الفصل الأول

الليبيدات Lipids

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

وبصفه عامة تستعمل كلمة الدهن Fat للدلالة علي المادة التي لا تذوب في الماء ولها خواص شمعية الملمس - وكلمة زيت Oil تدل علي الحالة الطبيعية فقط التي توجد عليها الماده أي سائله علي درجة حرارة الغرفة وهي لا تدل مطلقا علي التركيب الكيماوي لها ويجب التفرقه 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 الثابته Fixed oils .

وتوجد عدة إختبارات للتعرف علي وجود الليبيدات منها : -

١ - تكون الليبيدات بقع شمعية Greasy ولا تذوب في الماء وتطفو علي سطح الماء حيث أن كثافتها النوعية تقع ما بين ٨٧ . ٠ - ٩٧ . ٠ .

٢ - توجد عدة تفاعلات لونية للتعرف علي الليبيدات منها أن المواد الدهنية تصبغ بواسطة صبغة سودان III (تذاب ٠.٠١ جم صبغة في ٥سم^{٣} كحول (٩٥٪) + ٥ سم^{٣} جلسرول) وهذا التفاعل يعطي ايضا 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 جوهر كشاف شيف ويختزل محلول نترات الفضة الامونيومي .

obeikandl.com

٣ – 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 وخليط 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.

obeikandl.com

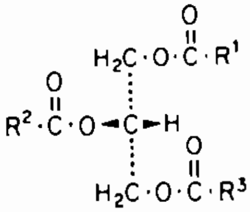
تقسيم الليبيدات

أولاً : الليبيدات البسيطة Simple Lipids

مركبات تتكون فقط من نوعين من التركيبات الكيماوية المختلفة مثل :

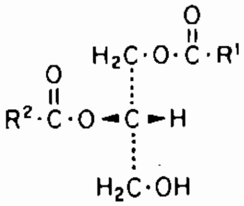
ا - استرات الجليسرول Glyceryl esters

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

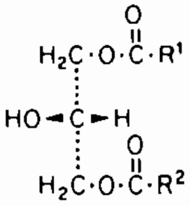


(a) 1,2,3-triacyl-*sn*-glycerol

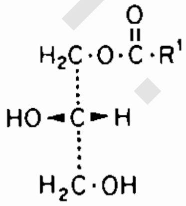
Triglycerides



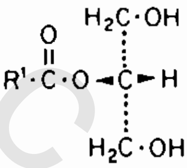
(b) 1,2-diacyl-*sn*-glycerol



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



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



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

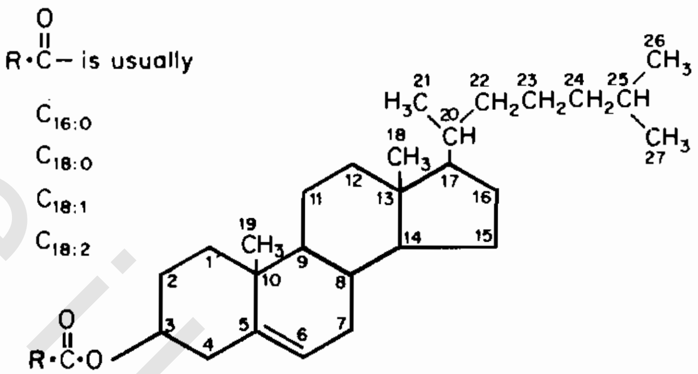
Diglycerides

Monoglycerides

obeikandl.com

٢ - استرات الكوليستيرول Cholesteryl esters

تتكون من الكوليسترول والاحماض الدهنية .



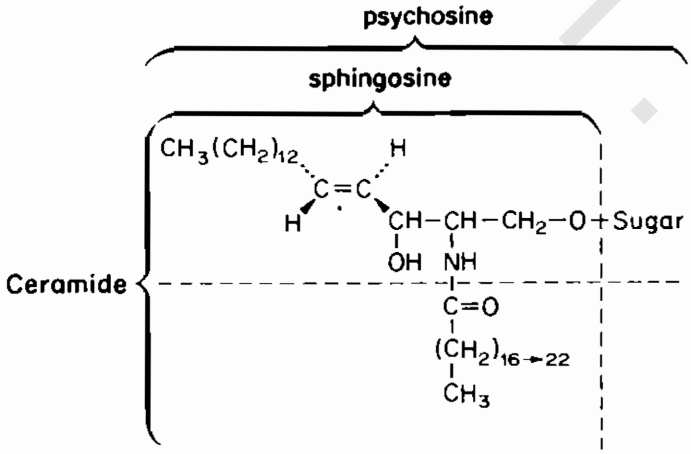
٣ - الشموع : Waxes

عبارة عن إسترات الكحولات طويلة السلسلة مع الاحماض الدهنية .

٤ - السيراميدات : Ceramides

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

والمركبات المتكونة من الاسفنجوزين هي الاكثر شيوعا .



obeikandl.com

ثانيا : الليبيدات المركبة : Compound Lipids

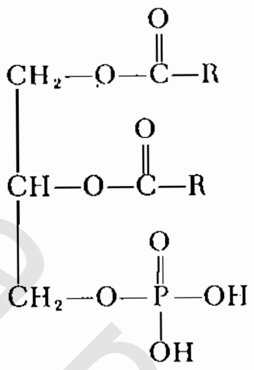
عبارة عن مركبات تتكون من أكثر من نوعين من التركيبات الكيماوية المختلفة .

أ - فوسفاتيدات الجليسرول : Glyceryl phosphatids

مركبات مشتقة من حامض الفوسفاتيديك .

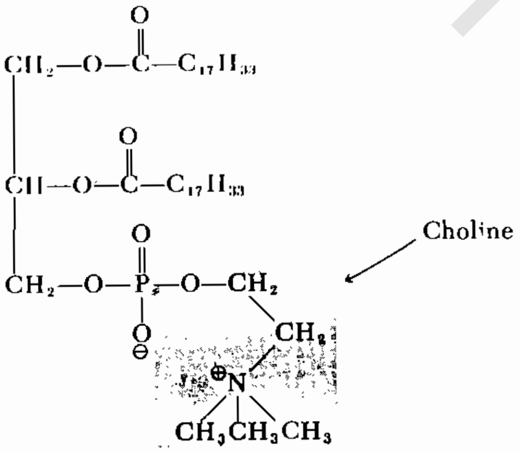
١- حامض الفوسفاتيديك : Phosphatidic acid

عبارة عن جليسريد ثنائي متحد مع حامض الفوسفوريك .



٢ - فوسفاتيديل كولين : Phosphatidyl Choline

يتكون من حامض فوسفاتيديك مرتبط بقاعدة كولين .

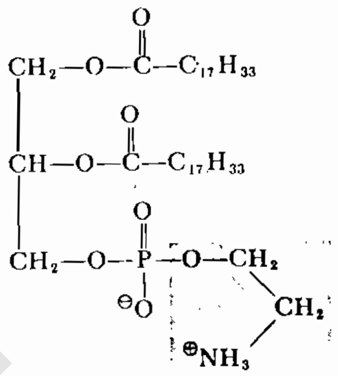


Lecithin

obeikandl.com

٣ - فوسفاتيديل ايثانول امين : Phosphatidyl ethanol amine

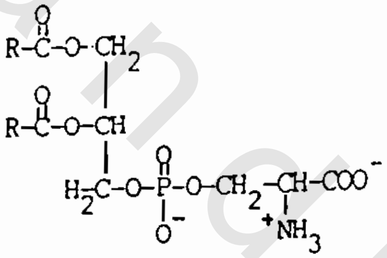
ويسمي خطأ سيفالين



Cephalin

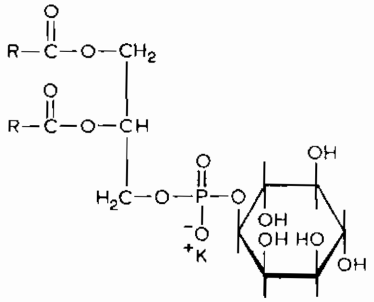
٤ - فوسفاتيديل سيرين : Phosphatidyl serine

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



٥ - فوسفاتيديل اينوزيتول : Phosphatidyl Inositol

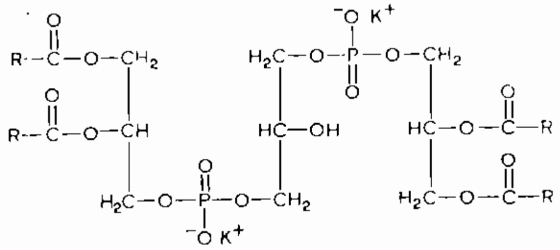
قسم أساسي من مركبات الفوسفاتيدات المعقدة المحتوية إينوزيتول ومجموعة أو أكثر من الفوسفات .



obeikandl.com

٦ - ثنائى فوسفاتيديل جليسرول : Diphosphatidyl glycerol

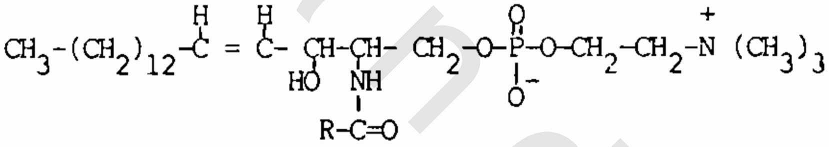
ويطلق عليه أيضا كارديوليبين



ب - سفنجوليبيدات : Sghingolipids

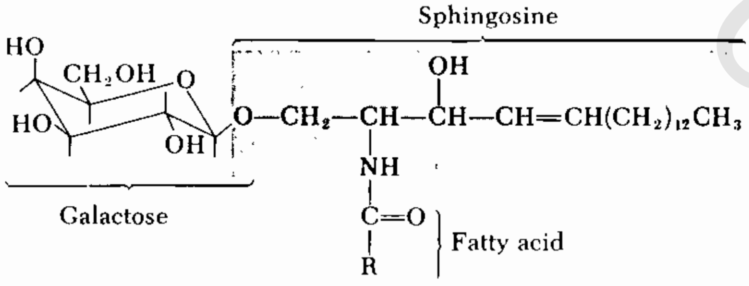
وهي مشتقات السيراميد

١ - سفنجوميلين : Sphingomyelin



٢ - سربروسيدات : Cerebrosides

سيراميد مرتبط مع سكر أحادى ويعرف بسيراميد أحادى السكر



Cerebroside

obeikandl.com

٣ - سيراميد ثنائي السكر : Ceramide dihexoside

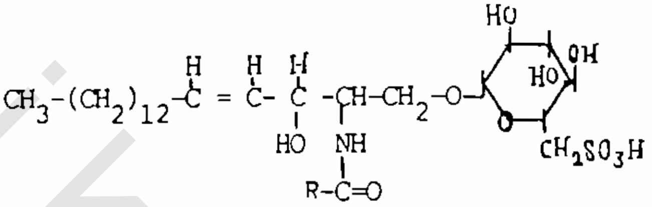
نفس التركيب السابق ولكن يرتبط السيراميد مع سكر ثنائي .

٤ - سيراميد عديد السكر ات : Ceramide poly hexoside

نفس التركيب السابق ولكن مرتبط مع أكثر من ٣ وحدات سكر أحادي .

٥ - كبريتات السيربروسيد : Cerebroside sulphate

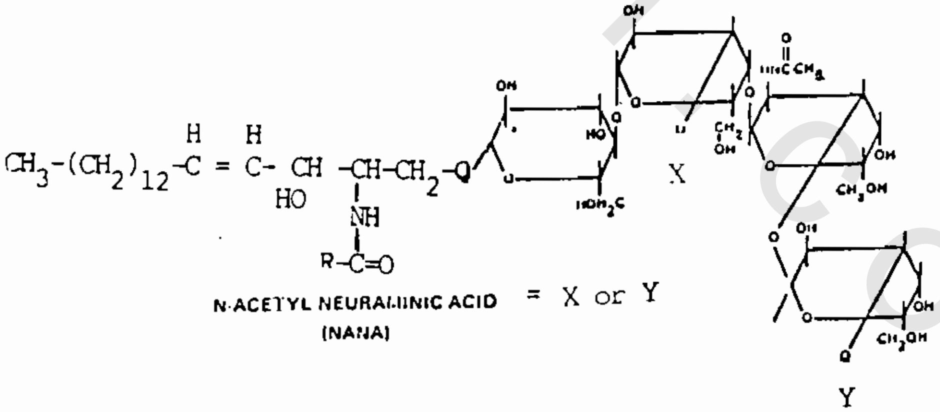
سيراميد مرتبط مع سكر أحادى مرتبط برابطة إستر بمجموعة كبريت .



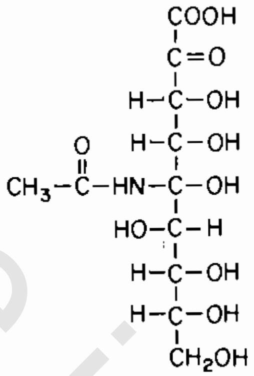
٦ - الجانجليو سيدات : Gangliosides

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

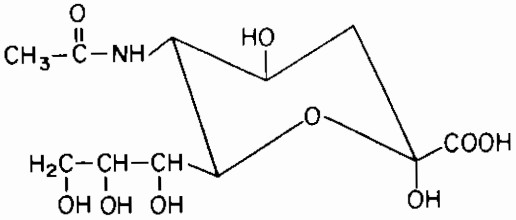
ومعظمها يحتوي علي سكر أميني بالاضافة إلي سكريات أخري ولكن ليس معني ذلك أن كل الجانجليوسيدات تحتوى على سكريات أمينية .



obeikandi.com



Open form



Ring form

ثالثاً : الليبيدات المشتقه : Derived Lipids

هى مركبات تحتوي علي تركيب كيماوي واحد من الليبيدات كجزء في تكوينها .

" أي هي المركبات التي توجد مكونة للانواع المختلفة من الليبيدات "

المذيبات والأجهزة الشائعة في تحليل الليبيدات

المذيبات : Solvents

نظرا للحساسية الشديدة لطبيعة الليبيدات للاكسدة والتحليل المائي فانه لا بد من استخدام مذيبات عضوية عالية في النقاوة وخالية تماما من الشوائب فاذا إحتوي مذيب ما علي ۰٫۰۱٪ شوائب من المواد الغير الطيارة الضارة وإستخدم في استخلاص الليبيدات فان 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 الاتي :

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 الاتية لا يتطلب منها الا التقطير البسيط قبل الاستعمال وتظل ثابتة لعدة أشهر :

البنزين – التولوين – رابع كلوريد الكربون – خلات الايثايل – الاسيتون .

أما المذيبات الاخري فانها تحتوي علي مواد ضارة تظهر أثناء التخزين ومن أمثلة ذلك :

١ – الألدهيدات :

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

٢ – الفوسجين $COCl_2$

يظهر في الكلوروفورم وثنائي كلوروميثان وهو يتفاعل مع مجاميع الامين والهيدركسيل 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 .

أولا : الكحولات

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

ثانيا : المذيبات التي تحتوي 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 ولمنع تكوين الفوسجين مرة أخري 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 دون الغسيل بالماء .

ثالثا : الإيثير 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 كالاتي : يرج ٢ سم٣ من المذيب مع ١ سم٣ محلول يوديد بوتاسيوم ١٠٪ " محضر حديثا " وعن طريق إضافة محلول النشا كدليل فاذا تكون اللون الازرق دل ذلك علي وجود البيروكسيدات (نتيجة لاكسدة البيروكسيدات لمحلول يوديد البوتاسيوم ينفرد يود يعطي لون أزرق مع النشا) .

وتوجد طريقة بديله Alternal method للكشف عن البيروكسيدات وهي :

١ – يذاب ١ ملجم ثاني كرومات البوتاسيوم في ١ سم٣ ماء في أنبوبة إختبار .

٢ – يضاف نقطة أو نقطتين من حمض كبريتيك مخفف .

٣ – تكمل أنبوبة الاختبار 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 سم٣ محلول كبريتات حديدوز تركيزه ٢٠٪ في حمض كبريتيك ١ ع ثم يتبع ذلك الغسيل بـ ١٠٠ سم٣ ماء ثم التجفيف فوق كلوريد كالسيوم ثم التقطير .

أما بالنسبة لمذيب ايثايل إثير فيضاف الي المذيب ببطء وبحذر شديد ليثيوم الومنيوم هيدريد $Li\ Al\ H_4$ في حدود ٥ – ١٠ جم لكل ١٠٠ سم٣ 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

يرج البنزين أو التولوين مع حامض الكبريتيك المركز (٨٠ سم٣ حامض كبريتيك مركز / لتر بنزين) في قمع فصل وعلي درجة حرارة الغرفة لمدة تتراوح من نصف – ١ ساعة ثم يتم سحب الجزء الحامضي 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 .

obeikandl.com

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

الاسم	الرمز الجزئى	الوزن الجزئى	الكثافة	درجة الغليان (مْ)
أسيتون	C_3H_6O	٥٨.١	٠.٧٩٦ علي ١٥ مْ	٥٧
بنزين	C_6H_6	٧٨.٠٥	٠.٨٧٨ علي ٢٠مْ	٨٠.٢
رابع كلوريد الكربون	CCl_4	١٥٣.٨	١.٤٨٣ علي ٢٥ مْ	٧٦.٧
ثنائى كبريتيد الكربون	CS_2	٧٦.١٣	١.٢٩٢٧ علي ٢٠ مْ	٤٦
كلوروفورم	$CHCl_3$	١١٩.٣٨	١.٥٢٦ علي ٢٠ مْ	٦١.٢
ثنائي كلور وإيثان	$C_2H_4Cl_2$	٩٨.٩٥	١.٢٥٧ علي ٢٠ مْ	٨٣.٨٤
هكسان	C_6H_{14}	٢٦.١	٠.٦٦٢ علي ١٧مْ	٧١

الأوانى الزجاجية Glassware

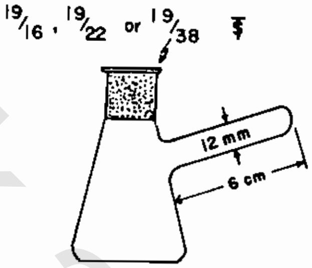
يجب إبعاد وتفادي أي مصدر للتلوث أثناء إجراء التجارب العملية علي الليبيدات وهذا المصدر ربما يكون متمثلا في الاجهزة المستعملة أو الادوات مثل الصنابير أو السدادات أو الوصلات . لذلك يجب عدم استعمال الشحوم ، البلاستيك أو اللدائن Plasticisers .

ويجب أن تتم جميع العمليات في أوانى من الزجاج ويجب أن تكون جميع الوصلات 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 إثيلين للدوارق 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 كميا في نفس الدورق . ويصنع الدورق (٥٠ سم ٣) من الزجاج المقاوم للحرارة وله عنق بمقاس (١٩/١٦ . ١٩/٢٢ ، ١٩/٣٨) وله أنبوبة جانبية سعة ٥ سم٣ (١,٢ × ٦ سم) تقع عموديا على جانب الدورق أسفل فوهة الدورق بحوالي ١ سم .



ويستخدم هذا الدورق اذا كانت العينة في حدود ١ر – ١٠٠ ملجم أما بالنسبة للعينات الكبيره فان الدورق يمكن أن يدرج في أبعاده ليكون مناسبا مثال ذلك دورق سعته ١٢٥ سم٣ له انبوبة جانبية ١٠ – ١٥ سم٣ 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 كميه من المذيب الأعلي كثافة (الجزء السفلي) تكفي لملء الانبوبة الجانبية ثم يضاف بعد ذلك المذيب الاخف كثافة (الجزء العلوي) في حدود ٥ – ١٠ سم٣ ثم يرج الخليط ثم تترك فترة لكي ينفصلا عن بعضهما ثم يميل الدورق ببطء للوضع الافقي حيث تدخل الطبقة السفلي في الانبوبة 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 أخرى 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 .

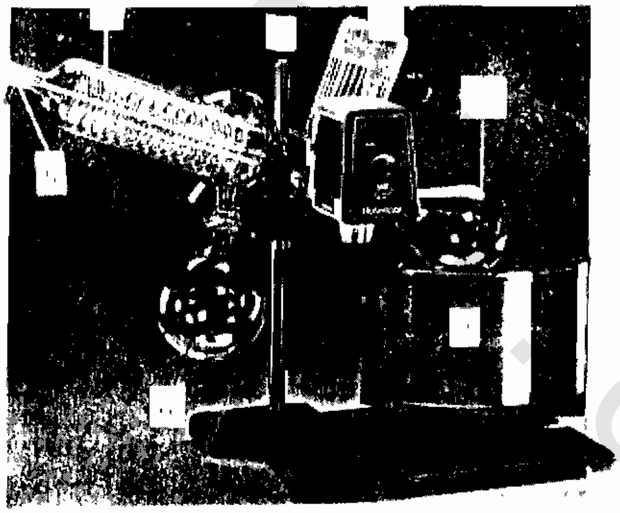
التبخير في وجود تيار من النتروجين Evaporation in a stream of N_2

تستخدم هذه الطريقة لتبخير أحجام صغيرة من المذيب (١٠ - ١٥ سم٣ أو أقل) الموجودة في أنبوبة صغيرة أو دوارق والطريقة الملائمة هو توجيه تيار من النيتروجين (N_2) فوق سطح المحلول الموجودة في حمام مائى 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 وتتم 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 مائى ومنظم حراري .



ويتكون الجهاز من :

١ - دورق المبخر وسعته ٥٠٠ سم٣ 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 .

إحلال المذيب Solvent replacement

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 .

obeikandl.com

إستخلاص الليبيدات Lipid extraction

الخطوة الاولي 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 كميا من مصادرها بأقل قدر ممكن من التغير في تركيبها - والتغير الحادث في التركيب نتيجة للهدم Degradation والتكسير ربما يحدث أثناء تخزين العينة وكذلك أثناء الاستخلاص ويرجع ذلك لنشاط انزيمات الليباز : والفوسفولیباز ، والاكسيديز حيث أن بعضها يكون نشط تحت الصفر المئوى وأما التغيرات الكيماوية فتشمل التحليل المائى 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 الاخري المصاحبة لها وبذلك يصبح الليبيد في صورة حره 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 تذوب في المذيبات الغير قطبية مثل الهكسان وإثير البترول أما المركبات القطبية مثل الجليكوليبيدات فانها تذوب في الكحول .

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

توجد ثلاث أنوا ع رئيسية من الروابط في الليبيدات .

١ - إتحاد 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 تسمي فان در

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

٢ - الروابط الهيدروجينية ، الارتباط الالكتروستاتكي أو الاتحاد المحب للماء :

Hydrogen bonding, electrostatic and hydrophilic association

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

٣ - الرابطة التساهمية Covalent association

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

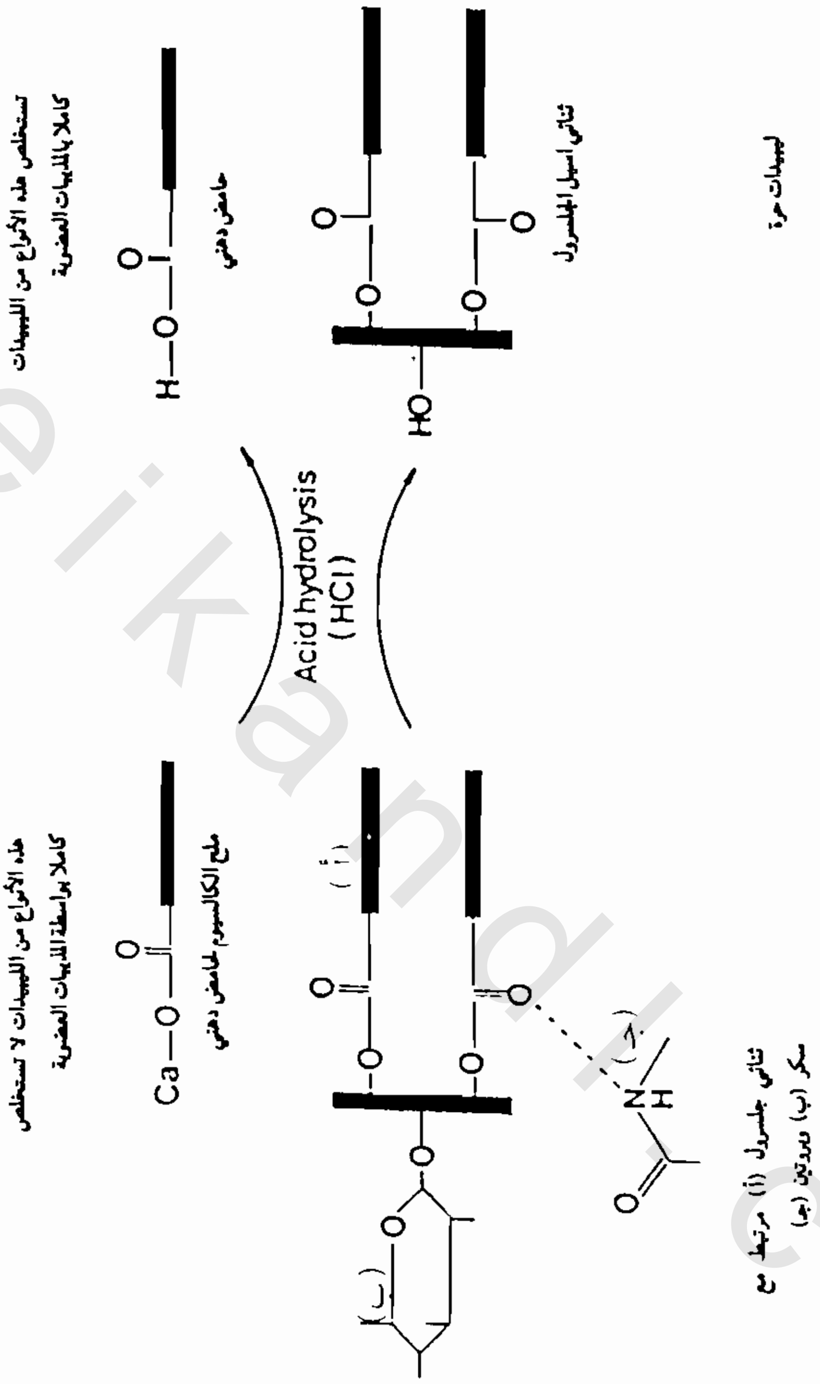
وعند الاستخلاص الكامل لليبيدات يجب الاخذ في الاعتبار الثلاث أنواع من الارتباط ولذلك:

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 فانه يمكن إستخلاصها بمذيبات قطبية مثل الايثانول والميثانول وذلك بكسر الروابط الهيدروجينية أو القوي الالكتروستاتيكية الموجودة بين الليبيدات والبروتين .

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

obeikandi.com



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

obeikandi.com

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 النتروجين) .

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 يذوب 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 الليباز ينشط عند درجة حرارة أعلي من ٤٥ْم بينما إنزيم الفوسفوليليز 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 الفوسفوليليز والليباز 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 للاسباب 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 السكرات 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 أضافة 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 (٢٠ر٪) ، كلوريد ماغنسيوم (١٧ر٪) كلوريد صوديوم (٢٩ر٪) أو كلوريد بوتاسيوم (٣٧٪) في ماء مشبع بالكلوروفورم والرسم في صفحة ٣٦ يبين طريقة استخلاص وتقدير الليبيدات عمليا .

تقدير الليبيدات

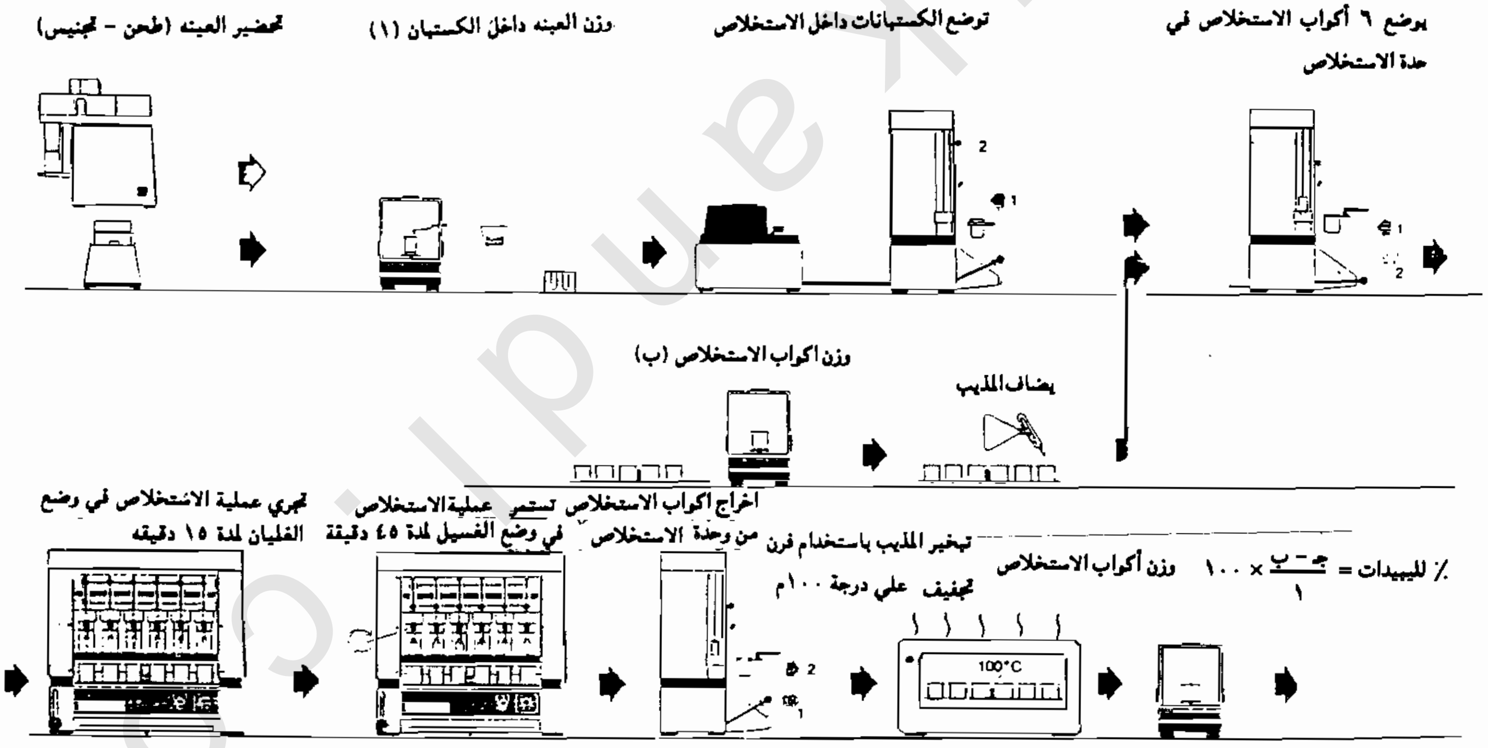
Lipid determination

هناك العديد من الوسائل والاساليب المختلفة المتاحة لتقدير محتوي الليبيدات بسرعة ويستخدم جهاز التردد النووي المغناطيسي Nuclear Magnetic Resonance spec. (NMR) في تحليل الزيوت في البذور وهذا فتح الطريق وأعطي فرصة عظيمة لعلماء الوراثة والتهجن في النبات حيث لا يحدث بهذه الطريقة أي تكسير في العينات أو هدم وهي طريقة سريعة ويمكن إستخدمها لتقدير محتوي الزيت لبذرة واحدة أو لكمية من البذور 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 الحديديك فيتكون لون ثابت نسبيا له أقصي إمتصاص عند طول موجي ٥٤٠ nm .

ومن التفاعلات اللونية التي تستخدم لتقدير الليبيدات الكلية كميا سواء في السيرم أو أي مستخلص يحتوي علي المواد الليبيدية هو تفاعل سلفو فوسفوڤانيلين - 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 بالمذيبات العضوية



١ – يتفاعل حامض الكبريتيك المركز مع الليبيدات غير المشبعة لتكوين أيون الكاربونيوم.

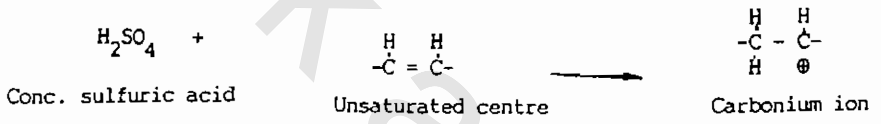
٢ – يتفاعل حامض الفوسفوريك مع الفانيلين ليعطي إسترفوسفات عطري وهذا يؤدي إلي زيادة نشاط مجموعة الكاربونيل للفانيلين .

٣ – يتفاعل أيون الكاربونيوم Carbonium مع مجموعة الكاربونيل النشطة للفوسفوفانيلين ليتكون المركب الملون الثابت نتيجة لعملية التردد Resonance .

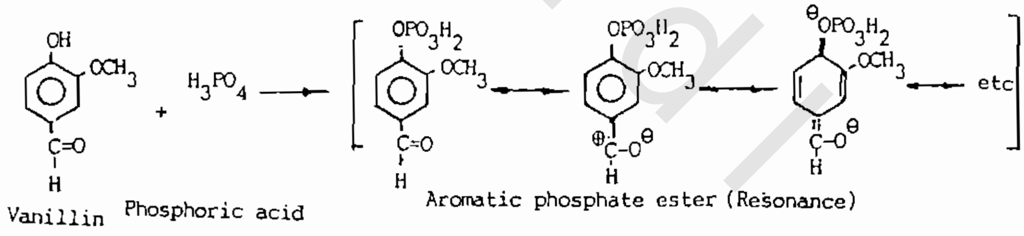
٤ – تتفاعل أيضا المركبات غير المشبعة المحتوية علي أكثر من رابطة زوجيه بنفس الطريقة ولكن تختلف طبيعة هذا التفاعل طبقا للاعاقه الفراغيه Steric hindrance .

تبين المعادلات التاليه كيفية تتابع هذا التفاعل :

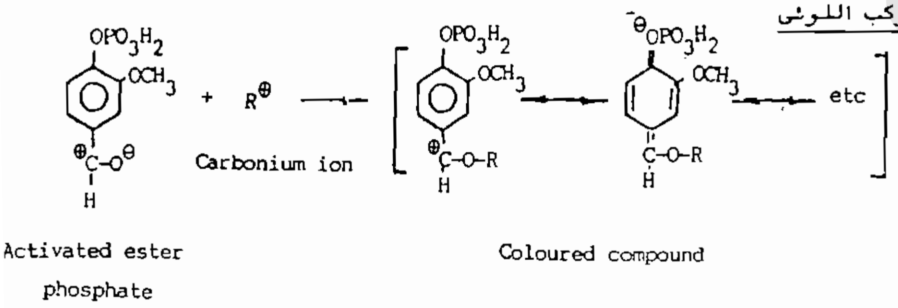
١– تكوين ايون الكربونيوم



٢– تكوين استرفوسفات عطرى



٣– تكوين المركب اللونى



obeikandl.com

الجواهر الكشافة Reagents

١ - الفوسفوڤانيلين

يذاب الڤانيلين (٦ر٠ جم) في كحول إيثايل مطلق (٨ - ١٠ سم٣) ثم يكمل الحجم بالماء المقطر الي ١٠٠ سم٣ - يضاف إلي هذا المحلول حامض فوسفوريك مركز (٤٠٠ سم٣) مع الرج المستمر - يحفظ المخلوط في زجاجه 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 سم٣ حامض كبريتيك مركز إلي أنبوبة إختبار تحتوي علي ١ . ٠ سم٣ سيرم أو مستخلص ليبيدي .

٢ - تسخن الأنبوبة ١٠ دقائق باستخدام حمام مائى يغلى - تبرد الانبوبة ثم يؤخذ منها ٤ . ٠سم٣ وتوضع في أنبوبة نظيفة وتعرف بالـ Unknown .

٣ - يجري عمل بلانك Blank بوضع ٤ر٠سم٣ حامض كبريتيك مركز في أنبوبة إختبار .

٤ - يضاف ٦ سم ٣ من الجوهر الكشاف الفوسفوڤانيلين لكل أنبوبه وتترك الأنابيب في الظلام لمدة ٤٥ دقيقة ثم تسجل قراءات الامتصاص عن طول موجة ٥٢٥٠

٥ - يجرى عمل منحني قياسي الذي يدل علي العلاقه بين الامتصاص عند طول موجه ٥٢٥ وتركيزات مختلفة من المخلوط القياسي لليبيدات ومنه نستنتج تركيز الليبيدات في العينات .

تخزين الليبيدات المستخلصة Storage of lipid extraction

نتيجة لتعرض الليبيدات للتحليل المائى 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 .

obeikandi.com

في حالة تخزين الليبيدات علي فترات قصيرة عدة أسابيع فانه :

١ – يفضل نوبان 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 – تمليء 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 ٠.٠٠٥٪ ويخزن المحلول علي درجة حرارة – ٤٠ درجة مئوية أو اقل إن أمكن .

ويجب أخذ الحيطة والحذر اللازم لمنع التلوث أو التغير الكيماوي 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 الاحماض عديدة التنشبع

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 – تبخير المذيبات تحت درجة حرارة أقل من ٤٠ درجة مئوية وتحت ضغط منخفض .

٤ – إضافة مادة مضادة للاكسدة بتركيز ٠٠٥ر٪ (وزن / حجم) لمحلول العينة المخزنة ويجب

الاهتمام باختيار هذه المادة " المضاده 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 الـ Peak الخاص بالـ BHT يظهر قريب من أو مع الـ 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 بالنيتروجين وعلي درجة حرارة الصفر المئوي أو أقل .

لمنع حدوث التغير 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 .

obeikandl.com