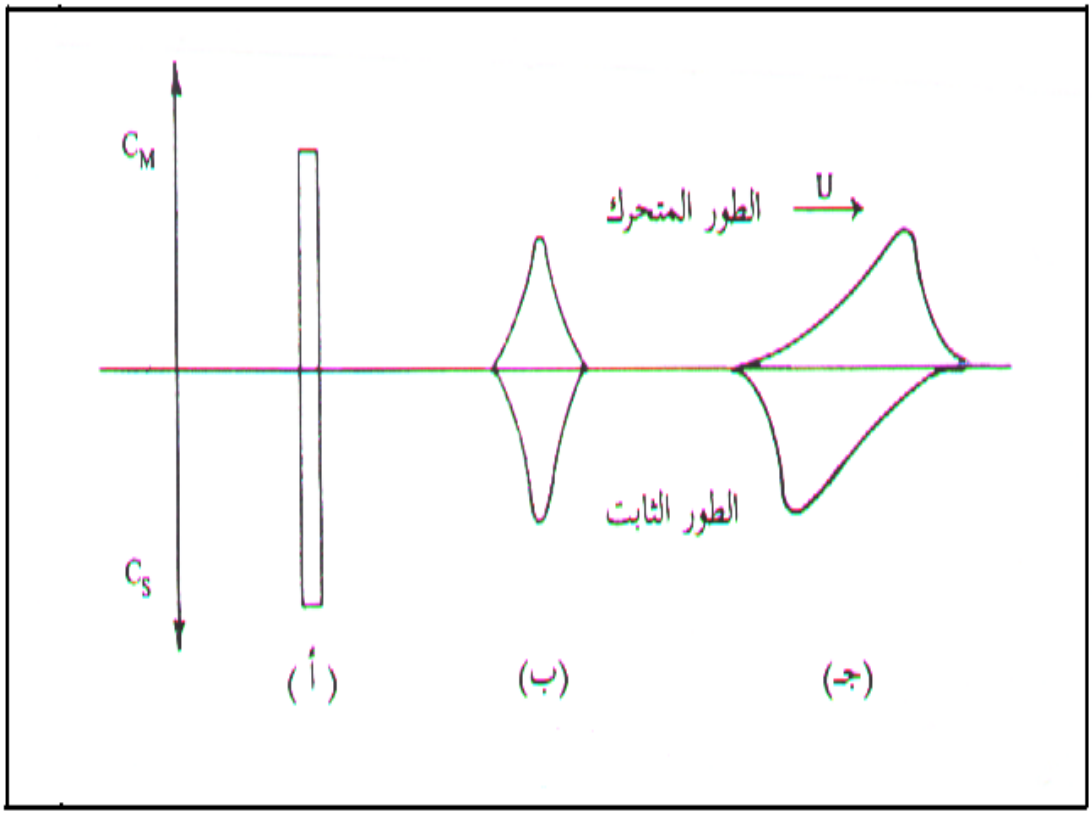
إن مرور جزيئات المادة خلال العمود المعبأ بالطور الثابت عملية عشوائية فـبعض الجزيـئات تتخذ طريقاً أطول من بعضها الآخر وهذا يعنى أن بعضها سيسبق بعضها الآخر في الوصول إلى نهاية العمود مما يساهم في زيادة عرض السـن. ويمكن التقليل من تأثيره بواسطة التعبئة المحكمة للعمود وجعل الحبيبات صغيرة الحجم ومنتظمة الشكل وعندما يتحقق ذلك فإن قيمة A تقترب من الصفر ويمكن إهمالها.

٢) الانتشار الطولي: Longitudinal Diffusion (B)

إن تركـيز المادة في منتصف الحزمة أعلى منه عند حوافها ويترتب على ذلـك أن تنتشـر جزيئات المادة من المنطقة الأعلى تركيزاً (وسط الحزمة) إلى المـنطقة الأقـل تركيزاً (الحواف) مما يزيد من عرض السن ويرتبط هذا العامل بعلاقـة عكسية مع سرعة الجريان، فكلما زادت سرعة الجريان كلما قل الزمن المتاح للجزيئات لتنتشر وبالتالي يقل عرض السن والشكل (٢-٤-ب) يوضح هذا النوع من الانتشار مقارنة بالكروماتوجراف النموذجي كما في الشكل (٢-٤-أ). وحيـث أن الانتشار في السوائل أقل بكثير من الانتشار في الغازات لذا فإن هذا العامل غير مهم عندما يكون الطور المتحرك سائلاً.

٣) مقاومة انتقال المواد: (C) Resistance to mass transfer

تحتاج جزيئات المادة إلى بعض الوقت لينشأ اتزان بين تركيزها في الطور المـتحرك وتركيزها في الطور الثابت فإذا كانت سرعة جريان الطور المتحرك عالية وكانت لجزيئات المادة رغبة قوية في الطور الثابت عندئذ سيتحرك الطور المتحرك مخلفاً وراءه جزيئات المادة وسيزداد عرض السن. وكلما زادت سرعة الجريان كلما زاد عرض السن. كما في الشكل (٢- ٤-ج). و يتضح من هذا أن هـناك علاقـة قويـة بيـن سرعة جريان الطور المتحرك وكفاءة العمود ممثلة (بصورة عكسية) بالارتفاع المكافئ لصفيحة نظرية HETP.



شكل (٢- ٤)

توزيع التركيز خلال النطاق في العمود الكروماتوجرافي

(أ) كروماتوجراف نموذجي.

(ب) توسّع النطاق بسبب انتشار الجزيئات.

(ج) توسّع النطاق بسبب بطء الاتزان بين الطورين

حيث أن:

C_s تركيز المادة في الطور الثابت.

C_M تركيز نفس المادة في الطور المتحرك.

ب) معامل التوزيع: Distribution Coefficient

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

$$D = \frac{C_S}{C_M} \qquad (1)$$

حيث C_S تركيز المادة في الطور الثابت.

C_M تركيز نفس المادة في الطور المتحرك.

فـإذا كانت قيمة معامل التوزيع كبيرة فإن اغلب جزيئات المادة توجد في الطور الثابت ولهذا فإن المادة تمكث مدة أطول في العمود. والعكس صحيح وان الجزء من الزمن الكلي الذي يقضيه جزيء المادة في الطور المتحرك t يتناسب طـرديأ مع الجزء من الكمية الكلية من تلك المادة الموجودة في الطور المتحرك كالتالي:

$$t = \frac{\text{عدد الجزيئات في الطور المتحرك}}{\text{العدد الكلي للجزيئات}}$$

$$= \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S} \qquad (2)$$

$$= \frac{1}{1 + D\frac{V_S}{V_M}} \qquad (3)$$

$$= \frac{1}{1+k} \qquad (4)$$

حيث أن k معامل السعة *Capacity Factor*

ويمكن حساب معدل سرعة سريان جزئ المادة r عبر العمود وذلك بضرب t في سرعة سريان الطور المتحرك u هكذا.

$$r = ut = u\frac{1}{1+k} \qquad (5)$$

نستنتج من ذلك أن r تعتمد على u و k والأخيرة تعني نسبة حجم الطور الثابت إلى حجم الطور المتحرك مضروباً في معامل التوزيع وجميع العوامل ثابتة بالنسبة إلى المواد المراد فصلها إلا أن معامل التوزيع يختلف من مادة إلى أخرى وعلى هذا الأساس يتم فصل المواد عن بعضها البعض.

ج) زمن المكوث أو الاستبقاء: Retention Time

يسمى الزمن اللازم للمادة لكي تمر عبر طول العمود L أي الزمن المستغرق من بدء مرور الطور المتحرك وحتى خروج المادة من العمود بزمن المكوث أو الاستبقاء ويرمز له بالرمز t_R.

$$t_R = \frac{L}{r} = \frac{L}{u}(1+k) \qquad (6)$$

$$= t_M(1+k) \qquad (7)$$

حيث t_M ترمز للزمن اللازم لجزيء الطور المتحرك ليمر عبر العمود.

د) حجم المكوث أو الاستبقاء: Retention Volume

وهـو حجم الطور المتحرك اللازم لتمرير وإخراج المادة من العمود وإذا كـان معدل سريان الطور المتحرك F بوحدة الحجم ثابتاً فإنه يمكن حساب حجم المكوث V_R.

$$V_R\ (ml) = t_R\ (min) \times F\ (ml/min) \qquad (8)$$

وبالتعويض في المعادلة رقم (7)

$$V_R = V_M(1+k) \qquad (9)$$
$$= V_M + DV_S$$

حيث أن V_M حجم الطور المتحرك الموجود في العمود.

هـ) درجة الفصل: Resolution

إن أهـم وظيفة للطرق الكروماتوجرافية تتضمن فصل مكونات العينة عن بعضها ولذا فإن درجة الفصل تلعب دوراً مهماً جداً ويبين الشكل (٢-٥-أ) فصلاً رديـئاً لمكونين مما يحول دون معرفة نوع وكمية المكون ويمكن تحسين درجة الفصل عن طريق:

١. تغيـير درجة الحرارة أو طبيعة الطورين الثابت والمتحرك أو أحدهما وذلك لتحسين معامل الفصل. شكل (٢-٥-ب).

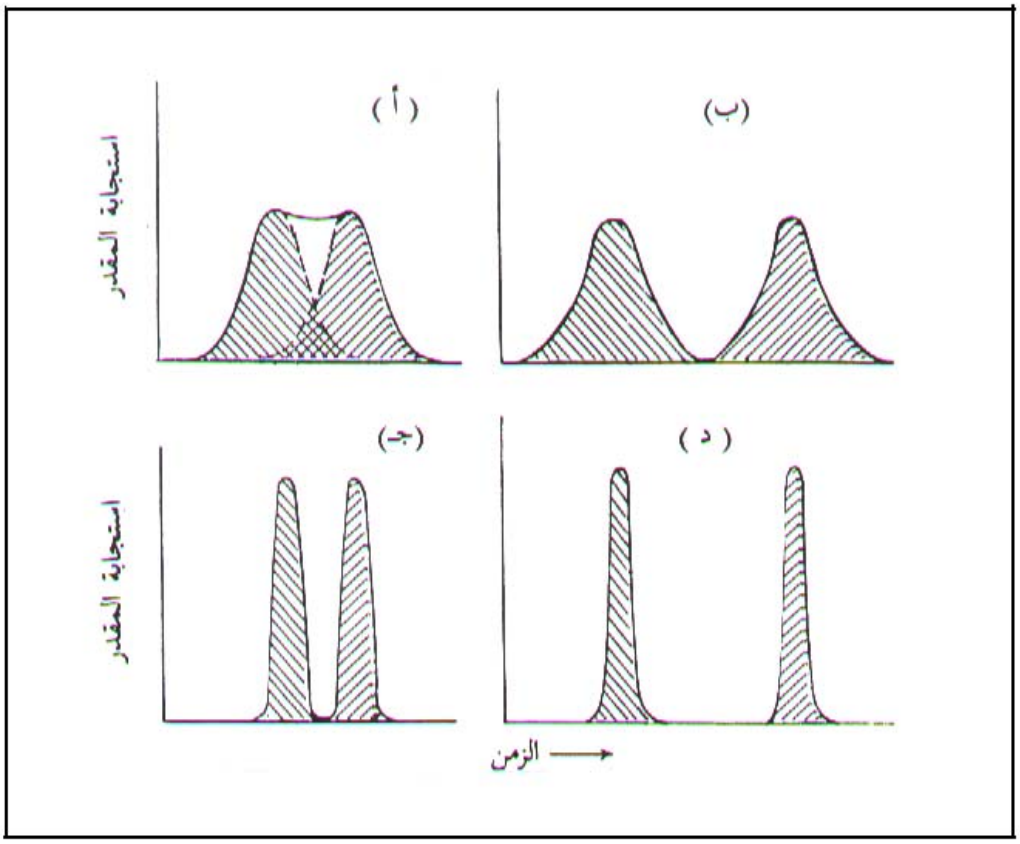
٢. تضـييق عرض الأسنان (*Peaks Width*) بواسطة تحسين كفاءة العمود (تقليل HETP وزيادة N) كما في الشكل (٢-٥-ج).

٣. استخدام كل من ١ و ٢ معاً الشكل (٢-٥-د).

ويعبر عن درجة الفصل R بين مكونين زمن استبقائهما t_2, t_1 وعرض سنيهما w_2, w_1 بالشكل (٢-٦) وبالمعادلة التالية:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{(w_2 + w_1)}$$

عـندما تكـون قيمة $R > 1.5$ فإن الفصل يكون تاماً أما إذا كانت $R = 1.0$ فإنه يحدث تداخل بين السنين[62,63].



شكل (٢-٥)

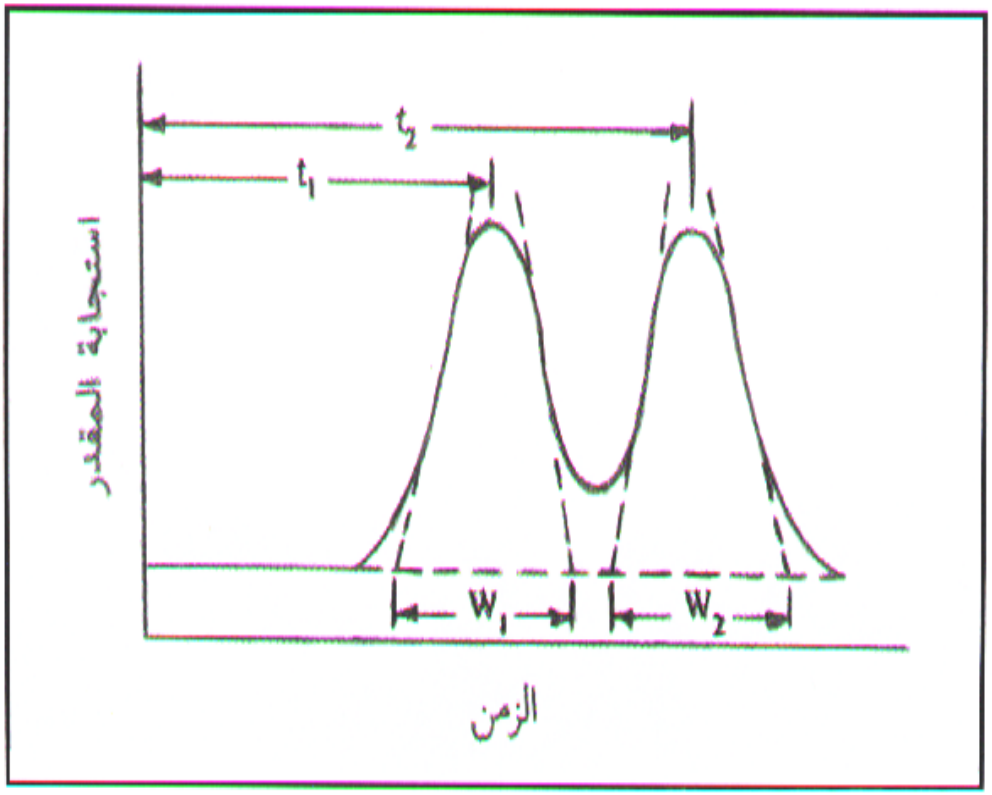
تأثير معامل الفصل وعدد الطبقات النظرية في العمود على درجة فصل سنين لمكونين في مخلوط.

(أ) يوضح الحالة التي يكون فيها درجة الفصل رديء وعدد الطبقات النظرية صغير.

(ب) يوضح الحالة التي يكون فيها درجة الفصل جيد وعدد الطبقات النظرية صغير.

(ج) يوضح الحالة التي يكون فيها درجة الفصل رديء وعدد الطبقات النظرية كبير.

(د) يوضح الحالة النموذجية التي يكون فيها درجة الفصل جيد وعدد الطبقات النظرية كبير.



شكل (٢- ٦)

القياسات اللازمة في حالة حساب درجة الفصل بين السنين في الكروماتوجرام.

٢-٦ أنواع أعمدة الفصل:

٢-٦-١ الأعمدة ذات الطور الطبيعي: Normal Phase

وتشـمل أعمـدة امتزاز مثل هلام السيليكا والألومينا ذات القطبية العالية وباسـتخدام أطـوار متحركة غير قطبية لهذا تُفصل المركبات الأقل قطبية أولاً وتمكث المركبات الأكثر قطبية مدة أطول.

٢-٦-٢ الأعمدة ذات الطور العكسي: Reversed Phase

يكـون الطـور الثابـت غـير محب للماء أي غير قطبي بينما الأطوار المـتحركة تكـون قطبـية وتشـمل أعمدة السيليكا القاعدية و C18 ولهذا تُفصل المركبات الأكثر قطبية أولاً ويزيد مكوث المركبات الأقل قطبية.

٢-٦-٣ الأعمدة ذات التبادل الأيوني: Ion Exchange

يوجد بعض مواد التعبئة الخاصة للتحليل العالي الأداء مثل:

١. *Polystyrene* مضاف إليه DVB (***D**ivinyl **B**enzene*).

٢. المبادلات الأيونية الصمغية(*Resins*)[64].

٢-٧ تحليل المواد المفصولة:

هناك العديد من الطرق والوسائل التي يمكن بواسطتها تحليل المواد بعد فصـلها بطـرق الكروماتوجرافـي، وابسـط هذه الطرق تتضمن جمع المذيب المـتحرك في نهاية العمود على دفعات في أنابيب اختبار بحيث يتراوح حجم كل دفعـة فـي حدود بضعة مليلترات. وبعد ذلك يتم تحليلها باستخدام طرق التحليل المألوفـة مثل التحليل الحجمي أو الطيفي.... الخ. ويمكن أيضاً تركيب مقدر من المقـدرات المعـروفة في نهاية العمود بحيث يتم قياس تركيز المادة مباشرة بعد خروجها من العمود[65].

٢-٨ المقدِّرات: Detectors

وظيفة المقدر أن يحس بالمادة عندما تخرج من العمود كما يعطي استجابة معيـنة تتناسب مع تركيز المادة المفصولة. وهنالك عدد كبير من المقدرات من أجل الكشف عن العينات وتقديرها. ويمكن تصنيف هذه المقدرات بالشكل التالي:

١. مقدرات تعتمـد على الخواص النوعية للعينـة المذابـة (*Solute*) مثل UV (مطـياف الأشعة فوق البنفسجية) والتألق (*Fluorescence*)؛ حيث تمتلك هذه العينات خواصاً لكشفها.

٢. أنظمة كشـف تعتمد على خصائص المادة المخـرجة (*Eluent*) مثل معامل الانكسـار *Refractive Index*، حيث تتغير قيمة معامل الانكسار لهذا المذيب بوجود العينة.

٣. مقدرات تعمل على الفصل بين محلول العينة (*solute+eluent*) والمادة المخرجة (*eluent*) مـثل المقدر ذو التأين اللهبي *Flame ionization* ومقدر طيف الكتلة *Mass Spectrometry*.

اختيار المقدر المناسب غالباً ما يعتمد على خواص العينة والحساسية التي يتطلبها التحليل. بالإضافة إلى عوامل أخرى مهمة للمقدر مثل مستوى الكشف والحساسية والخطية. ويفضل المقدر الثابت الذي تكون العلاقة بين استجابته وتركيز المادة علاقة خطية عبر مدى واسع من التركيز. ويتوفر لتقنية الكروماتوجرافيا السائلة ذات الضغط (الأداء) العالي مقدرات عديدة تتناسب مع تنوع استخداماتها وتعددها وسوف نتطرق لبعض منها :

١) مقدرات الامتصاص: Absorbance Detectors

العديـد من مقدرات الامتصاص أجهزة تعطي حزمة أشعه، تمر هذه الأشعة من خلال مرشح يمتص كل الأشعة عدا الأشعة ذات طول الموجة المناسبة للمادة المراد تقديرها. ومن أنواعها:

أ) مقدرات امتصاص الأشعة فوق البنفسجية مع مرشحات:

Ultraviolet Absorbance Detectors with Filters

يعتـبر مـن ابسط أنواع المقدرات مقدر امتصاص الأشعة فوق البنفسجية والمحتوية على مرشح ومصباح زئبق كمصدر للأشعة. ويتم بواسطة المرشحات اختـيار الخط ذي الشدة الأعلى عند 254 nm ويمكن القياس عند أطوال موجات 250 و 313 و 334 و365 nm وذلك بتبديل المرشحات. هذا النوع من المقدرات محـدود الاسـتعمال حيث لا يمكن تقدير إلا المواد التي تمتص عند أطوال تلك الموجـات وهـناك بعض المجموعات الوظيفية العضوية والمواد غير العضوية تُظهـر امتصاصـاً عند أطوال هذه الموجات. وفي هذا النوع من المقدرات يتم تقديـر المـواد المفصولة كمياً ونوعياً؛ حيث أن القياس هنا يخضع لقانون بيير لامبرت.

$$\text{Absorbance} = \log \frac{I_o}{I_t} = \varepsilon C \ell$$

حيث أن:

ε = معامل الامتصاص الجزيئي.

C = تركيز العينة المولاري.

ℓ = طول مسار الأشعة.

I_o = شدة الأشعة الساقطة.

I_t = شدة الأشعة النافذة.

ب) مقدرات امتصاص الأشعة فوق البنفسجية مع موحد طول الموجة

Ultraviolet Absorbance Detectors with Monochromators

أكـثر مصنعي جهاز HPLC يصنعون مقدرات طيفية تحتوي على ماسح ضوئي وبعضـها تحتوي على أشعة فوق بنفسجية فقط وبعضها يشتمل على أشعة مرئية وفوق بنفسجية معاً.

ج) مقدرات امتصاص الأشعة تحت الحمراء:

Infrared Absorbance Detectors

يتوفر تجارياً نوعين من هذه المقدرات الأول به ماسح ضوئي للطول الموجي وبـه ثلاثـة مرشحات شـبه دائرية. ومدى هذا الجهاز في الكشف يتراوح بين 2.5-14.5 µm. النوع الثاني الأكثر تطوراً يعتمد على محول (*Fourier transform*) وهـو مشابه لمقدر الامتصاص للأشعة فوق البنفسجية، لكن هناك قيود تحد من استخدام هذا النوع من المقدرات أهمها انخفاض الشفافية لكثير من المذيبات مثل الماء و الكحولات وهذا يحول دون استخدامها في كثير من التطبيقات.

٢) مقدرات التألق: Fluorescence Detectors

أبسط الأنواع منها يرتكز على مصدر إثارة زئبقي ومرشح واحد أو أكثر لعـزل حـزمة الشعاع المنبعث. أما الأجهزة الأكثر تطوراً فتعتمد على مصباح الزيـنون مع موحد طول الموجة وذلك لعزل شعاع التألق، ويحاول مصنعو هذا

الـنوع من المقدرات تطويرها باستعمال مصادر الليزر التي تزيد من الحساسية والانتقائية. ويستعمل هذا النوع من المقدرات في تحليل بعض المواد الصيدلانية والعينات الطبية والمنتجات النفطية.

٣) مقدرات معامل الانكسار: Refractive–Index Detectors

فـي هذا النوع من المقدرات يمر المذيب من خلال أحد نصفي الخلية في طريقه للعمود وتمر مادة التخريج من خلال النصف الآخر من الخلية ويتم فصل الخلـية إلـى نصـفين بلـوح زجاجي تثبت بزاوية بحيث يحدث انحناء للحزمة الشـعاعية السـاقطة إذا اختلف معامل الانكسار للمحلولين. تمتاز هذه المقدرات بالاسـتجابة لكـل المحاليل تقريباً. لهذا تعتبر مقدرات عامة. وهي تشبه مقدرات اللهب في كروماتوجرافيا الغاز وتتميز بحساسية عالية لدرجة الحرارة.

٤) مقدرات تشتت الضوء بالبخار:

Evaporative Light Scattering Detectors (ELSD)

فـي هـذا الـنوع من المقدرات تخرج المواد من العمود من خلال بخاخ يحولهـا لـرذاذ دقـيق بواسطة تدفق تيار من الهواء أو النيتروجين. وتمر هذه القطرات عبر أنبوب ضبطت درجة حرارته ليتم تبخير الطور المتحرك فيه، مما يـؤدي إلـى تكوين جزيئات دقيقة للمادة المحللة. وتمر هذه الجزيئات من خلال أشـعة لـيزر مما يؤدي إلى تشتت الأشعة ويتم قياس الشعاع المشتت عند زاوية قائمة بالنسبة لسريانه بواسطة صمام ضوئي من السليكون (*Silicon Photodiode*).

وإن مـا يميز هذا النوع من المقدرات استجابتها المتساوية تقريباً لكل المركبات غير المتطايرة وهي أكثر حساسية من مقدرات معامل الانكسار.

0) مقدرات كهروكيميائية: Electrochemical Detectors

هـذا الـنوع من المقدرات مبني على القياسات التيارية (*Amperometry*) والبولاروجرافية (*Polarography*) والكولوميتريـة (*Coulometry*) والتوصيليـة (*Conductometry*) وتتميز بحساسيتها العالية وبساطتها[66,67].

فـي هـذا البحـث تم اختيار طريقـة مـن الطـرق الكروماتوجـرافية هـي الكروماتوجرافـيا السـائلـة ذات الضغـط (الأداء) العالـي (HPLC، *High Pressure (Performance) Liquid Chromatography*) وذلـك لإجـراء عمليات الكشف عن الكوليسترول وتقديره في العينات المختارة.

٢-٩ الكروماتوجرافيا السائلة ذات الضغط (الأداء) العالي: HPLC

يسـتخدم في الطرق الكروماتوجرافية العمودية السائلة التقليدية عمود ذو قطـر كبـير نسبياً، كما أن معدل سريان الطور المتحرك المناسب بطيء نسبياً وعمليـة الفصـل تستغرق زمناً طويلاً قد يصل إلى عدة ساعات كذلك فإن جمع المكونات وتحليلها يستغرق ساعات إضافية لهذا فكر الباحثون في تطوير الطرق الكروماتوجرافية العمودية السائلة وتمكن كل من *Synge* و *Martin* عام ١٩٤١م من التوصل إلى الطريقة التي تسمى بالكروماتوجرافيا السائلة ذات الضغط (الأداء)

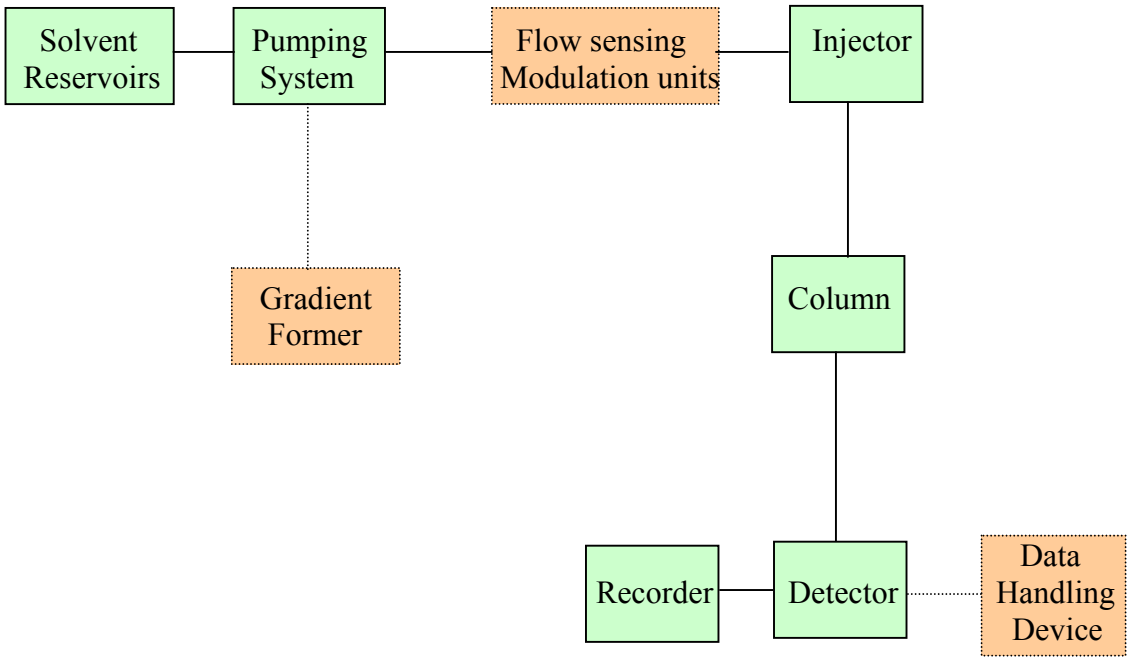
العالي (*High Pressure*) أو السـرعة العالية (*High Speed*) أو الكفـاءة العالية (*High Performance*). إن السبب الذي يجعل معدل السـريان للطور المتحرك بطيـئاً في الطرق التقليدية هو أن معدل الانتشار في السوائل بطيء ويمكن زيادة سـرعة سـريان الطـور المتحرك عن طريق تطبيق ضغط عالي قد يصل إلى 10,000 **p**ounds per **s**quare **i**nch (Psi) باسـتخدام غـاز الهليوم أو النيتروجين لإجبار السائل على التحرك عبر العمود بالسرعة المطلوبة (في حدود أجزاء من المليليـتر فـي الدقيقة) مما يجعل عملية الفصل تتم في دقائق وهذا يعني أن عدد الطـبقات الـنظرية N فـي العمود الرفيع كبيرة جداً مما يؤدي إلى كفاءة فصل ممتازة.

يتلخص العمل على جهاز HPLC بحقن كمية صغيرة من العينة المذابة في مذيـب مـا في وسط سائل متدفق هو الطور المتحرك الذي يمر في عمود معبأ بالطور الثابت وتنفصل العينة إلى مكوناتها وذلك بسبب تفاوت مكونات العينة في زمـن الاستبقاء الخاص بكل منها وزمن الاستبقاء يحدده مدى التفاوت في الميل إلـى الطـور الثابت أم إلى الطور المتحرك اعتمادا على الخواص القطبية. وقد طـورت عدة تقنيات للـ HPLC التي تستند إلى استخدام أطوار ثابتة ومتحركة مخـتلفة لـتخدم أغـراض تحليلـية متـنوعة، مـنها كروماتوجرافيا الامتزاز

(*Adsorption Chromatography*) التي تستند إلى استخدام مادة صلبة ذات قابلية عالـية لامـتزاز مركبات أخرى كالسيليكا المتميئة والالومينا المتميئة. وبما أن هاتين المادتين لهما قطبية عالية لذا فإن المركبات القطبية يكون لها أزمنة استبقاء اكـبر مـن المركبات غير القطبية ويزداد زمن الاستبقاء بزيادة قطبية المركب وبالتالي تختلف أزمنة الاستبقاء لمكونات العينة.

٢-١٠ أهم المكونات الرئيسية لجهاز HPLC:

يوضح الشكل (٢- ٧) رسماً تخطيطياً لمكونات الجهاز. حيث يتكون من مستودع للطور المتحرك أو مستودعات للسوائل المختلفة حيث يمكن استخدام خليط متدرج من السوائل. يلي ذلك مضخة لضغط السائل وإجباره على المرور في العمود الرفيع ثم يأتي الجزء الخاص بحقن العينة في العمود والذي غالباً ما يكون صغيراً جداً (عدة ميكرو لترات) مما يؤدي إلى الحصول على أسنان حادة وبالتالي فصل جيد للمكونات، ويأتي المقدر في نهاية العمود وغالباً ما يستخدم مقدرا حساسا في مجال الأشعة فوق البنفسجية (UV detector) مثبت عند 254nm أو عند 280nm وذلك لأن أغلب المركبات العضوية وبعض المعقدات غير العضوية تمتص بشكل قوي عند هذا الطول الموجي، يليها الجزء الخاص بإظهار وتسجيل النتائج والقمم المتحصل عليها[68,69].



شكل (٢-٧)

تخطيط لمكونات جهاز HPLC.

٢-١١ الطور الثابت المعبأ: Packing materials

أمكن التوصل إلى أفضل شروط لتعبئة المواد الصلبة في العمود وهي أن تكون حبيبات المادة المكونة للطور الثابت صغيرة من حجم ميكرون وهي حوالي 10 µm وأقل مع سطح كبير لها حوالي 200-300 $m^2 g^{-1}$ وهذا يحقق معادلة فان ديمتر. الحبيبات من حجم 5–10 µm تؤمن للعمود كفاءة فصل أكبر بعشرة مرات من حبيبات من حجم 40µm ومن فوائد السطح الكبير لهذه الحبيبات أنها تزيد من كفاءة الفصل وتقلل من مشاكل استخدام السيليكا أو الألومينا. وعادة يُعتمد ماركات محددة لهذه الأطوار الثابتة حسب صناعتها. مثلاً السيليكا من نوع *Partisil* و *Lichrosorb* تحضر من تفاعل سيليكات الصوديوم مع حمض الهيدروكلوريك *Hydrochloric acid*.

وحبيبات الـ *Spherical* و *Spherisorb* تصنع من تفاعل تكثيف أو بلمرة تكثيف للبولي إبتوكسيلين. هذه الاصطناعات تعطي حبيبات ذات نفاذية دقيقة (*micro porous*) وذات طول قطر صغير 3–10 µm وبتشويش صغير ومسيطر عليه أكثر من الحبيبات ذات الحجم 6–10 µm وسطح نوعي حوالي 200–400 m^2g^{-1} وهذا يحقق إمكانية استخدام أعمدة أصغر (أقصر) وكفاءة فصل أفضل وأسرع.

أمـا الأطـوار المتحركة المستخدمة في HPLC فيمكن أن يكون الماء أو المحالـيل العضوية مثل الميثانول أو الأسيتونيتريل أو مزيجيهما معاً (والاختيار فـي هـذه الحالة يحكمه نوع العينة) ويجب أن يعاد تنقيتها قبل الاستخدام أو أن تكون مُصنعة خصيصاً لجهاز HPLC. كما يجب أن تكون شفافة بالنسبة لأجهزة الكشف بالأشعة مثل UV، أي لا تمتص عند الأطوال الموجية المختلفة[70,71].

يعتـبر HPLC من أفضل أجهزة الفصل المستخدمة في فصل الليبيدات وذلك لما يتميز به الجهاز من بساطة و سرعة عالية في الفصل و دقة متناهية. كل هذه الأسـباب جعلتـنا نفضل استخدام جهاز HPLC في تقدير الكوليسترول موضوع بحثنا هذا.

الفصل الثالث

تقدير الكوليسترول باستخدام *HPLC*

Chapter three

Determination of Cholesterol Using HPLC

٣-١ الأجهزة: Instruments

تم تجهيز جميع المواد والأدوات والأجهزة اللازمة لهذا البحث واستُخدم من أجل التحليل جهاز الفصل الكروماتوجرافي السائل ذا الضغط (الأداء) العالي HPLC، ماركة (*Shimaduz, Japan*) نوع (CTO–10A) والذي يحتوي على الوحدات التالية:

- وحدة التحكم *System controller*، موديل (SCL – 10A).
- وحدة طرد الغازات *Degasser unit*، موديل (DGU – 14A).
- مقدر *UV detector*، موديل (SPD-10A).
- مضخة *pump* موديل (LC – 10AT).
- فرن العمود *column oven*، موديل (CTO-10A).
- عمود الفصل *column* نوع STR-ODS II، قطره الداخلي 4.6 mm وطوله 25 cm وحجم حبيباته 5 µm.
- حارس للعمود *Guard column*، قطره الداخلي 4.6 mm وطوله 5 cm.
- وحدة لطرد السوائل *waste unit*.
- وحدة كمبيوتر *Computer* متكاملة.

أما بالنسبة للأدوات الأخرى المستخدمة فكانت:

- إبرة دقيقة للحقن *Micro-syringe*، حجمها 25 µL، موديل (Hamilton 702-LC).

- فرن تجفيف ماركة (Heraeus).

- ميزان حساس، موديل (Denver Instrument, U.S.A).

- حمام مائي ماركة (Memmert).

- محرك مغناطيس لإتمام عملية الخلط .

- أسطوانات غاز النيتروجين.

- جهاز طرد مركزي موديل (ALC).

- جهاز (UV-visible spectrophotometer) ماركة (Pharmacia Biotech).

- جهاز المبخر الدوراني (Rotavapor-RE 120) ماركة (BUCHI).

٣-٢ الكواشف والمحاليل: Materials and Reagents

بالنسبة للمواد والكواشف فكانت كلها مخصصة لهذه التحاليل الحساسة والخاصة بـ (HPLC).

* ميثانول (CH_3OH) Methanol (BDH).

* أسيتون (CH_3COCH_3) Acetone (BDH).

* ثنائى إيثيل إيثر ($C_2H_5OC_2H_5$) Diethyl ether (BDH).

* كحول الأيزوبروبيل Isopropyl alcohol $H_3C—\overset{\overset{OH}{|}}{C}H—CH_3$ (Mallinc Krodt).

* كبريتات الصوديوم اللامائية

(BDH) Anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4)

* كوليستيرول نقي ($C_{27}H_{46}O$) (BDH) Cholesterol extra pure.

٣-٣ تحضير المحاليل: Preparation of Solutions

قبل البدء بتحليل عيناتنا كان من الضروري تحضير محاليل قياسية للكوليسترول من أجل تحديد زمن الحجز الدقيق للكوليسترول، لهذا تم تحضير محلول قياسي أولي من الكوليسترول النقي وذلك بوزن 0.1 g بدقه وإذابتها في دورق قياسي سعته 100 ml بواسطة الميثانول (*Methanol*) وذلك للحصول على محلول تركيزه 1000 ppm وبعد ذلك يتم تحضير محاليل قياسية ذات تراكيز أقل باستخدام قانون التخفيف:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

للحصول على محاليل قياسية ذات تراكيز مختلفة لاستخدامها كعينات قياسية معتمدة ذات زمن حجز معلوم لمقارنتها بالعينات المختارة للتحليل.

٣-٤ دراسة الظروف المؤثرة على تقدير الكوليسترول:

Study of Effective Factors on the Determination of Cholesterol

إن عملية تقدير الكوليسترول بواسطة جهاز HPLC تتحكم فيها عدة ظروف مهمة هي (درجة الحرارة – تركيب الطور المتحرك – طول موجة المقدر – سرعة تدفق الطور المتحرك) وقد تم دراسة كل من هذه الظروف دراسة وافية ومستفيضة وتم تحديد أفضل هذه الظروف التي يجب استخدامها في هذا البحث. ويتم عمل ذلك بحقن 25 µL من المحاليل القياسية سابقة الذكر، ونغير أحد الظروف مع تثبيت الظروف الأخرى للحصول على أمثل الظروف لتقدير الكوليسترول في هذه المحاليل القياسية.

أ) اختيار أنسب درجة حرارة لفرن العمود:

Selection of the Suitable Temperature

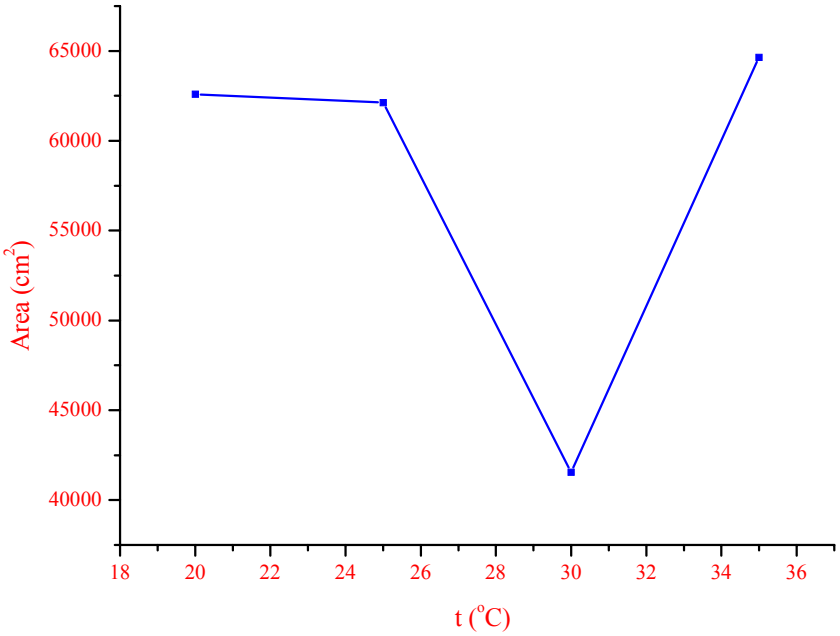
لمعرفة درجة الحرارة المناسبة لعمود الفصل في الجهاز، تم إجراء عدة تجارب بدرجات حرارة مختلفة (20, 25, 30, 35°C) وقد تم الحصول على أفضل تقدير للكوليسترول في هذه المحاليل القياسية تم الحصول عليه عند درجة حرارة 30°C وذلك اعتماداً على مساحة القمم الناتجة. وقد تم اعتماد هذه الدرجة وتثبيتها عند قياس كل العينات. ويوضح الجدول (٣-١) والشكل (٣-١) أن أنسب درجة حرارة تم التوصل إليها كانت عند 30°C.

جدول (٣-١)

دراسة تأثير درجة حرارة العمود على مساحة السن في تقدير الكوليسترول

Effect of Column Temperature on the Peak Area in Cholesterol Determination

مساحة السن Peak Area (cm^2)	درجات الحرارة t (^oC)	التركيز Concentration	معدل التدفق Flow Rate	الطول الموجي Wavelength	الطور المتحرك Mobile Phase
62589	20	10 ppm	2 ml/min	210 nm	100% Methanol
62120.5	25				
41557	30				
64650	35				



شكل (٣- ١)

تأثير درجة الحرارة على مساحة السن في تقدير الكوليسترول.

Effect of Temperature on Peak Area in Cholesterol Determination.

ب) تأثير مكونات الطور المتحرك:

Effect of Constituents of Mobile Phase

من خلال المسح الشامل للدراسات السابقة لتقدير الكوليسترول بطريقة HPLC أُوحظ أن المزيج ميثانول – ماء يمكن استعمالهما معاً كطور متحرك ولكن بنسب مختلفة ولمعرفة النسبة الأفضل لهذا المزيج تم استخدام النسب التالية من هذا المزيج كطور متحرك في عدة تجارب علما بأن عملية خلط المزيج تتم من خلال الجهاز بطريقة ذاتية باستخدام مستودعين للطور المتحرك الأول فيه ماء والثاني ميثانول والنسب المستخدمة هي:

ماء : ميثانول 96 : 4

ماء : ميثانول 97 : 3

ماء : ميثانول 98 : 2

ماء : ميثانول 99 : 1

ميثانول 100 : 0

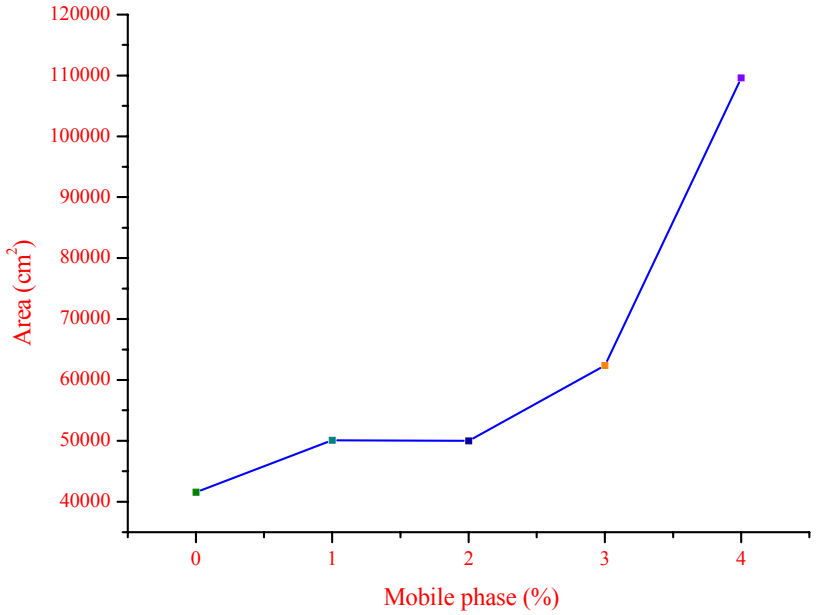
وقد وُجِدَ أن أعلى قيمة للكوليسترول تم الحصول عليها عند النسبة 100% ميثانول كطور متحرك. ويوضح ذلك الجدول (٣-٢) والشكل (٣-٢).

جدول (٣-٢)

تحديد أفضل نسبة للطور المتحرك.

Determination of the Best Percentage of Mobile Phase.

مساحة السن Peak Area (cm^2)	نسبة الطور المتحرك Mobile Phase	التركيز Concentration	معدل التدفق Flow Rate	**درجات الحرارة** Temperature	الطول الموجي Wavelength
109595	96	10 ppm	2 ml/min	30^oC	210 nm
62370	97				
49981	98				
50095	99				
41557	100				



شكل (٣ - ٢)

تحديد أفضل نسبة تركيب للطور المتحرك
على مساحة السن في تقدير الكوليسترول.

Determination of the Best Percentage of Mobile Phase
on Peak Area in Cholesterol Determination.

ج) اختيار أنسب طول موجي Selection of the Suitable Wavelength

تمت دراسة فصل الكوليسترول في المحاليل القياسية المحضرة أنفة الذكر باستخدام جهاز الكروماتوجرافيا السائلة ذات الضغط (الأداء) العالي في المدى بين 209 nm إلى 212 nm وأتضح من خلال التجارب أن أفضل قمة لمساحة السن لتقدير الكوليسترول تم الحصول إليها عند الطول الموجي 210 nm كما هو موضح بالجدول(٣-٣) و الشكل (٣- ٣).

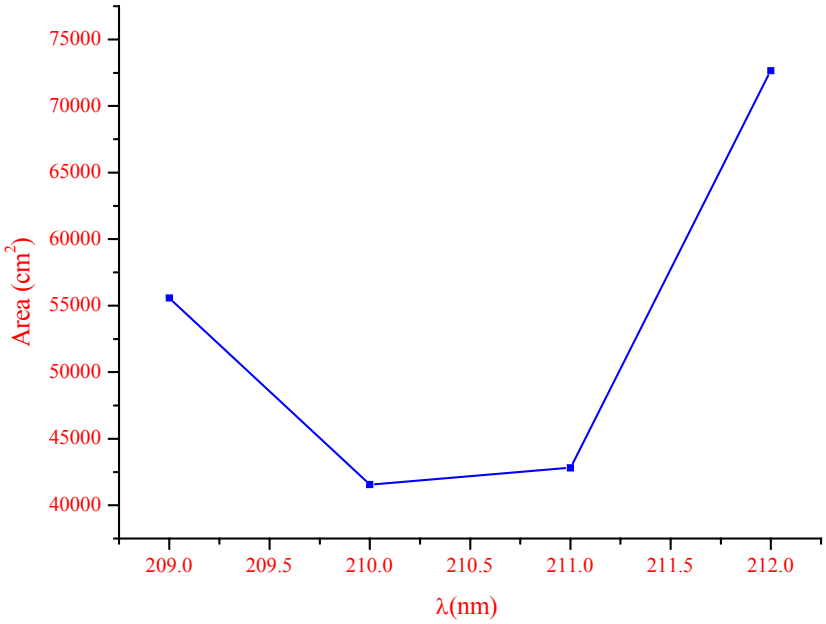
أيضاً تم اسـتخدام جهـاز التحليل الطيفـي في المجال فـوق البنفسـجي UV-spectrophotometer والذي يعمل عن طريق تسليط الأشعة فوق البنفسجية على عينة محلول الكوليسترول القياسي. ووُجِد أن أعلى امتصاص للكوليسترول كان عند الطول الموجي 210 nm كما هو موضح في الشكل (٣-٤). ونستنتج من ذلك أن أفضل طول موجي لامتصاص الكوليسترول في المحاليل القياسية في كل من الجهازين (HPLC & UV) كان عند 210 nm .

جدول (٣-٣)

دراسة تأثير الطول الموجي على مساحة السن في تقدير الكوليسترول.

Effect of Wavelength on Peak Area in Cholesterol Determination.

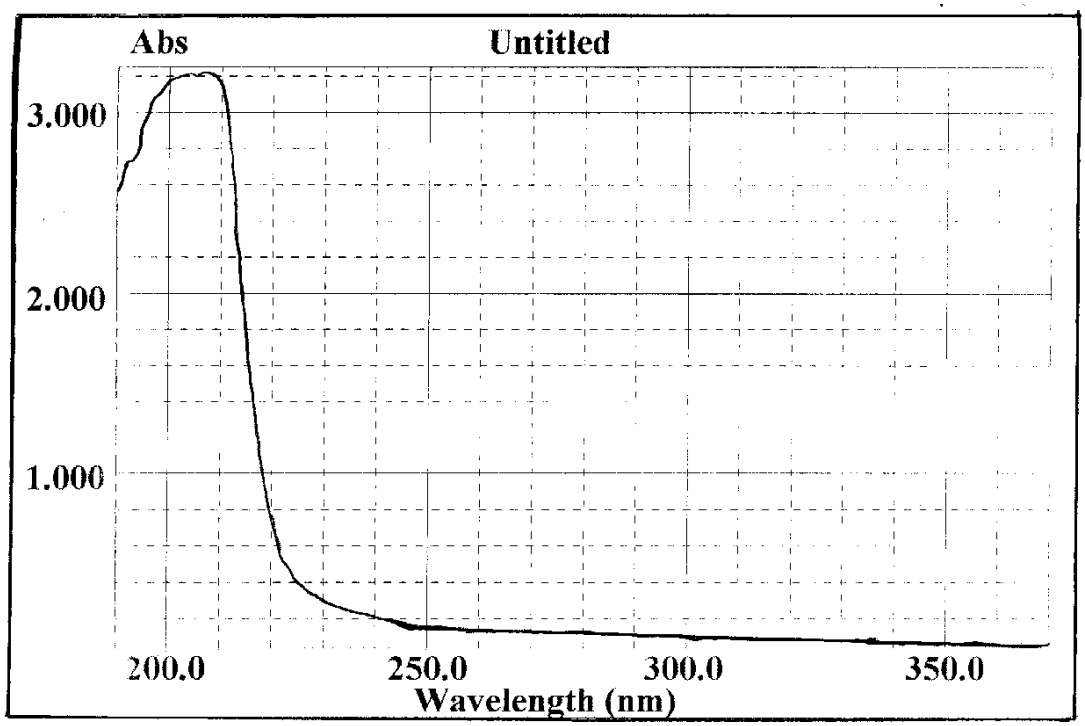
مساحة السن Peak Area cm^2	الطول الموجي Wavelength	التركيز Concentration	معدل التدفق Flow Rate	درجة الحرارة Temperature	الطور المتحرك Mobile Phase
55568.5	209 nm	10 ppm	2 ml/min	30°C	100% Methanol
41557.0	210 nm				
42815.0	211 nm				
72645.5	212 nm				



شكل (٣-٣)

تأثير الطول الموجي على مساحة السن في تقدير الكوليسترول.

Effect of Wavelength on Peak Area in Cholesterol Determination.



شكل (٣- ٤)

منحنى امتصاص محلول الكوليسترول القياسي باستخدام جهاز التحليل الطيفي في المجال فوق البنفسجي عند تركيز 10 ppm.

Absorption Curve of Standard Cholesterol Solution Using UV-Spectrophotometer at 10 ppm.

د) تأثير معدل التدفق الكلي للمحاليل: Effect of total Flow - Rate

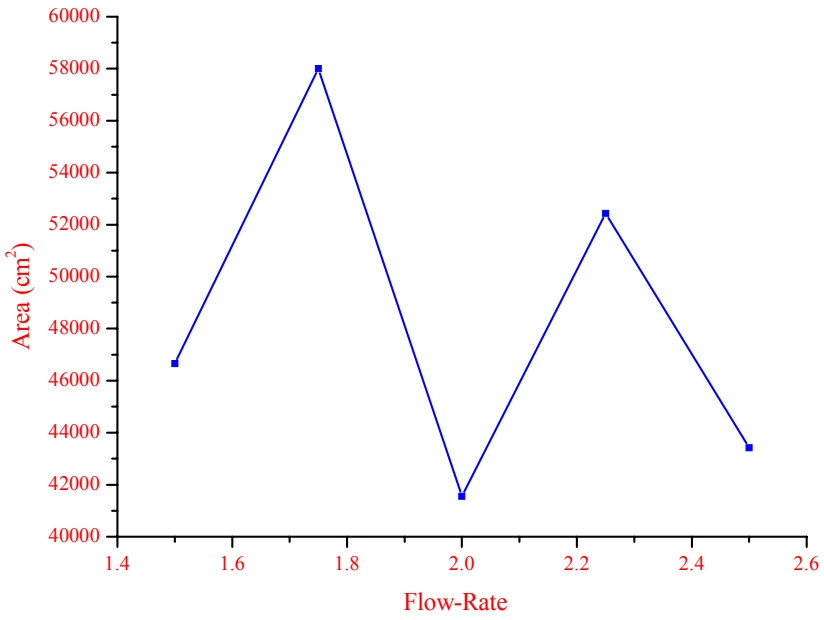
يعتبر معدل التدفق للطور المتحرك *Flow-Rate* عاملاً مهماً جداً وفعالاً بل على درجة عالية من الأهمية لأنه يوضح الحساسية العالية للطريقة ويظهر قمماً سنية حادة وفصلاً جيداً، فإذا كان زمن الاستبقاء طويل فإن الفصل في هذه الحالة يحتاج إلى زمن طويل ويعد هذا قصوراً في التجربة. وبما أن جهاز HPLC يمتاز بالسرعة ويعطي زمن استبقاء قليل و فصل جيد للمركبات المدروسة، فإنه بناءً على ذلك تم إجراء عدة تجارب لمعدلات تدفق مختلفة على المحاليل القياسية للكوليسترول ليتم من خلالها التوصل إلى معدل التدفق المناسب والذي يعطي فصل جيد للمركبات. و قد وجد أن أفضـل معدل تدفق للطـور المتحـرك كان 2 ml/min. كما هو موضح في الجدول (٣-٤) و الشكل (٣- ٥).

جدول (٣-٤)

دراسة تأثير معدل التدفق للطور المتحرك على مساحة السن في تقدير الكوليسترول

Effect of flow – Rate on Peak Area in Cholesterol Determination.

مساحة السن Peak Area cm^2	معدل التدفق Flow Rate	التركيز Concentration	الطول الموجي Wavelength	درجة الحرارة Temperature	الطور المتحرك Mobile Phase
46661.5	1.5 ml/min	10 ppm	210 nm	30^oC	100% Methanol
58007.5	1.75 ml/min				
41557	2.0 ml/min				
52433	2.25 ml/min				
43421.5	2.5 ml/min				



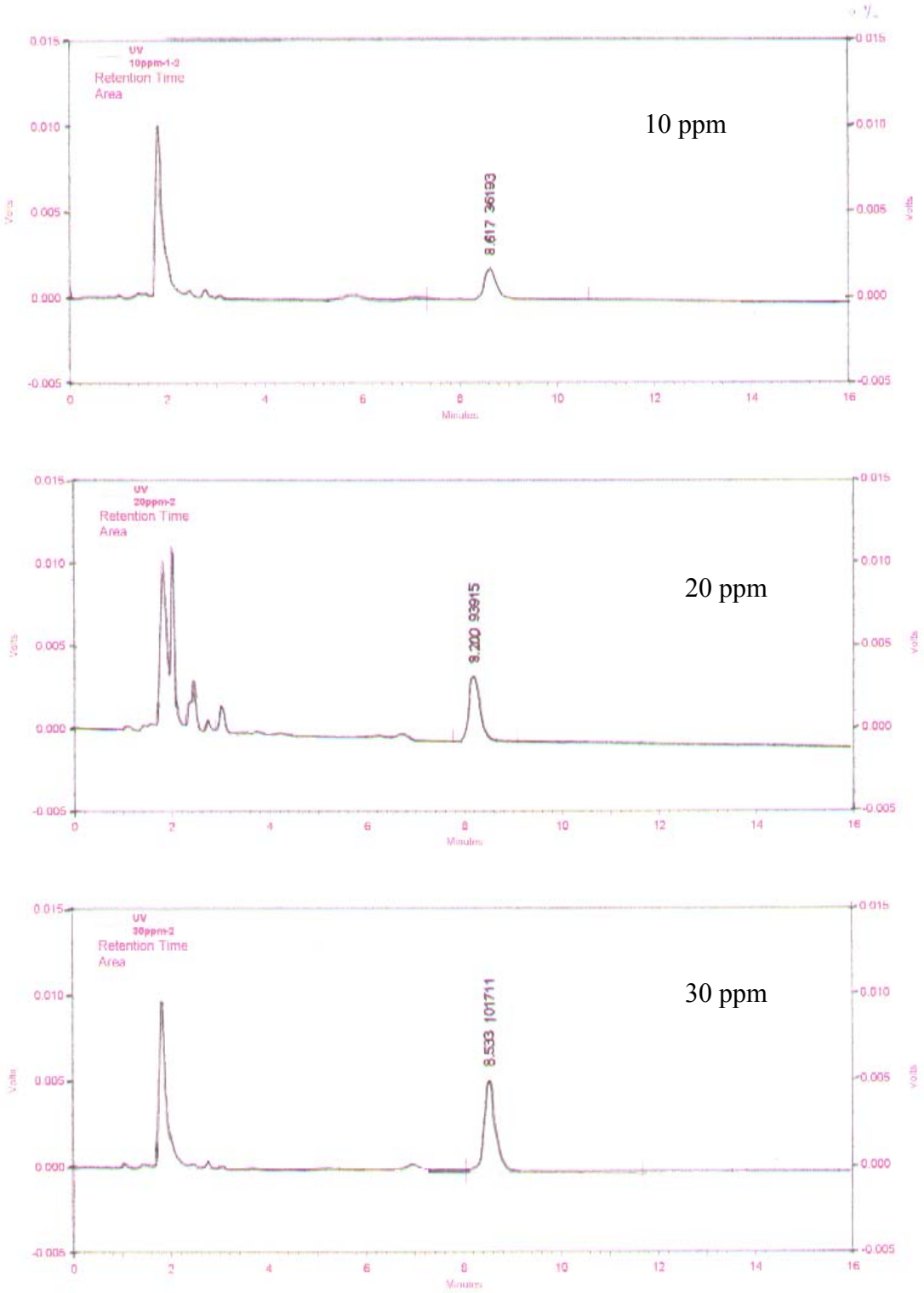
شكل (٣ - ٥)

تأثير معدل التدفق على مساحة السن في تقدير الكوليسترول.

Effect of Flow-Rate on Peak Area in Cholesterol Determination.

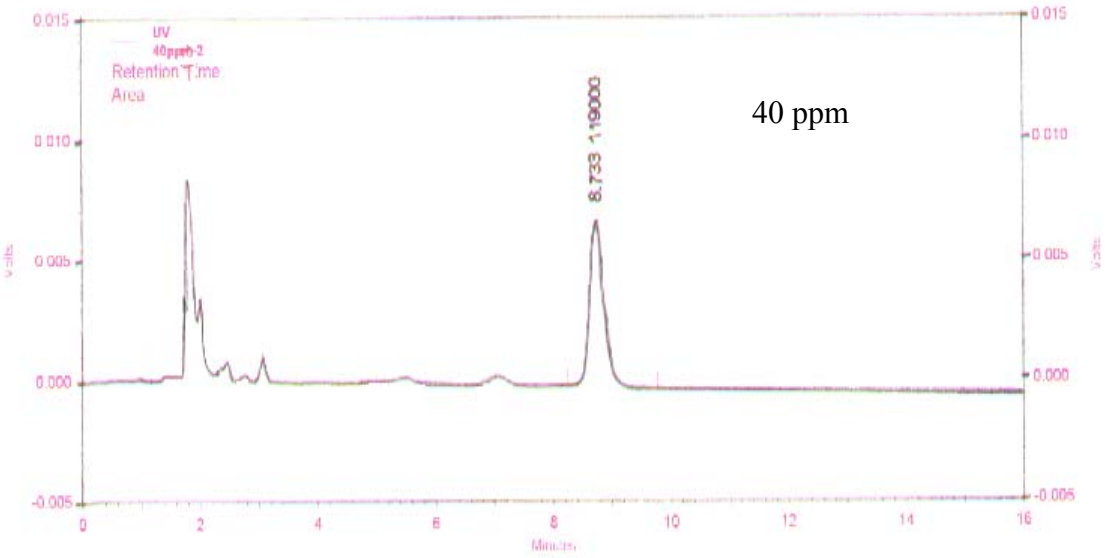
هـ) إيجاد المنحنى القياسي عند أفضل الظروف المعملية:

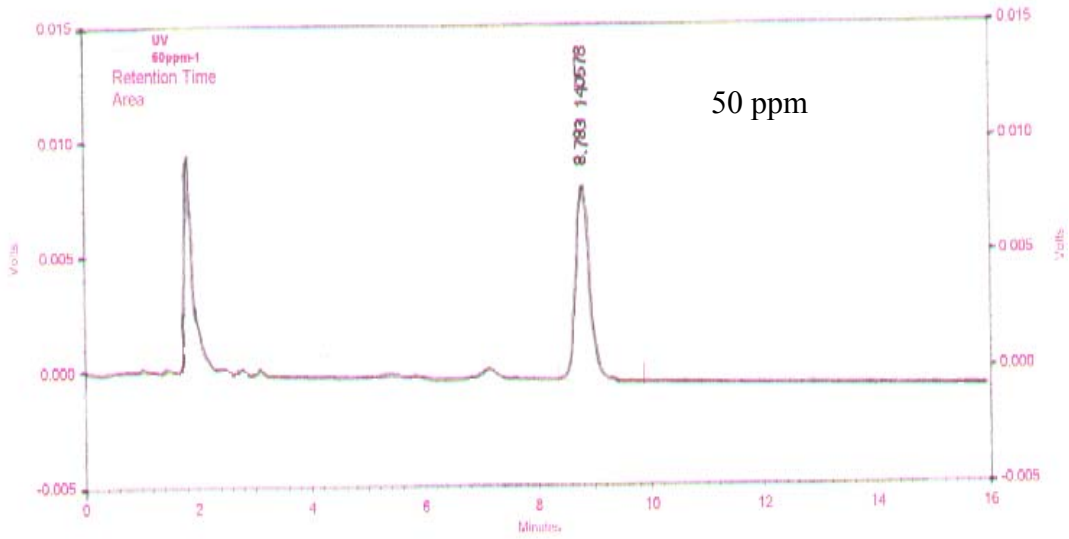
تم تحضير محاليل قياسية للكوليسترول بتراكيز مختلفة (10-50 ppm) وحقن كل منها في جهاز HPLC تحت الظروف المثالية التي تم التوصل إليها وهي درجة حرارة $30^{o}C$ ومعدل تدفق 2 ml/min وطول موجي 210 nm وطور متحرك من الميثانول 100%. وكانت النتيجة الحصول على الشكل (٣-٦). وقد تم رصد النتائج في الجدول (٣-٥). ومن ثم رسمت العلاقة بين تراكيز هذه المحاليل القياسية وبين مساحة القمم التي توافق كل تركيز للحصول على علاقة خط مستقيم كما في المنحنى القياسي الموجود في الشكل (٣- ٧).



شكل (٣-٦)

الكروماتوجرام الناتج عن حقن العينات القياسية بتراكيز مختلفة عند الظروف التي تم اختيارها.


UV
40ppm-2
Retention Time
Area
8.733 119000
40 ppm
0.015
0.010
0.005
0.000
-0.005
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Minutes
Volts

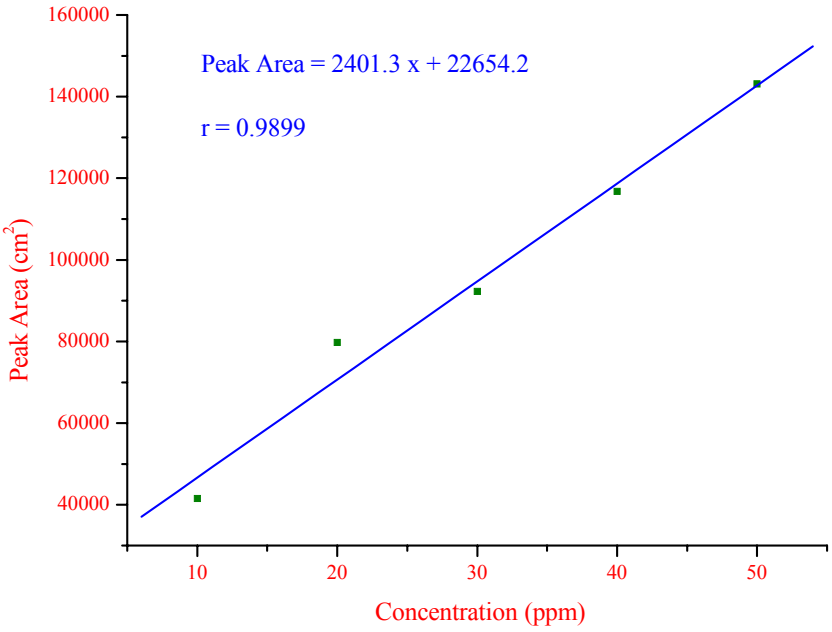

UV
60ppm-1
Retention Time
Area
8.783 142578
50 ppm
0.015
0.010
0.005
0.000
-0.005
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Minutes
Volts

تابع شكل (٣-٦)

جدول (٣-٥)

مساحات القمم لتراكيز مختلفة للمحاليل القياسية للكوليسترول.

مساحة السن Peak Area cm^2	التركيز Concentration	الطول الموجي Wavelength	معدل التدفق Flow Rate	درجة الحرارة Temperature	الطور المتحرك Mobile Phase
41557	10 ppm	210 nm	2 ml/min	30^oC	100% Methanol
79756	20 ppm				
92248	30 ppm				
116804.5	40 ppm				
143096.5	50 ppm				



شكل (٣-٧)

المنحنى القياسي للكوليسترول عند الظروف المثالية المدروسة.

Calibration Curve of Cholesterol at the Studied Optimum Conditions.

الفصل الرابع

التطبيقات

Chapter four

Applications

٤-١ العينات المستخدمة: The Used Samples

بعد تحديد أفضل الظروف لتقدير الكوليسترول باستخدام تقنية الكروماتوجرافيا السـائلة ذات الضـغط (الأداء) العالي والحصول على منحنى قياسي جيد أصبح بالإمكـان تطبـيق هذه الطريقة على بعض العينات. لذا تم اختيار وجمع بعض أنواع الأطعمة المحتوية على الكوليسترول وهي السمن الحيواني والسمن النباتي والحليـب واللحم بأنواعه الطازج والمجمد والمعلب. أيضا، تم تطبيق هذه التقنية علـى عيـنات مـن بلازما الدم سبق أن تم تحليلها باستخدام تقنية التحليل الآلي المستمر في مختبر مستشفى الملك فهد للحرس الوطني. وذلك لتقدير محتواها من الكوليسترول ومن ثم مقارنتها بالطريقة المقترحة في هذا البحث.

٤-٢ تجهيز العينات: Sample Preparation

أ) عينات الحليب:

جُمعت عينات مختلفة من الحليب وهي حليب نيدو (بودرة)، حليب الصافي (سائل)، حليب المراعي (سائل)، حليب نادك (سائل) وتم القيام باستخلاص الدهون في هذه العينات كلاً على حده بالطريقة التالية:

١. أخذ 5 g من حليب نيدو وأذيب في قليل من الماء المقطـر وأكمل الحجم حتى 250 ml، أما عينات الحليب السائلة (المراعي- نادك - الصافي) فقد تم أخذ 250 ml منها.

٢. وُضعت عينات الحليب كلٍ على حده في قمع فصل سعته 500ml وأضيف لـه 60 ml من ثنائي إيثيل الإيثر اللامائي مع الرج لمدة 30 sec ثم تُركت لمدة 10 min ليتم الفصل.

٣. نُقلت الطبقة السـفلية (الطبقة المائية من الحليب) إلى قمع فصـل سـعته 250 ml وأضيف إليها 60 ml من ثنائي إيثيل الإيثر اللامائي مـع الـرج أيضا لمدة 30 sec وذلك لاستخلاص ما يُحتمل بقائه في الطبقة المائية من الدهون.

٤. أفرغ محتوى القمع (طبقة الإيثر المحتوية على الدهون) في أنابيب الطرد المركزي ووضعت في جهاز الطرد المركزي عند درجة حرارة $4^{o}C$ لمدة 5 min وعند سرعة دوران 1500 rpm.

٥. أخـذت الطـبقة المائـية مـن قمع الفصل وأعيدت عملية الفصل باتباع الخطوات رقم (٢) و (٣) و (٤).

٦. غُسِل المستخلص (الذي تم تجميعه في أنابيب الطرد المركزي) بـ 30 ml من الماء المقطر مع الرج لمدة 15 min ثم تُرك لينفصل.

٧. تم التخلص من الطبقة السفلية (المائية) مع إبقاء 0.5ml منها في القمع.

٨. تم إعادة عملية الغسيل والفصل السابقة في الخطوتين (٦) و (٧).

٩. أضيف 30 ml من المـاء و 10 ml مـن الكاشـف الكحـولي (كحـول الأيزوبروبيل) مع الرج لمدة 15 sec وتترك لتنفصل الطبقتين.

١٠. تم التخلص من الطبقة المائية.

١١. مُـررت العينة من خلال عمود يحتوي على كبريتات الصوديوم اللامائية وذلك للتخلص من بقية الماء.

١٢. جُمعت العينة في دورق مخروطي سعته 250ml وتم تجفيفها بغاز النيتروجين مع وضعها في حمام مائي عند درجة حرارة $50^{o}C$ كحد أقصى.

١٣. أضيف 20 ml من الأسيتون ثم تم تبخير المتبقي.

١٤. أضـيف 8 ml من ثنائي إيثيل الإيثر اللامائي، ثم نُقلت العينة بحـذر إلى دورق آخر مع غسيل الدورق السابق مرتين بـ 4ml من ثنائي إيثيل الإيثر اللامائي وإضافته إلى العينة.

١٥. تم تجفيف العينة بغاز النيتروجين.

١٦. أذيبت العينة المجففة بـ 5 ml أسيتون ووُضعت في دورق قياسـي سعة 100 ml وخُففت بالميثانول حتى العلامة.

١٧. حقن 25 µL من العينة في الجهاز.

١٨. تم تكرار عملية الحقن ثلاث مرات للحصول على تكرارية جيدة.

ب) عينات السمن:

جُمعت عينات لأنواع مختلفة من السمن الحيواني وهي (سمن فارم – سمن المراعـي – سمن ريحان) وكذلك جُمعت عينات لأنواع مختلفة من السمن النباتي وهـي (سمن مازولا- سمن حلواني) وتمت معالجة هذه العينات المختارة معالجة كيميائية بالشكل التالي:

تم وزن مقدار 0.5g من جميع العينات السابقة الذكر كل على حده ووضعت في دورق قياسـي سعته 100 ml ثم أذيبت العينات في 5 ml من الأسيتون وأكمل الحجـم حتى العلامة بالميثانول وبعد ذلك سُحِب مقدار 25 µL من محلول العينة وتـم حقـنها فـي جهـاز الكروماتوجرافيا HPLC. وكررت هذه العملية مرتين للحصول على تكرارية جيدة.

ج) عينات اللحوم الطازجة والمجمدة والمعلبة:

تم وزن 100 g من أنواع مختلفة من اللحوم الطازجة وهي (بقر – غنم – جمل) لاستخلاص الدهون وتقدير الكوليسترول وذلك بالعمل على فرم تلك اللحوم بواسـطة خـلاط كهربائي كلٌ على حده وبعد إتمام عملية فرم اللحوم تم إضافة مقدار 200 ml من الأسيتون النقي عليها وفي الخطوة التالية أجريت عملية الترشيح

باستعمال ورق ترشيح للحصول على مستخلص نقي ثم جُففت العينات وذلك على النحو التالي:

أولا: تم اسـتخدام جهاز المبخـر الدوراني (*Rotary Evaporator*) والذي يتميز بكفاءتـه في تركيز الأحجام الكبيرة لمستخلصات عينات اللحوم المستخدمة وعند درجـة حرارة منخفضة $35^{o}C$ وذلك باستخدام حمام مائي بمنظم حراري، إضافة إلـى عـدم إمكانـية حدوث تلوث للعينات أثناء التجفيف باستخدام جهاز المبخر الدوراني.

ثانـيا: القـيام بعملية تمرير غاز النيتروجين (Evaporation in a stream of N_2) وذلـك لطرد المذيب المتبقي في العينة وهذه العملية تعتمد بشكل كلي على توجيه غاز النيتروجين فوق سطح المحلول الموجود في حمام مائي درجة حرارته $35^{o}C$.

ثم تم أخذ 0.5 g من مستخلصات العينات المجففة كلٌ على حده ووضعت في دورق قياس سـعة 100 ml وبعد ذلك تم إذابتها في الأسـيتون وأكمل الحجم إلى العلامة بالميثانول ثم أخذ 25 µL وحقنت في الجهاز. وكررت هذه العملية مرتين للحصول على تكرارية جيدة.

وبـتكرار الخطـوات السـابقة تم استخلاص الدهون وتقدير الكوليسترول لعيـنات مختلفة من اللحوم المجمدة وهي نقانق دجاج ماركة (نبيل) و لحم بقري

ماركـة (فيـتا) ونقانق بقري ماركة (لانشون). كما تم تطبيق نفس الطريقة على عينات مختلفة من اللحوم المعلبة وهي دجاج ماركة (لانشون) ولحم بقري ماركة (*Frisky*).

د) عينات بلازما الدم:

تـم التنسيق مع المسؤولين بمستشفى الملك فهد للحرس الوطني للحصول على عينات الدم وتم تزويدنا بستة عينات من البلازما الجاهزة والتي سبق أن تم تحلـيلها لديهم لقياس تركيز الكوليسترول فيها وذلك باستخدام جهاز التحليل الآلي موديل *Hitachi*-917. وقد قمنا بتحضير هذه العينات بحيث يمكن تحليلها بواسطة جهـاز HPLC لديـنا وذلك لمقارنة نتائجنا مع النتائج التي أعطونا إياها ومن ثم إمكانـية تقيـيم طريقتـنا المستخدمة في التحليل وإمكانية تطبيقها وذلك بإجراء حسـابات إحصـائية تبين ذلك. وقد تطلب تحضير هذه العينات معالجة كيميائية كالتالي:

١. أخذ 0.25 ml من عينات البلازما كلٌ على حده.

٢. تم إضافة 4 ml من محلول ثنائي إيثيل الإيثر لكل عينة.

٣. تم تجفيف كل عينه باستخدام غاز النيتروجين.

٤. تم إذابة كل عينه مجففه في 0.05 ml من الأسيتون.

٥. أضيف لكل عينة 1 ml محلول الميثانول.

٦. سحب 25 µL من محلول كل عينة.

٧. حُقنت محاليل العينات في جهاز HPLC.

٨. تم تكرار عملية الحقن مرتين للحصول على تكرارية جيدة.

٤-٣ مناقشة النتائج:

لقد تم اختيار جهاز HPLC لفصل وتقدير الكوليسترول في عينات مختلفة من الأطعمة وبلازما الدم وذلك لما يتميز به من دقه وسرعة وبساطة في الفصل؛ حيث تم أولاً إجراء العديد من التجارب الأولية على محاليل قياسية للكوليسترول حُضـرت فـي المعمـل مـن مركب الكوليسترول النقي لإيجاد أفضل الظروف المناسـبة لإجراء عملية فصل وتقدير الكوليسترول في العينات، من حيث اختيار أفضـل طول موجي ودرجه حرارة ومعدل تدفق للطور المتحرك ونسبة مكونات الطـور المـتحرك وقد وجد أن أفضل الظروف لفصل وتقدير الكوليسترول في عينات الأطعمة وبلازما الدم هي:

١. مكونات الطور المتحرك هي 100% ميثانول.

٢. الطول الموجي 210 nm.

٣. درجة الحرارة 30°C.

٤. معدل تدفق للطور المتحرك 2 ml/min.

وبعـد الحصـول علـى زمن الحجز للكوليسترول في المحاليل القياسية عند الظـروف المثالـية السـابق ذكـرها، تم رسم المنحنى القياسي بين تراكيز هذه المحالـيل القياسـية ومسـاحة قممها المتحصل عليها من جهاز الكروماتوجرافيا HPLC، وجد أن المنحنى القياسي يعطي علاقة خط مستقيم في المدى من 10 إلى 50 جـزء مـن المليون (10-50 ppm) بمعامل ارتباط (r) مقداره 0.9899 وذلك باستخدام معادلة الخط المستقيم:

$$A = m\,x + b$$

حيث أن:

m = الميل = 2401.3

b = تقاطع الخط المستقيم = 22654.2

x = تركيز الكوليسترول.

A = استجابة المقدر والمتمثلة في مساحة السن.

وبعـد ذلـك تم تحضير العينات المختارة ومعالجتها كيميائياً وهي عينات مختلفة من الحليب والسمن واللحوم والعمل على حقنها في جهاز HPLC، وقد تم الحصول على النتائج المبينة في الجداول (٤-١) و (٤-٢) و (٤-٣) والأشـكال (٤-١) و (٤-٢) و (٤-٣).

وبعد الحصول على هذه النتائج تم عمل مقارنه بين هذه العينات المدروسة (الحليب – السمن – اللحوم) لمعرفة نسبه الكوليسترول في كل منها وكانت النتيجة كما هي موضحة في الجدول (٤-٤) والشكل (٤-٤). أما بالنسبة لعينات بلازما الـدم فقـد تـم الحصـول على ستة عينات مختلفة من بلازما الدم بمساعدة من مستشـفى الملـك فهد للحرس الوطني. وبحرص شديد تمت المعالجة الكيميائية للعيـنات ومـن ثم تقدير الكوليسترول فيها.ثم تم عمل مقارنة بين النتائج التي تم الحصول عليها من المستشفى مع النتائج المتحصل عليها من جهاز HPLC وذلك بحساب نسبة الاسترجاع. وكانت النتائج كما هي موضحة في الجدول (٤-٥).

جدول (٤-١أ)

تقدير الكوليسترول في عينات مختلفة من الحليب (بدلالة مساحة القمم cm^2).

***Determination of Cholesterol in Different Samples of Milk* (cm^2).**

	حليب نيدو	حليب المراعي	حليب الصافي	حليب نادك
$\bar{x}$	65386.5	57705.5	47121.5	59755.0
S.D	64.8	16	14.35	2.65
%RSD	0.1	0.03	0.03	4.43×10^{-3}

* $\bar{x}$ = متوسط المساحات للعينات.

جدول (٤-١ب)

تقدير الكوليسترول في عينات مختلفة من الحليب (بدلالة التركيز ppm).

***Determination of Cholesterol in Different Samples of Milk* (ppm).**

	حليب نيدو	حليب المراعي	حليب الصافي	حليب نادك
$\bar{y}$	19.720	17.140	14.216	18.026
S.D	0.016	3.85×10^{-3}	3.45×10^{-3}	6.38×10^{-4}
%RSD	0.08	0.02	0.02	3.54×10^{-3}

* $\bar{y}$ = متوسط تركيز الكوليسترول في العينات.

جدول (٤-٢أ)

تقدير الكوليسترول في عينات مختلفة من السمن (بدلالة مساحة القمم cm^2).

Determination of Cholesterol in Different Samples of Fat **(cm^2).**

	السمن الحيواني			السمن النباتي	
	سمن المراعي	سمن فارم	سمن ريحان	سمن حلواني	سمن مازولا
$\bar{x}$	50978	50404.5	50795.0	37551.0	50179.5
S.D	9.75	4.58	21.56	24.35	19.84
%RSD	0.02	9.1×10^{-3}	0.04	0.06	0.04

* $\bar{x}$ = متوسط المساحات للعينات.

جدول (٤-٢ب)

تقدير الكوليسترول في عينات مختلفة من السمن (بدلالة التركيز ppm).

Determination of Cholesterol in Different Samples of Fat **(ppm).**

	السمن الحيواني			السمن النباتي	
	سمن المراعي	سمن فارم	سمن ريحان	سمن حلواني	سمن مازولا
$\bar{y}$	15.380	15.206	15.324	11.330	15.142
S.D	2.346×10^{-3}	1.102×10^{-3}	5.188×10^{-3}	5.859×10^{-3}	4.774×10^{-3}
%RSD	0.02	7.25×10^{-3}	0.03	0.05	0.03

* $\bar{y}$ = متوسط تركيز الكوليسترول في العينات.

جدول (٤-٤)

نتائج تقدير الكوليسترول في العينات المختارة.

Determination of Cholesterol in the Studied Samples.

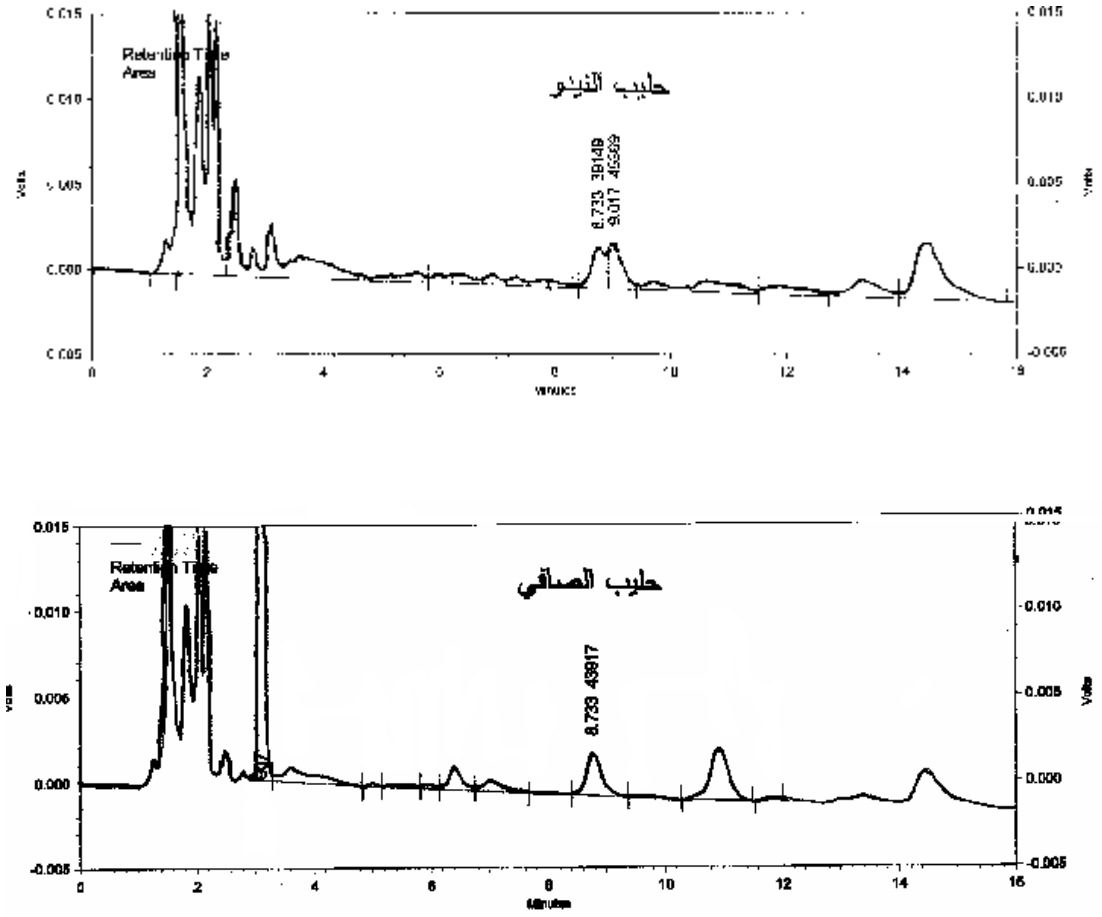
	Sample العينة	متوسط مساحة السن Average Peak Area (cm^2)	متوسط التركيز Average Concentration (ppm)
1	لحم طازج	1380787.5	416.58
2	لحم معلب	1128115.0	340.347
3	لحم مجمد	458604.7	138.358
4	الحليب	57492.125	17.343
5	السمن الحيواني	50725.8	15.30
6	السمن النباتي	43865.25	13.236

جدول (٤-٥)

نسبة الاسترجاع للكوليسترول المقدر في عينات الدم بطريقتين مختلفتين.

% Recovery of Cholesterol in Blood Samples.

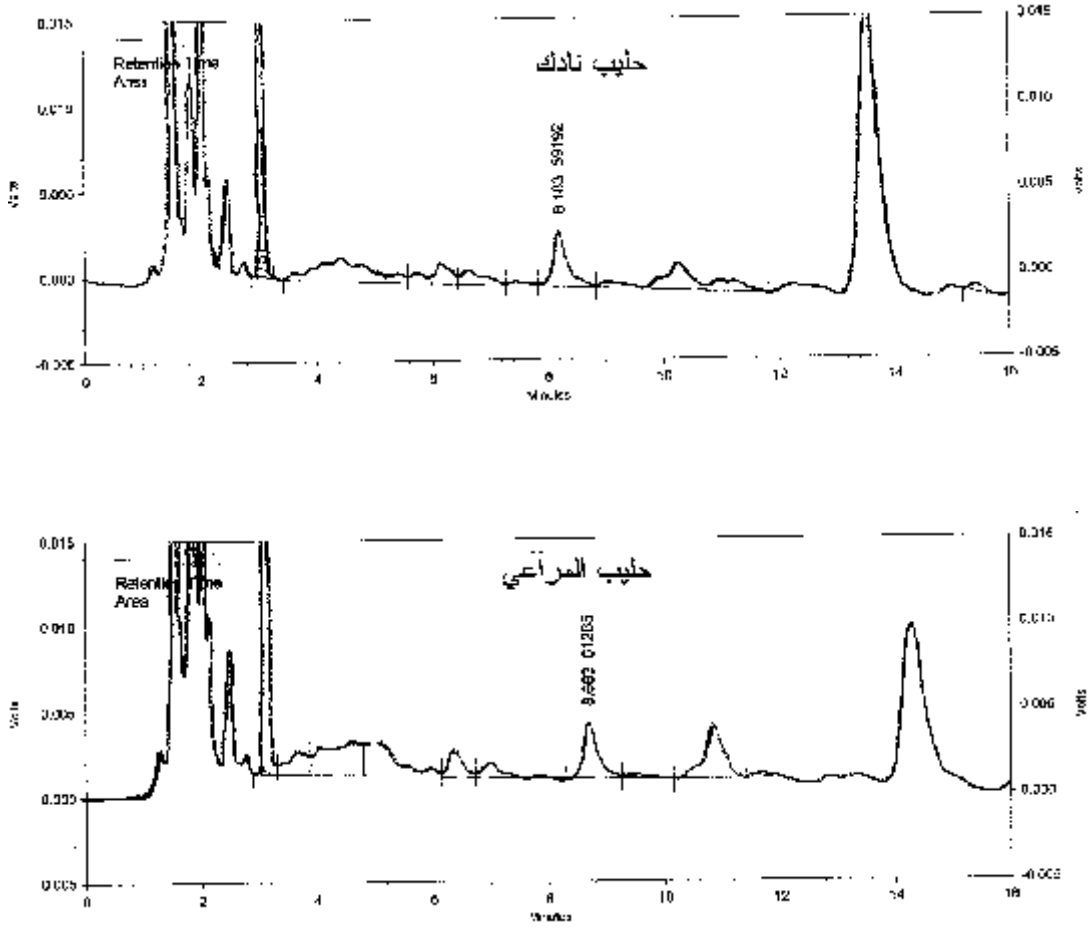
	التركيز المتحصل عليه من المستشفى (ppm)	التركيز بطريقة HPLC (ppm)	نسبة الاسترجاع (%)
1	2292.84	2246.99	98
2	2153.88	2068.59	96.04
3	1659.8	1624.95	97.90
4	2481.98	1826.23	73.58
5	1764.02	1572.64	89.15
6	1358.72	1204.97	88.68



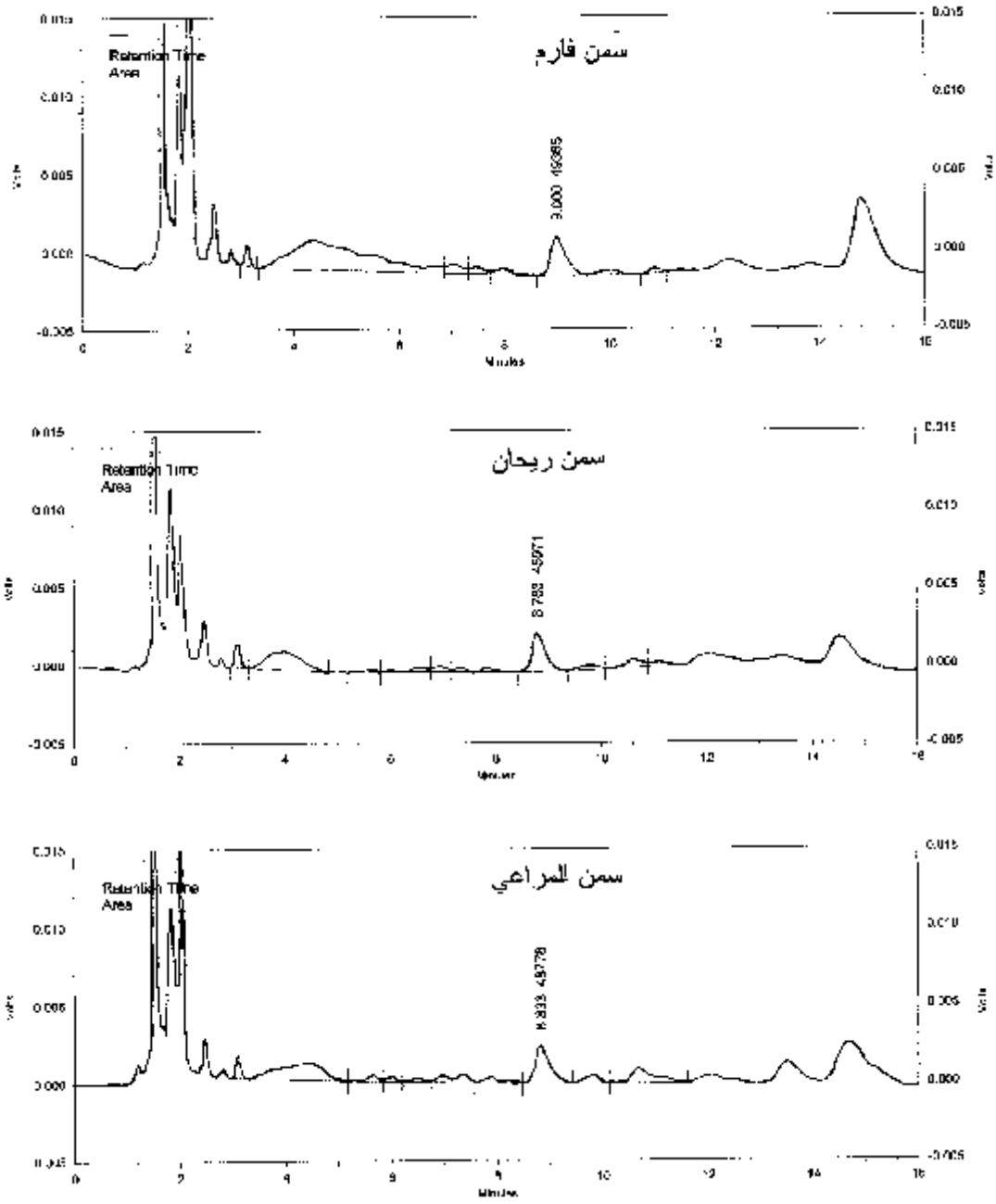
شكل (٤-١)

المنحنيات المتحصل عليها لتقدير الكوليسترول في عينات الحليب.

***Chromatograms of Cholesterol in Milk Samples*.**


حليب نادك
Retention Time
Area
حليب المراعي
Retention Time
Area

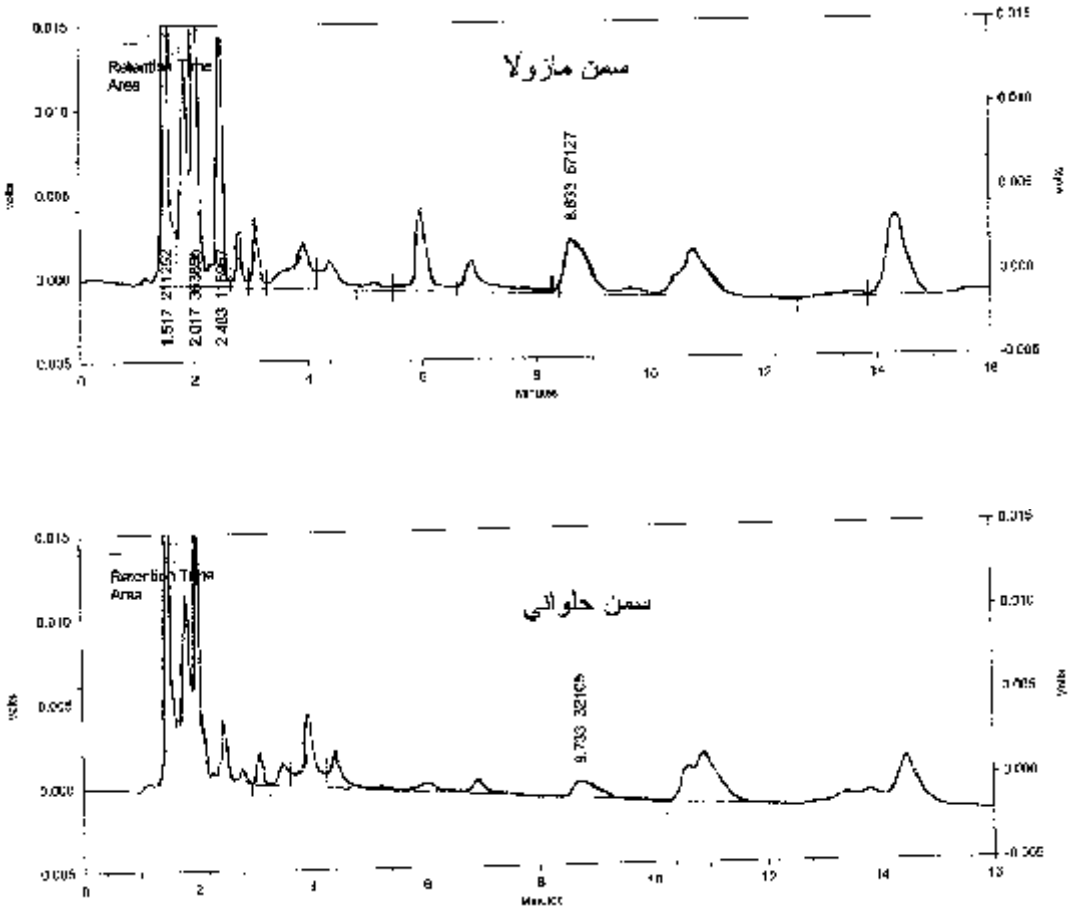
تابع شكل (٤-١)



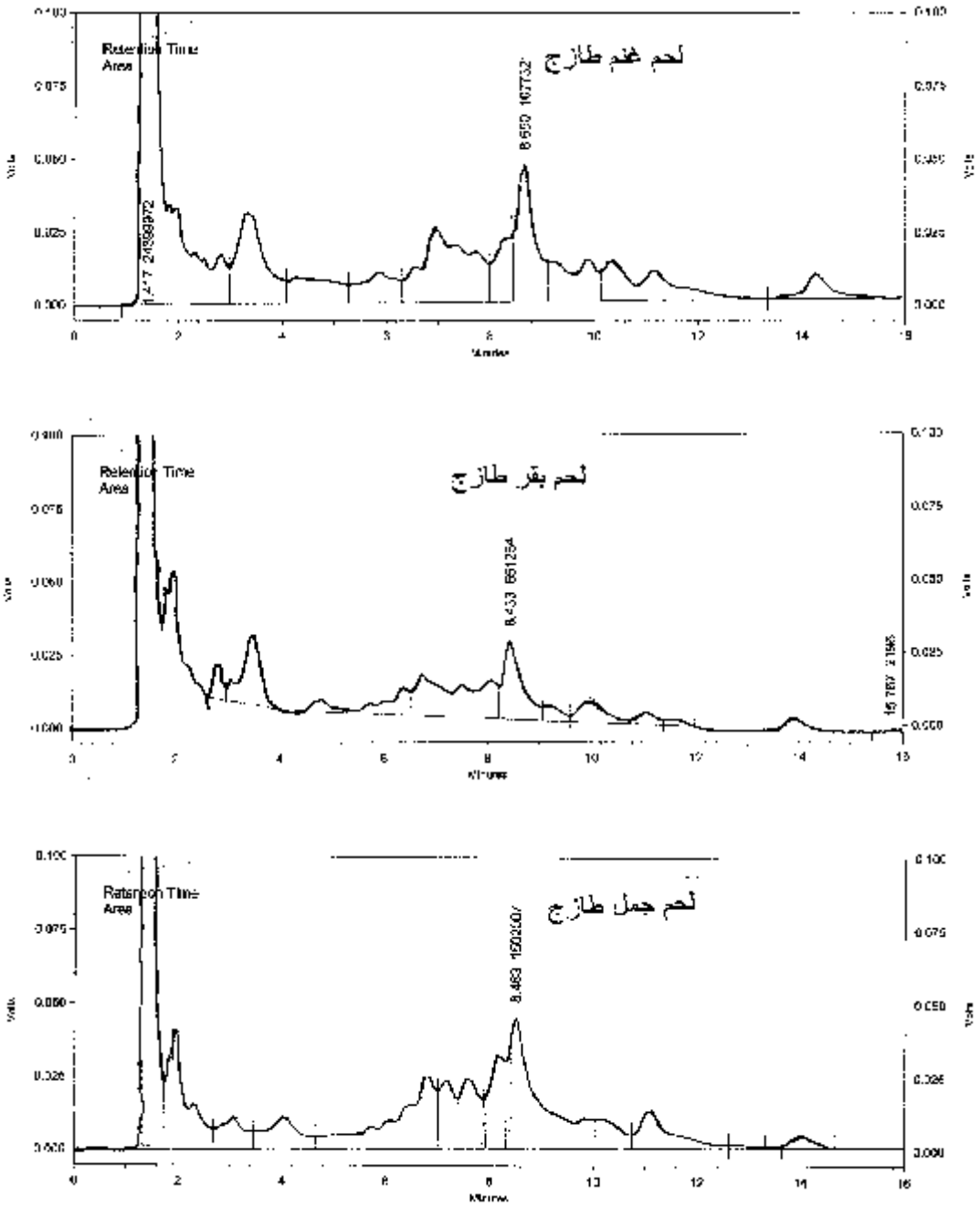
شكل (٤-٢)

المنحنيات المتحصل عليها لتقدير الكوليسترول في عينات السمن.

***Chromatograms of Cholesterol in Fat Samples*.**


سمن مازولا
Retention Time
Area
8.833 67127
1.517 21252
2.017 36388
2.483 11
سمن حلواني
Retention Time
Area
9.733 32165

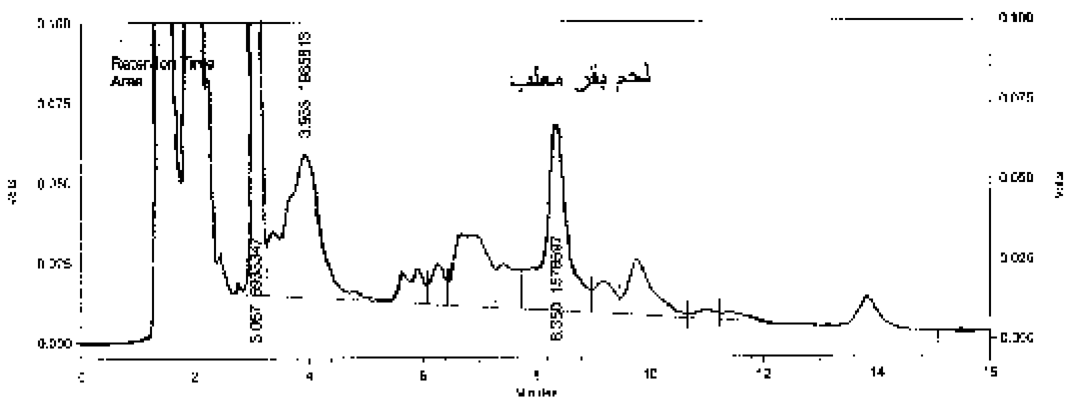
تابع شكل (٤-٢)

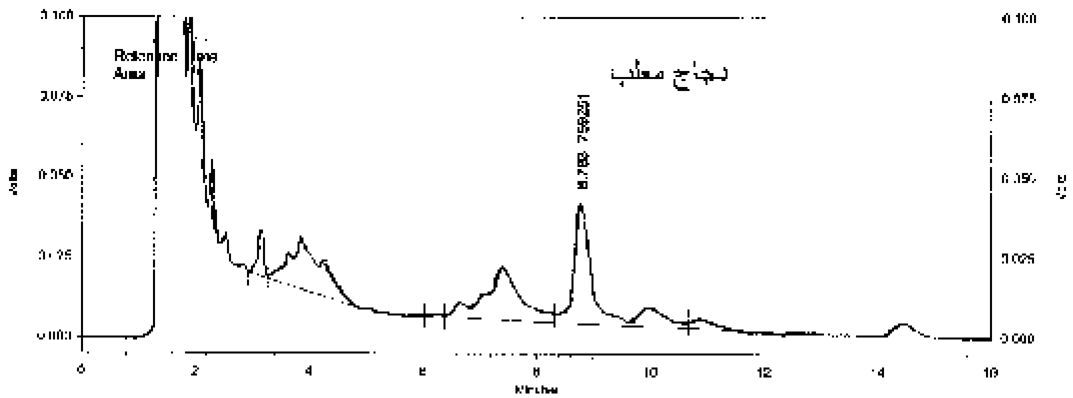


شكل (٤-٣)

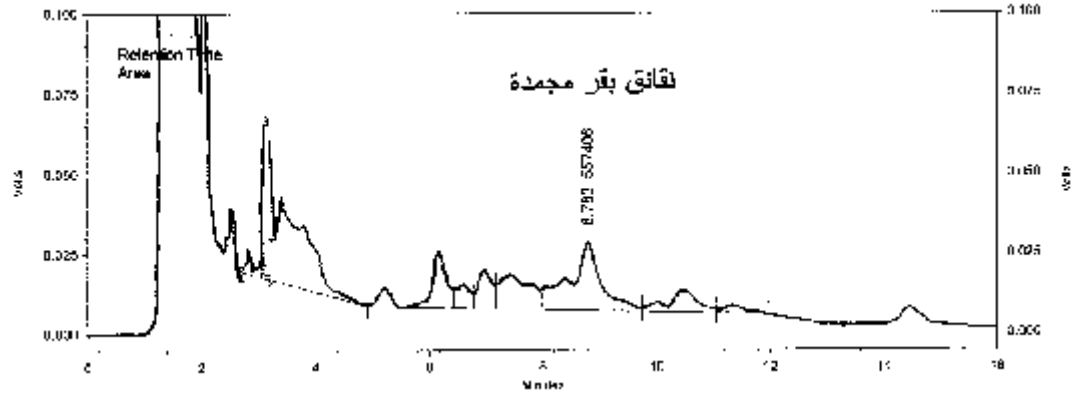
المنحنيات المتحصل عليها لتقدير الكوليسترول في عينات اللحوم.

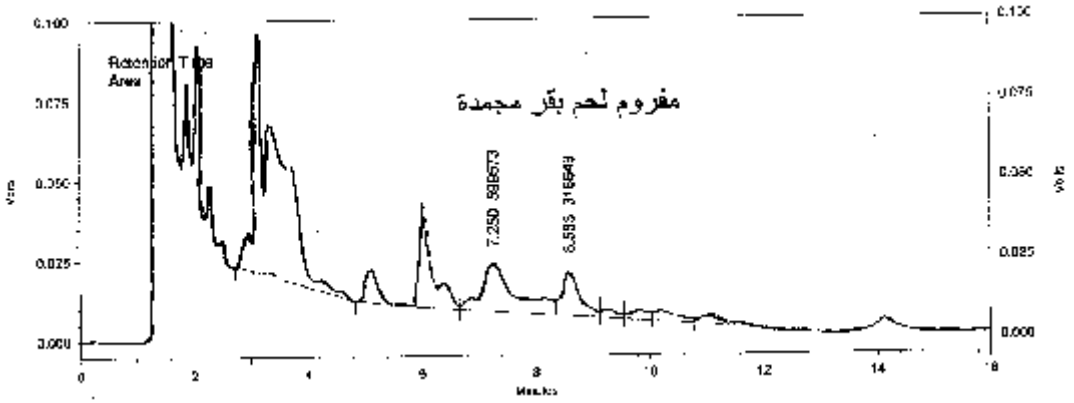
***Chromatograms of Cholesterol in Meat Samples*.**

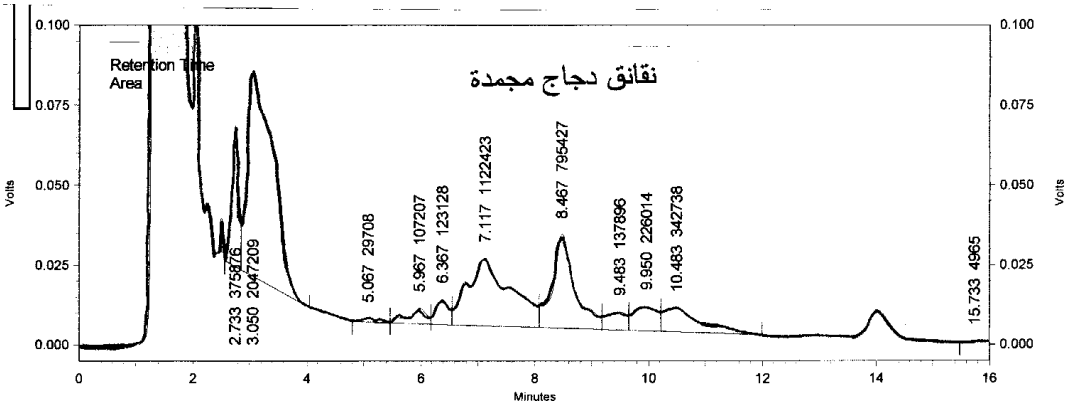

لحم بقر مغلف
Retention Time
Area
3.533 1683913
5.067
8.350 1578697
Minutes


دجاج مغلف
Retention Time
Area
8.783 759251
Minutes

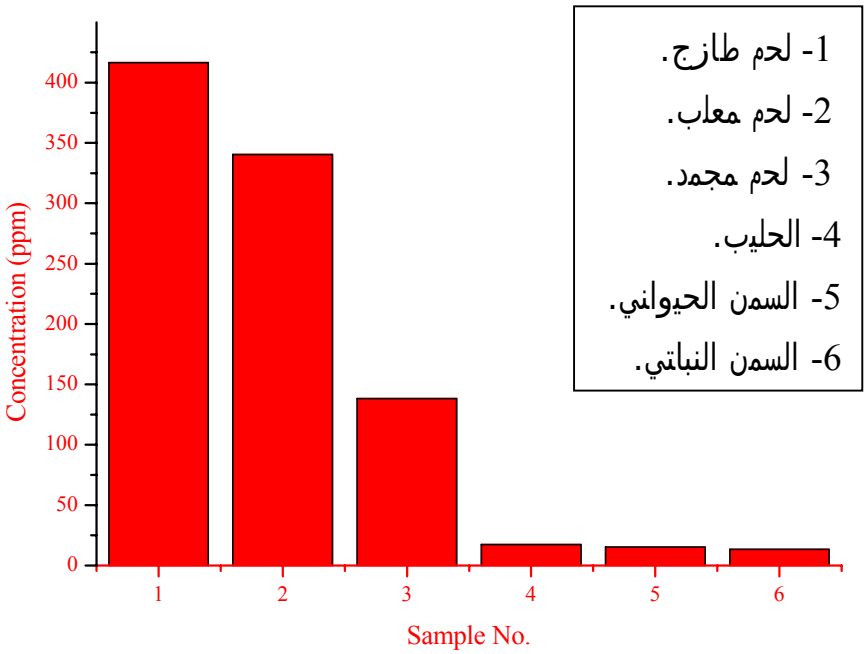
تابع شكل (٤-٣)


نقانق بقر مجمدة
Retention Time
Area
8.782 557406


مفروم لحم بقر مجمدة
Retention Time
Area
7.250 938573
8.585 316549


نقانق دجاج مجمدة
Retention Time
Area
2.733 375826
3.050 2047209
5.067 29708
5.967 107207
6.367 123128
7.117 1122423
8.467 795427
9.483 137896
9.950 226014
10.483 342738
15.733 4965
Volts
Minutes

تابع شكل (٤-٣)



شكل (٤-٤)

مقدار الكوليسترول في العينات المدروسة.

Amount of Cholesterol in the Studied Samples.

٤-٤ الخلاصة:

لُوحظ وجود الكوليسترول في جميع العينات التي تمت دراستها وإن اختلفت كمياته من عينة إلى أخرى؛ حيث تقل كميات الكوليسترول بوحدة ppm في عينات الحليب والسمن المختلفة التي تمت دراستها مقارنة مع كميات الكوليسترول الموجودة في عينات اللحوم سواء كانت اللحوم طازجة أو معلبة أو مجمدة وإن كانت نسبة الكوليسترول تختلف فيما بين تلك العينات من اللحوم. فمثلا وُجد أن اللحوم الطازجة تحتوي على نسبة كوليسترول أعلى من اللحوم المعلبة والتي تحتوي بدورها على نسب الكوليسترول أعلى من اللحوم المجمدة، وذلك بسبب استخدام أجزاء تحتوي على نسب أعلى من الشحوم في صناعة تلك اللحوم سواء المعلبة أو المجمدة من قِبل الشركة المصنعة. كما ويجب توخي الحذر في الإكثار من أكل اللحوم المعلبة وغير المعلبة وذلك نظرا لاحتوائها على نسب عالية من الكوليسترول.

لقد تم تقدير الكوليسترول في العينات المختلفة من الأطعمة والدهون وعينات بلازما الدم بنجاح. كما وُجد أن قيم الكوليسترول في عينات الدم والتي تم تحليلها بالطريقة المقترحة في هذا البحث تتوافق مع القيم التي تم تحليلها بواسطة طرق التحليل الآلي المستمر والتي تستخدم في المستشفيات مما يزيد من مصداقية الطريقة المقترحة.

المراجع

References

١. دين أورنيش: **مجلة عالم الغذاء**. العدد ١٥، ص ٤٨-٥٠، ١٩٩٩م.

٢. رضوان صدقي محمد: **التحاليل الطبيعية والكيماوية للزيوت والدهون**. المكتبة الأكاديمية - القاهرة ، ١٩٩٥م.

٣. عبد المنعم الجيار: **مجلة العثيم**. العدد ٢٦، ص ٤١-٤٢، ٢٠٠٣م.

٤. نهله باوزير: **مجلة السكري**. العدد ١٦، ص ١٨-٢١، ٢٠٠١م.

٥. سامي المظفر: **أساسيات الكيمياء الحياتية**. دار المسيرة للنشر والتوزيع، ١٩٩٩م.

٦. إبراهيم حسن و عاطف أبو عرب: **تحليل الأغذية**. دار الفجر للنشر والتوزيع، ٢٠٠٢م.

٧. سعد محمد و تاج الدين مرغني: **الكيمياء الحيوية**. جامعة عمر المختار، ١٩٩٦م.

٨. جون ر. هولم، ترجمة مهدي الزكوم و قيس شريف: **أسس الكيمياء العامة والعضوية والحياتية**. مطابع جامعة البصرة، ١٩٨٤م.

٩. حسن الحازمي: **المنتجات الطبيعية**. دار الخريجي للنشر والتوزيع، ٢٠٠١م.

١٠. ماهر راشد: **الكوليسترول المتهم البريء في تصلب الشرايين**. دار النشر للجامعات، ١٩٩٩م.

١١. أيمن الحسيني: **خطر يهدد صحتنا اسمه ارتفاع الكوليسترول**. دار الطلائع للنشر والتوزيع، ١٩٩٧م.

١٢. أولف رامسي: **الكوليسترول والحد من مخاطره**. الدار العربية للعلوم، ١٩٩٢م.

١٣. علي الناصر: **مجلة الفيصل**. العدد ٢٨٠، ص ١٠٢-١٠٤، ١٩٩٩م.

14. Dennis E. Vance, Henk Van den Bosch: *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA). Vol. 1529 (1-3), 1-8, **2000**.

١٥. عبد الله الشهري: **رسالة الإشارة**. العدد الأول، ص ٤٦-٤٨، ١٩٩٨م.

١٦. محمد كمال: **أسس الكيمياء الحيوية**. دار النهضة العربية، ١٩٦٦م.

17. Uffe Ravnskov, M. D., *The Cholesterol Myths*. New Trends - Washington, **2000**.

١٨. مصطفى حيات: **الكوليسترول وأمراض العصر**. مؤسسة الكويت للتقدم العلمي، ١٩٩٦م.

١٩. عادل البطوسي: **مجلة الفيصل**. العدد ١٩٥، ١٩٩٣م.

٢٠. خالد المدني: **مجلة عالم الغذاء**. العدد ٣٠، ٢٠٠٠م.

٢١. عرسان المنسي و نزار جاد الله وعقاب العزام: **الكيمياء الحيوية ١+٢+٣ العملية**. دار المستقبل للنشر والتوزيع، ١٩٩٧م.

٢٢. صالح إزمرلي و أحمد شوالي: **الكيمياء العضوية العملية المعاصرة لعلوم الحياة**. جامعة الملك عبد العزيز - جده، ١٩٨٧م.

23. Doshi. S, Gibboni. D , Nikolioukine. Y, Keane. R , Zheng. J, Rao. J, Ertingshausen. G., *Clinical Chemistry*. 43 (2), 384-389, **1997**.

24. Harris. N, Galpchian. V, Thomas. J, Iannotti. E, Law. T, Rifai. N., *Clinical Chemistry*. 43 (5), 816-823, **1997**.

25. Maitra.A , Hirany. S, Jialal. I., *Clinical Chemistry*. 43 (6), 1040-1047, **1997**.

26. Huang.Y, Kao. J, Tsai. K., *Clinical Chemistry*. 43 (6), 1048-1055 , **1997**.

27. Hansen. M, Giddings. J., *Journal of Liquid. Chromatography Relat. Technology*. 20 (16-17), 2777-2802, **1997**.

28. Henrion. A., *Accred. Quality Assurence*. 3 (3), 127-130, **1998**.

29. Sugiuchi. H, Irie. T, Uji. Y, Ueno. T, Chaen. T, Uekana. K, Okabe. H., *Clinical Chemistry*. 44 (3), 522-531, **1998**.

30. Pineiro-Avila. G, Salvador. A., *Analyst*. 123 (5), 999-1003, **1998**.

31. Simo. J, Castellano. I, Ferre. N, Joven. J, Camps. J., *Clinical Chemistry*. 44 (6), 1233-1241, **1998**.

32. Artiss. J, Capellari . E, Warnick. G, Zak. B., *Journal of Microchemistry*. 60 (1), 67-74, **1998**.

33. Shahnaz. B, Tada. S, Kajikawa. T, Ishid. T, Kawanishi. K., *American Clinical Biochemistry*. 35 (5), 665-670, **1998**.

34. Arranz-pena. M, Tasende-Mata. J, Martin-Gil. F., *Clinical Chemistry*. 44 (12), 2499-2505, **1998**.

35. Sandhoff. R, Bruegger. B, Jeckel. D, Lehmann. W, Wieland. F., *Journal of Lipid Res*. 40 (1), 126-132, **1999**.

36. Araujo. A. N, Catita. J. A, Lima. J. L., *Pharmacology*. 54 (1-2), 51-55, **1999**.

37. Nakaminami. T, Kuwabata. S, Yoneyama. H., *Analytical Chemistry*. 71 (5), 1068-1076, **1999**.

38. Kan-Zhi Liu , R. Anthony Shaw , Angela Man , Thomas. C, Henry. H., *Clinical Chemistry*. 48 (3), 499-506, **2002**.

39. Zarzycki P. K., Wierzbowska M., Lamparczyk H., *Journal of Chromatography* A. 857, 255-262, **1999**.

40. Esmaeel. D. Naeemi, Nissar Ahmad, Tahani. K. AL-Sharrah, Montaha Behbahani, *Journal of AOAC International*. 78 (6), 1522-1525, **1995**.

41. Park. S, Addis. P., *Journal of Food Science*. 52, 1500-1503, 1987.

42. Nourooz-Zadeh. J, Appelquist. L., *Journal of Food Science*. 53, 74-79, **1988**.

43. Zhang Rongzhen, Li Long , Liu Shutao, Chen Ruming , Rao Pingfan, *Chinese Journal of Chromatography*. Vol 16 (2), 91-94, **1998**.

44. Samy Emara, Samiha A. Hussien , Fardos A. Mohamed: *Journal of Liquid Chromatography and Rel. Technology*. 22 (8), 1235-1246, **1999**.

45. Yasuto Tsuruta, Toshio Teranishi, Yuuko Date, Kazuya Kohashi, *Journal of Chromatography*. 617, 213-220, **1993**.

46. Sion B., Grizard G., Boucher D., *Journal of Chromatography* A. 935, 259-265, **2001**.

47. Nightingale D., Blumberg B., Handelman J., *Journal of Chromatography* B. 732, 495-500, **1999**.

48. Fazeli Razzazi, Kleineisen S., Luf W., *Journal of Chromatography* A. 896, 321-334, **2000**.

49. King J., Paniangvait P., Jones D., German B. G., *Journal of Food Science*. 60 (1150), **1995**.

50. Laakso Seppanen, Laakso I., Vanhanen H., Kiviranta K., Lehtimaki T., Hiltunen R., *Journal of Chromatography* B. 754, 437-445, **2001**.

51. Stump D., Roth F., Gilbert S., *Journal of Chromatography*. 306, 371-376, **1984**.

52. Spanos A., Schwartz J., *Liquid Chromatography-Gas Chromatography*. Vol. 10 (10), 774-777, **1992**.

53. Osada Kyoichi, Ravandi Amir, Kuksis Arnis, *Journal of American O. Chemical Society*. Vol. 76 (7), 863-871, **1999**.

54. Csiky I., *Journal of Chromatography*. 661, 381-389, **1982**.

55. Ansari G. A. S, Smith L. L., *Journal of Chromatography*. 175, 307-315, **1979**.

56. Finocchiaro T. E, Richarson T., *Journal of American Oil Chemical Society*. 61, 877-883, 1984.

57. David Harvey, *Modern Analytical Chemistry*. International Edition-North America, **2000**.

٥٨. عبد الغني حمزة و محمد أحمد آشى و عبد الفتاح بسطاوي و عبد العزيز السباعي و توفيق عميرة: **الكيمياء التحليلية بعض الأسس النظرية لطرق التحليل الآلي**. مطابع جامعة الملك عبد العزيز - جده، ١٩٨٦م.

59. Csaba Horvath, *High Performance Liquid Chromatography*. Academic Press- New York, **1980**.

٦٠. حسان أمين و حسن الحازمي: **الكيمياء العضوية العملية**. مطابع جامعة الملك سعود ، ١٩٨٧م.

٦١. عبد الغني حمزة و محمد آشي و أحمد عشي و عبد العزيز السباعي و توفيق عميرة: **الكيمياء التحليلية تجارب عملية في طرق التحليل الآلي**. مركز النشر العلمي جامعة الملك عبد العزيز - جده ، ١٩٩٢م.

٦٢. محمد الحوراني: **الكيمياء التحليلية أسسها ومبادئها**. دار الضياء للنشر والتوزيع ، ٢٠٠٢م.

63. Robert L. Pecsok, L. Donald shields, Thomas Cairns, Ian G. McWilliam, *Modern Methods of Chemical Analysis*. John Wiley and Sons- New York, **1976**.

٦٤. فتحي عفيفي و خالد محمد: **التحليل الدقيق لمتبقيات السموم والملوثات البيئية في مكونات النظام البيئي**. دار الفجر للنشر والتوزيع، ٢٠٠٠م.

٦٥. إبراهيم زامل الزامل: **الكيمياء التحليلية التحليل الآلي**. دار الخريجي للنشر و التوزيع ، ١٩٩٨م.

66. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*. Saunders College- Philadelphia, **1992**.

67. Gary D. Christian, James E. Oreilly, *Instrumental Analysis*. Prentice Hall- New Jersey, **1986**.

68. Colin F. Poole, Salwa K. Poole, *Chromatography Today*. Elsevier-Tokyo, **1991**.

69. Douglas A. Skoog, Donald M. West, *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Saunders College, New York, **1982**.

70. Hamilton R. J., Sewell P. A., *Introduction to High Performance Liquid Chromatography*. Chapman and Hall, London, **1982**.

71. Sandie Lindsay, *High Performance Liquid Chromatography*. John Wiley and Sons, New York, **1992**.