

Štruktúrna analýza lipidov

I. Hypotézy polohovej distribúcie mastných kyselín v triacylglyceroloch

ŠTEFAN SCHMIDT

Súhrn. V práci sa prehľadne opisujú rôzne hypotézy polohovej distribúcie mastných kyselín v triacylglycerolových molekulách. Čerpalo sa pritom z údajov literatúry a vlastných skúseností autora. Osobitne sa zdôraznila hypotéza distribúcie mastných kyselín spôsobom 1-náhodne-2-náhodne-3-náhodne a Vander Walova hypotéza 1,3-náhodne-2-náhodne.

Poukázalo sa aj na platnosť, resp. obmedzenie distribučných výpočtových hypotéz a výhody ostatne menovanej hypotézy pri štruktúrnej analýze olejov a tukov rastlinného pôvodu.

So vzrastaním množstva analytických údajov o zložení triacylglycerolových molekúl prírodných tukov a olejov sa zvyšovalo úsilie vyjadriť matematické formulácie odvodzujúce zloženie triacylglycerolov (TAG) zo zloženia mastných kyselín (MK). Pretože glycerol má tri hydroxylové funkčné skupiny a môže teda viazať tri acyly mastných kyselín, existujú veľké možnosti tvorby rôznych TAG izomérov. Daubert [1] odvodil matematické vzťahy na výpočet maximálneho počtu možných TAG molekulových štruktúr, vytvorených z n rôznych MK. Autor formuloval vzťahy v závislosti od analyticky rozlíšených TAG izomérov: n^3 – všetky, $(n^3 + n^2)/2$ – optické nie a $(n^3 + 3n^2 + 2n)/6$ – bez rozlíšenia TAG izomérov. Pri väčšom počte mastných kyselín v tuku (zvyčajne 5 až 15 rôznych MK) je počet rôznych TAG štruktúr veľmi vysoký. Najkomplexnejší prírodný tuk – tuk z kravského mlieka môže obsahovať až 142 druhov MK [2], ktoré sú schopné vytvoriť neuveriteľný počet (takmer 3 milióny) štruktúr TAG molekúl. Mastné kyseliny nie sú rozdelené v triacylglyceroloch náhodne (randomizovane), ale podľa určitých pravidiel enzýmovej biosyntézy TAG molekúl. V rámci určitých obmedzujúcich podmienok boli uvedené viaceré hypotézy mastných kyselín v triacylglyceroloch.

Ing. Štefan Schmidt, CSc., Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Chemickotechnologická fakulta SVST, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Distribučné hypotézy

A. Hypotéza distribúcie mastných kyselín spôsobom 1 – náhodne – 2 – náhodne – 3 – náhodne

Hypotézu navrhol r. 1962 Tsuda [3]. Predpokladá sa v nej, že tri rozdielne súbory MK sa oddelene distribuujú do strednej (sn-2) i krajných (sn-1, sn-3) polôh všetkých triacylglycerolových molekúl tuku. V rámci ich individuálnych polôh sa každý súbor MK distribuuje náhodne. Zastúpenie každej štruktúry TAG sa počíta zo všeobecnej rovnice:

$$\% \text{sn-XYZ} = (\text{mol. \% } X \text{ v sn-1}) (\text{mol. \% } Y \text{ v sn-2}) (\text{mol. \% } Z \text{ v sn-3}) \cdot 10^{-4}.$$

Uvažujúc tuk, ktorý sa skladá z kyseliny palmitovej (P), stearovej (St) a olejovej (O), množstvo monokyselinového triacylglycerolu PPP sa potom vypočíta podľa vzťahu:

$$\% \text{PPP} = (P_1)(P_2)(P_3) \cdot 10^{-4},$$

pričom indexy 1,2 a 3 reprezentujú mol % MK nájdenej v sn-1, sn-2 a sn-3 polohe TAG.

Tri polohové izoméry dikyselinového triacylglycerolu PPO sa počítajú:

$$\begin{aligned} \% \text{sn-PPO} &= (P_1)(P_2)(O_3) \cdot 10^{-4}, \\ \% \text{sn-OPP} &= (O_1)(P_2)(P_3) \cdot 10^{-4}, \\ \% \text{sn-POP} &= (P_1)(O_2)(P_3) \cdot 10^{-4}. \end{aligned}$$

Ak $P_1 \neq P_3$ alebo $O_1 \neq O_3$, potom enantioméry sn-PPO a sn-OPP budú prítomné v nerovnakých množstvách. Šesť polohových izomérov trikyselinového triacylglycerolu PStO sa vyjadria:

$$\begin{aligned} \% \text{sn-PStO} &= (P_1)(St_2)(O_3) \cdot 10^{-4}, \\ \% \text{sn-OStP} &= (O_1)(St_2)(P_3) \cdot 10^{-4}, \\ \% \text{sn-OPSt} &= (O_1)(P_2)(St_3) \cdot 10^{-4}, \\ \% \text{sn-POST} &= (P_1)(O_2)(St_3) \cdot 10^{-4}, \\ \% \text{sn-StOP} &= (St_1)(O_2)(P_3) \cdot 10^{-4}, \\ \% \text{sn-StPO} &= (St_1)(P_2)(O_3) \cdot 10^{-4}. \end{aligned}$$

Aplikácia tohto postupu na všetky možné permutácie a kombinácie troch MK poskytuje výpočtové riešenie TAG zloženia celkového tuku. Zásadnou podmienkou je tu znalosť polohového rozloženia MK v každej z troch možných polôh molekuly TAG.

B. Hypotéza distribúcie mastných kyselín spôsobom 1,3 – náhodne – 2 – náhodne

Hypotézu navrhol nezávisle Vander Wal [4] a Coleman s Fultonom [5] v rokoch 1960–1961. Predpokladá sa tu, že dva rozdielne súbory MK sa separátne a náhodne distribuujú do sn-1,3 a sn-2 polôh všetkých glycerolových molekúl v tuku. Pretože sn-1 a sn-3 polohy sú obe náhodne esterifikované z toho istého súboru, ich zloženie MK bude ekvivalentné. Z matematického hľadiska 1,3-náhodne-2-náhodne distribučná hypotéza je špeciálnym prípadom predchádzajúcej hypotézy, kde $X_1 = X_3$, $Y_1 = Y_3$, $Z_1 = Z_3$, atď.

Obsah každej štruktúry TAG sa počíta podľa vzťahu:

$$\% sn-XYZ = (\text{mol. \% } X \text{ v sn-1,3})(\text{mol. \% } Y \text{ v sn-2})(\text{mol. \% } Z \text{ v sn-1,3}) \cdot 10^{-4}.$$

Aplikáciou na už uvedený príklad vychádza pre výpočet obsahu štruktúry typu PPP:

$$\% PPP = (P_{1,3})^2(P_2) \cdot 10^{-4}, \quad \text{kde } P_{1,3} = P_1 = P_3.$$

Tri polohové izoméry dikyselínového triacylglycerolu PPO sa vypočítajú potom podľa vzťahov:

$$\% \beta\text{-PPO} = \text{sn-PPO} + \text{sn-OPP} = 2(P_{1,3})(P_2)(O_{1,3}) \cdot 10^{-4},$$

$$\% \beta\text{-POP} = (P_{1,3})^2(O_2) \cdot 10^{-4}$$

Označenie β sa vzťahuje na prípad, keď stredná MK je esterifikovaná na sn-2 polohu (β -polohu) a rozloženie dvoch ďalších MK do sn-1 a sn-3 polôh je neznáme. β teda špecifikuje zmes dvoch enantiomérov v akomkoľvek pomere. Pretože $P_1 = P_3$ a $O_1 = O_3$, enantioméry sú prítomné v zhodných množstvách a je účelné počítať iba ich celkový obsah. Šesť polohových izomérov trikyselínového triacylglycerolu PStO sa vypočíta podľa vzťahov:

$$\% \beta\text{-PStO} = \text{sn-PStO} + \text{sn-OStP} = 2(P_{1,3})(St_2)(O_{1,3}) \cdot 10^{-4},$$

$$\% \beta\text{-OPSt} = \text{sn-OPSt} + \text{sn-StPO} = 2(O_{1,3})(P_2)(St_{1,3}) \cdot 10^{-4},$$

$$\% \beta\text{-POSt} = \text{sn-POSt} + \text{sn-StOP} = 2(P_{1,3})(O_2)(St_{1,3}) \cdot 10^{-4}.$$

Distribúcia MK podľa hypotézy 1,3-náhodne-2-náhodne sa obvykle počíta z údajov získaných po hydrolýze celkových TAG s pankreatickou lipázou.

C. Iné hypotézy distribúcie mastných kyselín

Okrem už uvedených distribučných hypotéz sa zriedkavo používajú kvôli celkovému zjednodušeniu aj iné teórie, ktoré napr. diferencujú iba nasýtené a nenasýtené MK, prípadne neuvažujú vôbec polohové izoméry TAG.

1. *Distribúcia mastných kyselín spôsobom 1,2,3-náhodne.* Navrhol ju už roku 1941 Longenecker [6]. Podľa nej sa jeden súbor MK náhodne esterifikuje do všetkých troch polôh glycerolovej molekuly. Zloženie MK v sn-1, sn-2 a sn-3 polohách triacylglycerolov bude takto rovnocenné. Z matematického hľadiska táto hypotéza predstavuje špeciálny prípad 1-náhodne-2-náhodne-3-náhodne hypotézy, kde $X_1 = X_2 = X_3$, $Y_1 = Y_2 = Y_3$, $Z_1 = Z_2 = Z_3$, atď. Obsah každého typu TAG sa potom vypočíta:

$$\% \text{ sn-XYZ} = (\text{mol. \% } X \text{ v TAG})(\text{mol. \% } Y \text{ v TAG})(\text{mol. \% } Z \text{ v TAG}) \cdot 10^{-4}.$$

Aj keď je v prírodných tukoch v rôznych polohách TAG rôzne zastúpenie MK, nachádza hypotéza uplatnenie pri určovaní zloženia syntetických TAG zmesí, ktoré majú úplne náhodne esterifikované acylové skupiny (do rovnováhy preesterifikované – randomizované TAG molekuly).

2. *Distribúcia mastných kyselín spôsobom obmedzene náhodne.* Kartha [7] predpovedal, že nasýtené MK (NaMK,S) a nenasýtené MK (NeMK,U) sú v prírodných tukoch rozmiestnené podľa distribučného kľúča 1,2,3-náhodne, ale s obmedzením, že obsah SSS zostáva nízky pri kvapalných olejoch. Formy SSS (trinasýtená molekula TAG) sa stanovia experimentálne a pre zostávajúce S a U sa predpokladá náhodná distribúcia na štrukturálne tvary SSU, SUU a UUU. Presné matematické formulácie neskôr odvodil Hammond a Jones [8].

% SSS = experimentálne určené,

$$\% \text{ SSU} = 1,5 \{ 100 + S - 2(\text{SSS}) - [10^4 - 3S^2 + 2000S + 4S(\text{SSS}) - 400(\text{SSS})]^{0.5} \}$$

$$\% \text{ SUU} = 3S - 3(\text{SSS}) - 2(\text{SSU}),$$

$$\% \text{ UUU} = 100 + 2(\text{SSS}) + \text{SSU} - 3S.$$

Distribučná hypotéza obmedzene náhodne sa dnes zriedkakedy používa, lebo nerozlišuje individuálne MK a neposkytuje možnosť určovať polohové izoméry.

3. *Hilditchova distribučná hypotéza*. Hilditch a kol. [9] v nej vyjadrili zreteľnú tendenciu MK vytvárať kombinované štruktúry TAG molekúl v prírodných tukoch. V hypotéze sa predpokladá, že individuálne MK sa umiestňujú do TAG molekúl najvoľnejším možným spôsobom. Pôvodná forma bez podrobnej matematickej interpretácie sa definovala podľa kľúča:

- ak $S < 15 \%$, S sa vyskytujú iba ako SXX,
- ak $S > 35 \%$, S sa nachádza min. raz v každej TAG molekule,
- ak $35 \% < S < 65 \%$, budú prítomné SSX,
- ak $S > 70 \%$, budú prítomné iba SSX a SSS.

Neskôr Dutton a kol. [10] zaviedol spresňujúcu matematickú formuláciu:

- ak $0 \% < S < 33,3 \%$ budú prítomné iba XXX a SXX,
- ak $33,3 \% < S < 66,7 \%$, budú prítomné iba SXX a SSX,
- ak $66,7 \% < S < 100 \%$, budú prítomné iba SSX a SSS.

Výpočty sa môžu aplikovať iba na dvojzložkové sústavy a nepostihujú polohové izoméry.

V literatúre sú opísané i mnohé ďalšie, menej presné alebo chybné hypotézy. Medzi ne patrí napr. Youngsova hypotéza, monokyselinová hypotéza, hypotéza 1-náhodne-2, 3-náhodne a ďalšie. Ani jedna z nich neposkytuje hodnoverné výsledky.

D. Platnosť distribučných hypotéz

Pretože každá hypotéza sa opiera o skutočnosť, že zloženie TAG molekúl je funkciou zloženia MK, dajú sa tieto aplikovať na prírodné zmesi v týchto prípadoch:

- pri biosyntéze TAG molekúl je zloženie dodávaných substrátových MK rovnaké pre všetky bunky producentov,
- metabolické dráhy biosyntézy TAG sú vo všetkých bunkách zhodné.

Z uvedeného vyplýva, že distribučné hypotézy sa môžu použiť iba pre prírodné tuky homogénneho pôvodu. Na základe mnohých porovnaní TAG zloženia určeného experimentálne a výpočtom sa všeobecne usudzuje, že štruktúry TAG molekúl olejnatých rastlinných semien obsahujúcich iba bežné MK (16:0, 18:0, 18:1, 18:2 a 18:3) sú v tesnej korelácii s 1,3-náhodne-2-náhodne distribučnou hypotézou [11]. Distribučné teórie sú menej presné pre TAG živočíšneho pôvodu pre ich často nehomogénny pôvod.

Litchfield [12] zhrňuje platnosť distribučných hypotéz biosyntézy TAG molekúl prírodných tukov takto:

1. Hypotéza 1,3-náhodne-2-náhodne poskytuje takmer presné určenie TAG zloženia tukov semien obsahujúcich iba bežné MK, pričom sa nerozlišujú enantioméne TAG.
2. Hypotéza 1-náhodne-2-náhodne-3-náhodne môže poskytnúť TAG zloženie živočíšnych tukov.
3. Pre iné prírodné zmesi TAG obe predchádzajúce hypotézy poskytujú iba hrubý obraz prítomných štruktúr TAG. Vypočítané TAG štruktúry môžu však poskytovať cennú orientačnú informáciu, hoci nie sú porovnateľné s výsledkami priamej analýzy.

Záver

Z uvedeného vyplýva, že z praktického hľadiska najväčšie uplatnenie z uvedených hypotéz polohovej distribúcie mastných kyselín v triacylglyceroloch má distribúcia spôsobom 1,3-náhodne-2-náhodne. Táto hypotéza dáva výborné výsledky predovšetkým pre nemodifikované tuky a oleje rastlinného pôvodu. Zložitosť riešenia TAG štruktúr je v optimalizácii enzýmovej deacylačnej metódy s využitím pankreatickej lipázy a jej kombinácii s chromatografickými separačnými technikami. Analytické aspekty štruktúrnej analýzy triacylglycerolov budú podrobne opísané v [13].

Literatúra

- [1] DAUBERT, B. F., J. Am. Oil Chem. Soc., 26, 1949, s. 556.
- [2] JENSEN, R. G. et al., J. Dairy Sci., 50, 1967, s. 119.
- [3] TSUDA, S., Yukagaku, 11, 1962, s. 408.
- [4] VANDER WAL, R. J., J. Am. Oil Chem. Soc., 37, 1960, s. 18.
- [5] COLEMAN, M. H. – FULTON, W. C., Enzymes of Lipid Metabolism. Oxford, 1961.
- [6] LONGENECKER, H. E., Biol. Symp., 5, 1941, s. 99.
- [7] KARTHA, A. R. S., J. Am. Oil Chem. Soc., 30, 1953, s. 326.
- [8] HAMMOND, E. G. – JONES, G. V., J. Am. Oil Chem. Soc., 37, 1960, s. 376.
- [9] HILDITCH, T. P – WILLIAMS, P. N.: The Chemical Constitution of Natural Fats. 4th ed. London, 1964.
- [10] DUTTON, H. J. – LANCASTER, C. R. – BREKKE, O. L., J. Am. Oil Chem. Soc., 27, 1950, s. 25.
- [11] KOMAN, V.: Chémia a technológia tukov I. Bratislava, Chemickotechnologická fakulta SVŠT 1982. Skriptá.
- [12] LITCHFIELD, C.: Analysis of Triglycerides. New York–London, 1972.
- [13] SCHMIDT, Š. – BYSTRICKÁ, M., Bull. PV (v príprave).

Структурный анализ липидов

I. Гипотезы пространственного распределения жирных кислот в триацилглицеролах

Резюме

В работе наглядно описываются разные гипотезы пространственного распределения жирных кислот в триацилглицерольных молекулах. При этом источником были данные из литературы и собственный опыт автора. Особое внимание уделялось гипотезе распределения жирных кислот способом 1-случайно-2-случайно-3-случайно и Вандер Валовой гипотезе 1,3-случайно-2-случайно.

Показалось и на действие, а также ограничение распределительных вычислительных гипотез и выгоды данной гипотезы при структурном анализе масел и жиров растительного происхождения.

Structural analysis of lipids

I. Hypotheses of position distribution of fatty acids in triacylglycerols

Summary

Various hypotheses of fatty acids position distribution in triacylglycerol molecules are described in this paper. Information was gathered from literary sources and own author's experiences. The hypothesis of fatty acids distribution using the way 1-random-2-random-3-random and Vander Wal's hypothesis 1,3-random-2-random were here especially stressed.

The acceptance or limits of distributive computer hypothesis were described, as well as the advantages of the Vander Wal's hypothesis in the structural analysis of oils and fats originated from vegetables.