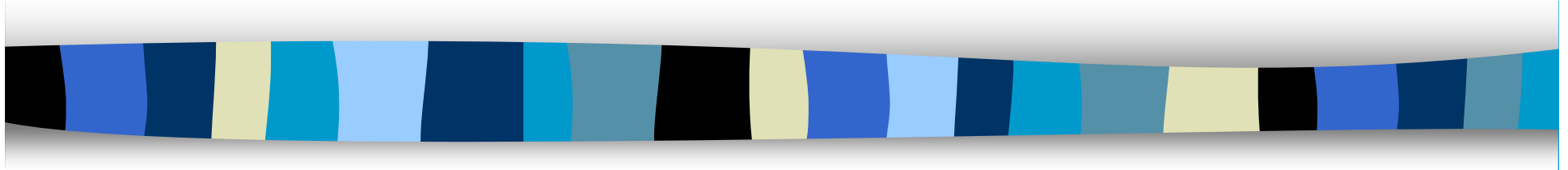


Φροντιστήριο Βιοχημείας Ι



Ε.Φραγκοπούλου
Επίκουρη καθηγήτρια

Μελέτη λιποειδών

Μέθοδοι
απομόνωσης

εκχύλιση

Μέθοδοι
προσδιορισμού

Ζύγιση

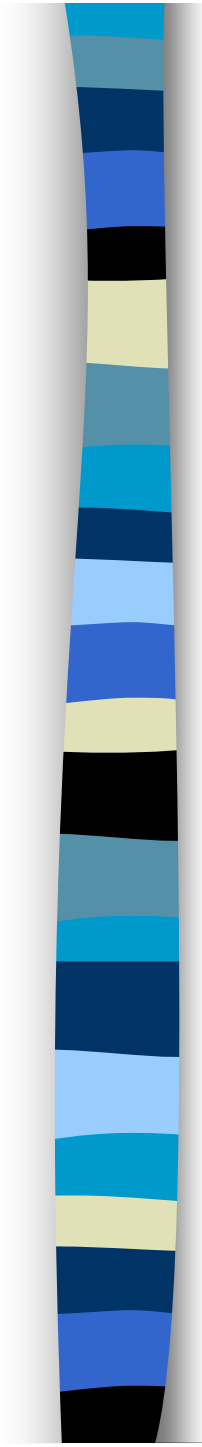
Χημικοί προσδιορισμοί

Τεχνικές
διαχωρισμού

καταβύθιση

εκχύλιση

χρωματογραφία



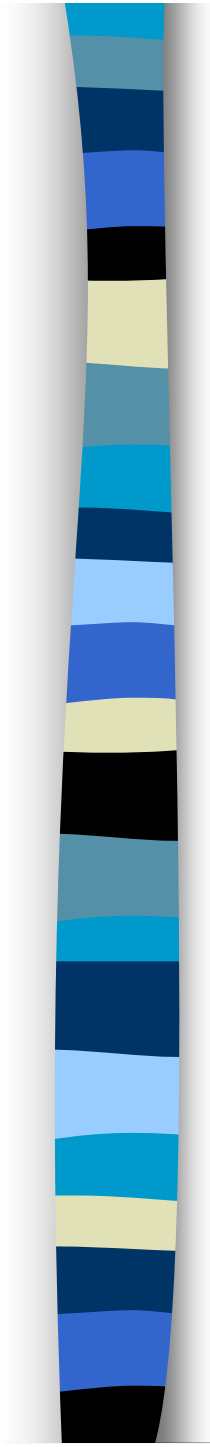
Μέθοδοι προσδιορισμού λιποειδών

Ζύγιση => μετά την εκχύλιση εξατμίζεται ο διαλύτης και ζυγίζεται μέχρι σταθερού βάρους

Χημικοί προσδιορισμοί

προσδιορίζονται ποσοτικά συγκεκριμένα χημικά στοιχεία ή ομάδες των λιποειδών

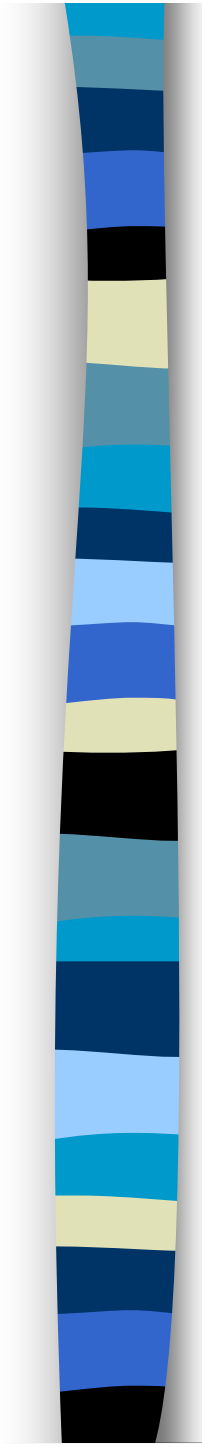
- Φωσφόρος
- Άζωτο
- Εστέρες
- Σάκχαρα
- Αμινομάδες
- Γλυκερόλη
- Θειικές ομάδες κ.λ.π.



Μέθοδοι προσδιορισμού λιποειδών

Ζύγιση

Για τον υπολογισμό των ολικών λιποειδών σε ένα δείγμα ο πιο απλός τρόπος είναι η εκχύλιση τους, η εξατμηση του διαλύτη εκχύλισης και η ζύγιση μέχρι σταθερού βάρους.



Μέθοδοι προσδιορισμού λιποειδών

Χημικοί προσδιορισμοί

Πραγματοποιούνται είτε

- στο εκχύλισμα
- στα επιμέρους κλάσματα του διαχωρισμού τους

Με τους χημικούς προσδιορισμούς προσδιορίζονται ποσοτικά συγκεκριμένα χημικά στοιχεία ή ομάδες των λιποειδών, όπως φωσφόρος, άζωτο, εστέρες, σάκχαρα, αμινομάδες, γλυκεριναιθερικές ομάδες, γλυκερόλη, θειικές ομάδες κ.λ.π.

Μέθοδοι προσδιορισμού λιποειδών

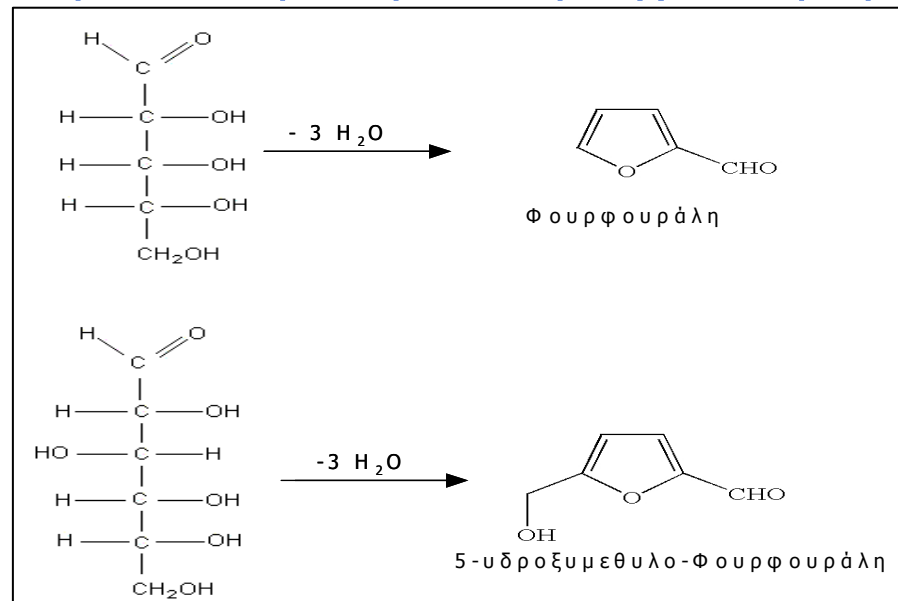
Προσδιορισμός φωσφόρου → φωσφολιποειδή

- καύση του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανο παρουσία υπερχλωρικού οξέος.
- προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ σχηματίζει φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_3\text{Mo}_{12}\text{PO}_{40} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- το φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο ανάγεται προς κυανούν του φωσφομολυβδαινίου του με προσθήκη αμινοναφθολοσουλφονικού οξέως και θέρμανση σε όξινο περιβάλλον.
- το προϊόν που παράγεται είναι έγχρωμο και φωτομετρείται στα 820 nm.

Μέθοδοι προσδιορισμού λιποειδών

Προσδιορισμός σακχάρων $\longrightarrow$ γλυκολιποειδή

- προσθήκη πυκνού θειικού οξέος όπου οι εξόζες σχηματίζουν ω-οξυμεθυλοφουρφουρόλη
- η ω-οξυμεθυλοφουρφουρόλη με φαινόλη δίνει έγχρωμη ένωση που απορροφά στα 490 nm
- η προσθήκη του πυκνού θειικού οξέος έχει παράλληλα σαν αποτέλεσμα και την υδρόλυση τυχόν παραγώγων των εξοζών.



Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών

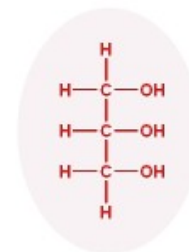
Προσδιορισμός γλυκερόλης → ακυλογλυκερόλες

- Αλκαλική υδρόλυση των εστέρων των λιπαρών οξέων με αποτέλεσμα να ελευθερώνεται η γλυκερόλη
(προσθήκη υδροξειδίου του καλίου και θέρμανση στους 70°C, σε αυτές τις συνθήκες δεν επηρεάζονται οι φωσφοεστερικοί δεσμοί)

- Ο προσδιορισμός της γλυκερόλης που προκύπτει γίνεται με διάσπασή της σε φορμαλδεΰδη με προσθήκη υπερωδικού νατρίου

- Η φορμαλδεΰδη αντιδρά με χρωμοτροπικό οξύ δίνει έγχρωμη ένωση που απορροφά στα 570 nm

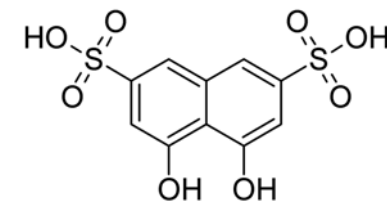
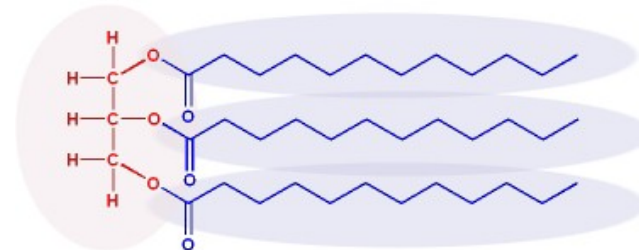
Glycerol



A "free" Fatty Acid



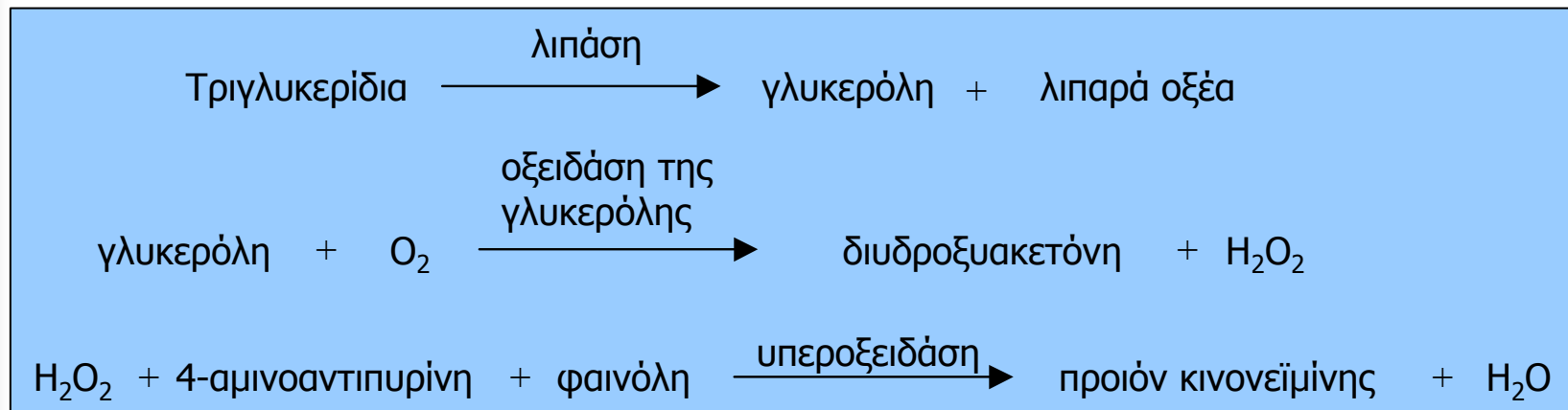
Triglyceride



χρωμοτροπικό οξύ

Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών

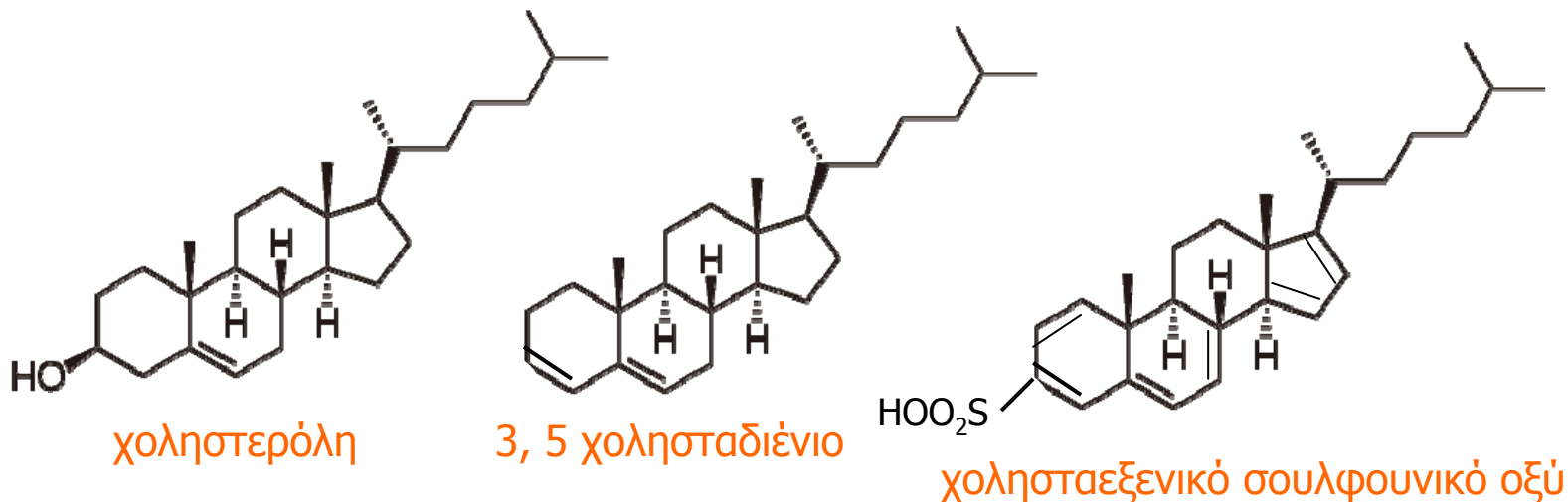
Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων ενζυμικά



Μέθοδοι προσδιορισμού λιποειδών

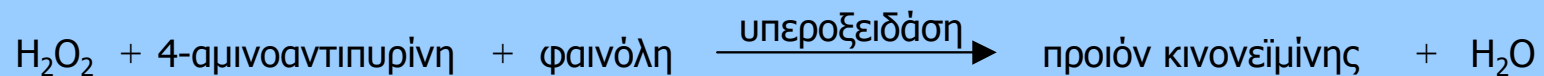
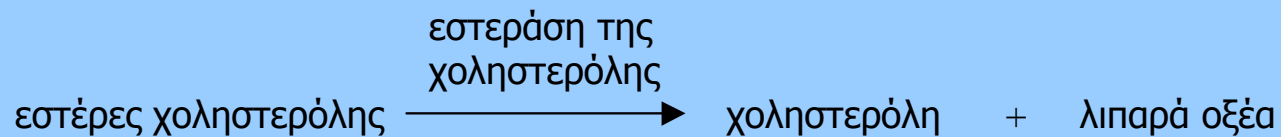
Προσδιορισμός χοληστερόλης χημικά

- αφυδάτωση της χοληστερόλης με οξικό οξύ και οξικό ανυδρίτη προς παραγωγή 3,5-χολησταδιενίου
- η προσθήκη πυκνού θειικού οξέος οδηγεί στην οξειδωση και την παραγωγή χολησταεξενικού σουλφονικού οξέος που απορροφά στα 410 nm



Μέθοδοι προσδιορισμού λιποειδών

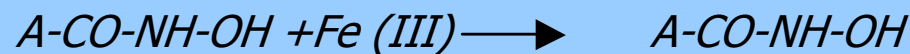
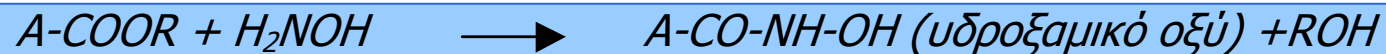
Προσδιορισμός χοληστερόλης ενζυμικά

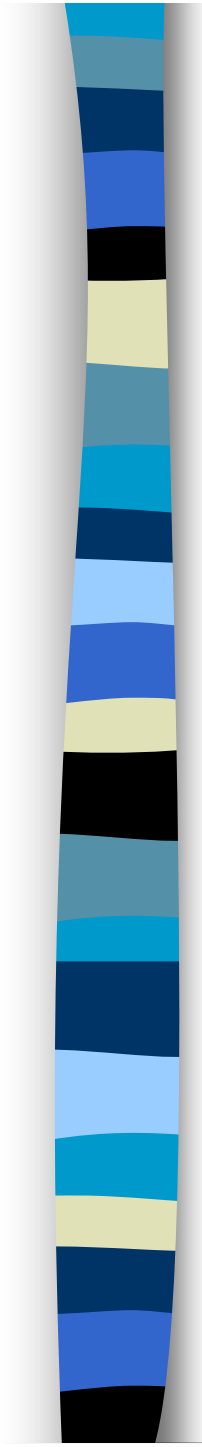


Μέθοδοι προσδιορισμού λιποειδών

Προσδιορισμός εστέρων

- με αλκαλική υδρόλυση της λιπαρής αλυσίδας του οξέως (με τη μορφή αλκοόλης) παρουσία υδροξυλαμίνης
- Το υδροξαμικό οξύ που σχηματίζεται αντιδρά με αιθανολικό διάλυμα υπερχλωρικού σιδήρου και υπερχλωρικού οξέος. Το χρώμα που προκύπτει φωτομετρείται στα 530 nm



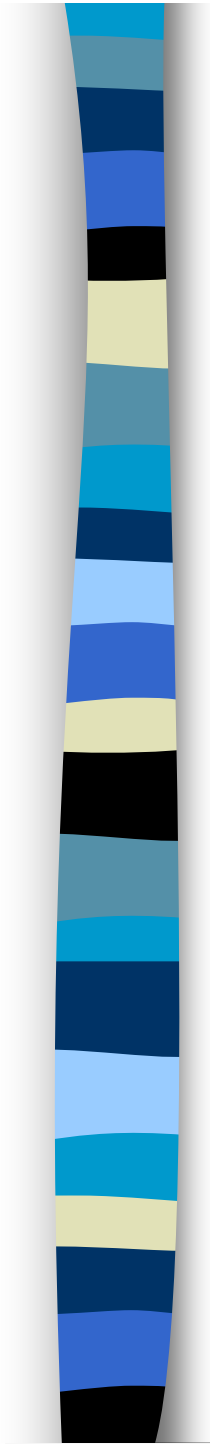


Μέθοδοι προσδιορισμού λιποειδών

Προσδιορισμός ολικών λιπαρών οξέων

- Υδρόλυση όλων των λιπαρών αλυσίδων από τα μόρια των λιποειδών
- Οι ελεύθερες αλυσίδες των λιπαρών οξέων μετατρέπονται στη συνέχεια σε μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων
- Ο προσδιορισμός εστέρων στη συνέχεια μας δίνει την ποσότητα των μεθυλεστέρων που είναι ανάλογη των λιπαρών αλυσίδων

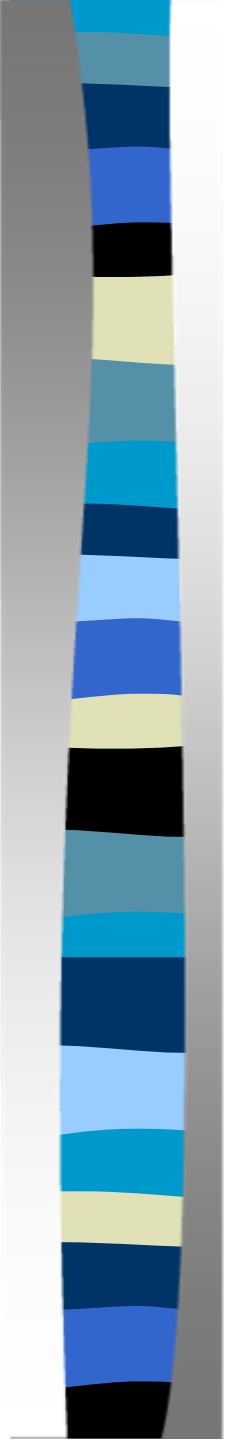
Μετά τη δημιουργία των μεθυλεστέρων μπορεί να πραγματοποιηθεί αέριος χρωματογραφία (GC) για να βρεθεί όχι μόνο η ποσότητα των λιπαρών οξέων αλλά και το είδος τους



Τεχνικές Διαχωρισμού των λιποειδών

Καταβύθιση

- Διαφορετική διαλυτότητα των λιποειδών στον επιλεγμένο οργανικό διαλύτη
(παγωμένη ακετόνη => καταβύθιση των φωσfolιποειδών)



Εκχύλιση

Διαχωρισμός ενός στερεού ή υγρού από ένα μίγμα (στερεό ή υγρό) με τη χρήση υγρού διαλύτη

- εκχύλιση στερεού-υγρού (*solid-liquid extraction*)

το εκχυλιζόμενο συστατικό περιέχεται σε στερεό μίγμα και η παραλαβή του γίνεται με υγρό διαλύτη

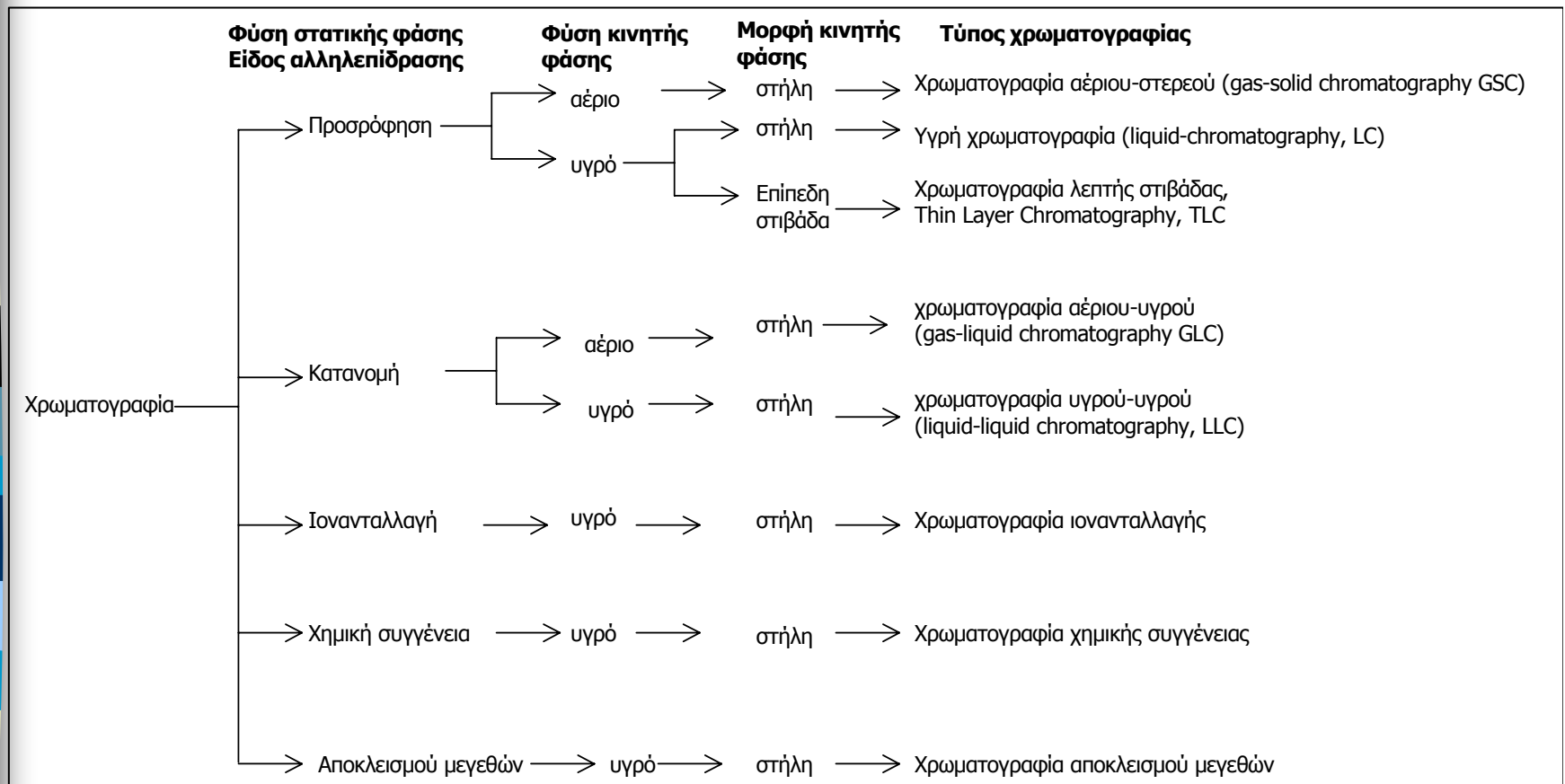
- εκχύλιση υγρού-υγρού (*liquid-liquid extraction*)

το εκχυλιζόμενο συστατικό περιέχεται σε υγρό μίγμα και η παραλαβή του γίνεται με υγρό διαλύτη

η διαλυτότητα του εκχυλιζόμενου συστατικού στον υγρό διαλύτη πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτή στο εκχυλιζόμενο μίγμα

Μέθοδοι διαχωρισμού λιποειδών

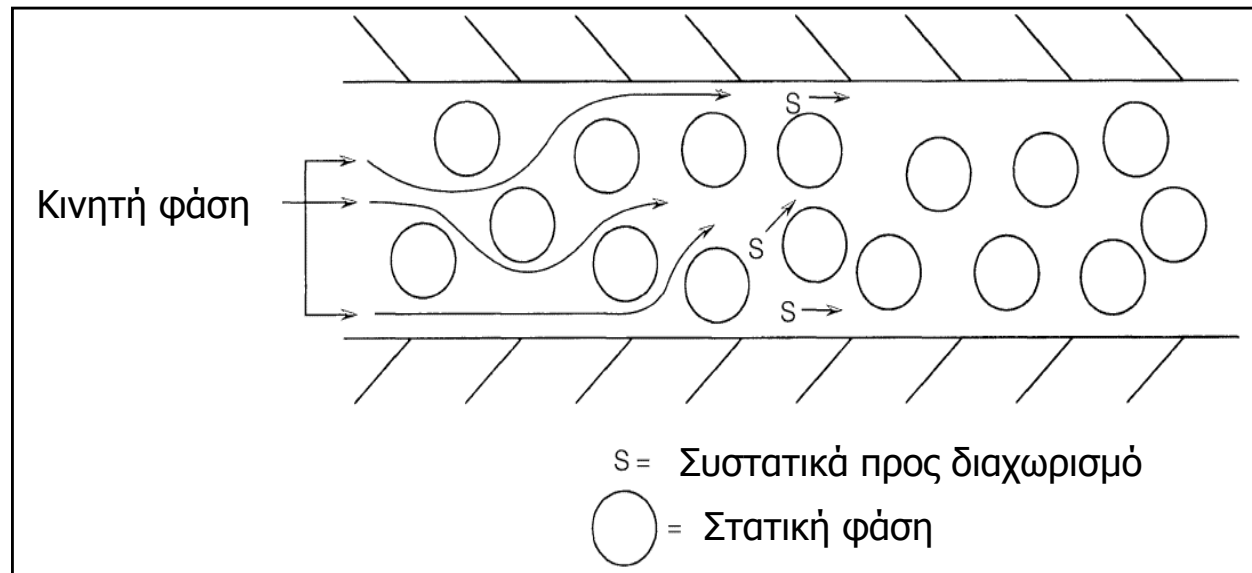
Χρωματογραφία

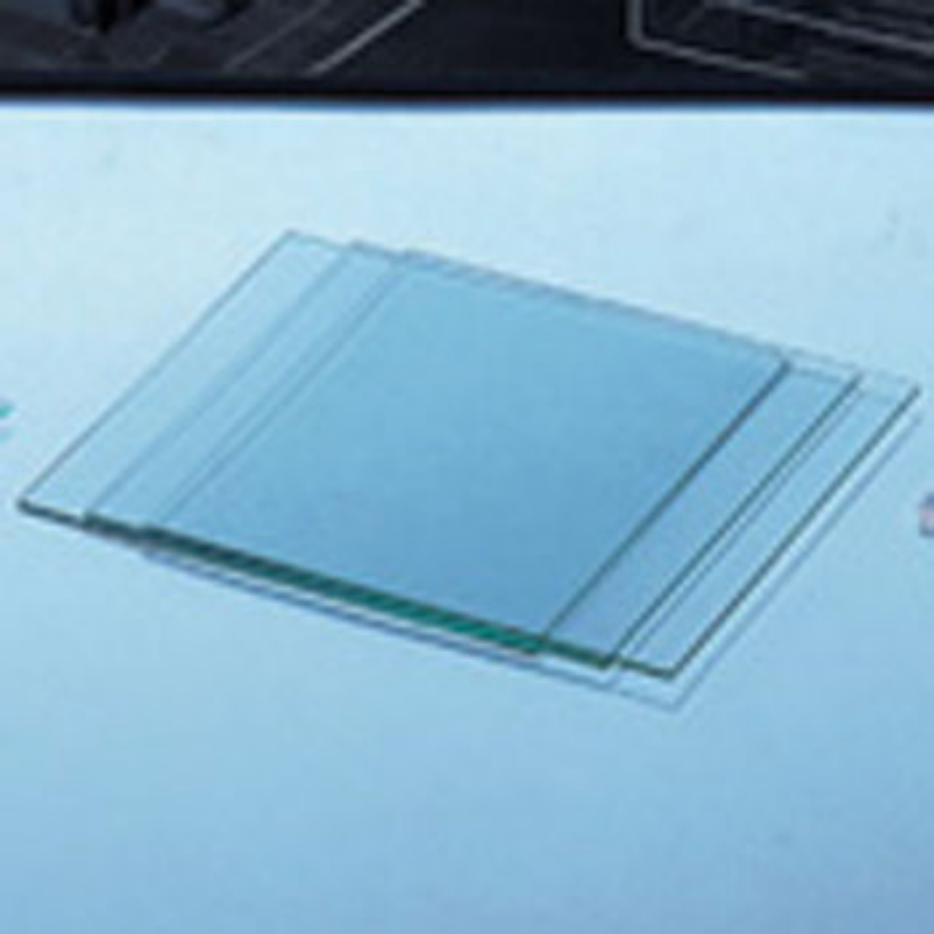


Τεχνικές Διαχωρισμού των πρωτεϊνών

Χρωματογραφία

Περιλαμβάνει μια πληθώρα τεχνικών που στόχο έχουν να διαχωρίσουν τα μίγματα στα επιμέρους συστατικά τους



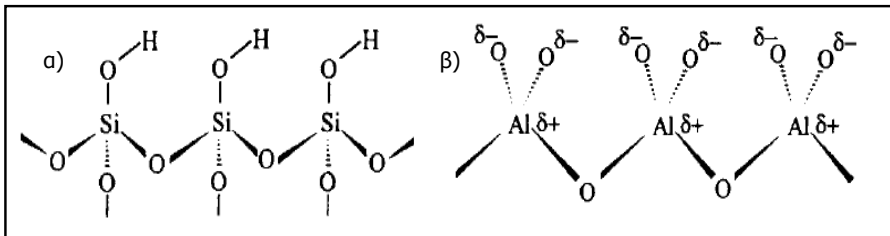




Μέθοδοι διαχωρισμού λιποειδών

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Στατική φάση



silica ή silica gel ή silicic acid

- αναμιγνύεται το υλικό σε νερό και ανακατεύεται ώστε να δημιουργηθεί μια ομοιόμορφη πηκτή η οποία στρώνεται πάνω σε γυάλινες πλάκες και αφήνεται να στεγνώσει

- πριν το διαχωρισμό απαιτείται η «ενεργοποίηση» των πλακών δηλαδή η θέρμανση τους ώστε να φύγει το νερό που έχει δεσμευτεί στις ενεργές ομάδες.

Κινητή φάση

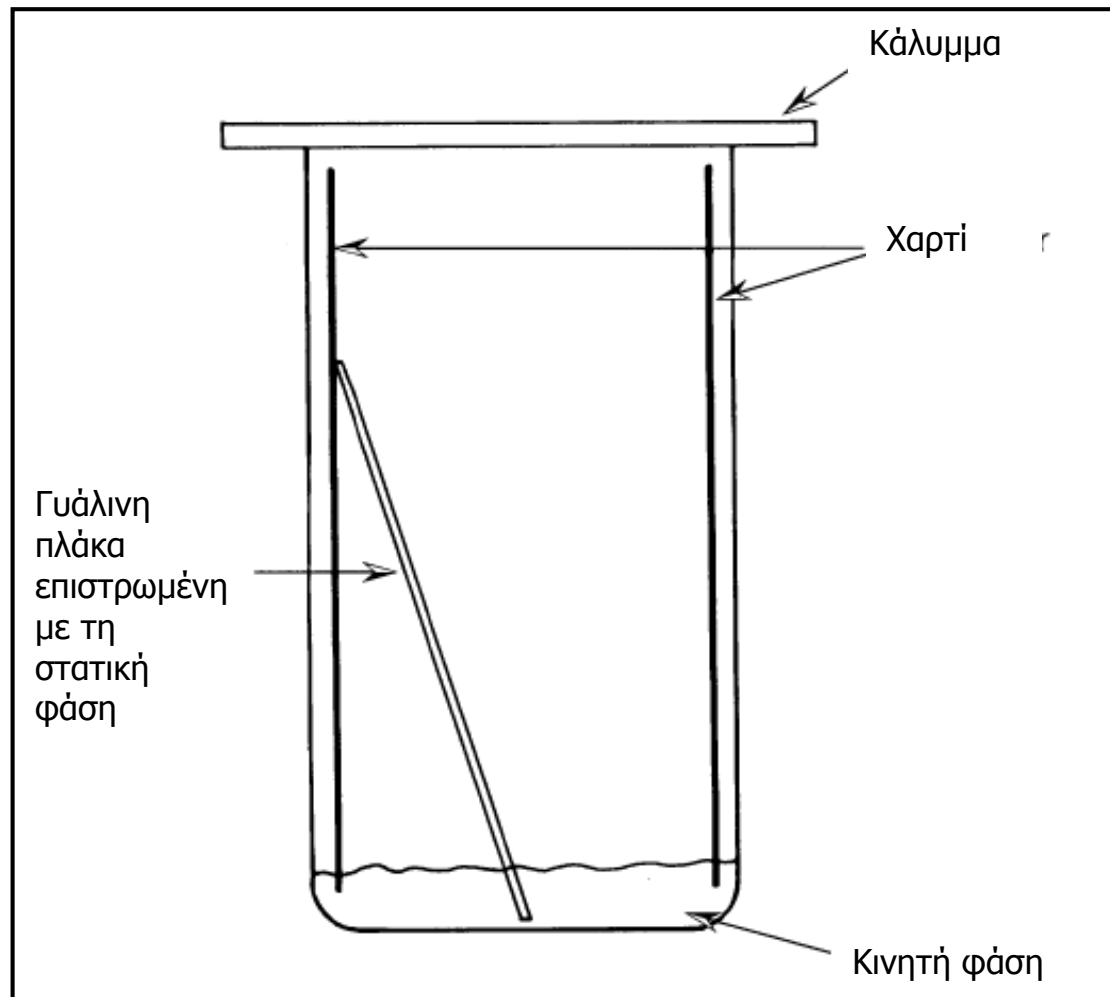
αποτελείται από συνδυασμό διαλυτών διαφορετικής πολικότητας

πολικότητα →

εξάνιο > βενζόλιο > ακετονιτρίλιο > διαιθυλαιθέρας > χλωροφόρμιο > οξικό οξύ > βουτανόλη > προπανόλη > ακετόνη > μεθανόλη > νερό

Μέθοδοι διαχωρισμού λιποειδών

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)





Μέθοδοι διαχωρισμού λιποειδών

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

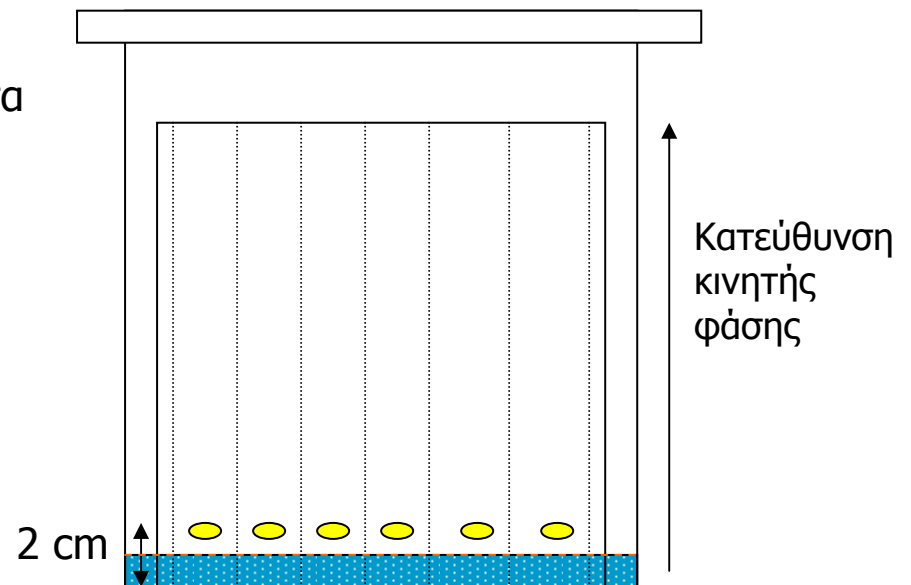
Προετοιμασία δείγματος

Εξατμίζεται και αναδιαλύεται σε μικρό όγκο πτητικού διαλύτη

Διαδικασία ανάπτυξης

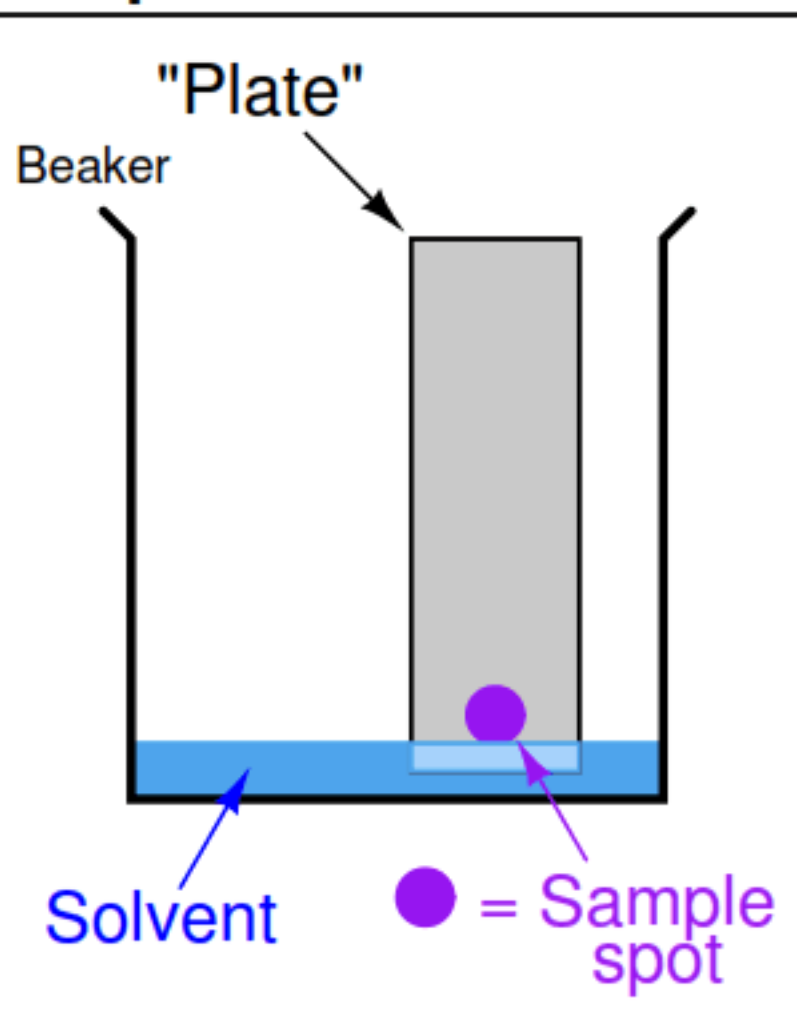
Μια μικρή σταγόνα από το δείγμα τοποθετείται πάνω στη στατική φάση και αφήνεται να εξατμιστεί ο διαλύτης του δείγματος. Επαναλαμβάνεται αυτό μέχρι να τοποθετηθεί ικανοποιητική ποσότητα δείγματος.

Στη συνέχεια τοποθετείται η πλάκα μέσα σε κλειστό προ-εξισορροπημένο θάλαμο που περιέχει το σύστημα ανάπτυξης.

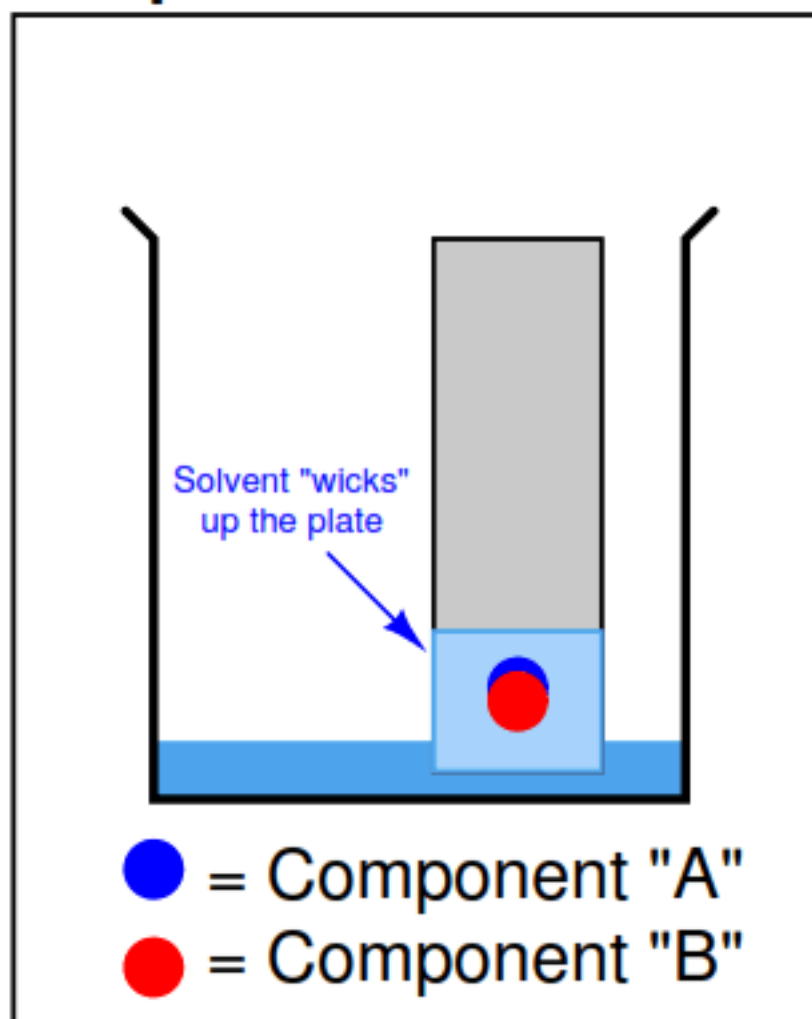


Thin-layer chromatography

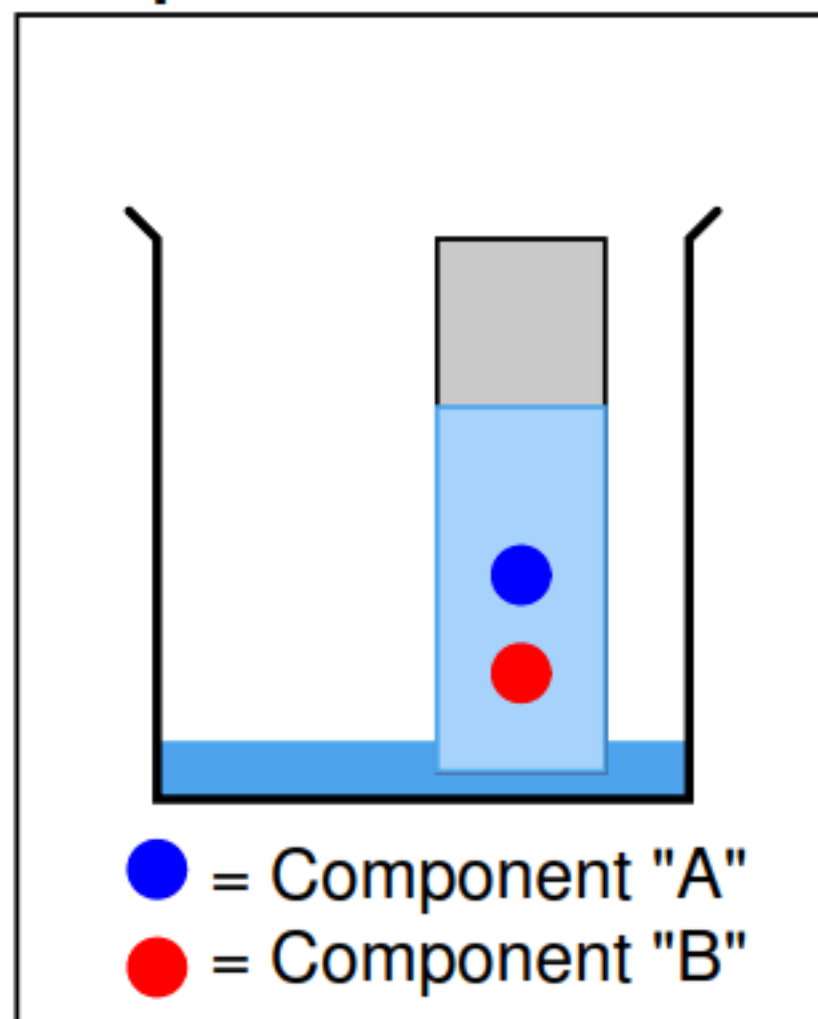
Step 1



Step 2

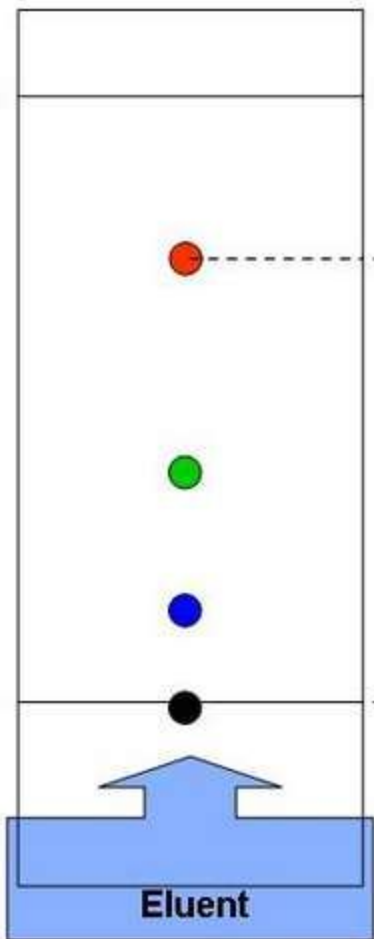


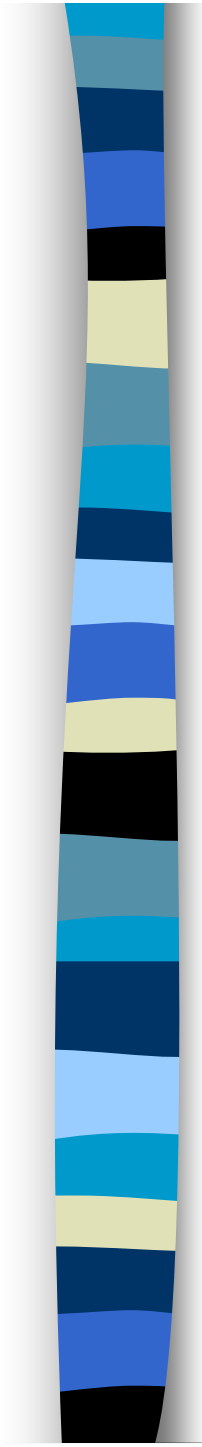
Step 3



maximum
distance the
eluent
traveled

distance
the spot
traveled





Μέθοδοι διαχωρισμού λιποειδών

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

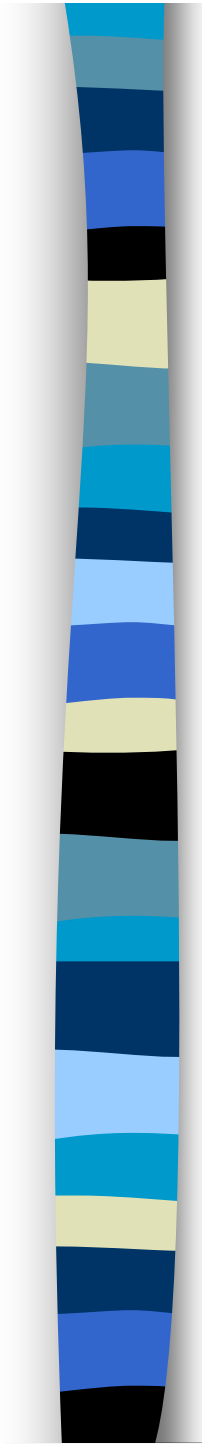
Θεωρία διαχωρισμού

Βασίζεται στη διαφορετική πολικότητα των συστατικών

Όταν το δείγμα τοποθετείται σε μια πολική στατική φάση (χρωματογραφία κανονικής φάσης, normal phase) τα συστατικά θα δημιουργήσουν δεσμούς με τις πολικές ομάδες.

Όσο πιο πολικό είναι ένα συστατικό τόσο πιο ισχυροί δεσμοί θα δημιουργηθούν και αντίστροφα.

Κατά τη διέλευση της κινητής φάσης τα μόρια του διαλύτη θα ανταγωνίζονται με τα συστατικά του μίγματος για τις θέσεις πρόσδεσης πάνω στη στατική φάση. **Τα συστατικά που έχουν προσροφηθεί ασθενώς στη στατική φάση θα εκτοπισθούν από τα μόρια του διαλύτη (κινητή φάση) πιο εύκολα και θα προχωρήσουν πιο γρήγορα κατά μήκος της στατικής φάσης για να βρουν νέες θέσεις πρόσδεσης.**



Μέθοδοι διαχωρισμού λιποειδών

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Ανίχνευση

Μετά το τέλος της ανάπτυξης τα συστατικά του μίγματος έχουν διαχωριστεί κατά μήκος της πλάκας (ή του χαρτιού) δημιουργώντας διαφορετικές κηλίδες. Οι κηλίδες τους όμως δεν είναι εμφανείς παρά μόνο εάν είναι έγχρωμες ενώσεις. Η ανίχνευση τους μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους.

- Τοποθέτηση της πλάκας σε θάλαμο που περιέχει ατμούς ιωδίου. Το ιώδιο προσροφάται σχεδόν σε όλες τις οργανικές ενώσεις (περισσότερο στις ακόρεστες) και δίνει χαρακτηριστικό καφέ χρώμα στις κηλίδες.
- Χρήση αντιδραστηρίων ψεκασμού

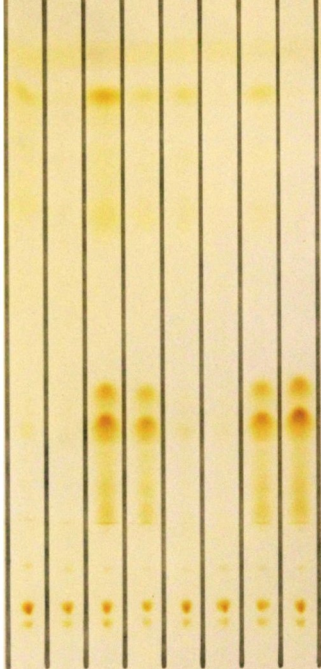
Αντιδραστήριο ψεκασμού	Ομάδα που ανιχνεύεται
Μολυβδαινικό αμμώνιο	Φωσφορικές ομάδες
Νινυδρίνη	Αμινο-ομάδες
Ναφθόλη	Σάκχαρα
Χλωριούχος σίδηρος	Χοληστερόλη

TAG

DAG

FFA

PC



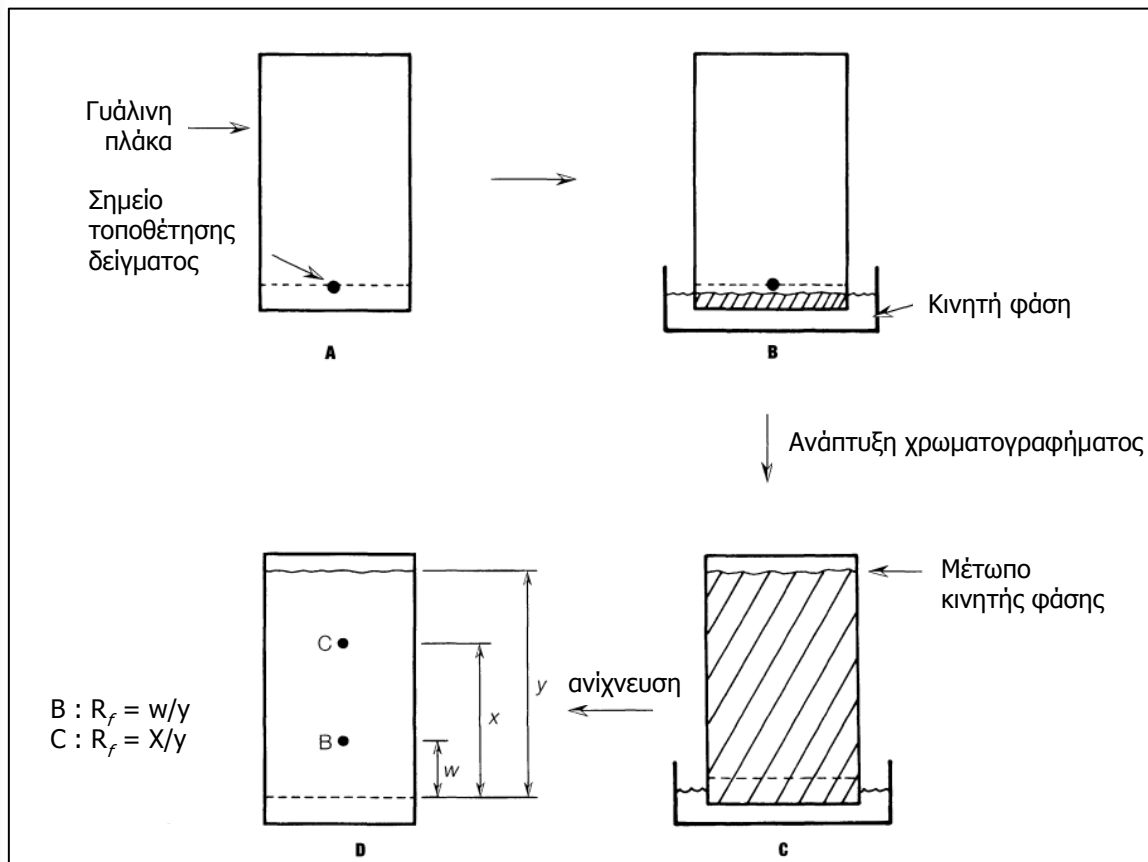
Μέθοδοι διαχωρισμού λιποειδών

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Ποιοτική ανάλυση των κηλίδων

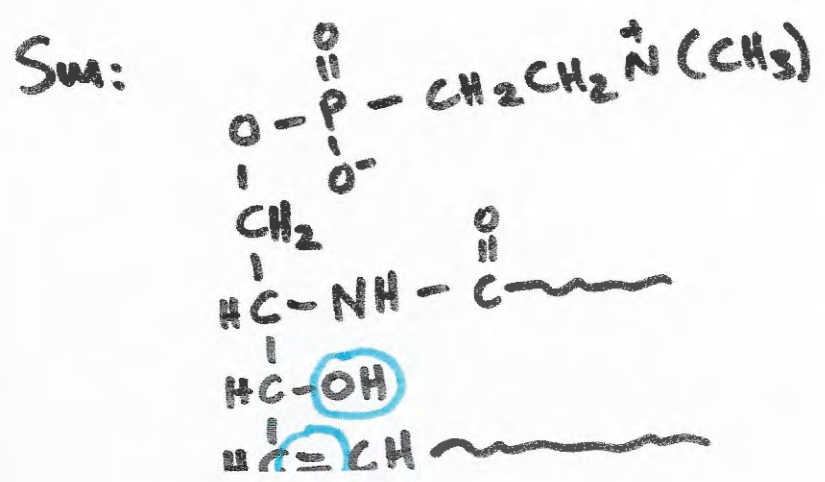
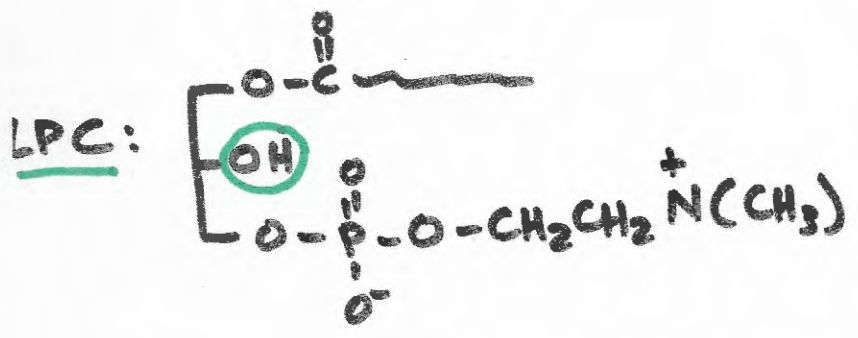
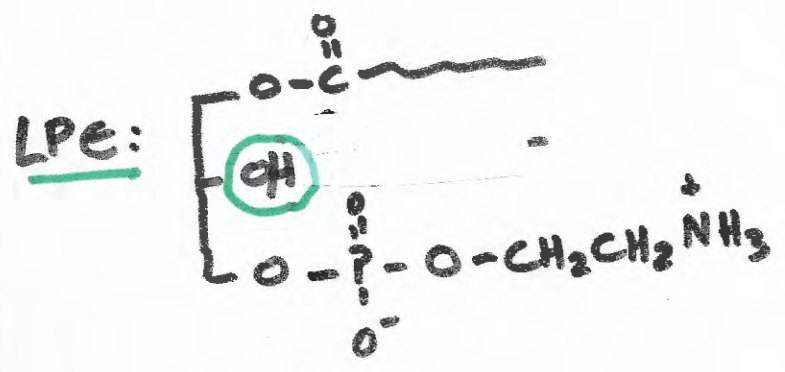
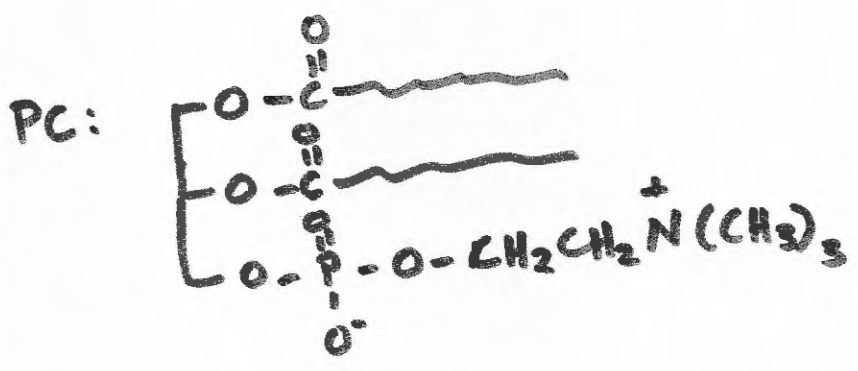
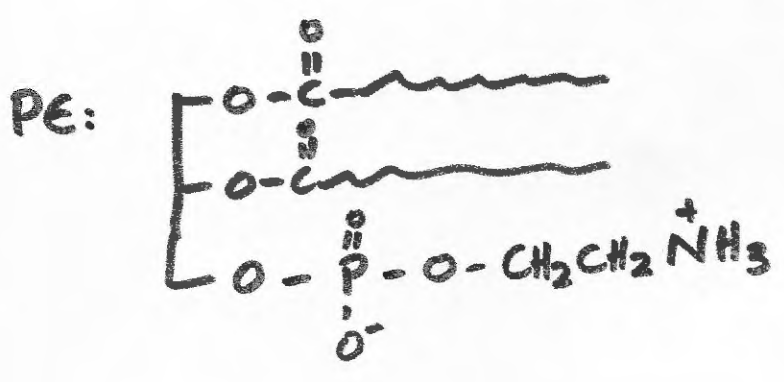
Συντελεστής R_f (retention factor)

R_f = απόσταση που διένυσε το δείγμα / απόσταση που διένυσε η κινητή φάση

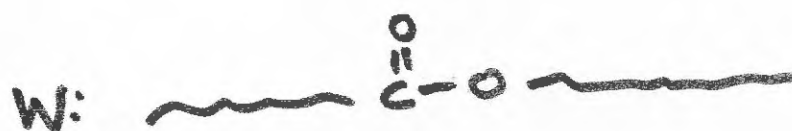
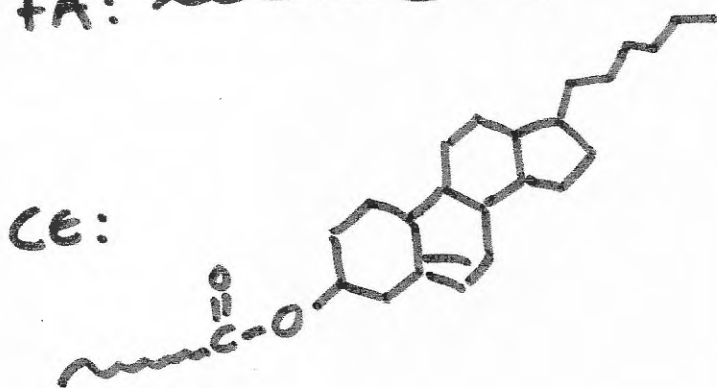
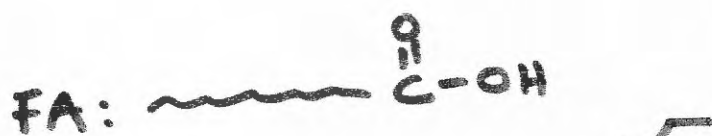
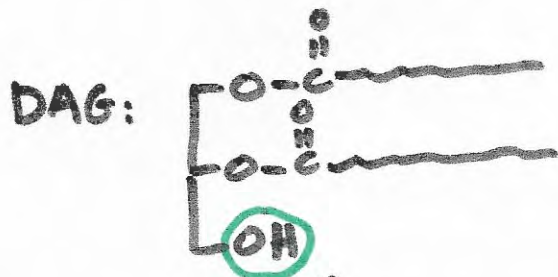
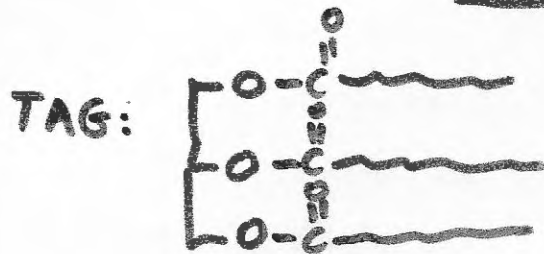


Η τοποθέτηση παράλληλα με το δείγμα πρότυπων ενώσεων στη χρωματογραφική πλάκα δίνει τη δυνατότητα της ταυτοποίησης ουσιών συγκρίνοντας τις τιμές R_f των άγνωστων συστατικών με τις τιμές R_f των πρότυπων ενώσεων.

ΠΟΛΙΚΑ ΛΙΠΟΕΙΔΗ



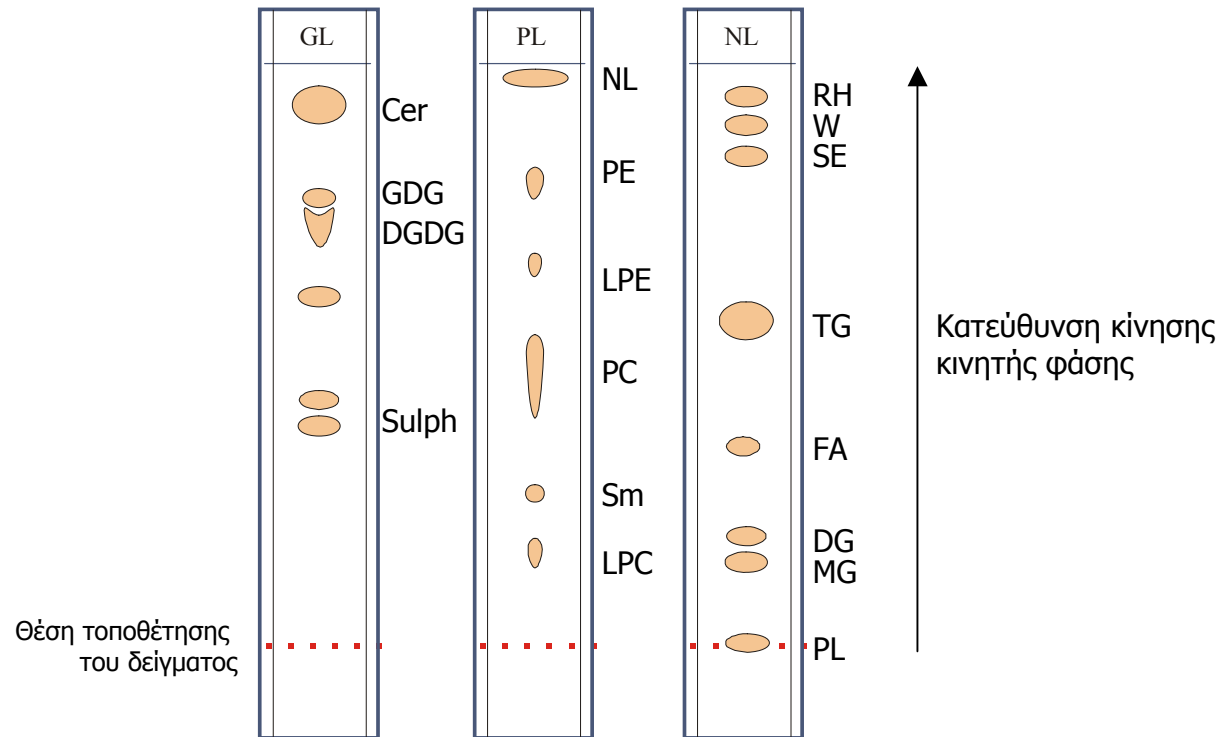
ΟΥΔΕΤΕΡΑ ΛΙΠΟΕΙΔΗ



Μέθοδοι διαχωρισμού λιποειδών

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Διαχωρισμός γλυκολιποειδών, φωσfolιποειδών, και ουδετέρων λιποειδών σε TLC πυριτικού οξέως.



Τα συστήματα ανάπτυξης είναι :

- για τα GL χλωροφόρμιο:ακετόνη:μεθανόλη:οξικό:νερό (50:20:17:5:5)
- για τα PL χλωροφόρμιο:μεθανόλη:νερό (65:35:6)
- για τα NL πετρελαιο:αιθέρας:οξικό (90:10:1)

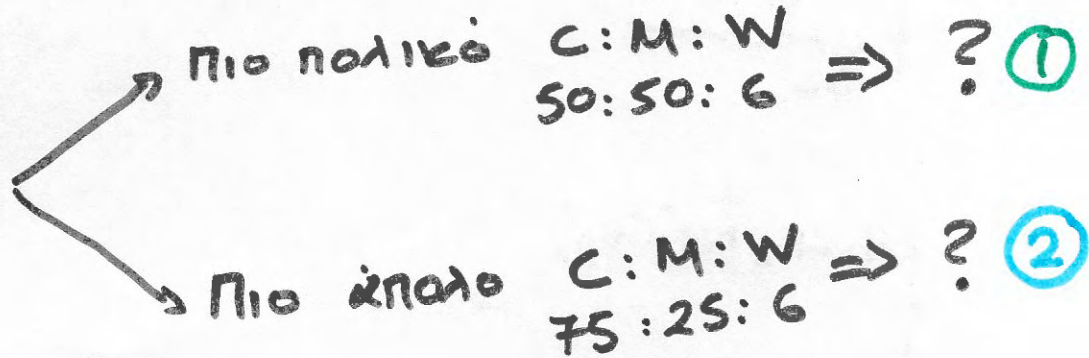
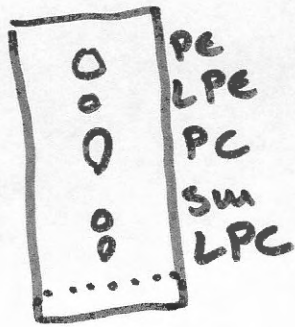
Μέθοδοι διαχωρισμού λιποειδών

Πολικότητα λιποειδών

Λιγότερο πολικά			
Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	RH	Άπολα λιποειδή	
Ακόρεστοι υδρογονάνθρακες	RH		
Κηροί	W		
Εστέρες στερολών	SE		
Λιπαρές αλδεΐδες	Fald		
Τριακυλογλυκερόλες	TG		
Λιπαρές αλκοόλες	Falc		
Λιπαρά οξέα	FA		
Στερόλες	S		
Διακυλογλυκερόλες	DG		
Μονοακυλογλυκερόλες	MG		
Κερεβροζίτες	Cer	Πολικά λιποειδή	Γλύκο
Γλυκοζυλο-διακυλογλυκερόλη	G-DG		
Σουλφατίδια	Sulph		Φώσφο
Φωσφατιδικό οξύ	PA		
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη	PE		
Λυσο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη	LPE		
Φωσφατιδυλοχολίνη	LPC		
Σφιγγομυελίνη	Sm		
Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη	LPC		
Περισσότερο πολικά			

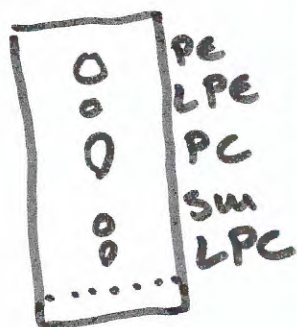
PL: Σύστημα Ανάπτυξης

C: M: W
65: 35: 6



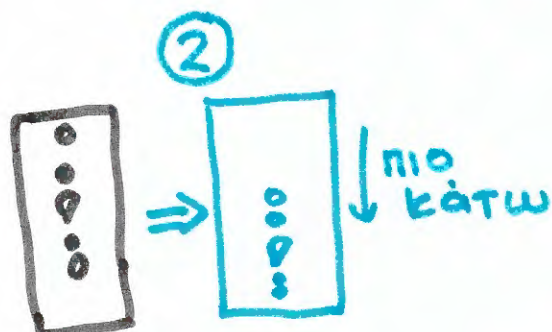
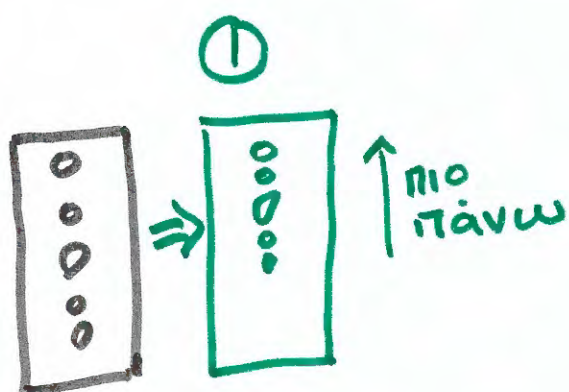
PL: Σύστημα Ανάπτυξης

C: M: W
GS: 35: 6



Πιο πολιτικό C: M: W $\Rightarrow ?$ ①
50: 50: 6

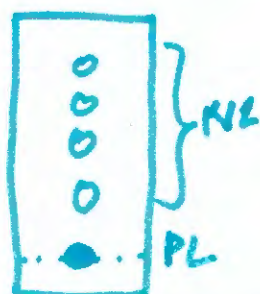
Πιο άπολο C: M: W $\Rightarrow ?$ ②
75: 25: 6



Ασκή: οφικό
οφύ

οδο πιο
άπολο τόσο
πιο κάτω

..... Πολύ άπολο
με αλλαγή διαλυτών
P. Et: Et: Ασκή
80: 20: 1

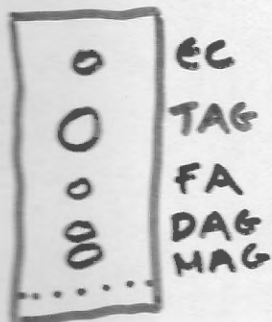


Διαχωρισμός
ουδετέρων λιποειδών (NL)
τα PL για κληδιά στην
θέση τοποθέτησης του
δείγματος

NL: Σύστημα Ανάπτυξης

P.Et: Et: ACOH

80: 20: 1



→ πιο παλιό P.Et: Et: ACOH
60: 40: 1

①

→ πιο άνω P.Et: Et: ACOH
90: 10: 1

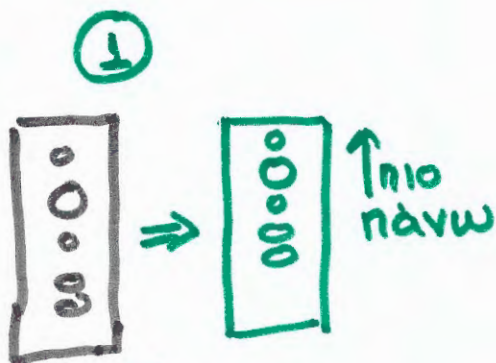
②

NL: Σύστημα Ανάπτυξης P.Et: Et: AcOH
80: 20: 1



Πιο παλιό P.Et: Et: AcOH ①
60: 40: 1

Πιο άπολο P.Et: Et: AcOH ②
30: 10: 1



↓ 60 πιο
παλιό τόσο
πιο πάνω

Παλιό παλιό
με αλλαγή δ/των

C: M: W
GS: 3S: 6



Διαχωρισμός PL
Τα NL μια κλίδα πάνω-
πάνω

