

## الفصل الأول

### الليبيدات Lipids

تعتبر الليبيدات أحد المركبات العضوية الثلاث الأساسية المكونة للكائنات الحية وتحتوي تقريبا كل الكائنات الحية علي البروتينات - الكربوهيدرات والليبيدات وتختلف نسب هذه المكونات تبعا لنوع الكائن الحي .

ويصفه عامة تستعمل كلمة الدهن Fat للدلالة علي المادة التي لا تنوب في الماء ولها خواص شمعية الملمس - وكلمة زيت Oil تدل علي الحالة الطبيعية فقط التي توجد عليها المادة أي سائله علي درجة حرارة الغرفة وهي لا تدل مطلقا علي التركيب الكيماوي لها ويجب التفرقة ما بين كلمة زيت وزيوت عطرية Essential Oils وزيوت معدنية Mineral oils وزيوت مصهورة Fused oils ولذلك يطلق علي كلمة زيت في بعض الأحيان الزيوت الدهنية أو الزيوت الثابتة . Fixed oils

وتوجد عدة إختبارات للتعرف علي وجود الليبيدات منها :-

١ - تكون الليبيدات بقع شمعية Greasy ولا تنوب في الماء وتطفو علي سطح الماء حيث أن كثافتها النوعية تقع ما بين ٠.٨٧ - ٠.٩٧ .

٢ - توجد عدة تفاعلات لونية للتعرف علي الليبيدات منها أن المواد الدهنية تصبغ بواسطة صبغة سودان III ( تذاب ٠.٠١ جم صبغة في ٥سم<sup>٣</sup> كحول (٩٥٪) + ٥ سم<sup>٣</sup> جلسرول ) وهذا التفاعل يعطي أيضا نتيجة موجبة مع البروتين .

٣ - عند تسخين كمية قليلة من المواد الدهنية مع ضعف وزنها بيكبريتيت الصوديوم فانه يتصاعد غاز الاكرولين ذو الرائحة المميزة - كما أنه عند تسخين الزيت مع الرمل Sand فانه تتصاعد غازات محتوية علي أكرولين الذي يعطي إختبار موجب مع جواهر كشاف شيف ويختزل محلول نترات الفضة الامونيومي .

٢ - عند وضع كمية قليلة من المواد الدهنية علي شريحة ميكروسكوب ثم يضاف اليها نقطة من مخلوط مركز من البوتاسا الكاوية والامونيا أو محلول إيثلات الصوديوم ثم تغطي بغطاء الشريحة Cover فانه تظهر بلورات ابرية بعد يوم في حالة المواد الدهنية .

### تعريف الليبيدات : Definition :

تعرف الليبيدات بانها المركبات التي لا تنوب في الماء وتنوب في مذيبات الدهون العضوية والمذيبات المستخدمة في إستخلاص الليبيدات تشمل - الاثير - إيثير البترول - الاسيتون - الكلوروفورم - البنزين - الكحول - البيوتانول المشبع بالماء وتحتوي علي احماض دهنية كجزء من مكوناتها .

وهذا التعريف ليس مطلق ويتضح ذلك من خلال الامثلة التالية :-

\* الاستيرولات والاسكوالين والكاروتينات تنوب في مذيبات الدهون ولا تحتوي علي احماض دهنية .

\* الجانجليوسيدات Gangliosides تنوب في الماء ومخيلط الماء والكحول ولا تنوب في كثير من المذيبات العضوية المستخدمة في استخلاص الليبيدات وتحتوي علي احماض دهنية.

ومن هنا يتضح ان تقسيم الليبيدات أمر صعب وذلك لطبيعتها الغير متجانسة .

والنظام الاكثر استخداما لتجنب تلك الصعوبات هو النظام المقترح بواسطة العالم

.Bloor

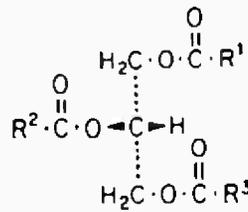
## تقسيم الليبيدات

أولاً : الليبيدات البسيطة Simple Lipids

مركبات تتكون فقط من نوعين من التركيبات الكيميائية المختلفة مثل :

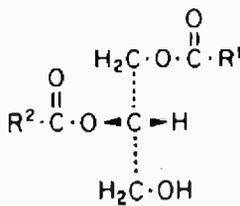
1 - استرات الجليسرول Glycerol esters

هي استرات جليسرول مع حامض دهني وتشتمل علي الجليسيريدات الثلاثية والثنائية والاحادية .

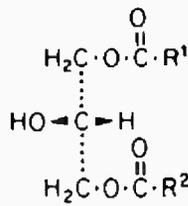


(a) 1,2,3-triacyl-*sn*-glycerol

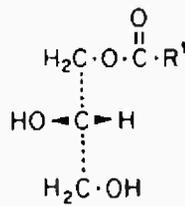
Triglycerides



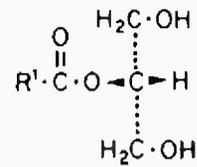
(b) 1,2-diacyl-*sn*-glycerol



(c) 1,3-diacyl-*sn*-glycerol



(d) 1-monoacyl-*sn*-glycerol



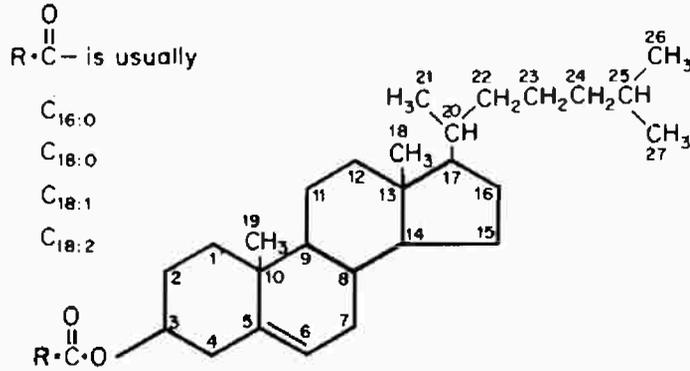
(e) 2-monoacyl-*sn*-glycerol

Diglycerides

Monoglycerides

### Cholesteryl esters - استرات الكوليستيرول

تتكون من الكوليستيرول والاحماض الدهنية .



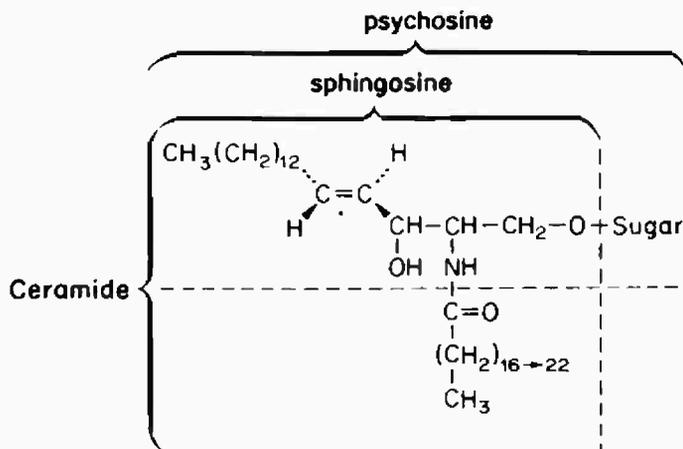
### Waxes : الشموع

عبارة عن إسترات الكحولات طويلة السلسلة مع الاحماض الدهنية .

### Ceramides : السيراميدات

عبارة عن أميد يتكون من إتحاد قاعدة إسفنجوزين أو مشتقاتها مع حامض دهني مرتبطين بروابط أميدية .

والمركبات المتكونة من الاسفنجوزين هي الاكثر شيوعا .



## ثانيا : الليبيدات المركبة : Compound Lipids

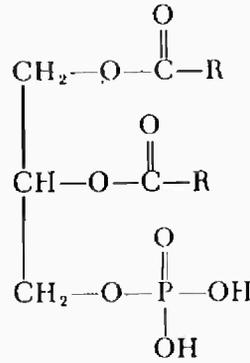
عبارة عن مركبات تتكون من أكثر من نوعين من التركيبات الكيماوية المختلفة .

### ١ - فوسفاتيديات الجليسرول : Glyceryl phosphatids

مركبات مشتقة من حامض الفوسفاتيديك .

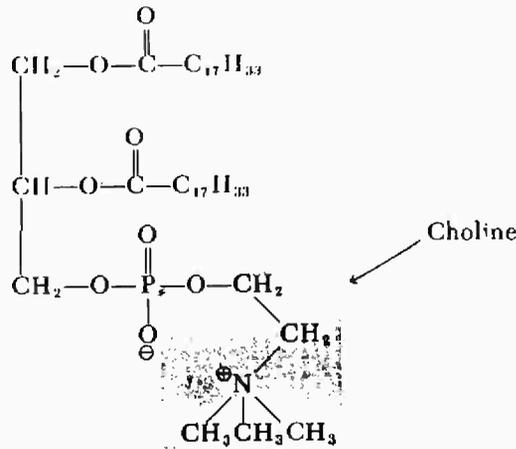
١- حامض الفوسفاتيديك : Phosphatidic acid

عبارة عن جليسرود ثنائي متحد مع حامض الفوسفوريك .



### ٢ - فوسفاتيديل كولين : Phosphatidyl Choline

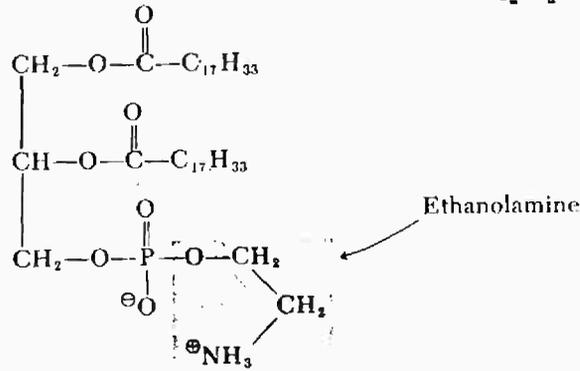
يتكون من حامض فوسفاتيديك مرتبط بقاعدة كولين .



Lecithin

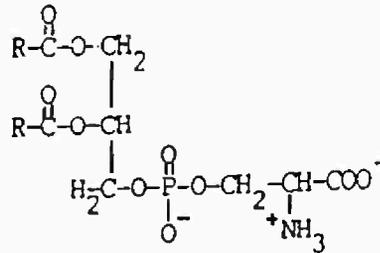
٣ - فوسفاتيديل ايثانول امين : Phosphatidyl ethanol amine

ويسمى خطأ سيفالين



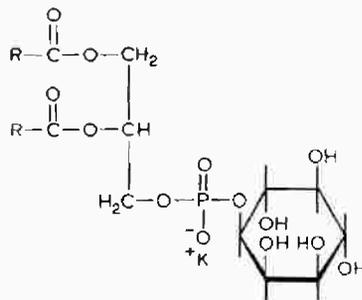
٤ - فوسفاتيديل سيرين : Phosphatidyl serine

يسمى خطأ ايضا سيفالين - وهي عبارة عن جلسريد ثنائي متحد مع حامض فوسفوريك وحامض أميني سيرين .



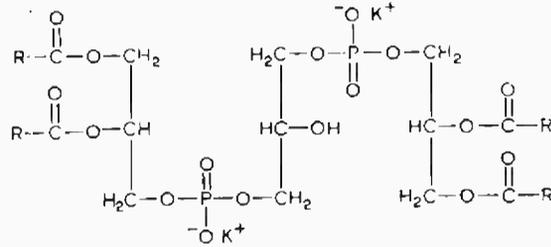
٥ - فوسفاتيديل اينوزيتول : Phosphatidyl Inositol

قسم أساسي من مركبات الفوسفاتيدات المعقدة المحتوية إينوزيتول ومجموعة أو أكثر من الفوسفات .



٦ - ثنائي فوسفاتيديل جليسرول : Diposphatidyl glycerol :

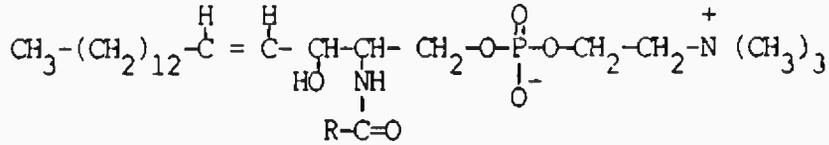
ويطلق عليه أيضا كاردوليبيين



ب - سفنجوليبيدات : Sphingolipids :

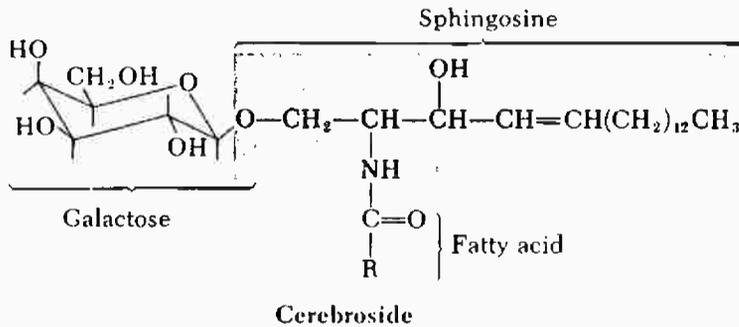
وهي مشتقات السيراميد

١ - سفنجومييلين : Sphingomyelin :



٢ - سيربوسيدات : Cerebrosides :

سيراميد مرتبط مع سكر أحادي ويعرف بسيراميد أحادي السكر



٣ - سيراميد ثنائي السكر : Ceramide dihexoside

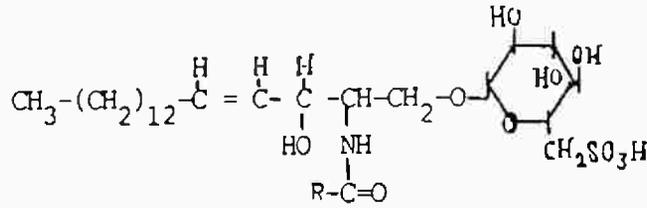
نفس التركيب السابق ولكن يرتبط السيراميد مع سكر ثنائي .

٤ - سيراميد عديد السكريات : Ceramide poly hexoside

نفس التركيب السابق ولكن مرتبط مع أكثر من ٢ وحدات سكر أحادي .

٥ - كبريتات السيربوسيد : Cerebroside sulphate

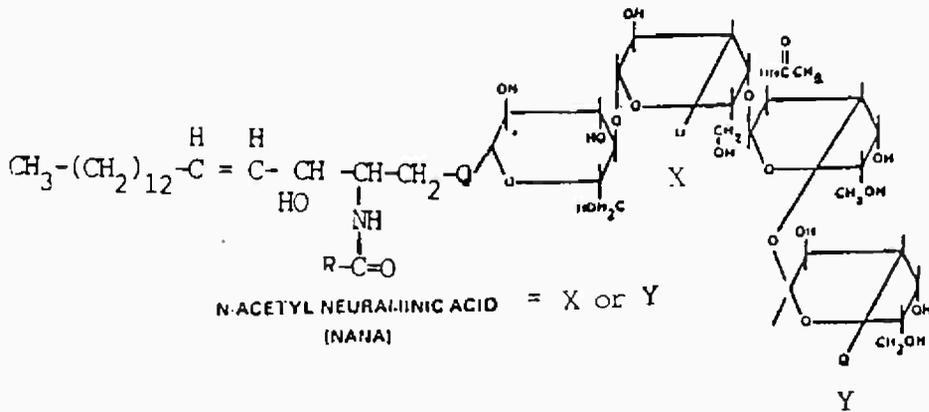
سيراميد مرتبط مع سكر أحادي مرتبط برابطة إستر بمجموعة كبريت .

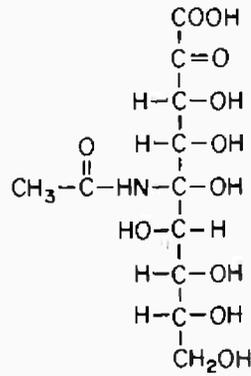


٦ - الجانجليو سيدات : Gangliosides

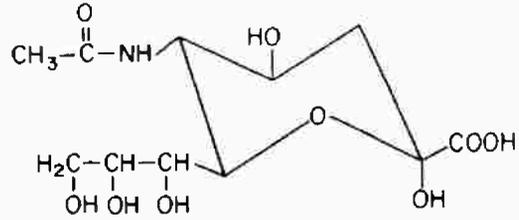
ليبيدات سكرية معقدة تشبه السيراميد عديده السكريات ولكن تحتوي أيضا علي حامض السياليك .

ومعظمها يحتوي علي سكر أميني بالاضافة إلي سكريات أخرى ولكن ليس معني ذلك أن كل الجانجليوسيدات تحتوي على سكريات أمينية .





Open form



Ring form

### ثالثاً : الليبيدات المشتقة : Derived Lipids

هي مركبات تحتوي علي تركيب كيمياري واحد من الليبيدات كجزء في تكوينها .  
 " أي هي المركبات التي توجد مكونة للانواع المختلفة من الليبيدات "

## المذيبات والأجهزة الشائعة في تحليل الليبيدات

Solvents : المذيبات :

نظرا للحساسية الشديدة لطبيعة الليبيدات للاكسدة والتحليل المائي فإنه لا بد من استخدام مذيبات عضوية عالية في النقاوة وخالية تماما من الشوائب فاذا إحتوي مذيب ما علي ٠.٠١٪ شوائب من المواد الغير الطيارة الضارة وإستخدم في استخلاص الليبيدات فإن كميات كبيرة من هذه المذيبات عند تبخيرها يصبح تركيز هذه المواد الضارة محسوسا وتتضح المشكلة بدرجة كبيرة عند تحليل الليبيدات باستخدام GLC أو TLC أو IR أو NMR أو Mass spec-trometry التي تمتاز بحساسيتها العالية .

والتغلب علي الصعوبات يجب إتباع الآتي :

- ١ - استخدام مذيبات ذات درجة عالية من النقاوة .
  - ٢ - تقطير كل المذيبات قبل الاستخدام مع إستبعاد ١٠٪ في بداية ونهاية عملية التقطير .
  - ٣ - تخزين المذيبات المقطرة في عبوات زجاجية بنية اللون .
- والمذيبات الآتية لا يتطلب منها الا التقطير البسيط قبل الاستعمال وتظل ثابتة لعدة أشهر :
- البنزين - التولوين - رابع كلوريد الكربون - خلات الايثايل - الاسيتون .
- أما المذيبات الأخرى فإنها تحتوي علي مواد ضارة تظهر أثناء التخزين ومن أمثلة ذلك :
- ١ - الأدهيدات :

توجد في الكحولات وهي تتفاعل مع مجاميع الأمين ، الهيدروكسيل أو مجاميع المثيلين النشطة في جزيء الليبيدات .

٢ - الفوسجين  $\text{COCl}_2$

يظهر في الكلوروفورم وثنائي كلوروميثان وهو يتفاعل مع مجاميع الأمين والهيدروكسيل في جزيء الليبيدات .

٣ - البيروكسيدات :

وتظهر في الاثير واثير البترول وهي تعمل علي أكسدة الرابطة الزوجية في الليبيدات .

والطرق التالية تبين كيفية إزالة الشوائب الضارة السابق ذكرها من أهم المذيبات المستخدمة في مجال تحليل الليبيدات .

### أولاً : الكحولات

يتم التخلص من الالدهيدات التي تتكون في كل من الايثانول والميثانول (٩٥ - ٩٩٪) . وكحول البروباييل العادي ، كذلك الايزوبروبانول عن طريق التقطير في وجود إيدروكسيد بوتاسيوم KOH ويتم تخزين المذيبات في زجاجات بنية لمدة ١ - ٢ شهر .

### ثانياً : المذيبات التي نحتوي علي كلور Chloronated solvents

يتم التخلص من الفوسجين  $COCl_2$  من المذيبات التي تحتوي علي كلور مثل الكلوروفورم عن طريق الغسيل بالماء ثم التجفيف فوق كلوريد الكالسيوم ثم التقطير ولتغتنق تكوين الفوسجين مرة أخرى يضاف ١٪ كحول ميثايل أو إيثانول ثم التخزين في زجاجات بنية ومن المعروف ان الكلوروفورم العالي النقاوة وكذلك التجاري والمحضر حديثا يكون خالي من الفوسجين لذلك يمكن تقطيره مباشرة نون الغسيل بالماء .

### ثالثاً : الايثير والهيدروكربونات واثير البترول

Alkyl ether and hydrocarbons or petroleum ether

يمكن استخدام هذه المذيبات بعد إجراء عملية تقطير بسيطة خاصة إذا كانت لا تحتوي علي بيروكسيدات ، ويمكن إجراء إختبار بسيط للكشف عن البيروكسيدات في تلك المذيبات كالآتي : يرج ٢ سم<sup>٢</sup> من المذيب مع ١ سم<sup>٢</sup> محلول يوديد بوتاسيوم ١٠٪ " محضر حديثا " وعن طريق إضافة محلول النشا كدليل فاذا تكون اللون الأزرق دل ذلك علي وجود البيروكسيدات (نتيجة لأكسدة البيروكسيدات لمحلول يوديد البوتاسيوم بفرد يود يعطي لون أزرق مع النشا) -

وتوجد طريقة بديله Alternat method للكشف عن البيروكسيدات وهي :

١ - يذاب ١ ملجم ثاني كرومات البوتاسيوم في ١ سم<sup>٢</sup> ماء في أنبوبة إختبار .

٢ - يضاف نقطة أو نقطتين من حمض كبريتيك مخفف .

٣ - تكمل أنبوبة الإختبار بالاثير وترج الانبوبة .

٤ - يتكون لون أزرق في طبقة ثاني كرومات البوتاسيوم والتي لا تمتزج مع الاثير دليل علي وجود البيروكسيدات .

يتم التخلص من البيروكسيدات عمليا برج ١ لتر مذيب مع ١٠٠ سم<sup>٣</sup> محلول كبريتات حديوز تركيزه ٢٠٪ في حمض كبريتيك ١ ع ثم يتبع ذلك الغسيل ب ١٠٠ سم<sup>٣</sup> ماء ثم التجفيف فوق كلوريد كالسيوم ثم التقطير .

أما بالنسبة لمذيب ايثايل اثير فيضاف الي المذيب ببطء وبحذر شديد ليثيوم الومنيوم هيدريد  $Li Al H_4$  في حدود ٥ - ١٠ جم لكل ١٠٠ سم<sup>٣</sup> مذيب ثم يسخن في وجود مكثف عاكس Reflux لمدة ١ - ٢ ساعة ويقطر .

### إثير البترول Petroleum ether

عادة يحتوي إثير البترول علي هيدروكربونات غير مشبعة والتي تكون غير مرغوبة بسبب نشاطها . ويمكن التخلص من هذه الهيدروكربونات الغير المشبعة عن طريق الرج مع حامض كبريتيك مركز ويمكن إستخدام محلول برمنجنات بوتاسيوم وحامض كبريتيك والرج حتي يتم كسر المواد القابلة للاكسدة " الهيدروكربونات الغير مشبعة " ثم يجري بعد ذلك الغسيل بالماء ثم التجفيف فوق كلوريد كالسيوم والتقطير .

### البنزين أو التولوين Benzene or toluene

برج البنزين أو التولوين مع حامض الكبريتيك المركز (٨٠ سم<sup>٣</sup> حامض كبريتيك مركز / لتر بنزين ) في قمع فصل وعلي درجة حرارة الغرفة لمدة تتراوح من نصف - ١ ساعة ثم يتم سحب الجزء الحامض المسود من أسفل القمع وتكرر هذه العملية مرتين باضافة جزء جديد من حامض الكبريتيك والرج حتي تصبح طبقة الحامض عديمة اللون ثم يغسل بالماء المقطر للتخلص من الحموضه ثم بعد ذلك ينقل البنزين الي دورق نظيف ويقطر .

والجدول (١) يبين أهم خصائص المذيبات الشائعة الاستخدام في تحليل الليبيدات :

الاسم	الرمز الجزئي	الوزن الجزئي	الكثافة	درجة الغليان (م°)
أسيبتون	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	٥٨.١	٠.٧٩٦ علي ١٥ م°	٥٧
بنزين	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	٧٨.٠٥	٠.٨٧٨ علي ٢٠ م°	٨٠.٢
رابع كلوريد الكربون	CCl <sub>4</sub>	١٥٢.٨	١.٤٨٢ علي ٢٥ م°	٧٦.٧
ثنائي كبريتيد الكربون	CS <sub>2</sub>	٧٦.١٣	١.٢٩٢٧ علي ٢٠ م°	٤٦
كلوروفورم	CHCl <sub>3</sub>	١١٩.٣٨	١.٥٢٦ علي ٢٠ م°	٦١.٢
ثنائي كلور وايتان	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	٩٨.٩٥	١.٢٥٧ علي ٢٠ م°	٨٣.٨٤
هكسان	C <sub>6</sub> H <sub>١٤</sub>	٢٦.١	٠.٦٦٢ علي ١٧ م°	٧١

### الأواني الزجاجية Glassware

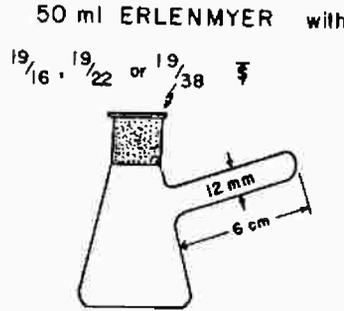
يجب إبعاد وتقادي أي مصدر للتلوث أثناء إجراء التجارب العملية علي الليبيدات وهذا المصدر ربما يكون متمثلا في الاجهزة المستعملة أو الادوات مثل الصنابير أو السدادات أو الموصلات . لذلك يجب عدم استعمال الشحوم ، البلاستيك أو اللدائن Plasticisers .

ويجب أن تتم جميع العمليات في أواني من الزجاج ويجب أن تكون جميع الموصلات والسدادات من الزجاج مع إحكام القفل وعدم إستخدام الشحوم أو وصلات الكاوتشوك كذلك لا يستخدم سدادات من الفلين ، ويجب إستخدام صنابير مصنوعة من التفلون Teflon بعد إختبارها بالمذيب بحك جزء منها مع المذيب وملاحظة حدوث تآكل من عدمه لذلك يجب عدم إستخدام سدادات من الفلين أو المطاط أو البولي إيثيلين للوارق أو الانابيب بل يجب أن تكون من الزجاج فان كان ذلك غير متاح فيستعاض عن ذلك بأغطية من شرائح الالومنيوم .

## دورق الاستخلاص والتحليل :

Combination hydrolysis and extraction flask

هذا الدورق مهم خاصة في عمليات التحليل المائي والميثله حيث يتم الفصل والاستخلاص لنواتج التحليل كيميا في نفس الدورق . ويصنع الدورق ( ٥٠ سم<sup>٢</sup> ) من الزجاج المقاوم للحرارة وله عنق بمقاس ( ١٦/١٩ . ٢٢/١٩ . ٢٨/١٩ ) وله أنبوبة جانبية سعة ٥ سم<sup>٢</sup> ( ١.٢ × ٦ سم ) تقع عموديا علي جانب الدورق أسفل فوهة الدورق بحوالي ١ سم .



ويستخدم هذا الدورق اذا كانت العينة في حدود ار - ١٠٠ ملجم أما بالنسبة للعينات الكبيرة فان الدورق يمكن أن يدرج في أبعاده ليكون مناسباً مثال ذلك دورق سعته ١٢٥ سم<sup>٢</sup> له انبوبة جانبية ١٠ - ١٥ سم<sup>٢</sup> يمكن إستخدامه لعينات أكثر من ٥ جم .

ولقد صمم هذا الدورق لاستعماله مع أي زوج من المذيبات الغير قابلة للامتزاج فاذا كان المطلوب إستخلاص الطبقة السفلي عدة مرات بواسطة الطبقة الاعلي . يضاف كمي من المذيب الاعلي كثافة ( الجزء السفلي ) تكفي للميء الانبوية الجانبية ثم يضاف بعد ذلك المذيب الاخف كثافة ( الجزء العلوي ) في حدود ٥ - ١٠ سم<sup>٢</sup> ثم يرج الخليط ثم تترك فترة لكي ينفصلا عن بعضهما ثم يميل الدورق ببطء للوضع الافقي حيث تدخل الطبقة السفلي في الانبوية الجانبية وفي نفس الوقت تخرج الطبقة العليا من الدورق حيث يجمع في كأس مناسب .

ثم يغسل فوهة الدورق بالمذيب ثم يرجع الدورق لوضعه الرأس ثم تضاف كمية أخري من المذيب العلوي ويكرر ما سبق أكثر من مرتين كلما دعت الضرورة وبذلك يمكن استخلاص كمي وسريع لكل من الطبقة العليا والطبقة السفلي .

## طرق تبخير المذيبات Evaporatorion

توجد ثلاث طرق لتبخير المذيب في الليبيدات تعتمد علي كمية المذيب المطلوب تبخيره .

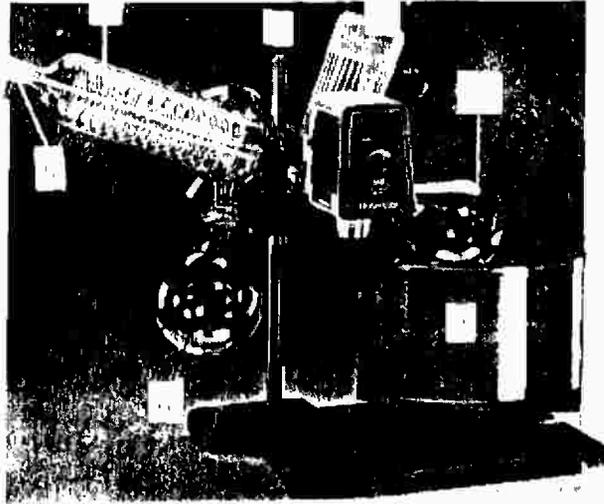
### التبخير في وجود تيار من النتروجين Evaporation in a stream of $N_2$

تستخدم هذه الطريقة لتبخير أحجام صغيرة من المذيب ( ١٠ - ١٥ سم<sup>٣</sup> أو أقل ) الموجودة في أنبوبة صغيرة أو دوارق والطريقة الملائمة هو توجيه تيار من النتروجين ( $N_2$ ) فوق سطح المحلول الموجودة في حمام مائي درجة حرارته ٣٠ درجة مئوية .

### المبخرات الدورانية Rotary evaporators

يعتبر التبخير باستخدام المتبخرات الدورانية هو الاجراء الاكثر كفاءة الي جانب أنه يستخدم لتركيز حجم كبير أو صغير من محاليل الليبيدات بسرعة علي درجة حرارة منخفضة وبدون حدوث تلوث للعينة بالشحوم أو الدهون ويتم عملية التبخير للمذيبات تحت تفريغ مع إستعمال مضخة مائية قادرة علي إعطاء تفريغ ١٠ - ٢٠ مم زئبق .

ويجب أن تكون درجة الحرارة في حدود ٣٠ - ٣٥ درجة مئوية أو أقل باستخدام حمام مائي ومنظم حراري .



ويتكون الجهاز من :

- ١ - بورق البخار وسعته ٥٠٠ سم<sup>٢</sup> .
- ٢ - حامل معدني .
- ٣ - موتور .
- ٤ - مكثف قياسي .
- ٥ - أنبوبة ملىء يضاف خلالها باستمرار محلول العينة أثناء عملية التبخير .
- ٦ - قابلة للجزء المقطر .
- ٧ - حمام مائي مزود بثرموستات .

### Solvent replacement **إحلال المذيب**

ويستخدم ذلك عند التخلص من آثار الماء في الكلوروفورم عن طريق إضافة البنزين الي الكلوروفورم . كذلك عند التخلص من الميثانول ، والماء ، AcOH عن طريق إضافة كميات صغيرة من الكلوروفورم ثم التبخير حتي الجفاف بين كل إضافة وأخري من الكلوروفورم .

## إستخلاص الليبيدات Lipid extraction

الخطوة الاولى في تحليل الليبيدات هي فصل كل الجلسريدات الثلاثية من العينة الاصلية ودراسة الاحماض الدهنية الداخلية في تركيبها والتعرف عليها .

وتعتمد الدراسات الحيوية علي الطرق المتاحة لاستخلاص الليبيدات كميًا من مصادرها بأقل قدر ممكن من التغيير في تركيبها - والتغيير الحادث في التركيب نتيجة للهدم Degradation والتكسير ربما يحدث أثناء تخزين العينة وكذلك أثناء الاستخلاص ويرجع ذلك لنشاط انزيمات الليياز : والفوسفوليپاز ، والاكسيديز حيث أن بعضها يكون نشط تحت الصفر المنوى وأما التغييرات الكيماوية فتشمل التحليل المائي والاكسدة - لذلك فان الطريقة المثلي لاستخلاص الليبيدات هي التي تعمل علي إستخلاص كلي لليبيدات وأن تخلو من المواد المصاحبة مثل السكريات الحرة والاحماض الامينية وتعتمد الكفاءة العالية في الاستخلاص علي طبيعة التركيب الكيماوي Chemical nature لمكونات الليبيد ونوع الارتباط Kind of complex or association بينها وبين مكونات الخلايا وكما هو معروف أن الدهون تمتاز بصعوبة ذوبانها في الماء وقابليتها العالية للذوبان في المذيبات العضوية ومع ذلك وجد مدي واسع في خاصية ذوبان الليبيدات وذلك لاختلافها في التركيب الكيماوي مما جعل من المستحيل إختيار مذيب واحد شامل لاستخلاص الليبيدات والاستخلاص الناجح يعتمد علي إمكانية كسر الروابط بين الليبيدات والمركبات الاخرى المصاحبة لها وبذلك يصبح الليبيد في صورة حرة يسهل ذوبانها بعد ذلك وعموما هذه الدرجة من الاذابة يمكن أن تتحقق عندما تتشابه كل من قطبية الليبيد مع قطبية المذيب وبالتالي فان الجلسريدات الثلاثية الغير قطبية تنوب في المذيبات الغير قطبية مثل الهكسان وإثير البترول أما المركبات القطبية مثل الجليكوليبيدات فانها تنوب في الكحول .

### أنواع الروابط التي تشترك فيها الليبيدات مع المواد المصاحبة في الخلايا .

توجد ثلاث أنواع رئيسية من الروابط في الليبيدات .

#### 1 - إنحداد Van der Waals أو الارتباط الكاره للماء

Van der Waals or hydrophobic association

ترتبط الليبيدات المتعادلة أو الغير قطبية مثل إسترات الاستيرولات - الجلسريدات - الهيدروكربونات والكاروتينات بواسطة روابط ضعيفة نسبيا غير تساهمية تسمى فان در

فالس أو إرتباط كارهه للماء من خلال الارتباط مع السلاسل الهيدروكربونية الجانبية للأحماض الأمينية . ومن أمثلة ذلك الارتباط الذي يحدث في أنسجة تخزين الدهون -adi pose tissue وكذلك الليبوبروتين من نوع Chylomicrons والمعقد المكون من الليبومين مع الحامض الدهني .

## ٢ - الروابط الهيدروجينية ، الارتباط الألكتروستاتيكي أو الإنحداء للمحب للماء :

Hydrogen bonding, electrostatic and hydrophilic association

ترتبط الليبيدات القطبية والفوسفاتيدات ، والجليكوليبيدات مع البروتين بواسطة رابطة هيدروجينية أو الكترولستاتيكية أو هيدروفيلية ومن أمثلة ذلك كما في أغشية البلازما ؛ الميتوكوندريا ، النسيج الاندوبلازمي ومعقد السيرم والليبوبروتين .

## ٣ - الرابطة التساهمية Covalent association

ترتبط الأحماض الدهنية ، الأحماض الهيدروكسيلية ، الأحماض المتفرعة برابطة تساهمية في صورة إستر أو رابطة أميدية أو رابطة جليكوسيدية مع مركبات السكريات العديدة ومن أمثلة ذلك الليبيدات المحتوية على سكر عديد في جدر أغشية خلايا البكتريا .

وعند الاستخلاص الكامل لليبيدات يجب الأخذ في الاعتبار الثلاث أنواع من الارتباط ولذلك :

١ - في حالة الليبيدات التي ترتبط برابطة ضعيفة وهي الكارهة للماء أو رابطة فان در فالس "غير قطبية " فإنه يمكن إستخلاصها بمذيبات غير قطبية مثل الاثير - البنزين - الكلوروفورم.

٢ - في حالة الليبيدات التي ترتبط برابطة هيدروجينية كما في الليبيدات المرتبطة بالأغشية فإنه يمكن إستخلاصها بمذيبات قطبية مثل الايثانول والميثانول وذلك بكسر الروابط الهيدروجينية أو القوي الألكتروستاتيكية الموجودة بين الليبيدات والبروتين .

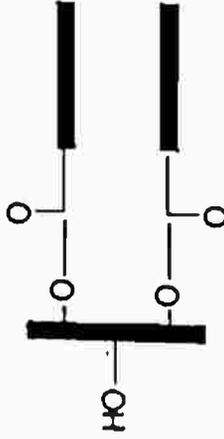
٣ - في حالة الليبيدات التي ترتبط برابطة تساهمية فإنه لا يمكن إستخلاصها مباشرة بأي مذيب ولكي يتم إستخلاصها لا بد أولا من فصلها من المعقد وذلك بالتطليل المائي بالحامض أو القلوي .

تستخلص هذه الأنواع من الليبيدات  
كاملا بالليبيدات العضوية



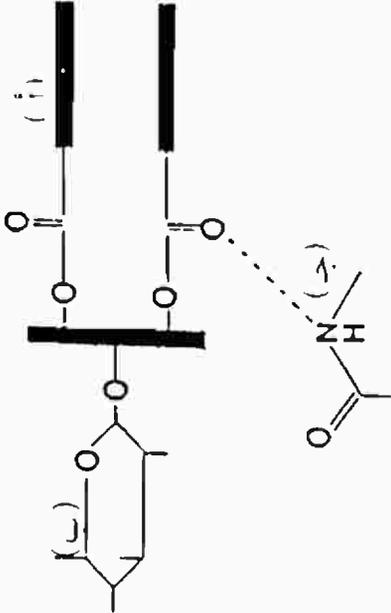
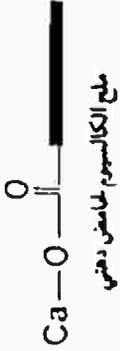
Acid hydrolysis  
(HCl)

ثنائي اسيل الجليسرول



ليبيدات صلبة

هذه الأنواع من الليبيدات لا تستخلص  
كاملا بواسطة الليبيدات العضوية



الرسم التخطيطي السابق بين انفراد الاحماض الدهنية المرتبطة كيمائيا مع مكونات الخلايا  
بالتحليل المائي باستخدام حامض معدني .

ويجب مراعاة ما يلي عند استخلاص الليبيدات :

- ١ - تحدد طبيعة التركيب الكيماوي لليبيدات طريقة إستخلاصها .
- ٢ - لمنع أكسدة الروابط الزوجية يجب أن تكون كل المذيبات مقطره حديثا وخالية من البيروكسيدات قبل إستخدامها .
- ٣ - بالنسبة للزيوت العالية في درجة عدم التشبع يجب أن تستخدم لها مذيبات خالية من الهواء وذلك بأمرار تيار من النيتروجين خلال المذيب وكذلك فان عملية الاستخلاص والعمليات التالية لها يجب أن تتم في جو خامل خالي من الاكسجين ( أي في وجود تيار من النيتروجين ) .
- ٤ - بعد عملية الاستخلاص يجب عدم تبخير المذيب الي الجفاف التام كما لا يجب أن يترك المستخلص علي هذه الحالة لفترة طويلة ، بل يجب أن ينوب بأسرع ما يمكن في مذيب مناسب .
- ٥ - يجب حفظ الليبيدات علي صورة محلول وعادة يستخدم الكلوروفورم الذي يحتوي علي ميثانول الذي يعمل كمضاد للاكسدة .
- ٦ - يجب أن تكون درجة حرارة عملية الاستخلاص في حدود درجة حرارة الغرفة أو أقل إذا كان ذلك ضروريا وذلك لمنع تكوين البيروكسيدات أو حدوث تفاعل التحلل المائي . وتلعب درجة الحرارة دورا أساسيا في عملية الاستخلاص فتؤدي درجة الحرارة المنخفضة إلي خفض أو قلة ذوبان بعض الليبيدات بينما إذا تمت عملية الاستخلاص علي درجة حرارة مرتفعة فان ذلك يؤدي إلي تنشيط الانزيمات مما يؤدي إلي تغير وكسر في التركيب الكيماوي لليبيدات خاصة وأن الليبان ينشط عند درجة حرارة أعلى من ٤٥م° بينما إنزيم الفوسفوريلاز ينشط باستخدام مذيبات معينة . لذلك فان طريقة سوكسلت الخاصة باستخلاص الليبيدات من الانسجة يجب تجنبها وعدم إستخدامها وذلك لانها تستخدم حرارة مرتفعة لعدة ساعات .
- ٧ - يحدث للعينات النباتية تحلل إنزيمي أثناء عملية الاستخلاص ولايقاف ذلك يفضل إستخدام الكحول ضمن مخلوط المذيبات المستخدم حيث أن الكحول كاف لايقاف نشاط كل من الفوسفوريلاز والليبان أما الانزيمات الاكثر ثباتا عادة يوقف نشاطها بغمر النسيج لمدة ١-٢ دقيقة في الكحول الساخن أو الماء المغلي .

- مما سبق يتضح أهمية الكحول كمعاون لمذيب الاستخلاص وضروري للأسباب الآتية :
- ١ - يعمل علي كسر Disruption المعقد أو الرابطه بين الليبيدات والبروتين (الرابطه الايدروجينية).
  - ٢ - يعمل علي إذابة Dissolution الدهون ( ذات القطبية العالية مثل الجليكوليبيدات ) .
  - ٣ - يعمل علي وقف النشاط Inactivation الانزيمي ( أو منع التحلل الانزيمي ) .
  - ٤ - تعتبر الكحولات مضادات للاكسدة Antioxidants .

لكن هناك عيب عند إستخدام الكحول كمذيب معاون في إستخلاص الليبيدات من الانسجة وهو أن يعمل الكحول علي استخلاص مواد مصاحبة اخري غير دهنية Water soluble contaminants مثل السكريات والاحماض الامينية والاملاح ولذلك يجب تخلص الزيت أو الدهون الخام المتحصل عليه بهذه الطريقة من المواد المصاحبة ( الشوائب ) والتي تنوب في الماء .

### إعداد العينة لاستخلاص الليبيدات

#### Preparation of sample for lipid extraction

ليست هناك طريقة واحدة قياسية لاستخلاص الليبيدات والطريقة المستعملة تعتمد علي نوع الليبيد ومصدره وطبيعة الطرق التحليلية المراد القيام بها لذلك فان طريقة استخلاص الدهون من اللبن تعتبر بسيطة نسبيا بالمقارنة باستخلاص الدهون من الانسجة النباتية أو الحيوانية حيث أن الانسجة النباتية والحيوانية تحتاج الي بعض عمليات من الاعداد والتجهيز (تكسير الانسجة) مثل الطحن الميكانيكي ، التكسير بواسطة الموجات فوق الصوتية العالية - التجنيس ، الضغط وغيرها .

ومن أكثر الطرق كفاءة في إستخلاص الليبيدات والتي تتغلب علي كل العقبات السابق ذكرها هي طريقة (Bligh and Dyer 1959) .

وفيها يتم مزج العينة مع مخلوط من الكلوروفورم والميثانول بنسبة ٢ : ١ حجم/ حجم . وهذا النظام قابل الامتزاج بالماء الموجود بالعينة التي سبق معاملتها بالكلوروفورم - ميثانول وأن إضافة كمية ملحوظة من الماء تعمل علي فصل مخلوط المذيب الي طبقتين (طبقة الكلوروفورم وهي تحتوي علي كل الليبيدات والطبقة الثانية هي طبقة الميثانول والتي تحتوي علي

كل المركبات الغير دهنية) . يتم فصل طبقة الكلوروفورم للحصول علي الليبيد النقي عن المواد الغير ليبيدية والذائبة في الماء (مثل الكربوهيدرات - الاملاح - الاحماض الامينية التي تستخلص من الانسجة مع الليبيدات) . أحيانا يتكون مستحلب عند السطح الفاصل بين الطبقتين وبذلك قد تهرب بعض الليبيدات وتظل في منطقة الاستحلاب لذلك يجب كسر هذا المستحلب ويتم ذلك بواسطة إضافة كميات من مخلوط الاملاح الذي يحتوي علي كلوريد كالسيوم (٠.٢٪) ، كلوريد ماغنسيوم (١٧٪) كلوريد صوديوم (٢٩٪) أو كلوريد بوتاسيوم (٢٧٪) في ماء مشبع بالكلوروفورم والرسم في صفحة ٣٦ يبين طريقة استخلاص وتقدير الليبيدات عمليا .

### تقدير الليبيدات

#### Lipid determination

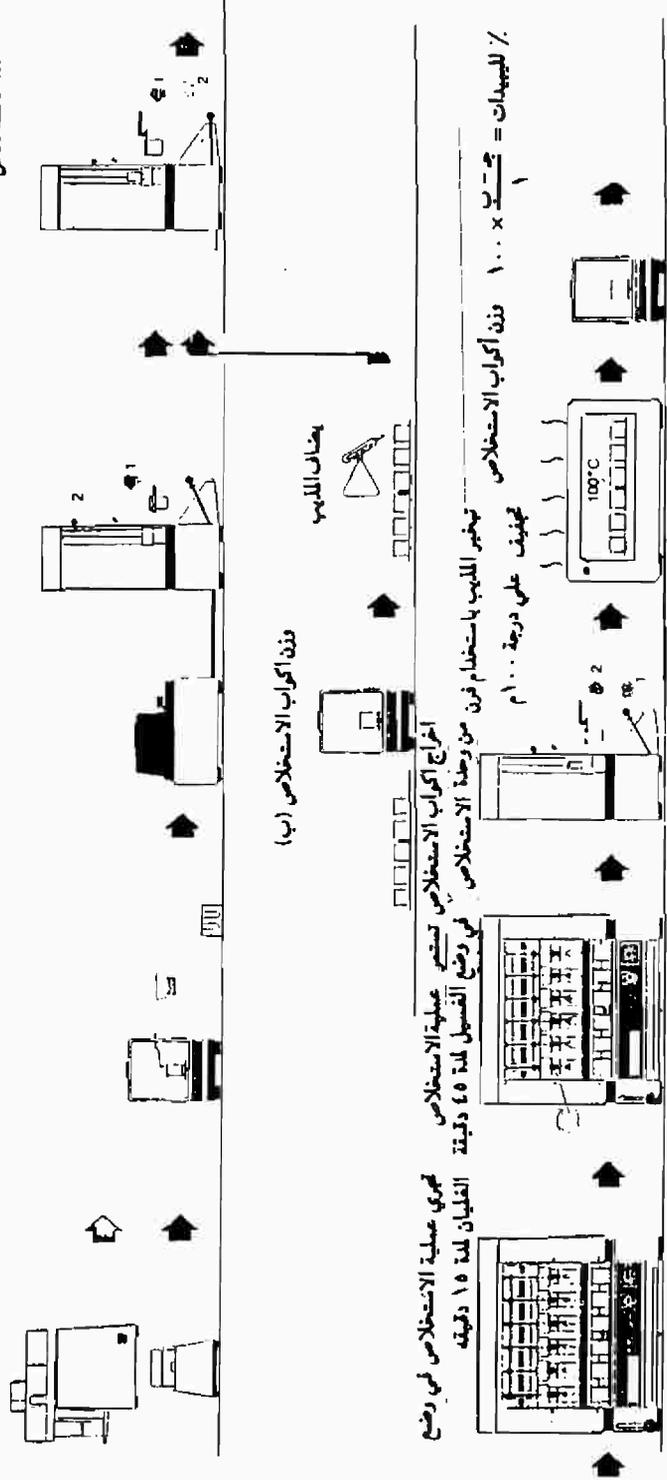
هناك العديد من الوسائل والاساليب المختلفة المتاحة لتقدير محتوى الليبيدات بسرعة ويستخدم جهاز التردد النووي المغناطيسي (NMR) Nuclear Magnetic Resonance spec. في تحليل الزيوت في البنور وهذا فتح الطريق وأعطى فرصة عظيمة لعلماء الوراثة والتهجن في النبات حيث لا يحدث بهذه الطريقة أي تكسير في العينات أو هدم وهي طريقة سريعة ويمكن إستخدامها لتقدير محتوى الزيت لبذرة واحدة أو لكمية من البنور والقراءة المقاسة بجهاز NMR ترجع الي الهيدروجين الكلي للجزء الزيتي في البذرة ولا تتأثر بالهيدروجين الموجود في الجزء الغير زيتي ويتم حساب كمية الزيت عن طريق جداول أو منحنيات معايره .

وتوجد طرق لونية لتقدير الزيت حيث يعامل مستخلص الليبيدات بواسطة محلول قلوي لحامض الهيدروكساميك Hydroxamic وبعد ذلك تترك فترة للتفاعل ثم تحمض بحامض HCl ويضاف كلوريد الحديدك فيتكون لون ثابت نسبيا له أقصى إمتصاص عند طول موجي ٥٤٠ nm .

ومن التفاعلات اللونية التي تستخدم لتقدير الليبيدات الكلية كيميا سواء في السيرم أو أي مستخلص يحتوي علي المواد الليبيدية هو تفاعل سلفو فوسفوفانيلين Sulfo - phospho - vanillin ( Knight et al, 1972 ) ويشترط لنجاح هذا التفاعل وجود مركب يحتوي علي رابطة زوجية بين ذرتي كربون - وفيما يلي خطوات هذا التفاعل :-

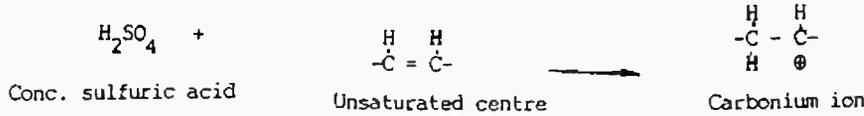
استخلاص الليبيدات بالذهبيات العضوية

تجفيف العينة (طحن - تجفيف)      وزن العينة داخل الكستبان (١)      توضع الكستبان داخل الاستخلاص      توضع ٦ أكراب الاستخلاص في حدة الاستخلاص

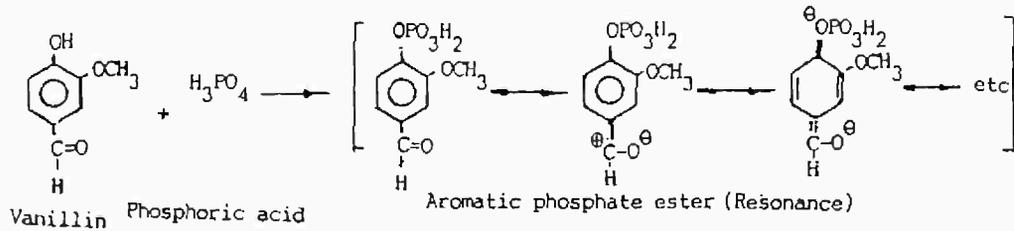


- ١ - يتفاعل حامض الكبريتيك المركز مع الليبيدات غير المشبعة لتكوين أيون الكربونيوم.
  - ٢ - يتفاعل حامض الفوسفوريك مع الفانيلين ليعطي إسترفوسفات عطري وهذا يؤدي إلي زيادة نشاط مجموعة الكربونيل للفانيلين .
  - ٣ - يتفاعل أيون الكربونيوم Carbonium مع مجموعة الكربونيل النشطة للفوسفوانيلين ليتكون المركب الملون الثابت نتيجة لعملية التردد Resonance .
  - ٤ - تتفاعل أيضا المركبات غير المشبعة المحتوية علي أكثر من رابطة زوجيه بنفس الطريقة ولكن تختلف طبيعة هذا التفاعل طبقا للإعاقه الفراغيه Steric hindrance .
- تبين المعادلات التاليه كيفية تتابع هذا التفاعل :

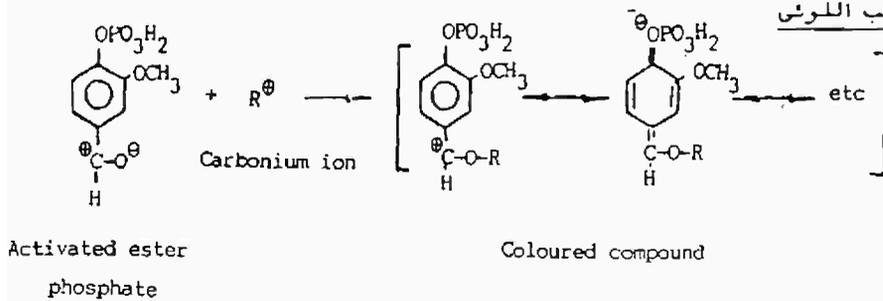
١- تكوين ايون الكربونيوم



٢- تكوين استرفوسفات عطري



٣- تكوين المركب اللوني



## الجواهر الكشافة Reagents

## ١ - الفوسفوفانيلين

يذاب الفانيلين ( ٠.٦ جم ) في كحول إيثايل مطلق ( ٨ - ١٠ سم<sup>٣</sup> ) ثم يكمل الحجم بالماء المقطر الي ١٠٠ سم<sup>٣</sup> - يضاف إلي هذا المحلول حامض فوسفوريك مركز ( ٤٠٠ سم<sup>٣</sup> ) مع الرج المستمر - يحفظ المخلوط في زجاجة بنية علي درجة حرارة الغرفة .

## ١ - المخلوط القياسي من الليبيدات

يتكون هذا المخلوط من ٧٠٪ حامض أوليك ، ٣٠٪ حامض بالميتيك أو حامض إستياريك ويحضر بنسبة ١٪ باستعمال كحول إيثايل مطلق .

## طريقة العمل Procedure

١ - يضاف ٥ سم<sup>٣</sup> حامض كبريتيك مركز إلي أنبوبة إختبار تحتوي علي ١ . ٠ سم<sup>٣</sup> سيرم أو مستخلص ليبيدي .

٢ - تسخن الأنبوبة ١٠ دقائق باستخدام حمام مائي يغلي - تبرد الأنبوبة ثم يؤخذ منها ٤ . ٠ سم<sup>٣</sup> وتوضع في أنبوبة نظيفة وتعرف بال Unknown .

٣ - يجري عمل بلانك Blank بوضع ٤ . ٠ سم<sup>٣</sup> حامض كبريتيك مركز في أنبوبة إختبار .

٤ - يضاف ٦ سم<sup>٣</sup> من الجواهر الكشاف الفوسفوفانيلين لكل أنبويه وتترك الأنابيب في الظلام لمدة ٤٥ دقيقة ثم تسجل قراءات الامتصاص عن طول موجة ٥٢٥ .

٥ - يجري عمل منحني قياسي الذي يدل علي العلاقة بين الامتصاص عند طول موجة ٥٢٥ وتركييزات مختلفة من المخلوط القياسي لليبيدات ومنه نستنتج تركيز الليبيدات في العينات .

## تخزين الليبيدات المستخلصة Storage of lipid extraction

نتيجة لتعرض الليبيدات للتحليل المائي أو تكوين البيروكسيدات نتيجة للاكسدة لذلك يفضل أو ينصح بعدم تخزينها لفترات طويلة أكثر ١ - ٢ سنة لاجراء الدراسات التحليلية عليها . لذلك فانه من الافضل إجراء تلك الدراسات التحليلية علي الليبيدات المستخلصة حديثا أو علي الأقل المخزنة لفترات قصيرة وذلك لأنه في هذه الحالة تكون النتائج أفضل .

في حالة تخزين الليبيدات علي فترات قصيرة عدة أسابيع فانه :

١ - يفضل نويان الليبيدات في مخلوط من الكلوروفورم والميثانول بنسبة ٢ : ١ حجم / حجم بحيث يكون المذيب حديث التقطير ويخزن علي درجة تتراوح من صفر الي - ١٥ درجة مئوية .

٢ - يجب وضعها في عبوات زجاجية لها غطاء مصنفر .

٣ - تملئ هذه العبوات حتي النهاية ( أي مملوءه حتي العنق ) بالمذيب .

وفي حالة التخزين لفترات طويلة ( ١ - ٢ سنة ) يجب اضافة مضادات للاكسدة مثل التوكوفيرول أو Butylated hydroxytoluene (BHT) بنسبة ٠.٠٥٪ ويخزن المحلول علي درجة حرارة - ٤٠ درجة مئوية أو اقل إن أمكن .

ويجب أخذ الحيطة والحذر اللازم لمنع التلوث أو التغير الكيمائي للعينة سواء قبل أو أثناء الاستخلاص ولاجراء ذلك يتبع الاتي :

### لمنع التلوث بالشوائب to avoid contamination

١ - يجب تقطير كل المذيبات قبل الاستعمال .

٢ - يجب غسل جميع الاواني الزجاجية قبل الاستخدام مباشرة بالمخلوط كلوروفورم - ميثانول بنسبة ٢ : ١ ، حجم / حجم .

٣ - تجنب ملامسة العينة مع أي من المطاط أو البلاستيك وإستخدام سدادات من التفلون .

٤ - يجب أن تحفظ العينة في أوعية من الزجاج ذات غطاء من الزجاج أو التفلون ونفس الاجراء يجري علي المذيبات .

### لمنع أكسدة الأحماض عديدة التشعب

to prevent oxidation of poly unsaturated acids.

١ - تتم كل عمليات التحليل في جو غني من النيتروجين .

٢ - طرد الاكسجين من المذيبات عن طريق إمرار غاز النيتروجين خلال المذيب .

٣ - تبريد المذيبات تحت درجة حرارة أقل من ٤٠ درجة مئوية وتحت ضغط منخفض .

٤ - إضافة مادة مضادة للاكسدة بتركيز ٠.٠٥٪ ( وزن / حجم ) لمحلول العينة المخزنة ويجب

الاهتمام باختيار هذه المادة " المضادة للاكسدة " وذلك حتي لا يحدث لها تداخل مع عمليات التحليل الكروماتوجرافي وغالبا ما يستخدم BHT لانها لا تتداخل مع الأحماض الدهنية قصيرة أو طويلة السلسلة حيث أن ال Peak الخاص بالـ BHT يظهر قريب من أو مع ال Peak الخاص بالمذيب وذلك عند تحليل إسترات الميثايل للأحماض الدهنية بواسطة جهاز التحليل الكروماتوجرافي الغازي .

٥ - تجنب تعريض العينة للهواء لتقليل فرص حدوث عمليات الاكسدة الذاتية ولحماية المركبات الحساسة للضوء مثل الكينونات .

٦ - تخزين العينات في صورة محلول وفي جو غني بالنتروجين وعلي درجة حرارة الصفر المنوي أو أقل .

### لمنع حدوث التغيير الكيماوي to avoid chemical alteration

- ١ - يجب أن يتم الاستخلاص لليبيدات مباشرة بعد قطع النسيج والهرس .
- ٢ - تجنب إطالة ملامسة العينات للكحولات خاصة في وجود وسط حامضي أو قلوي لمنع حدوث عملية تبادل تكوين الاستر .