الفصل الثامن

التعرف على توزيع الاحماض الدهنية فى الجلسريدات الثلاثية

Stereospecific analysis

تستخدم الطرق الكيماوية والانزيمية كما سبق ذكره للتعرف على الاحماض الدهنية المرتبطة بروابط إستر فى الوضع ٢ والمتحدة فى المواضع ١ و ٣ وللتعرف على الاحماض الدهنية فى المواضع ١ و ٣ كل على حده يلزم اجراء التحليل الكامل باستخدام التحليل التخصصى الفراغى Stereospecific analysis .

الطرق Methods

تشمل طرق التحليل التخصص الفرغى للجلسريدات الثلاثية على ٣ تفاعلات أساسية :

١ – تحليل الجلسريدات الثلاثية إلى جلسريدات ثنائية مشابه لتركيب الجلسريدات الثلاثية .

٢ – إجراء عملية فسفرة للجلسريد الثنائى وإنتاج فوسفوليبيد .

٣ – تحليل الفوسفوليبيد باستعمال إنزيم الفوسفوليباز A .

وبعد كل تفاعل تفصل النواتج باستخدام TLC ثم التعرف على تركيب الحامض الدهنى عندما يكون ذلك ضروريا .

أ - طريقة بروكرهوف للجلسريد الثنائى ١ ، ٢ - و ٢، ٣ -

Sn - 1,2 - ; 2,3 - DG of Brockerhoff : (Brockerhoff, 1967)

١ – تشمل الخطوة الاولى على تحضين الجلسريد الثلاثى مع إنزيم ليباز البنكرياس للحصول على جلسريد أحادى (٢ –) كما يحدث فى نفس الوقت نزع مجموعة أسيل من الجلسريد الثلاثى ليعطى ١ ، ٢ – و ٢ ، ٣ – جلسريدات ثنائية .

٢ – بعد فصل الجلسريدات الثنائية ١ ، ٢ – و ١ ، ٣ – بواسطة TLC يحدث لها تفاعل فسفرة مع فينايل ثنائى كلورو فوسفات وذلك لانتاج مخلوط من ١ ، ٢ – ثنائى أسيل – ٣ فوسفاتيديل فينول و ٢ ، ٣ – ثنائى أسيل – ١ – فوسفاتيديل فينول .

٣ - تحضين المركبات المفسفرة مع إنزيم الفسفولیباز A فانه ينفرد الحامض الدهنى من الموضع (٢) فى حالة ما اذا كانت مجموعة الفوسفاتيد على الوضع (٣) ولا يحدث ذلك اذا كانت مجموعة الفوسفاتيد على الوضع (١) اى أن هذا الانزيم يحلل فقط الحامض الدهنى فى الوضع ٢ عندما تكون مجموعة الفوسفاتيد فى الوضع (٣) .

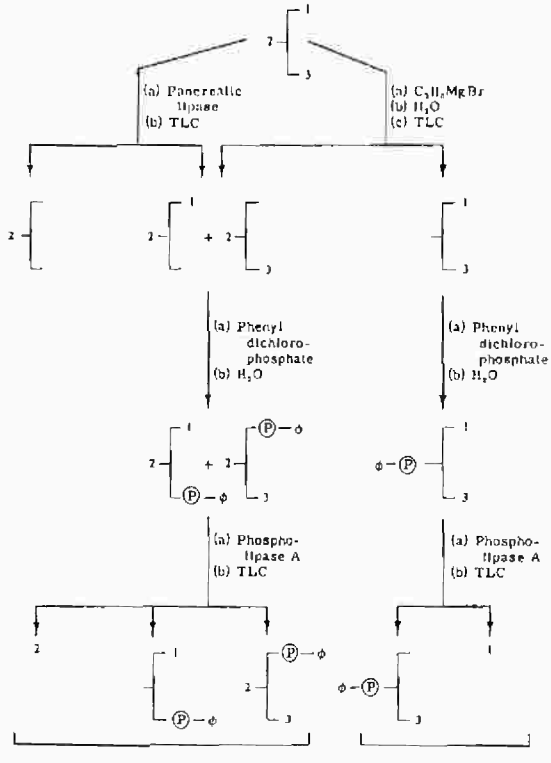
يتم فصل الاحماض الدهنية والتعرف على توزيعها فى المواضع ١ و ٢ و ٣ كما يلى :

١ - يتم التعرف على الحامض الذى يشغل الوضع (١) من خطوة التحليل المائى باستعمال انزيم الفوسفولیباز A .

٢ - يتم التعرف على الحامض الذى يشغل الموضع (٢) من التحليل المائى للجلسريد الاحادى بواسطة إنزيم الليباز .

٣ - يتم معرفة الحامض الذى يشغل الموضع (٣) بالفرق .

فى هذه الطريقة يتم تقدير الاحماض فى الوضع ١ و ٢ مباشرة والموضع ٣ بالفرق .



Sn - 1,2 (2,3-) Diglyceride method Sn - 1,3 - Diglyceride method

ب - طريقة بروكرهوف للجلسريد الثنائى ١، ٣

sn-1,3 - Diglyceride Method of Brockerhoff (Brockerhoff et al, , 1966)

١ - يتفاعل مركب جرينيارد مع الجلسريد الثلاثى ليعطى جلسريدات ثنائية (١ .٣)، (٢ .٣) وكذلك ١ .٢ .٣ ممثل للجلسريد الثلاثى .

٢ - يفصل الجلسريد الثنائى ١ .٣ باستخدام TLC ثم يحول الى ١ .٣ ثنائى الاسيل ٣- فوسفاتيديل فينول وذلك باستخدام فينايل ثنائى كلوروفوسفات .

٣ - التفاعل مع إنزيم الفوسفوليبياز A يفرد الحامض الدهنى فى الوضع (١) فقط ويعطى ليسوفوسفاتيد يحتوى على مجموعة أسيل فى الوضع (٣) أى أن هذا الانزيم مختص فى هذه الحالة على انفراد الاحماض الدهنية فى الوضع ١ .

٤ - بعد فصل وتحليل الاحماض الدهنية من التفاعلات المختلفة يمكن معرفة انواع الاحماض التى تشغل المواضع الثلاثة كلها مباشرة .

* يتم معرفة الحامض الذى يشغل الوضع ١ من خطوة التحليل بواسطة انزيم فسفوليباز A

* يتم معرفة الحامض الذى يشغل الوضع ٢ من الجلسريد الاحادى الناتج من خطوة التحليل بواسطة أنزيم الليباز .

* يتم معرفة الحامض الذى يشغل الموضع ٣ من الليسوفوسفاتيد الناتج بفعل انزيم فوسفوليباز A .

* ومن أهم عيوب هذه الطريقة هو أنه قد يحدث نتيجة لاستخدام مركب جرينارد تكوين مشابهات مما يقلل من كفاءة الطريقة .

* ومن مميزات هذه الطريقة هو تقدير الاحماض فى الوضع ٣ مباشرة وليس بطريقة الفرق كما فى الطريقة السابقة .

ج - طريقة لاندس Method of Lands (Lands et al. , 1966)

١ - الخطوة الاولى هى تحليل جزئى للجلسريد الثلاثى بواسطة إنزيم الليباز ثم يتبع ذلك فصل ٢ - جلسريد أحادى وكذلك الجلسريدات الثنائية ١ ، ٢ و ٢ ، ٣ - من نواتج التفاعل .

٢ - تحضين الجلسريدات الثنائية مع إنزيم Diglyceride kinase الذى يفسفر ١ .٢ -

الجلسريد الثنائى فقط الى ٢,١ - ثنائى أسيل ٣ - فوسفاتيد بينما يبقى الجلسريد الثنائى الآخر كما هو بدون فسفرة .

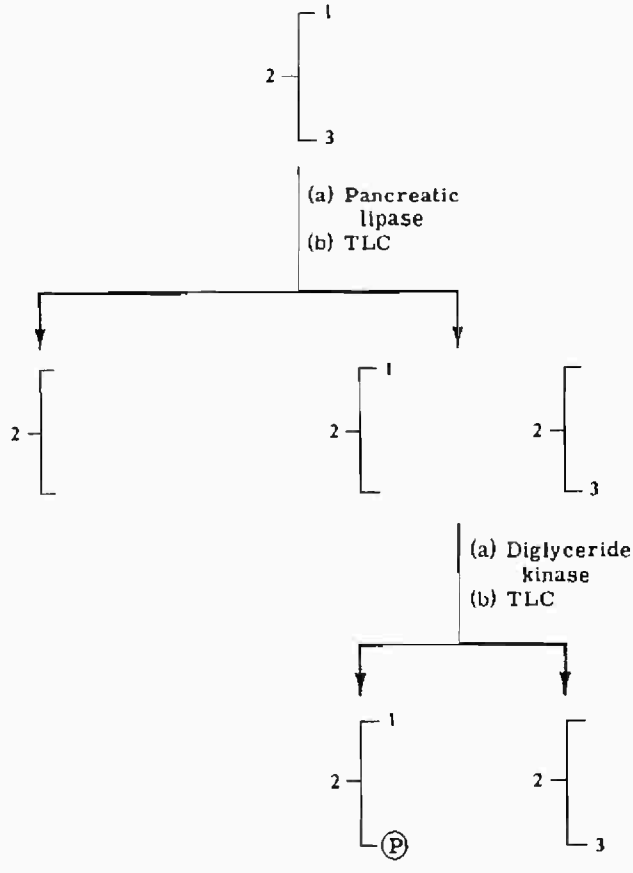
٣ - يمكن حساب ومعرفة المواضع ١ و ٢ و ٣ التى تشغلها الاحماض الدهنية على جزىء الجلسريد الثلاثى الاصلى كما يلى :

* يمكن معرفة المواضع ١ من : ٢,١ - فوسفاتيد الجلسريد الاحادى .

* يمكن معرفة المواضع ٢ من : ٢ - جلسريد احادى الناتج من التحليل الانزيمى مباشرة باستخدام الليباز .

* يمكن معرفة المواضع ٣ من : ٣ (جلسريد ثلاثى اصلى - ٢,١ فوسفاتيد).

1. METHODS



إختيار الطريقة Choice of method

بتوقف إختيار الطريقة المناسبة على :

١ - الدقة . ٢ - السرعة . ٣ - كمية الحامض الدهنى المراد تقديره .

١ - عندما تكون الدقة المتناهية هى المطلوبة فنختار طريقة (2,3-) - 1,2 الجلسريد الثنائى لبروكرهوف وذلك للاسباب التالية :

إن إنتاج الجلسريدات الثنائية من ١ . ٢ - و ٢ . ٣ - باستخدام مركب جرينيارد أو انزيم الليباز تعتبر أكثر تمثيلا للواقع عن طريقة ١ . ٣- وذلك لان طريقة ١ . ٣- تعطى مشابهات مما يزيد من الخطأ ويقلل من الدقة .

٢ - التقدير المباشر للاحماض الدهنية التى تشغل الوضع ١ وكذلك طريقة حساب الموضع ٣ تعطى بيانات أكثر دقة من طريقة لاندس التى تحسب الموضعين ١ و ٣ بالفرق .

٣ - عندما تكون السرعة هى المطلوبة تختار طريقة لاندس وذلك لانها أسرع طريقة وذلك لان طريقة بروكرهوف تشمل على الخطوات التالية :

أ - التحليل بواسطة إنزيم الليباز .

ب - الفسفرة .

ج - التحليل بانزيم فوسفوليباز A .

وكل هذه الخطوات تحتاج ٣ - ٤ يوم للتحليل التخصصى الفرغى وأن طريقة لاندس تحتاج الى ثلثى المدة السابقة حيث ليس من الضرورى إجراء خطوة التحليل بانزيم الفوسفوليباز A .

٤ - اذا كان من الضرورى تقدير الحامض الدهنى الذى يشغل الوضع ٣ فلا بد من إختيار طريقة تقدير الحامض الدهنى الذى يشغل الوضع ٣ فلا بد من إختيار طريقة ١ . ٣ - الجسريد الثنائى لبروكرهوف التى تقدره مباشرة وليس بالفرق .

فسفرة الجلسريدات الثنائية

Phosphorylation of diglycerides

أولا : بواسطة ثنائى كلوروفوسفات الفينايل

Phenyl dichlorophosphate

١ – يذاب ٩٣ مجم من الجلسريدات الثنائية فى اسم٣ من الاثير الجاف ثم يضاف بالتدريج Dropwise مع التحريك الى المخلوط اسم٣ من البيريدين الجاف – اسم٣ إثير – ٠,٥ سم٣ من ثنائى كلوروفوسفات الفينيل حديث التقطير .

٢ – بعد ٦٠ دقيقة على درجة حرارة الغرفة يضاف ٥ سم٣ بيريدين و ٣سم٣ اثير ثم بضع نقط من الماء مع التبريد .

٣ – ينقل مخلوط التفاعل الى قمع فصل يحتوى على ٣٠ سم٣ كحول ميثايل و ٢٥سم٣ ماء و٣٠سم٣ كلوروفورم واسم٣ ثلاثى إيثايل أمين – وبعد الرج تؤخذ طبقه الكلوروفورم السفليه ويبخر المذيب للحصول على فوسفاتيديل الفينول .

ثانيا : فسفرة الجلسريدات الثنائية بواسطة إنزيم Diglyceride kinase

١ – يوضع ١ – ٣ مجم من الجلسريدات الثنائية ١ ، ٣ – (٢ ، ٣ –) فى أنبوبة إختبار ثم تضاف الجواهر الكشافة التالية : ١٠ ميكرولتر من ٢٠٠ مجم/ سم٣ مخلوط أملاح الصفراء Bile Salts –١ ,٠ سم٣ من ٠,٠٥ مول أدينوزين ثلاثى فوسفات – ٠,٠٥ سم٣ من امول كلوريد ماغنسيوم – ٠,٠٥ من ٠,٥ مول فوسفات الصوديوم كمحلول منظم (pH ٧,٩٥) – ٠,٨ مجم من إنزيم diglyceride Kinase الخام فى ١ ,٠ سم٣ من محلول منظم سستئين الفوسفات .

٢ – يحضن التفاعل على ٣٧مْ مع التحريك المستمر وبعد ١ ساعة يضاف ٢ ,٠ سم٣ من اعيارى حامض الهيدروكلوريك .

٣ – تستخلص الليبيدات بواسطة ٢ سم٣ من مخلوط كلوروفورم : ميثانول (١:٢) يتبعه اضافة ١,٣ سم٣ كلوروفورم .

٤ – تضاف نقطة من ثلاثى إيثايل أمين الى المستخلص الكوروفورمى الكلى ثم يبخر المذيب .

٥ – تفصل sn-1,2-diacyl-3-phosphatidate بواسطة TLC باستخدام حامض السيليسيك كطور ثابت وكلوروفورم – ميثانول – ماء (٦٥ – ٢٦ – ٨) كطور متحرك.

تحليل الفوسفاتيديل فينول بواسطة إنزيم Phospholipase A

١ – تذاب الفوسفاتيديل فينول (٧ – ١٠ مجم) فى ٣ سم^{٣} اثير ثم يضاف ١ , ٠ سم^{٣} محلول منظم Tris يحتوى على كلوريد كالسيوم (٠,٥ مول Tris– ٠,٠٠٢ مول كلوريد كالسيوم نو (pH ٧,٥) ، ٠,٥ مجم من Ophiophagus hannah venom ثم يرج المخلوط لمدة ١٢ ساعة .

٢ – يضاف ٥ سم^{٣} أيزوبيوتانول – ٠,٠٢ سم^{٣} حامض خليك الى المخلوط السابق ثم يبخر نواتج التفاعل حتى الجفاف باستخدام Rotary evaporator .

٣ – يذاب المتبقى فى كمية قليلة من كلوروفورم – ميثانول (٢ : ١) ثم يضاف كشريط على لوح TLC يحتوى على حامض سيليسيك ثم تجرى له development باستخدام مذيب هكسان – اثير – حامض فورميك (٥٠ – ٥٠ – ١) .

٤ – يرش الثلث العلوى من اللوح بواسطة محلول 2,7- dichloro - fluorescein ثم تحدد مكان الحامض الدهنى المنفرد ويستخلص .

٥ – تجرى مرة أخرى عملية الـ development للوح باستخدام المذيب كلوروفورم – ميثانول – ١٤ مول إيدروكسيد الامونيوم (٩٠ – ٨ – ٣) حتى الثلث العلوى من اللوح .

٦ – يرش اللوح بواسطة محلول Rhodamine 6 G ثم تحدد أماكن الليسوفوسفاتيديل فينول والفوسفاتيديل فينول غير المحلله وتستخلص بواسطة مخلوط كلوروفورم – ميثانول (١:٢).

٧ – تحول نواتج التفاعل الثلاثة الى إسترات الميثايل لمعرفة أنواع الأحماض الدهنية بواسطة جهاز الكروماتوجرافى الغازى .

التطبيقات

Application

أ - توزيع مواضع الاحماض الدهنية

Positional distribution of fatty acids

تستخدم طرق التحليل التخصص الفراغى على نطاق كبير لمعرفة التوزيع الموضعى للاحماض الدهنية بين الموضع ١ ، والموضع ٢ ، الموضع ٣ للجلسريد الثلاثى فى الدهون الطبيعيه واجريت مقارنه بين طريقتى بروكرهوف - 1,3 و (2,3) - 1,2 على جلسريد ثلاثى لزيت الذرة فاوضح التحليل الفراغى المتخصص أن البيانات متقاربة جدا فى الطريقتين .

ب - تركيب مخاليط الجلسريدات الثلاثية

Composition of TG mixtures

تستخدم طرق التحليل الفراغى المتخصص لمعرفة الاحماض الدهنية المكونة لمخاليط بسيطة من الجلسريدات الثلاثية المفصولة من الدهون الطبيعية وتعتمد كفاءة هذه الطريقة على مدى تعقد متشابهات المخلوط فمثلا فى حالة الجلسريدات الثلاثية ثنائية الحامض لها ٣ متشابهات محتمله :

sn - PLL　　sn - LPL　　sn - LLP

وهذا التركيب الفراغى للمخلوط يكون من السهل مباشرة معرفته بطرق التحليل التخصص الفراعى .

وفى حالة الجلسريدات الثلاثية ثلاثية الحامض فان لها ستة متشابهات فمثلا :

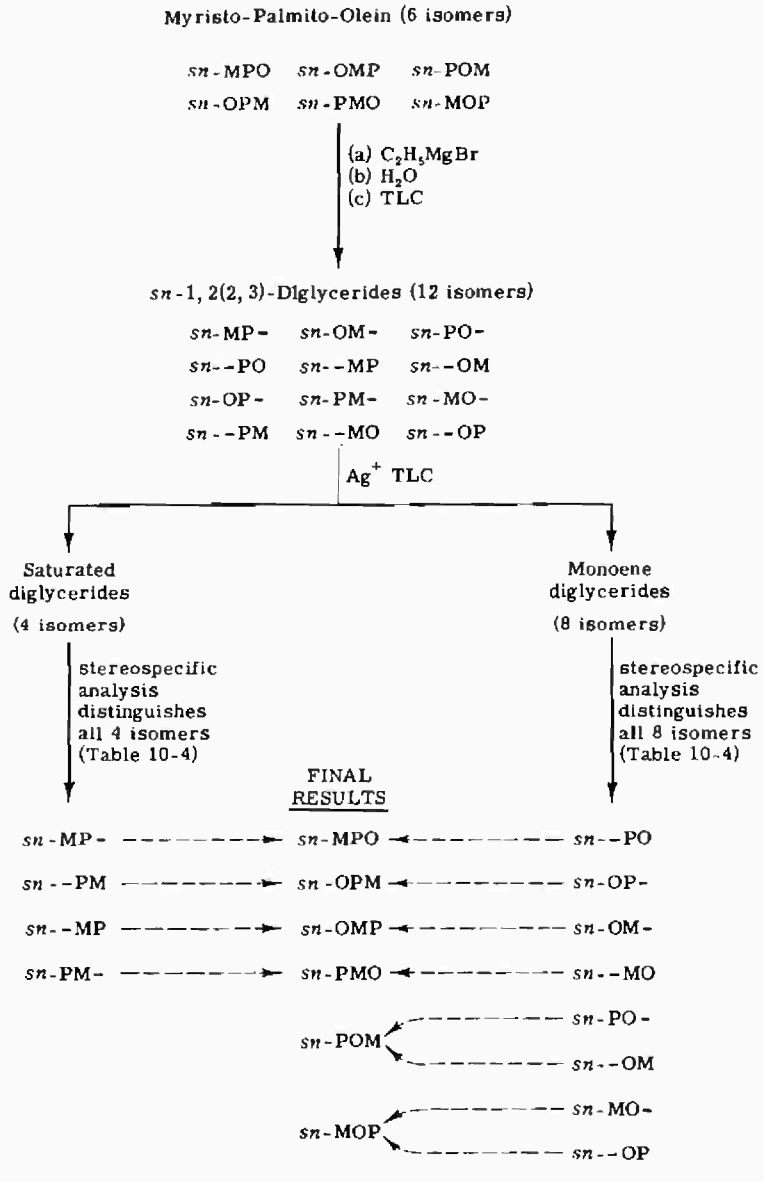
sn - MPO　　sn - OMP　　sn - POM

sn - OPM　　sn - PMO　　sn - MOP

وتوجد صعوبة فى فصل متشابهات هذا المخلوط بعملية واحدة single من التحليل الفراغى المتخصص وتنشأ هذه الصعوبة من المثال التالى اذا كان تركيز حامض الميرستيك هو ٣٠ ٪ فان معنى ذلك أن النسبة ٣٠٪ تتوزع على الجلسريدات الثلاثية Sn - MOP, Sn-MPO لكن النسبة بين هذين النوعين من متشابهات الجلسريدات الثلاثية غير معروفة ، وأيضا فى الجلسريد الثلاثى Sn - MPO الذى يحتوى فى الموضع ١ - على M والوضع ٢ على P

والموضع ٣ على O نجد أن P يشغل الموضع ٢ فى كلا من المتشابهات OPM و Sn-MPO فى إحتلال نفس الموضع ومرة أخرى فان النسبة بين كل هذه الازواج ما زالت غير معروفه وعادة تقدر واحدة فقط من أزواج تلك المشابهات .

ونظم التحليل العامة لتقدير الـ ٦ مشابهات من ميرستو بالميتوأولين Myristo Palmito Olein موضح بالشكل التالى :



وتشمل خطوات التحليل علي النقاط التالية :

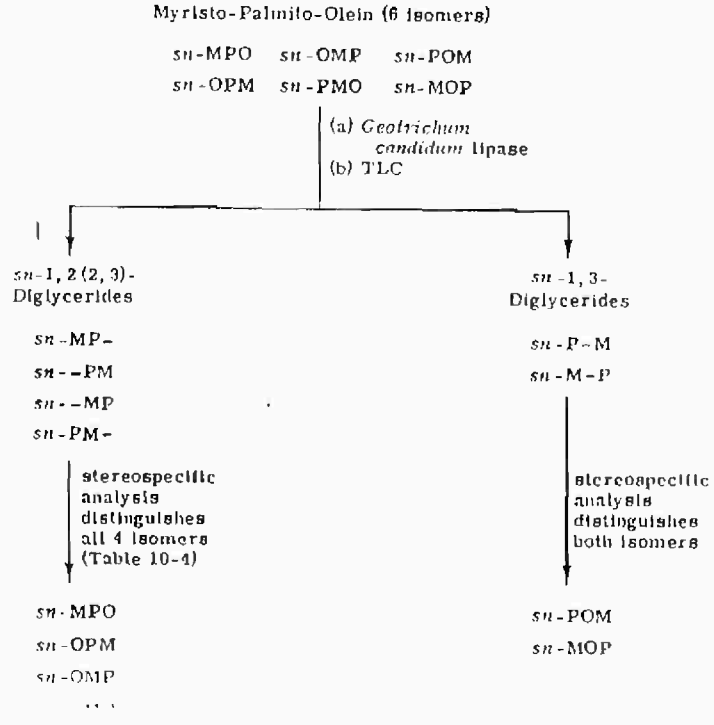
١ - ازالة مجموعة أسيل بواسطة الجوهر الكشاف جرينارد أو إنزيم ليباز البنكرياس .

٢ - فصل الجلسريدات الثنائية الناتجة عن طريق عدم التشبع باستخدام أيون الفضة المضاف الى حامض السيليسيك .

٣ - فصل أنواع الجلسريدات الثنائية بطريقة التحليل الفراغى التخصصى .

يتم نزع الاحماض الدهنية بواسطة مركب جرينيارد ليعطى ١٢ جلسريد ثنائى من نوع ١ ٢ - و ٢,٣ حيث تنفصل الى مركبات مشبعه ومركبات احادية عدم التشبع على الواح TLC المدعمة بالفضة ويتم التعرف على متشابهات الجلسريدات الثلاثية من معرفة تركيب الجلسريدات الثنائية معتمدا على نوع الحامض الدهنى الذى يشغل الموضع ٢ الذى يمكن اعتباره مشتركا مع جلسريد ثنائى آخر ولكن يختلف فى موضع الحامض الدهنى الذى يشغل الموضع ١ أو ٣.

والشكل التخطيطى التالى عبارة عن نموذج آخر للتعرف على توزيع الأحماض الدهنيه فى ميرستو بالميتو أوليين .



١ - يقوم انزيم الليباز المستخلص من Geotrichum candidum تخصصيا بازلة مجاميع الأوليل (cis -9) للجلسريدات الثلاثية .

٢ - الفصل الكروماتوجرافى للجسريدات الثنائية ١ ، ٢ - (٢ ، ٣) و ١ ، ٣ على الواح TLC باستخدام حامض سيليسيك كطور ثابت .

٣ - التحليل الفراغى التخصصي لفصل المكونات لنوعين من الجلسريدات الثنائية ١ ، ٢ (٢ ، ٣) - و ١ ، ٣ للتميز والتعرف على المتشابهات الست الأصلية للجلسريدات الثلاثية .