Electronic Journal of University of Aden for Basic and Applied Sciences
EJUA-BA Vol. 1 No. 2 (2020)
https://ejua.net/index.php/ejua-ba/article/view/22
ISSN: 2708-0684

مقالة بحثية

التّقدير الكمّي للكوليسترول الكُلّي في بعض ألبان الأسواق اليمنيّة

عادل أحمد محمّد سعيد[1]*، طه أبوبكر فضل سالم[2] و فارس سيف سالم السّعيدي[3]

[1] قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة عدن، عدن، اليمن
[2] قسم الكيمياء، كلية التربية، جامعة عدن، عدن، اليمن
[3] قسم الكيمياء، كلية التربية - جامعة عدن، يافع، اليمن

*الباحث الممثّل: عادل أحمد محمّد سعيد؛ بريد الكتروني: adel_saeed73@yahoo.com

استلم في: 07 يونيو 2020 / قبل في: 13 يونيو 2020 / نشر في: 30 يونيو 2020

المُلخّص

هدفت الدّراسة إلى تقدير الكوليسترول كمّيّاً في بعض الألبان المباعة في الأسواق اليمنيّة باستخدام الكروماتوجرافيا السّائلة فائقة الضّغط (HPLC). جمعت ثلاث عشر عيّنة بطريقة عشوائية من بعض الأسواق المحلّيّة وبعض المزارع الحيوانيّة (لمحافظتي عدن وأبين) وجهّزت للتحليل. تراوحت مستويات الكوليسترول بين (22.8-0.34 mg/100g). كان ترتيب المحتوى الكوليسترولي للعيّنات وفق المجاميع التّالية: الحليب الخام الطّازج كامل الدّسم الحيواني > الألبان التّجاريّة كاملة الدّسم الحيواني > الألبان التّجاريّة منزوعة الدّسم الحيواني والمضاف إليها دهن نباتي.

الكلمات الرّئيسية: الكوليسترول الكلي، الألبان في الأسواق اليمنيّة، التّحليل الكروماتوجرافي.

1. المقدّمة

يعدّ الكوليسترول أحد أشهر السّيترولات (كحولات صلبة) الحيوانيّة والّتي تمّ دراستها من نواحي عديدة مثل دراسة التّركيب، التخليق العضوي، الوظائف الحيويّة، الأيض، الامتزاز والتقدير الكمّي **[1]**.

وينتج الكوليسترول طبيعيّاً في خلايا جسم الإنسان كالأمعاء والكبد ويدخل كمكوّن أساسي في أغشية الخلايا والهرمونات **[2]** حيث يوجد في كثير من المنتجات والأغذية الحيوانية، ومنها اللبن الذي يعتبر أحد الأطعمة الطّبيعية الكاملة الّتي تفرزها الغدد اللّبنية للثّديّات. يمتلك الّلبن العديد من المكوّنات الحيويّة والمغذيّة ويسمّى الحليب الخامّ إذا لم يتم معالجته بحرارة فوق 40 ^{o}C أو أيّة معالجات مشابة أخرى **[3-6]** ويؤثّر تواجد الكوليسترول كمكوّن في الّلبن على صحّة الإنسان من خلال التّأثير على نوع ومستويات ليبيدات بلازما الدّم **[7]**.

يمكن استخدام مستوى الكوليسترول كمؤشّر على احتمال حدوث أمراض القلب وهناك العديد من الدّراسات الحاليّة الّتي قدّرت خلالها الكوليسترول بناءً على نوع معقّد اللّيبيد-بروتين (اللّيبوبروتين) والّذي يتمّ من خلاله وصول الكوليسترول إلى داخل الجسم **[8]** حيث يتواجد نوعان أساسيّان من اللّيبوبروتين (ليبوبروتين منخفض الكثافة LDL وليبوبروتين عالي الكثافة HDL) **[2]** وتعتبر هذه اللّيبوبروتينات جيّدة للجسم عند تواجدها في المستويات الصّحّيّة لكنّها تصبح مضرّة إذا ارتفع تركيز LDL أو انخفض HDL بشكل كبير.

تشير بعض الدّراسات الحاليّة إلى التّرابط بين انخفاض الكوليسترول عالي الكثافة HDL-C في بلازما الدّم ونقص فيتامين D لدى الأطفال ممّا يؤثّر على نمو الطّفل وظهور الحاجة إلى تزويدهم بنظام غذائي يحتوي على فيتامينD **[9]**.

على عكس ماهو سائد، خلصت بعض الدّراسات إلى أنّ خفض كمّيّة الكوليسترول منخفض الكثافة LDL-C يؤدّي إلى الإصابة بالأمراض البكتيريّة والفيروسيّة مثل فيروس كورونا (كوفيد-19) وذلك لارتباط الكوليسترول منخفض الكثافة بالجهاز المناعي حيث يقوم LDL-C بامتزاز ومنع نشاط معظم الميكروبات ونواتجها السّامّة **[10-12]**.

هناك العديد من التقنيّات المستخدمة لتقدير الكوليسترول في الّلبن **[13]** إلاّ أنّ تقنية كروماتوجرافيا السّائل فائق الضّغط يمكن استخدامها بنجاح لموثوقيّتها ودقّتها والبساطة والسّرعة في التّحليل **[14-17]**.

تسلّط الدّراسة الحاليّة الضّوء على تقدير الكوليسترول الكلّي في بعض الألبان المستخدمة في المائدة اليمنيّة ومقارنة النّتائج مع قيم الدّراسات الأخرى.

2. المواد وطرائق البحث

تمّ استخدام المواد الكيميائيّة المتعلّقة بالدّراسة بنقاوة عالية خاصّة للتّحليل بجهاز كروماتوجرافيا السائل فائق الضّغط HPLC ياباني الصّنع ماركة (JASCO, Co-2065 Plus) ويتركّب الجهاز من مضخّة (JASCO, PU-2089 Plus, Quaternary Gradient)، وكاشف يعمل في مجال الأشعّة المرئية وفوق البنفسجية نموذج (JASCO, UV-2070 Plus, Intelligent UV/Vis)، مرتبط بحاسوب يحوي برنامج التّحليل الكروماتوجرافي. استخدم للفصل عمود C8 (Mediterranea C8: 5µm, 15cm x 0.46cm) يحوي المادّة المالئة (Octyl Silyl (OS);-Si– $(CH_2)_7$-CH_3) وفرن للعمود ماركة (JASCO LC- Net II /ADC).

1.2. جمع العيّنات

جمعت العيّنات في شهري أكتوبر ونوفمبر 2018 من السّوق المحليّة وبعض مزارع محافظتي عدن وأبين. اختيرت العيّنات بشكل عشوائي وحفظت في أكياس بلاستيكية وأوعية زجاجية معقّمة، ومن ثمّ نُقلت للمختبر وجهّزت عيّنات كلّ نوع على حدة بترقيمها وخلطها ومزجها لتجانس مكوّناتها والحصول على عيّنة ممثلة للنّوع ذات حجم يكفي لإجراء التّحليل وتكرارها. حفظت العيّنات في أوعية بلاستيكية من البولي أثيلين داخل ثلاّجة تبريد حتّى يحين وقت تحليلها.

2.2. أنواع العيّنات المدروسة

1- حليب كامل الدّسم (الأخضر وصل)، حليب (الهناء)، حليب (يماني)، حليب منزوع الدّسم (بلدنا)، حليب (البقري)، وجميعها صنعت في اليمن، وهي منزوعة الدّسم الحيواني ومضاف إليها دهن نباتي؛

2- لبن أبقار خام، لبن ماعز خام، لبن إبل خام، لبن ضأن خام، وتمّ الحصول عليها من السّوق المحلية وبعض المزارعين في منطقة الحصن؛

3- لبن (ندى) كامل الدّسم، ولبن ندى منزوع الدّسم، لبن (مراعي) كامل الدّسم، ولبن مراعي قليل الدّسم وهي صناعة سعوديّة تمّ الحصول عليها من سوبر ماركت ضمران.

3.2. تحضير المحلول القياسي الأصلي للكوليسترول

تمّ وزن 0.1 g من الكوليسترول النّقي، وإذابته بكمّيّة كافية من الميثانول في دورق حجمي سعة 100 ml، ثم أكمل الحجم بالميثانول حتى العلامة، وذلك للحصول على محلول قياسي أوّلي تركيزه 1000 جزء من المليون (ppm) **[18]**.

4.2. تحضير محاليل قياسية من المحلول الأصلي للكوليسترول

من المحلول القياسي الأوّلي للكوليسترول (1000 ppm) حضّرت محاليل قياسية مخفّفة بالتراكيز 10، 20، 30، 40 و 50 ppm. استخدمت هذه المحاليل كعيّنات مرجعيّة معتمدة ذات زمن حجز معلوم لمقارنتها بالعينات قيد الدراسة، حيث حقن 20 µl من كلّ محلول قياسي – كلّ على حدة – في جهاز HPLC للحصول على منحنى المعايرة الخطّي من خلال رسم البياني لتراكيز المحاليل القياسيّة، التي حقنت بالجهاز مقابل مساحة القمم لكلّ منها **[19]**.

5.2. تحضير محلول الصّوبنة

تمّ تحضير محلول الصّوبنة بوزن 5.6 g بدقّة من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH ونقلها إلى دورق قياسي سعة 200 ml، واضيف إليها الميثانول حتى العلامة للحصول على محلول هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي بتركيز 0.5 M [**20**، **21**].

6.2. تحضير الطّور المتحرّك

أُستخدم الطور المتحرك المؤلف من المزيج الآتي (الأسيتونتريل: الميثانول: 2- بروبانول) بنسبة (7: 3: 1) على التّوالي حيث تمّ أخذ 350 ml من الأسيتونتريل و150 ml من الميثانول و50 ml من 2-بروبانول بواسطة مخبار قياسي مدرّج، ثم وضعت جميعها في قنينة سعة 1000 ml. وبهدف طرد الغازات من خليط الطّور المتحرّك تركت القنينة في جهاز الموجات فوق الصّوتيّة Ultrasonic cleaner لمدّة 15 min قبل استخدامه في جهاز الـHPLC **[13]**.
قيست جميع المحاليل القياسيّة والعيّنات عند طول موجي 205 nm وبمعدّل تدفّق الطّور المتحرّك 1.6 ml/min وحدود زمن 15-20 min.

7.2. اختبار الاسترجاع

أُخذت أربعة أنابيب اختبار ذات غطاء حلزوني من التّفلون، ووضع في كلّ أنبوبة 1 ml من حليب الهناء كامل الدّسم وأضيفت إلى الأنابيب 2, 3 و4 كوليسترول نقي بوزن 2 mg, 1 mg, 3 mg على التوالي، بينما الأنبوبة رقم1 تركت دون إضافة. تمّ صوبنة محتوى كل أنبوبة على حدة ومن ثم استخلاصه بواسطة الهكسان، وعقب ذلك بخّر المستخلص حتّى الجفاف. أذيب المتبقّي من عمليّة التّبخير باستخدام 1 ml ميثانول، ومن هذا المحلول تمّ حقن جهاز HPLC بـ 20 µl **[13]**.

8.2. تقدير الكوليسترول في العينات المدروسة

اتّبعت الاجراءات الواردة في **[20]**، **[21]** كما يلي. استخلص الكوليسترول من العيّنات قيد الدّراسة بطريقة الصّوبنة المباشرة، حيث وزن 2 ml من اللبن بدقّة ونقل كلاً على حدة إلى أنبوب اختبار بغطاء تفلون حلزوني. أجريت عمليّة التّصبّن بإضافة 2 ml من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم الميثانولي 0.5 M، لمدّة 15 min عند درجة حرارة 80 ºC في حمّام مائي ساخن مع تحريك الأنبوبة كلّ 5 min أثناء ذلك، بعدها تمّ تبريد الأنبوبة بماء الحنفية.
الجزء غير المتصبّن تمّ استخلاصه ثلاث مرّات بإضافة 5 ml من الهكسان و2 ml ماء مقطّر. مزج هذا الخليط بالرّجّ الشّديد لمدّة 10 ثواني، ثمّ خضع للطّرد المركزي لمدّة 5 min عند 1400 دورة في الدّقيقة.
نقلت أقسام المستخلص من الهكسان إلى دورق زجاجي ذات قاع مستديرة سعة 50 ml. بخّر المستخلص الكلّي حتّى الجفاف في جهاز المبخّر الدّوّار عند درجة حرارة 70 °C. أذيب المتبقي منه في 2 ml ميثانول، وحقن منه 20 µl مباشرة في جهاز HPLC، وكررّت عمليّة الحقن ثلاث مرّات، ثمّ قدّر الكوليسترول كمّيّاً في هذه الطريقة من خلال الاستفادة من منحنى المعايرة لمحاليل الكوليسترول القياسية.
تمّ إجراء هذه التّحاليل في مختبر الهيئة العليا للمواصفات وجودة الأدوية (خور مكسر- محافظة عدن).

9.2. التّحليل الإحصائي

تم استخدام برنامج (Origin Pro 9.5- إصدار 2018م) في التّحليل الإحصائي باستخدام التّصميم العشوائي الكامل (التّام) واعتمد تحليل التّباين أحادي الاتجاه One way ANOVA لتحليل النّتائج عند مستوى معنوي P (< 0.05).كما تمّ حساب أقلّ فرق معنوي (LSD) لاختبار الفروق المعنوية بين المتوسّطات **[22]**.

3. النّتائج والمناقشة

1.3. منحنى التّعيير

للوصول إلى رسم منحنى التعيير لمادة الكوليسترول المدروسة، استخدمت خمسة تراكيز قياسية مختلفة تقع في المدى من (10–50) جزء من المليون. من خلال النّتائج المتحصّل عليها من جهاز HPLC (جدول 1 و2)، حُسبت معادلات الميل ونقاط التّقاطع مع المحور الصّادي، من تراكيز المحاليل القياسية على المحور السّيني مقابل قيم الاستجابة (المحور الصّادي)، وتمّ قياس الاستجابة (مساحة القمّة) ثلاث مرّات (n=3)، وبناء على الجدول 2 تمّ رسم منحنى التّعيير (شكل 1) حيث تمّ الحصول على استجابة خطّيّة بمعامل ارتباط $R^2 = 0.9986$، والمعادلة الخطّيّة التّالية:

$$y = 5886.33x + 2771.9 \quad (1)$$

جدول 1: متوسّط مساحات القمم لتراكيز المحاليل القياسية لمادة الكوليسترول عند ظروف استخدام HPLC

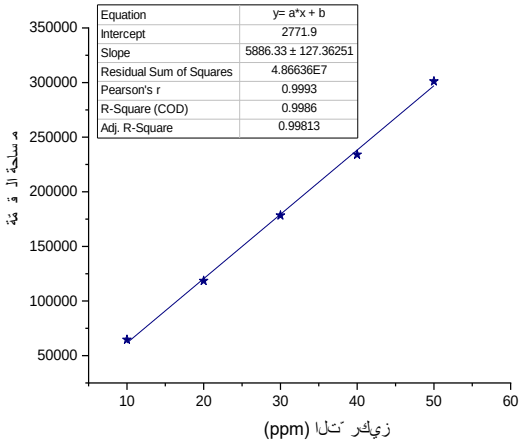
م	التّركيز ppm	متوسّط مساحة القمّة (n=3)	الطّول الموجي(λ)	معدّل التّدفّق (ml/min)	زمن الحجز (min)	الطّور المتحرّك Mobil Phase
1	10	64680	205nm	1.6	3.8	(اسيتونيتريل، ميثانول، 2-بروبانول) (1:3:7)
2	20	118486				
3	30	178375				
4	40	234057				
5	50	301211				

جدول 2: الدّوال الخطية للمنحنى القياسي لمادة الكوليسترول

م	المؤشّر Parameter	القيمة Value
1	الميل a	5886.3
2	التقاطع b	2771.9
3	معامل الارتباط R^2	0.9986
4	الانحراف المعياري SD	4027.556
5	تكرار القراءات N	5
6	مستوى الدلالة P	< 0.0001
7	الحدّ الأدنى للكشف *LOD	0.226 mg/100g
8	الحدّ الكمّي للكشف **LOQ	0.684 mg/100g

* الحدّ الأدنى للكشف (LOD) هو أقلّ تركيز للجزء قيد التحليل، والذي يمكن قياسه مع دقّة إحصائية مقبولة.

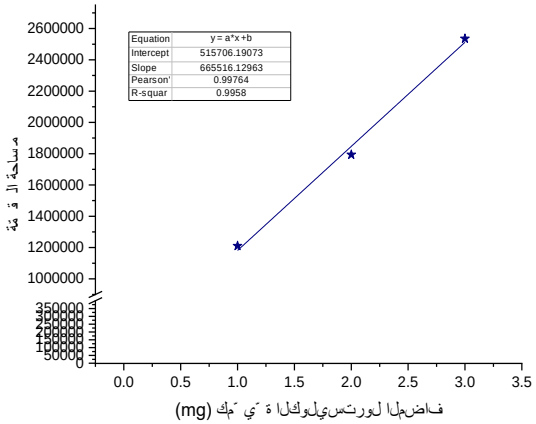
** الحدّ الكمّي للكشف (LOQ) هو أقلّ تركيز يمكن تحديده للجزء قيد التحليل، ويمكن تقديره باستخدام مواد قياسيّة مناسبة.



شكل 1: منحنى التّعيير لتراكيز الكوليسترول

2.3. اختبار الاسترجاع

يظهر الجدول 3 وشكل 2 نتائج اختبار الاسترجاع لعينات حليب الهناء المضاف إليها كوليسترول نقي بتراكيز مختلفة، ويتبيّن منه أنّ نسبة الاسترجاع (%) للمحاليل الثلاثة هي: 91.74، 92.95 و 101.8على التّوالي بمتوسّط يشكّل 95.49 %، وهي نسبة مقبولة تؤكّد أن طريقة الاستخلاص المستخدمة في هذه الدّراسة قد استرجعت أو استخلصت نسبة كبيرة من الكوليسترول في العيّنات المدروسة، ممّا يزيد من موثوقيّة النّتائج في هذه الدّراسة، حيث تمّ الحصول على منحنى انحدار خطّي من خلال رسم تراكيز الكوليسترول المضافة إلى عينات اختبار الاسترجاع المأخوذة مع إشارات الاستجابة النّسبيّة أي مساحة القمّة الظاهرة على الكروماتوجرام، وتمّ حساب قيم دوال معادلة منحنى الانحدار الخطّي وكان معامل الارتباط 0.9958 = R^2 وهي قيمة تعتبر مقبولة وقريبة من الواحد حسب مبادئ وتوجيهات ICH **[23]**، وقيمة الميل 665516 = a بينما كان التقاطع 515706 = b واستخدمت معادلة الخطّ المستقيم في هذا الاختبار.



شكل 2: المنحنى القياسي لتراكيز عيّنات الإضافة الدّاخليّة لحساب نسبة الاسترجاع

3.3. تحليل العيّنات المدروسة

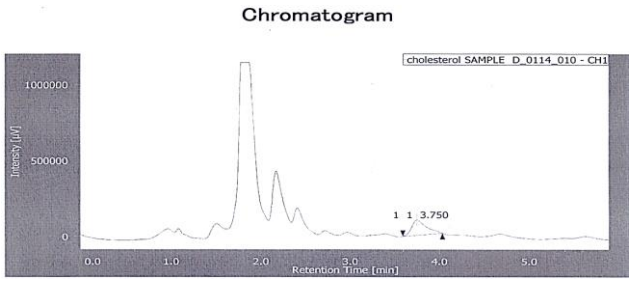
بعد إجراء التّحليل الكروماتوجرافي للعيّنات (الأشكال 3-12) وبهدف التّمييز بينها تمّ تقسيمها إلى ثلاثة أنواع، أوّلها: يشمل ألبان خام (طازجة) كاملة الدّسم بدهن حيواني، (بقري، وماعز، وإبل وضأن)، ثانيها: ألبان تجارية محليّة الصّنع منزوعة الدّسم الحيواني ومزوّدة بدهن نباتي بنسبة 3.1 % (الأخضر، والهناء ويماني) وبنسبة 3 % (بلدنا والبقري)، ثالثها: ألبان كاملة الدّسم بدهن حيواني (ندى والمراعي)، وألبان منزوعة وقليلة الدسم الحيواني وتحمل الأسماء ذاتها أيضاً (ندى والمراعي) (انظر جدول 4).

يشكل الكوليسترول مركبات معقدة مع الجزيئات البيولوجية الأخرى، وبدرجة رئيسية الليبيدات الفوسفاتية والبروتينات، مما يغير من صفاتها الفيزيائية كلياً، الأمر الذي يؤدي إلى استخلاص غير فعال للكوليسترول، ويفسر ذلك الاستعادة الفقيرة للكوليسترول خلال الخطوات الهامة في تحليل المواد الدهنية واستخلاصها **[7]**.

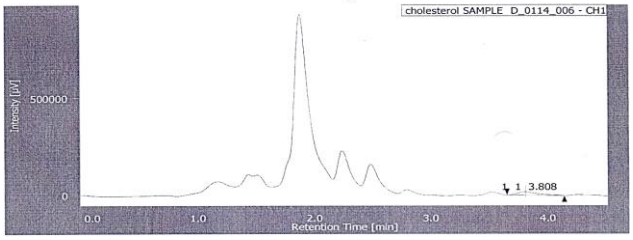
استخدمت عملية التّصبّن المباشر لاستخلاص الكوليسترول من عيّنات الألبان بدون استخلاص الدّهون، من أجل تجنّب أيّ فقدان للكوليسترول **[24]** وأظهر استخدام الهكسان كمذيب في استخلاص الجزء غير المتصبّن **[13، 25]** امتلاكه في الدّراسة الحاليّة لكروماتوجرام واضح ولم يكتشف فيها أيّ تداخل. وهذا يوضّح أنّه يمكن تبديل مذيب أيثر ثنائي الأثيل الوارد في الطّريقة الرّسميّة AOAC **[26]** والّتي تداخلت فيها الأحماض الدّهنيّة الحرّة والجليسرين والمواد القطبيّة إلى جانب الكوليسترول من النّموذج المتصبّن.

جدول 3: نسبة الاسترجاع (%) للكوليسترول من خلال الإضافة الدّاخلية إلى عينات من حليب الهناء

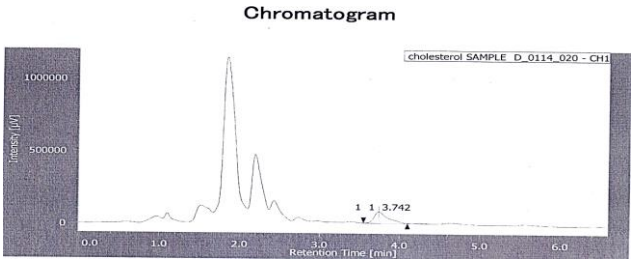
العيّنة	كمّيّة الكوليسترول المضاف (mg)	مساحة القمّة	كمية الكوليسترول الكلي (mg)	كمية الكوليسترول المسترجع (mg)	نسبة لاسترجاع (%)
حليب الهناء	0	74517	0.12	0	0
حليب الهناء	1	1210682.6	1.037	0.9174	91.74
حليب الهناء	2	1794094	1.979	1.859	92.95
حليب الهناء	3	2535438.75	3.175	3.055	101.8
المتوسّط					95.49
الانحراف المعياري SD					4.306
الانحراف النّسبي % RSD					4.51 %



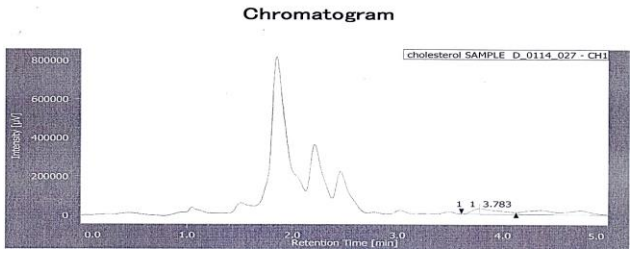
شكل 3: كروماتوجرام عيّنة لبن ماعز



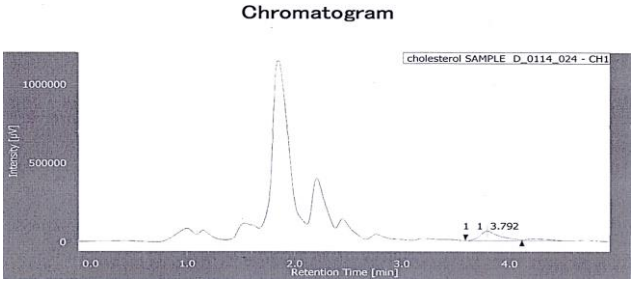
شكل 8: كروماتوجرام عيّنة ندى منزوع الدسم



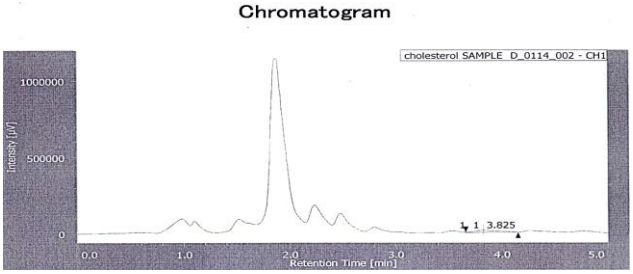
شكل 4: كروماتوجرام عيّنة لبن ضأن



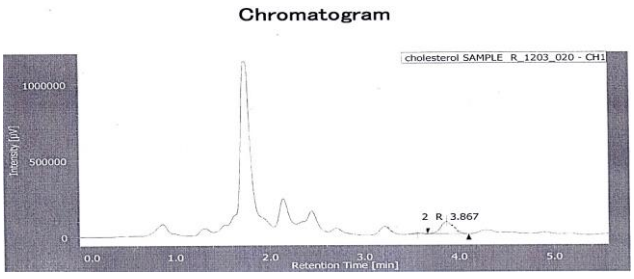
شكل 9: كروماتوجرام عيّنة مراعي كامل الدسم



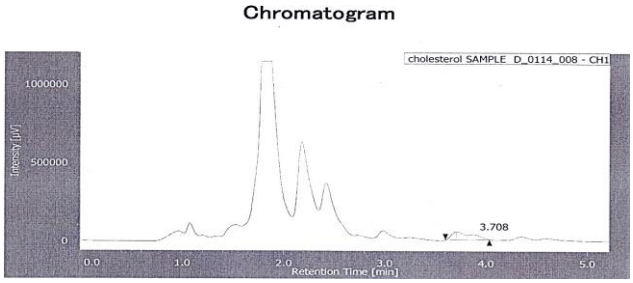
شكل 5: كروماتوجرام عيّنة لبن الإبل



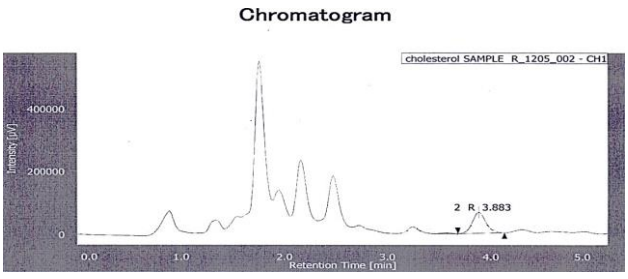
شكل 10: كروماتوجرام عيّنة مراعي قليل الدسم



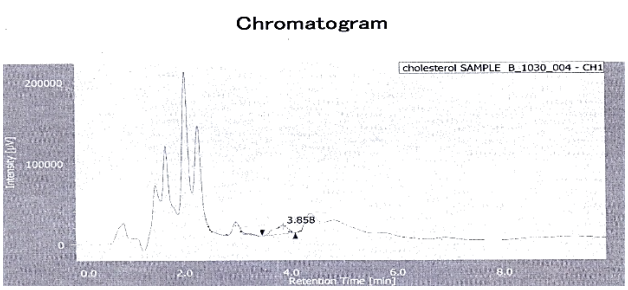
شكل 6: كروماتوجرام عيّنة لبن الأبقار



شكل 11: كروماتوجرام عيّنة لبن يماني



شكل 7: كروماتوجرام عيّنة ندى كامل الدسم



شكل 12: كروماتوجرام عيّنة لبن البقري منزوع الدسم

4.3. عينات الألبان

تشير نتائج تحليل عيّنات الألبان (13 عيّنة) الطّبيعية والتّجارية الموضّحة في الجدول 4 إلى وجود تفاوت في محتواها الكوليسترولي، حيث سجّلت عيّنة لبن الماعز أعلى قيمة لمحتواه (22.8 mg/100g)، بينما كانت أدناها (0.34 mg/100g) في عيّنة لبن بلدنا المحلّي التّجاري منزوع الدّسم الحيواني والمزوّد بدهن نباتي. يرجع سبب التفاوت هذا إلى الاختلاف في نسبة الدهن في الألبان وكذلك نوعه (دسم حيواني أم نباتي)، فهناك حليب كامل الدسم، وقليل الدسم ومنزوع الدسم الحيواني المزوّد بدهن نباتي، الأمر الذي يؤثّر على محتوى الكوليسترول في اللّبن. سجّل التراث العلمي **[13، 18]** وجود ترابط وعلاقة طردية بين محتوى الكوليسترول ونسبة الدهن ونوعه في اللبن، وينسجم هذا الاعتقاد تماماً مع ما خلصت إليه نتائج هذه الدراسة، حيث تفوّق محتوى الكوليسترول في جميع عينات ألبان النوع الأول (12.0 – 22.42 mg لكلّ 100g) وعينة واحدة من ألبان النوع الرابع وهي ندى (11.03 mg لكل 100g)، وجميعها كاملة الدسم بدهن حيواني، على محتواه في جميع الأنواع الأخرى من الألبان المدروسة. مستوى الكوليسترول (12.0–22.42 mg/100g) في تلك الألبان الطازجة كاملة الدسم بدهن حيواني تتوافق مع ما رصده **[20]** في دراسة على عيّنات ألبان دسمة (12.2 – 21.7 mg/100g. فيما يخصّ عينات الألبان التجارية كاملة الدسم، وهي: ندى 11.03 mg والمراعي 8.9 mg (صناعة سعودية)، وجد أنّ محتواها من الكوليسترول (لكل 100g من العينة) يقترب مع ما توصّل إليه **[13، 27]** من محتوى كوليسترولي (mg/100g) بلغ 10.5–12.5 و – 14.0 9.52، على التوالي، في دراستهم لعيّنات من الألبان التجارية كاملة الدسم. أشار باحثوا مرجع **[28]** إلى أنّ محتوى الكوليسترول في اللبن البقري الطبيعي كامل الدّسم بلغ في دراستهم 12.60 mg/100g، وهو مستوى ينسجم كثيراً مع ما توصلت إليه الدراسة الحاليّة للعينة ذاتها (أنظر شكل 13 وجدول 4)، كما يقترب مستوى الكوليسترول في دراستنا هذه للبن البقر الطّازج مع محتوى سجّلته دراسات عديدة لنفس العيّنة (9.7-15.8 mg/100g) **[29-31].**

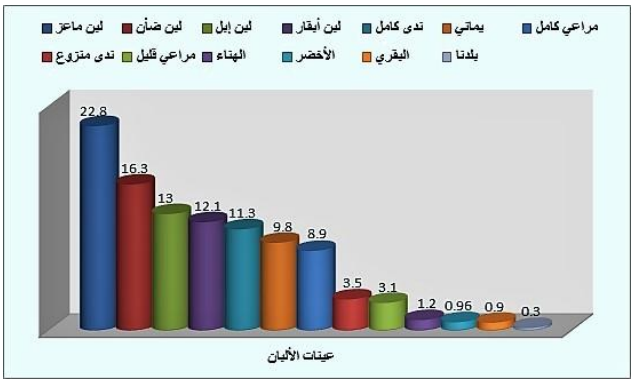
أظهر الكوليسترول في لبن الماعز أعلى قيمة (22.8 mg/100g)، وهي تقترب من دراسة **[32]**، التي رصدت (21.5 mg/100g)، وتزيد عن دراسات **[28]**، **[33]** و **[34]**(10.4 و 15.03 mg و16.9-18.09 لكلّ 100g، على التّوالي)، بينما في عيّنة لبن الضّأن نجد أنّ محتوى الكوليسترول فيها (16.3 mg/100g)، أقلّ من قيمته التي سجّلت في دراسة **[28]** (26.4 mg/100g) لكنّها تقترب من دراسة **[35]**، وفي لبن الإبل بلغ محتوى الكوليسترول (13.0 mg/100g) وهي قيمة متوافقة مع متوسّط محتوى الكوليسترول في لبن الإبل السّعودي في دراسة **[36]**، الّتي رصدت (13.0-18.7mg/100g)، ولكنها تقل عن القيم التي توصّل لها كلاً من **[37]** و**[38]** (7.73 ±37.15 و 31.3 mg لكلّ 100g، على التوالي)، في حين سجلت عينة لبن ندى التجاري منزوع الدسم 3.53 mg/100g وهي القيمة التي تتوافق مع محتوى الكوليسترول في اللبن منزوع الدسم الذي سجلته دراستي كلاً من **[29]** (3 mg/100g)، و**[39]** (2.8 mg/100g)، لكنها كانت أقل من دراسة **[40]** (6.1 mg/100g) للبن منزوع الدسم، بينما لبن المراعي قليل الدّسم سجّل قيمة منخفضة لمحتوى الكوليسترول (3.1 mg/100g) أقلّ ممّا كان متوقّعاً.

أظهرت العينات التجارية المحلية (الأخضر، الهناء، بلدنا والبقري)، وهي ألبان منزوعة الدسم الحيواني ومضاف إليها دهن نباتي قيم منخفضة لمحتوى الكوليسترول 0.96 mg , 1.2 , 0.34 , 0.89 لكل 100g، على التوالي، وهذه القيم تقل عما سجلته عينة ندى منزوعة الدسم، وجميع الدراسات سالفة الذكر التي قورنت بها، كما تقل كثيراً أيضاً عما رصد في الدراسات التالية لعينات من الألبان التجارية: (4.28 mg – 8.87) **[31]**، و للألبان التجارية الفنلندية (5.6 mg – 6.4) **[41]**، و للألبان التجارية البرازيلية (9.75 mg) **[42]**، و للألبان التجارية الإيطالية كاملة الدسم (10.9 mg – 11.3) **[43]** لكلّ 100g من العينة المدروسة.

ربّما يعزى سبب التدنّي لمحتوى الكوليسترول في العينات التجارية اليمنية المدروسة إلى كونها مصنوعة من لبن بودرة منزوع الدسم الحيواني، كما قد يعزى الاختلاف في قيم محتوى الكوليسترول بين بعض الدراسات السابقة والحالية إلى عوامل عدّة ومتنوّعة، تشمل الاختلاف في معالجة الحليب وسلالة الحيوان والخصائص الفردية والفواصل الزمنية بين الحلب، ومرحلة الرضاعة، وتكوين النظام الغذائي للحيوان، والتداخلات الموسمية والمناخية **[37، 44].**

جدول 4: تركيز الكوليسترول بوحدة mg/100g في عينات الألبان المختارة

منشأ العينة	نوع الحليب ونوع الدهن	اسم العينة	متوسط مساحة القمة	متوسط التركيز mg/100g	الانحراف المعياري SD	الانحراف المعياري النسبي RSD
عينات محلية	لبن خام طازج كامل الدسم بدهن حيواني	لبن ماعز	1346174	22.82^{a}	0.100	0.445
		لبن الضأن	959700	16.26^{b}	0.055	0.338
		لبن إبل	769590	13.03^{c}	0.42	3.22
		لبن بقري	713614	$12.07^{d,c}$	0.436	3.61
				LSD = 1.766		
صناعة وطنية	لبن تجاري منزوع الدسم (الدهن) الحيواني، ومزود بدهن نباتي بنسب مختلفة	يماني	580262	9.81^{e}	0.275	2.80
		الهناء	74850	$1.22^{f,i}$	0.049	4.02
		الأخضر	58293	$0.96^{g,f,h,i}$	0.03	3.12
		البقري	55095	$0.89^{h,f,i}$	0.036	4.04
		بلدنا	22865	0.34^{i}	0.02	5.88
				LSD = 0.595		
صناعة سعودية ألبان تجارية بدهن حيواني	كامل الدسم	ندى	651820	11.02^{j}	0.450	4.08
	منزوع الدسم	ندى	211001	3.48^{k}	0.170	4.88
	كامل الدسم	مراعي	528789	$8.93^{l,e}$	0.134	1.50
	قليل الدسم	مراعي	186785	$3.13^{m,k}$	0.091	2.907
				LSD = 1.092		

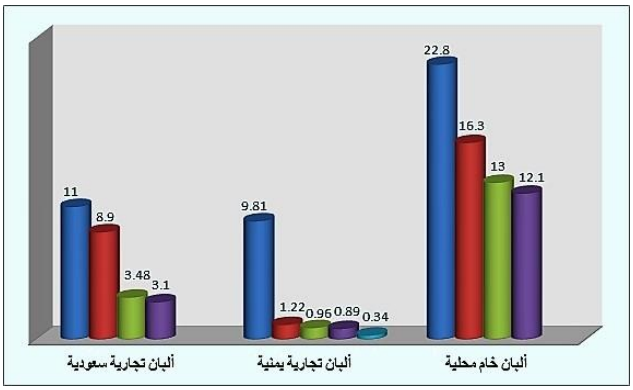


شكل 13: محتوى الكوليسترول بيانياً في عينات الألبان الطبيعية والتجارية mg/100g

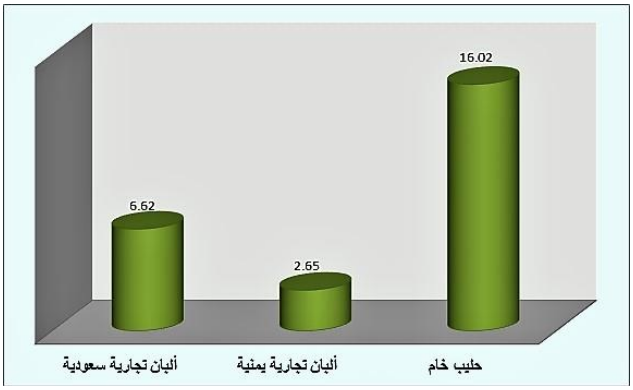
التّحليل الاحصائي لعيّنات الألبان عند مستوى دلالة $P < 0.05$ تمّ عرضه في الجدول 4، حيث تشير الحروف المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنويّة، أمّا المختلفة فتعني وجود فروق معنوية عند ذلك المستوى من الدّلالة.

5.3. مقارنة بين عينات الألبان المحلية والخارجية المدروسة

أظهرت النتائج الموضّحة في جدول 5 والشّكلين (14 و15) تفوّقاً واضحاً لعيّنات الألبان السّعودية في محتواها من الكوليسترول مقارنة بعينات الألبان اليمنية، ويعزى ذلك إلى أنّ الألبان السّعودية كاملة الدسم الحيواني وقليلة الدسم ومنزوعة الدسم وغير مضاف إليها دهن نباتي، وكانت قيمها قريبة من القيم الواردة في **[45]** عن الألبان الكاملة والقليلة والمنزوعة الدسم، بينما سجلت عينات الألبان التجارية اليمنية قيماً أقل لأنها ألبان منزوعة الدسم الحيواني ومضاف إليها دهن نباتي، باستثناء عينة لبن يماني القريبة في محتواها الكوليسترولي من الألبان كاملة الدسم السعودية مما يؤكد بأنه كامل الدسم الحيواني رغم التناقض في بيانات بطاقة المنتج، ومع ذلك تظل قيم بقية العينات أقل من 3mg/100g وهي القيمة المرصودة في التراث العلمي **[29]** للبن منزوع الدسم الحيواني وربما يعود سبب التدني للكوليسترول فيها إلى إضافة الدهن النباتي من جهة، ومن جهة أخرى إلى إضافة كمية أكبر من الماء إلى الكتلة المأخوذة من بودرة الحليب أثناء عملية التصنيع، مما يجعل اللبن المصنع أكثر تخفيفاً ومعه تقل نسبة الكوليسترول والمكونات الأخرى بعكس الألبان السعودية وهذا الأمر بحاجة إلى مزيد من البحث والدّراسة.
كما يوضّح الشكلين 14 و15 تفوّق الألبان الخام بمحتواها الكوليسترولي على الألبان التّجارية.



شكل 14: محتوى الكوليسترول في عيّنات الألبان المحلّيّة والخارجيّة mg/100g بيانياً



شكل 15: مقارنة بين متوسّط محتوى الكوليسترول في الألبان اليمنية والسّعودية mg/100g بيانياً

4. الاستنتاجات

قامت الدّراسة الحاليّة بتقدير الكوليسترول الكّلّي في مجموعة من اللّبن المستهلك في البيئة اليمنيّة باستخدام طريقة التّحليل الكروماتوجرافي HPLC. أظهرت طريقة التّحليل موثوقيّة ودقّة عاليان لتحديد تراكيز الكوليسترول في العيّنات المدروسة وكانت القيم ضمن قيم دراسات بحثيّة سابقة مع فروقات يمكن إرجاعها لعدّة عوامل مثل طبيعة المادّة المصنوع منها الحليب التّجاري، طريقة المعالجة والحفظ والنّظام الغذائي وفترة الارضاع والحلب ونوع السّلالة الحيوانيّة والمناخ وغيرها من العوامل الفيزوكيميائيّة والبيئيّة.

جدول 5: مقارنة بين عيّنات الألبان الخارجيّة والمحلّيّة بوحدتي mg/100g , ppm

نوع الدسم	اسم العينة	تركيز الكوليسترولppm	تركيز الكوليسترول mg/100g
كامل الدسم سعودي	ندى سعودي	110	11.0
كامل الدسم سعودي	مراعي	89	8.9
منزوع الدسم سعودي	ندى سعودي	34.8	3.48
قليل الدسم سعودي	مراعي	31	3.1
	LSD	3.895	1.092
كامل الدسم بدهن نباتي	يماني	98.10	9.81
منزوع الدسم الحيواني صناعة وطنية	الهناء	12.23	1.22
	الأخضر وصل	9.6	0.96
منزوع الدسم الحيواني مضاف إليه دهن نباتي صناعة وطنية	البقري	8.88	0.89
	بلدنا	3.41	0.34
	LSD	1.858	0.595

المراجع

[1] T. Dinh and L. Thompson, "Cholesterol: Properties, Processing Effects, and Determination," *Encyclopedia of Food and Health*, pp. 60-69, 2016. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00150-1

[2] L. Li, E. P. Dutkiewicz, Y. Huang, H. Zhou and C. Hsu, "Analytical Methods for Cholesterol Quantification," *Journal of food and drug analysis*, vol.27, pp.375-386, 2019.

[3] T. T. Le, T. T. Phan, J. V. Camp and K. Dewettinck, Milk and Dairy Polar Lipids: Occurrence, Purification ,and Nutritional and Technological Properties, (page 91), 2015.

[4] Y. W. Park (ed.), Bioactive Components in Milk and Dairy Products, USA: Wiley-Blackwell (page 3), 2009.

[5] A. Anadón, M. R. Martínez-Larrañaga, I. Ares, and M. A. Martínez, Overview: "Preclinical Studies of Dairy Milk and Products on Health", IN: Nutrients in Dairy and Their Implications for Health and Disease, Elsevier Inc., (page 261),2017. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809762-5.00021-8

[6] B. Socas-Rodrı´guez, M. Asensio-Ramos, J. Herna´ndez-Borges, A. V. Herrera-Herrera, M. A. Rodrı´guez-Delgado, "Chromatographic Analysis of Natural and Synthetic Estrogens in Milk and Dairy Products," *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 44, pp.58-77, 2013.

[7] K. M. Shingla and B.M. Mehta, " Cholesterol and its Oxidation Products: Occurrence and Analysis in Milk and Milk Products, " *Int. J. of Health, Animal Science and Food safety*, vol.4, pp. 13-39, 2018.

[8] M. J. Alkhatatbeh, N.A. Amara and K. K. Abdul-Razzak "Association of 25-Hydroxyvitamin D with HDL-Cholesterol and other Cardiovascular Risk Biomarkers in Subjects with Non-Cardiac Chest Pain," *Lipids in Health and Disease*, vol.18 no.27, pp.1-10, 2019. https://doi.org/10.1186/s12944-019-0961-3

[9] M. D. Filgueiras, L. G. Suhett, M. A. Silva, N. P. Rocha and J. F. de Novaes, "Lower Vitamin D Intake is Associated with Low HDL Cholesterol and Vitamin D Insufficiency/Deficiency in Brazilian Children," *Public Health Nutrition*, vol.21, no.11, pp.2004–2012, 2018.

[10] U. Ravnskov, K.S. McCully, "Vulnerable Plaque Formation from Obstruction of Vasa Vasorum by Homocysteinylated and Oxidized Lipoprotein Aggregates Complexed with Microbial Remnants and LDL Autoantibodies," *Ann Clin Lab Sci*., vol.39, pp.3–16, 2009.

[11] Ravnskov U, McCully KS. "Infections may be causal in the pathogenesis of atherosclerosis," *Am J Med Sci*., vol.344, pp.391–394, 2012. https: /doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31824ba6e0

[12] X. Hu, D. Chen, L. Wu, G. He and W. Ye, "Low Serum Cholesterol Level among Patients with COVID-19 Infection in Wenzhou, China (February 21, 2020). Available at SSRN: https://ssrn.com/abstract=3544826

[13] H. I. Oh, T.S. Shin and E. J. Chang, "Determination of Chelesterol in Milk and Dairy Products by High-Performance Liquid Chromatography," *Cholesterol Assay in Milk and Dairy Products by HPLC*, pp.1456-1469, 2001.

[14] J.H. Ahn, I.S. Jeong, B.M. Kwak, D. Leemb, T. Yoon, C. Yoon, J. Jeong, J.M. Park and J.M. Kimc, "Rapid Determination of Cholesterol in Milk Containing Emulsified Foods," *Food Chemistry*, vol.135, pp.2411-2417, 2012.

[15] R. Kala, E. Samková, L. Pecová, O. Hanuš, K. Sekmokas and D. Riaukienė, "An Overview of Determination of Milk Fat: Development, Quality Control Measures, and Application," *ACTA Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, vol.66, no.4, pp.1055-1064, 2018.

[16] M. Esteki, Z. Shahsavari and J. Simal-Gandara, "Food Identification by High Performance Liquid Chromatography Fingerprinting and Mathematical Processing, " *Food Research International*, vol.122, pp. 303–317, 2019.

[17] L. Kolarič and P. Šimko,"The Comparison of HPLC and Spectrophotometric Methods for Cholesterol Determination," *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Science*, vol. 14, pp. 118-124, 2020. https://doi.org/10.5219/1302

[18] ن. م. الشعلان، "تقدير الكوليسترول في الأطعمة والدهون وبلازما الدم بواسطة الكروماتوجرافيا السائلة ذات الأداء العالي. رسالة ماجستير. جامعة الملك سعود. كلية العلوم. قسم الكيمياء. ص7 ,2004.

[19] T. N. Rao, "Validation of Analytical Methods" IN: Calibration and Validation of Analytical Methods: A Sampling of Current Approaches, M. Stauner (Ed.), India, IntechOpen, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.69918

[20] D. J. Fletouris, N. A, Botsoglou, I. E. Psomas and A. I. Mantis, "Rapid Determination of Cholesterol in Milk Products by Direct Saponification and Capillary

[34] N. Strzałkowska, E. Bagnicka, A. J´o´zwik, A. ´Sliwa-J´o´zwik and J. Krzy˙zewski,"Relationship between the Number of Lipolytic Bacteria Season of the Year and Susceptibility of Goat Milk to Lipolysis," *Vet Med*, vol.62, pp.343–6, 2006.

[35] M. Gabryszuk, N. Strzałkowska and J. Krzy˙zewski, " Effects of Pre- and Post-Partum Injections of Se, Zn and Vitamin E on the Concentration of Cholesterol CLA Isomers and Fatty Acids in Ovine Milk," *Anim Sci Pap Rep*, vol.25, pp.87–95, 2007.

[36] A. Mussaad, G. Konuspayeva and B. Faye, "Some Lipid Components of the Camel Milk and Blood in Intensive Farm in Saudi Arabia," *J. food Agric.*, vol.26, no.4, pp. 349-353, 2014.

[37] E. Konuspayeva, B Lemarie, G. Faye, D. Loiseau, "Monett fatty Acid and Cholesterol Composition of Camel's Milk in Kazakhstan," *Dairy Science and Technology*, vol.88, pp. 327-340, 2008.

[38] A. S. Gorban and O. M. Izzeldin, "Study on Cholesteryl Ester Fatty Acids in Camel and Cow Milk Lipid," *Int. J. Food Sci. Technol.*, 34. pp. 229–234, 1999.

[39] A. Pihl, "Cholesterol Studies. I. The Cholesterol Content of Foods," *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol.4, p. 115, 1952.

[40] J. M. De Man, "The Free and Ester Cholesterol Content of Milk and Dairy Products," *Z. Ernaeh.*, vol.5, p.1, 1964.

[41] V. Piironen, J. Toivo and A.M. Lampi, "New Data for Cholesterol Contents in Meat, Fish, Milk, Eggs and Their Products Consumed in Finland," *J. Food Comp. Anal*, vol.15, p. 705, 2002.

[42] T. Saldanha, M. R. Mazalli and N. Bragagnolo, "Concerning Determination of Cholesterol and Cholesterol Oxides in Food," *Ciênc. Tecnol. Aliment*, vol.24, p. 109, 2004.

[43] P. Manzi and L. Pizzoferrato, "HPLC Determination of Lactulose in Heat Treated Milk," *Food Bioprocess Technol*, vol.3, p. 234, 2010.

[44] ج. م. جندل، كيمياء الألبان، الجزء الأوّل. دار البداية ناشرون وموزعون. الطبعة الأولى. ص12،11، عمان، الأردن،2014.

[45] D.E. LaCroix, W.A. Mattingly, N. P. Wong and J. A. Alford, "Cholesterol, Fat and Protein in Dairy Products," *J. Am. Diet. Assoc.*, vol. 62, p.275, 1973.

Gas Chromatography," *J. Dairy Sci.*, vol.81, pp. 2833-2840, 1998.

[21] ق. إ. محمّد، " تقدير الكوليسترول في الحليب بالطريقة الأنزيمية المستخدمة لتقدير كوليسترول الدم،" مجلة العلوم الزراعية العراقية،41 (3): ص100-105، 2010.

[22] ش. المحمّدي، تصميم وتحليل التجارب الزراعية. كلية الزراعة والطب البيطري، قسم الإنتاج الحيواني وعلوم الأغذية، جامعة إب، اليمن، 2005.

[23] ICH, Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology: Q2(R1), 2005.

[24] F. Ulberth and H. Reich, "Gas Chromatographic Determination of Cholesterol in Processed Foods," Food Chemistry, vol. 43, pp. 387–391, 1992.

[25] S.M. Al-Hasani, H. Shabany and J. Hlavac, "Rapid Determination of Cholesterol in Selected Frozen Foods," *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, vol.73, pp. 817-820,1990.

[26] AOAC. Cholesterol in Foods. Official Methods of Analysis, 18th ed., Chapter 45, pp. 100-102, 2005.

[27] P. Oles, G. Gates, S. Kensinger, J. Patchell, D. Schumacher, T. Showers and A. Silox, "Optimization of the Determination of Cholesterol in Various Food Matrixes," *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, vol.73, pp. 724-728, 1990.

[28] I. Borkovcova, E. Janouskova, M. Drackova, B. Janstonva and L. Volrova, "Determination of Sterols in Dairy Products and Vegetable Fats by HPLC and GC Methods," *Czech J. Food Sci.*, vol, 27, Special Issue, pp. S217-S219, 2009.

[29] R. Sieber, "Oxidised Cholesterol in Milk and Dairy Products," *Int. Dairy J.*, vol.15, pp.191–206, 2005.

[30] P. Walstra, T.J. Geurts, A. Noomen, A. Jellema, A. Van and M.A. Beckel, Principles of Milk Properties and Processes, Dairy Technology Marcel Dekker, Inc., 50, 1999.

[31] L. C. Bauer, D. A. Santana, M. S. Macedo, A.G. Torres, N. E. Souza and G. I. Simionato, "Method Validation for Simultaneous Determination of Cholesterol and Cholesterol Oxides in Milk by RP-HPLC-DAD," *J. Braz. Soc.*, vol, 25, no. 1, pp. 161-168, 2014.

[32] HH. Dam, "Concerning the Distribution of Cholesterol and Cholesterol Esters between Fat and Plasma in Cow's Milk," *Biochem. Z.*, vol. 270, 112, 1934.

[33] F. Domenico, "The Influence Exerted by Lecithin and by Cholesterol on the Mammary Section and the Chemical Composition of Milk," *Arch, Fisiol.*, vol.39, p. 431, 1940.

RESEARCH ARTICLE

QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE TOTAL CHOLESTEROL IN SOME MILKS OF YEMENI MARKETS

Adel A. M. Saeed[1,*], Taha Abu-Bakr Fahdel Salem[2] and Fares Saif Salem Al-Saidi[3]

[1]Dept. of Chemistry, Faculty of Science, University of Aden, Aden, Yemen
[2]Dept. of Chemistry, Faculty of Education, University of Aden, Aden, Yemen
[3]Dept. of Chemistry Faculty of Education, University of Aden, Yafae, Yemen

***Corresponding author: Adel Ahmed Mohammed Saeed; E-mail: adel_saeed73@yahoo.com**

Received: 07 June 2020 / Accepted: 13 June 2020 / Published online: 30 June 2020

Abstract

The recent study aimed to determine the total cholesterol quantitatively by High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) in some milks sold in Yemeni markets. Thirteen samples were randomly collected from several markets and animal farms (in Aden and Abyan governorates) and prepared for analysis. The cholesterol levels of the milk samples ranged between (0.34-22.8 mg/100g), and the highest cholesterol content was in the order: fresh and whole cream animal milk > the commercial whole cream animal milk > the commercial free-fat animal milk, to which a vegetable oil was added.

Keywords: Total Cholesterol, Milks in Yemeni Markets, HPLC Analysis.