الفصل السابع

تفاعلات الازالة الجزئية لا سيل الاحماض الدهنية

Partial Deacylation Reactions

بعد فصل مخلوط الجلسريدات الثلاثية بالطرق الكروماتوجرافية السابق ذكرها فانه يمكن الحصول على معلومات اضافية عن تركيب تلك الجلسريدات الثلاثية باستعمال تفاعلات الازالة الجزئية للأحماض Partial Deacylation وتستخدم مشتقات الجلسريدات الثنائية والاحادية (mono and diglycerides) فى ٣ أنواع من التحليلات وهى

١ - بعد فصل الجلسريدات الثنائية بالطرق الكروماتوجرافية العادية يمكن مطابقة تركيبها بتركيب الجلسريدات الثلاثية فى العينة الاصلية .

٢ - من تحليل الاحماض الدهنية للجلسريدات الثنائية والاحادية يمكن معرفة توزيع هذه الاحماض على المواضع ٢ - و ١ ، ٣ مجتمعا .

٣ - تستخدم الجلسريدات الثنائية الناتجة من عملية ازالة الاحماض الدهنية (deacylation) لمعرفة التوزيع الفرغى للاحماض الدهنية الداخلة فى تركيبها وخاصة معرفة الاحماض التى تشغل الاماكن ١ و ٢ .

وتتم عملية الازالة الاختياريه للأحماض الدهنية (Selective deacylation) فى الجلسريدات الثلاثية بطريقتين هما :

١ - إستخدام طريقة إنزيمية (انزيم الليباز (Pancreatic lipase) .

٢ - إستخدام طريقة كيماوية (معقد جرينيارد (Grignard reagent) .

الشروط الواجب مراعاتها عند إجراء عملية إزالة الاحماض الدهنية (deacylation)

١ - يجب أن تكون الجلسريدات الاحادية والثنائية الناتجة من الازاله الجزئية مماثلة representative للجلسريدات الثلاثية الاصلية من حيث إحتلال الاحماض الدهنية لاماكن معينة أى يجب أن تكون الاحماض الدهنية التى تحتل المواضع ١ ، ٣ فى الجلسريدت الثلاثى الاصلى هى نفسها الموجودة فى المواضع ١ ، ٢ فى الجلسريد الثنائى .

٢ - يجب ألا تظهر الجواهر الكشافه التى تستخدم فى عملية إزالة الأحماض الدهنيه (deacy lation) أى تخصص تجاه نوعية معينة من الأحماض الدهنية أو الجلسريدات الثلاثية .

٣ - يجب ألا تشجع انتقال لمجاميع الاسيل (Acyl) أى تحرك الاحماض الدهنية من ١ الى ٢ أو من ٣ الى ٢ .

أولا : الطرق الكيماوية لإزالة مجاميع الاسيل

Chemical Deacylation Methods

مركب جرينيارد Grignard reagent

إن معظم الطرق المستخدمة لانتاج جلسريدات ثنائيه يشابه أو يماثل الجلسريدات الثلاثية هى الطرق التى تعمل على إزالة مجاميع الاسيل بواسطة مركب جرينيارد ، يتفاعل مركب جرينيارد مع رابطة إستر واحدة فى جزئى الجلسريد الثلاثى ويعطى بعد التحليل المائى جلسريد ثنائى وكحول ثالث يحتوى على مجموعة الاسيل المفصولة ، وتستمر عملية نزع مجاميع الاسيل بحيث يحتوى نواتج التفاعل على متشابهات الجلسريدات الثنائية والاحادية والجليسرول وأحماض دهنيه .

ويوقف التفاعل باضافة حامض الخليك عند النقطة التى يصل فيها انتاج الجلسريدات الثنائية الى أقصى تركيز ويفضل استخدام ايثايل بروميد الماغنسيوم (CH_3 CH_2 MgBr) Ethyl Magnesium Bromide كجوهر كشاف لهذا التفاعل لانه يعطى كحول ثالث يسهل فصله من الجلسريد الثنائى بطرق الفصل الكروماتوجرافى لنواتج التفاعل .

وفيما يلى خطوات الطريقة التى ذكرها Christie and Moore (1969)

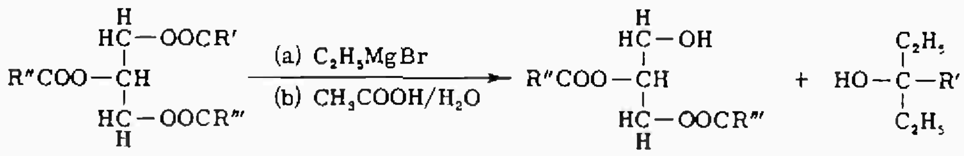
الطريقة :

تذاب ٤٠ ملجم من الجلسريدات الثلاثية فى ٣سم^3 اثير جاف + ١ سم^3 محلول جرينيارد (تركيزه ٠.٥ مول فى الاثير حديث التحضير) ويرج المخلوط لمدة ٦٠ ثانية - يضاف ٠.٠٥ سم^3 حمض خليك ثلجى ثم ٢سم^3 ماء لوقف التفاعل وتستخلص النواتج الدهنية بواسطة الاثير .

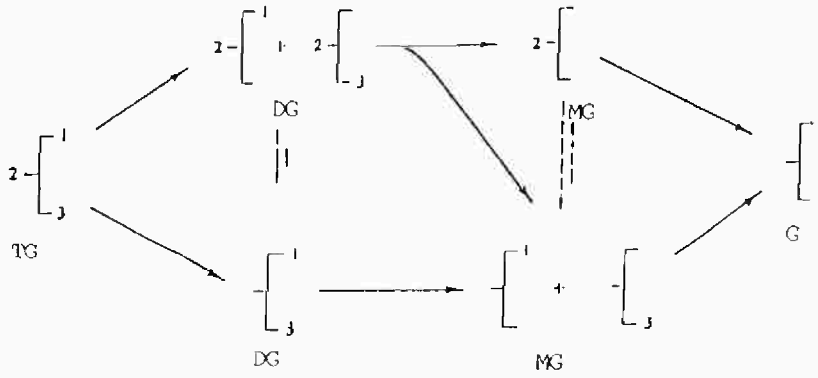
يغسل المستخلص أولا بمحلول مائى مخفف من بيكربونات البوتاسيوم ($KHCO_3$) ثم يغسل بالماء ويجفف الناتج فى النهاية على كبريتات الماغنسيوم ($MgSO_4$) وبعد التخلص من المذيب يتم فصل الجلسريدات الثنائية بسرعة على الواح T.L.C. (المادة الدعامية هى حمض السيليسيك محتويه على ٥٪ (وزن / وزن) حامض بوريك وذلك لمنع هجرة مجاميع الاسيل .

ويستخدم المذيب الآتى : هكسان / ايثير (٥٠/٥٠ - حجم / حجم) لفصل الجلسريدات الثنائية sn - 1,2 (2,3) و - sn - 1,3 عن بعضها البعض .

وفيما يلى المعادلات التى تبين ميكانيكية هذا التفاعل :



والرسم التخطيطى التالى يبين تفاعل معقد جرينيارد مع الجلسريد الثلاثى :



نواتج الجلسريدات الثنائية Diglyceride products

تعطى عملية إزالة مجاميع الاسيل بواسطة مركب جرينيارد الجلسريدات الثنائية ١ ، ٢ - (٢ ، ٣) و (١ ، ٣) والنسبة بينهما هى ٢ : ١ تقريبا .

والتحليل المباشر للجسريد الثنائى ١ ، ٣ يعطى تركيب الاحماض الدهنية الموجودة فى المواضع ١ و ٣ - ويعرف نوع الحامض الدهنى الذى يشغل الموضع ٢ بالفرق كما فى المعادلة التالية :

٪ للحمض الدهنى فى الوضع ٢ = ٣ (٪ الاحماض الدهنية الكلية فى الجلسريد الثلاثى)- (٪ الاحماض الدهنية للجسريد الثنائى ١ ، ٢) .

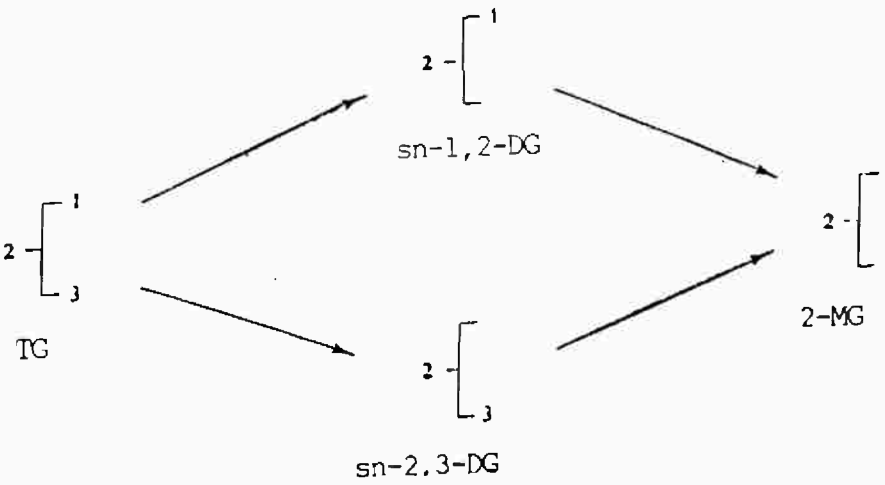
نواتج الجلسريدات الاحادية Monoglyceride products

لا يمكن استخدام الجلسريدات الاحادية sn - 3 و sn - 1 و sn - 2 الناتجة من تفاعل مركب جرينيارد مع الجلسريدات الثلاثية فى الأغراض التحليلية وذلك لأن الاحماض الدهنية الموجودة بالجلسريدات الاحادية لا تماثل الاحماض الدهنية not representative التى تحتل مواضع معينه فى الجلسريدات الثلاثية الأصلية نظرا لحدوث عملية انتقال الاحماض الدهنية من مواضعها الاصلية الى مواضع اخرى .

ثانيا : الطرق الانزيمية لازالة مجاميع الاسيل

Enzymatic deacylation methods

يعمل انزيم بنكرياس الليباز على تحليل رابطة استر أول فى جزىء الجلسريد الثلاثى ويعطى جلسريدات ثنائية من نوع (١ ، ٢) و (٢ ، ٣) ويعطى ٢ - جلسريد أحادى وكذلك أحماض دهنية حرة Free Fatty Acids .



وهذا الانزيم متخصص ويكاد يكون تخصصه مطلق لتحليل رابطة الاستر فى المواضع ١ و ٣ وتستخدم الجلسريدات الأحادية الناتجة من التحليل الانزيمى على نطاق واسع لمعرفة نوع الحامض الذى يشغل الوضع (٢) وعلى ذلك تستخدم نواتج التحليل الانزيمى لمعرفة توزيع وتحديد أماكن تلك الاحماض فى الدهون الطبيعية .

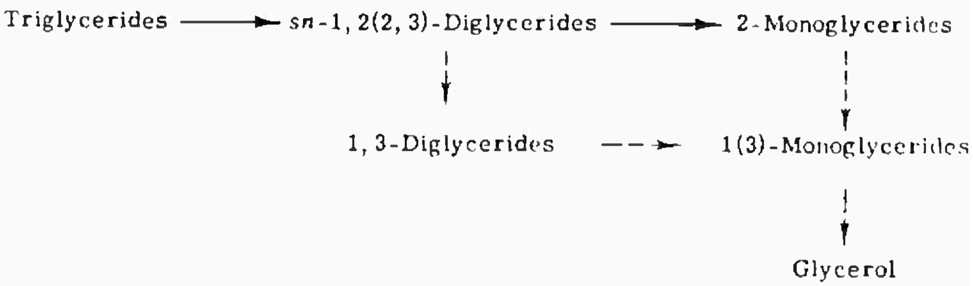
ا - الانزيم Enzyme

يستعمل بنكرياس الخنزير على نطاق واسع كمصدر لانزيم الليباز Pancreatic lipase ويمكن الحصول عليه فى صورة مسحوق powder وذلك عن طريق نزع الماء ونزع الدهن من البنكرياس (بنكرياس الخنزير) بواسطة الاسيتون والاثير ويكون الناتج بهذه الطريقة ثابت لمدة طويلة ويصاحب المستحضر الانزيمى كميات صغيرة من نوعين من الانزيمات غير المرغوبة فى وجودها وهما :

١ - Esterase يعمل على تحليل رابطة الاستر للمركبات الذائبة فى الماء .

٢ - Non - specific lipase يعمل على تحليل الاسترات الغير ذائبة فى الماء سواء الناتجة من الكحولات الاولى أو الثانية .

وهذا الانزيم الغير متخصص يعطى نسبة قليلة من الجلسريدات الثنائية من نوع (١ ، ٣) والمفروض ان تنتج جلسريدات ثنائية من نوع (١ ، ٢) و (٢ ، ٣) كذلك يعطى نسبة قليلة من الجلسريدات الاحادية من نوع (١ -) أو (٣ -) والمفروض أن ينتج فقط جلسريد احادى من نوع (٢ -) وتتكون كل هذه المكونات إذا وجدت هذه الانزيمات مع إنزيم ليباز البنكرياس Pan-creatic Lipase أثناء إزالة مجاميع الاسيل من الجلسريد الثلاثى ويتضح ذلك من هذا الرسم التالي :



ويمكن وقف نشاط إنزيم الليباز الغير متخصص Non - specific lipase بدون حدوث فقد فى نشاط إنزيم ليباز البنكرياس Pancreatic كما يلى :

١ – يتم التحليل فى غياب أملاح الصفراء Bile salts

٢ – يحدث لانزيم ليباز البنكرياس Pancreatic lipase هضم ذاتى Self - digestion على pH – ٩ ودرجة حرارة ٤٠ْم ولمدة ساعة .

٣ – يعامل إنزيم الليباز Pancreatic lipase بمحلول ثنائى إيثايل بارا نيتروفينايل فوسفات diethyl - p-nitrophenyl phosphate بتركيز ٠,٠٠٠٥ مولر ولمدة ساعة .

٣ - ظروف التفاعل Reaction conditions

تختار ظروف التفاعل بحيث تتم عملية إزالة مجموعة الاسيل للحامض الدهنى بسرعة كبيرة (أقل من ٩٠ ثانية) ومنع هجرة مجاميع الاسيل الغير مرغوبة باكبر قدر ممكن للجلسريدات الجزيئية (ثنائية وأحادية) والظروف المثلى لتفاعل انزيم ليباز البنكرياس المستخلصة من الخنزير هى :

١ – درجة الحوضة قريبة من ٨ .

٢ – الكتروليت تركيزه ٠,٥ – ١,٥ مولر .

٣ – وجود أيونات الكالسيوم .

٤ – نسبة الانزيم الى العينة كبيرة .

٥ – إثارة قوية (Vigorous agitation) .

٦ – وجود مستحلبات (أملاح الصفراء) لمزج هذه المكونات مع بعضها ولزيادة مساحة الاسطح المتداخله .

٧ – درجة حرارة التفاعل هى ٣٧ – ٤٠ْم وعلى هذه الدرجة تتم عملية إزالة أسيل الحامض الدهنى Deacylation بسرعة بدون تغير فى تركيبها الكيماوى كما أن الجلسريدات الثلاثية توجد فى الحالة السائلة عند اجراء التفاعل " ما عدا الجلسريدات الثلاثية المشبعة تماما".

وفيما يلى طريقة Luddy et al (1964) التى تستخدم فى إزالة الاحماض الدهنية للجلسريدات الثلاثية بواسطة إنزيم الليباز .

١ – توزن ٥٠ ملجم عينه جلسريد ثلاثى فى أنبوبة ويضاف كمية كافية من الانزيم (٩ ملجم) لاتمام عملية التحليل .

٢ - يضاف ١ سم^3 محلول منظم (Tris) تركيزه ١ مولر ذو درجة حموضة ٨ بالضبط ثم يضاف ١ سم^3 محلول كوريد كالسيوم (٢٢٪) ثم يضاف ٢٥سم^3 محلول أملاح صفراء (١٪) .

٣ - تسخن محتويات المخلوط فى حمام مائى على درجة حرارة ٤٠ْم لمدة ١ دقيقة بدون رج .

٤ - تغطى الانبوبة ويرج لمدة ٤٥ - ٩٠ ثانية بمعدل ٣٠٠٠ ذبذبة/ دقيقة .

٥ - فى نهاية زمن التفاعل ينقل المخلوط فى الحال الى قمع فصل ويستخلص بواسطة الاثير ويوقف التحليل الانزيمى عن طريق إضافة ٥ . ٠ سم^3 حامض HCl ٦ ع .

٦ - يغسل المستخلص بالماء ويجفف فوق كبريتات صوديوم لا مائية - يرشح ثم يبخر المذيب .

٧ - تفصل بسرعة نواتج التفاعل على ألواح TLC والمادة الدعامية المستخدمة هى حامض السيليسيك المدعمة - بـ ٨٪ (وزن / وزن) حامض بوريك لمنع حدوث انتقال الاحماض الدهنية .

٣ - التخصص Specificity

١ - تعتبر قدرة إنزيم ليباز البنكرياس على التخصص التحليلى قريبة من المطلقة (اكبر من ٩٧٪) وهذا التخصص يعنى تحليل رابطة الاستر الأولى الموجودة فى الموضع (١) أو (٣) فى جزئى الجلسريد الثلاثى ولا يبدأ فى تحليل رابطة الاستر الثنائية الا بعد الانتهاء من تحليل مجاميع الاستر الاولى . ويلاحظ أن انفراد الحامض الدهنى الموجودة فى الوضع (٢) يكون مصدره أو ينسب الى هجرة مجموعة الاسيل . يهاجم إنزيم ليباز البنكرياس كل من الموضعين (الاستر الاولى) (١) ، (٣) بنفس المعدل على جزئى الجلسريد الثلاثى أى أن هذا الانزيم لا يميز فى تحليله لرابطة الاستر فى الموضع (١) ، أو (٣) اذا كان الحامض الدهنى المرتبط فى (١) هو نفس الحامض المرتبط فى الوضع (٣) .

٢ - يحلل هذا الانزيم الاحماض الدهنية الغير المشبعة بسرعة اكبر من الاحماض الدهنية المشبعة إذا تساوت طول السلسلة فى كل منهما . وعلى ذلك يقوم انزيم الليباز بتحليل الجلسريد الثلاثى الذى يحتوى على أوليك فى الوضع (١) ، وأحماض إستياريك فى المواضع (٢ ، ٣) ويعطى جلسريد ثنائى الاستيارين فهذا يدل على أن الانزيم يعمل على تحليل الحامض الدهنى أوليك أولا (١) ويعطى جلسريد ثنائى عبارة عن ثنائى إستيارين .

٣ - لا يميز هذا الانزيم فى تحليله بين المشابهات المضاهية والمخالفة حيث أوضحت الدراسات المقارنة بين الجلسريدات التى تحتوى على حامض الاوليك الذى يحتوى على رابطة زوجية

فى وضع مضاهى (9C) والالياديك الذى يحتوى على رابطة زوجية فى وضع مخالف (9t) . فان الإنزيم لا يميز بينهما فى تحليل الجلسريدات الثلاثية .

٤ - يحلل هذا الانزيم الاحماض الدهنية التى تحتوى على رابطة زوجية ، تفرعات الالكيل أو مجاميع فعالة أخرى على ذرات الكربون ٢ ، ٣ ، ٤ ، ٥ بدرجة أبطأ من مشابهاتها التى تحتوى على مجاميع فعالة ترتبط بذرات كربون بعيدة عن رابطة الاستر وهذا يرجع الى إعاقة هذه المجاميع عمل الانزيم التحليلى .

٥ - يفضل إنزيم الليباز تحليل الاحماض الدهنية طويلة السلسلة بدرجة أكبر من الاحماض الدهنية قصيرة السلسلة بدليل أنه عند تحليل الجلسريد الثلاثى PBB يعطى نوعين من الجلسريدات الثنائية وهى ثنائى البيوترين ، بالميتوبيوترين إلا أن نسبة النوع الأول أعلى بمقدار أكثر من الضعف بالمقارنة بالجلسريد الآخر .