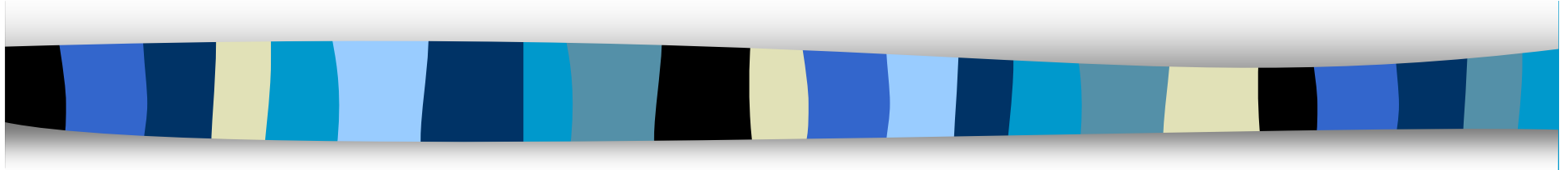


Φροντιστήριο Βιοχημείας Ι

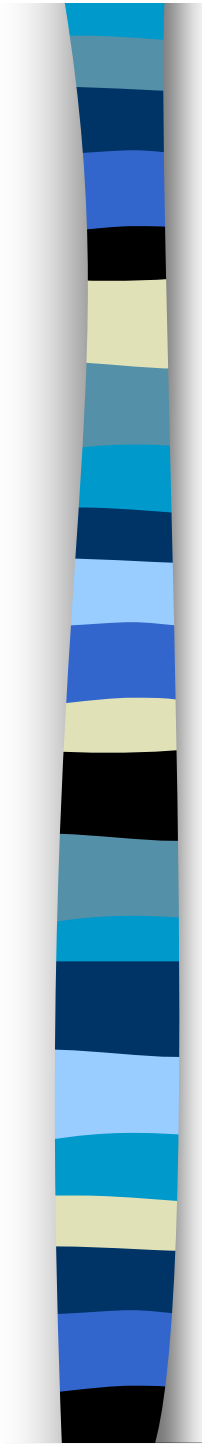


Ε.Φραγκοπούλου
Επίκουρη καθηγήτρια

Λιποειδή

Δράση στις εξής περιπτώσεις :

- Αποθηκευτικές μορφές ενέργειας
- Συστατικά των βιολογικών μεμβρανών
- Συμπαράγοντες ενζύμων
- Μεταφορείς ηλεκτρονίων
- Γαλακτωματοποιητές
- Ορμόνες
- Ενδοκυτταρικά μηνύματα

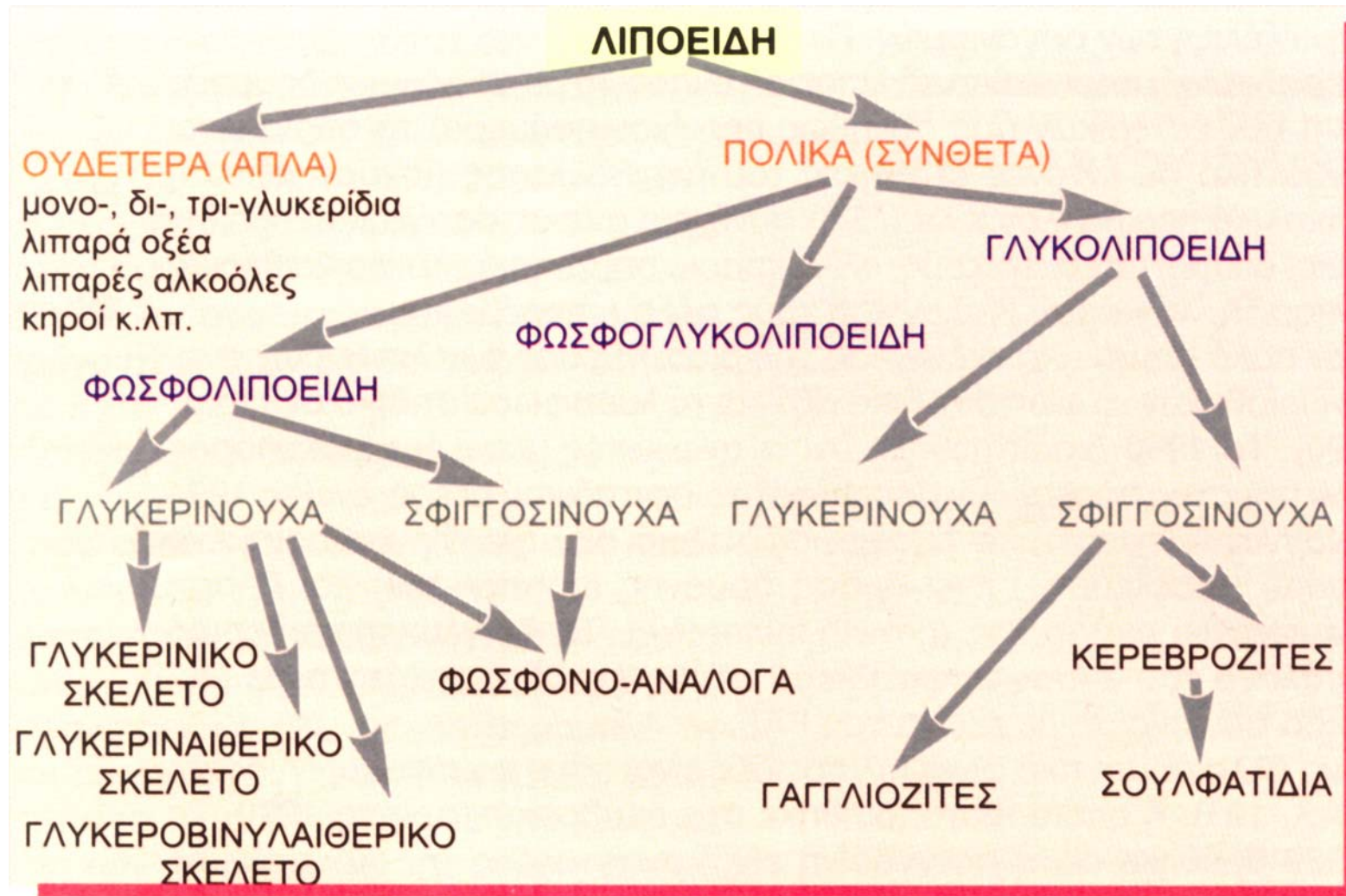


Λιποειδή

Οργανικά βιομόρια που είναι

- αδιάλυτα στο νερό
- διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες

Λιποειδή – κατάταξη



Μελέτη πρωτεϊνών

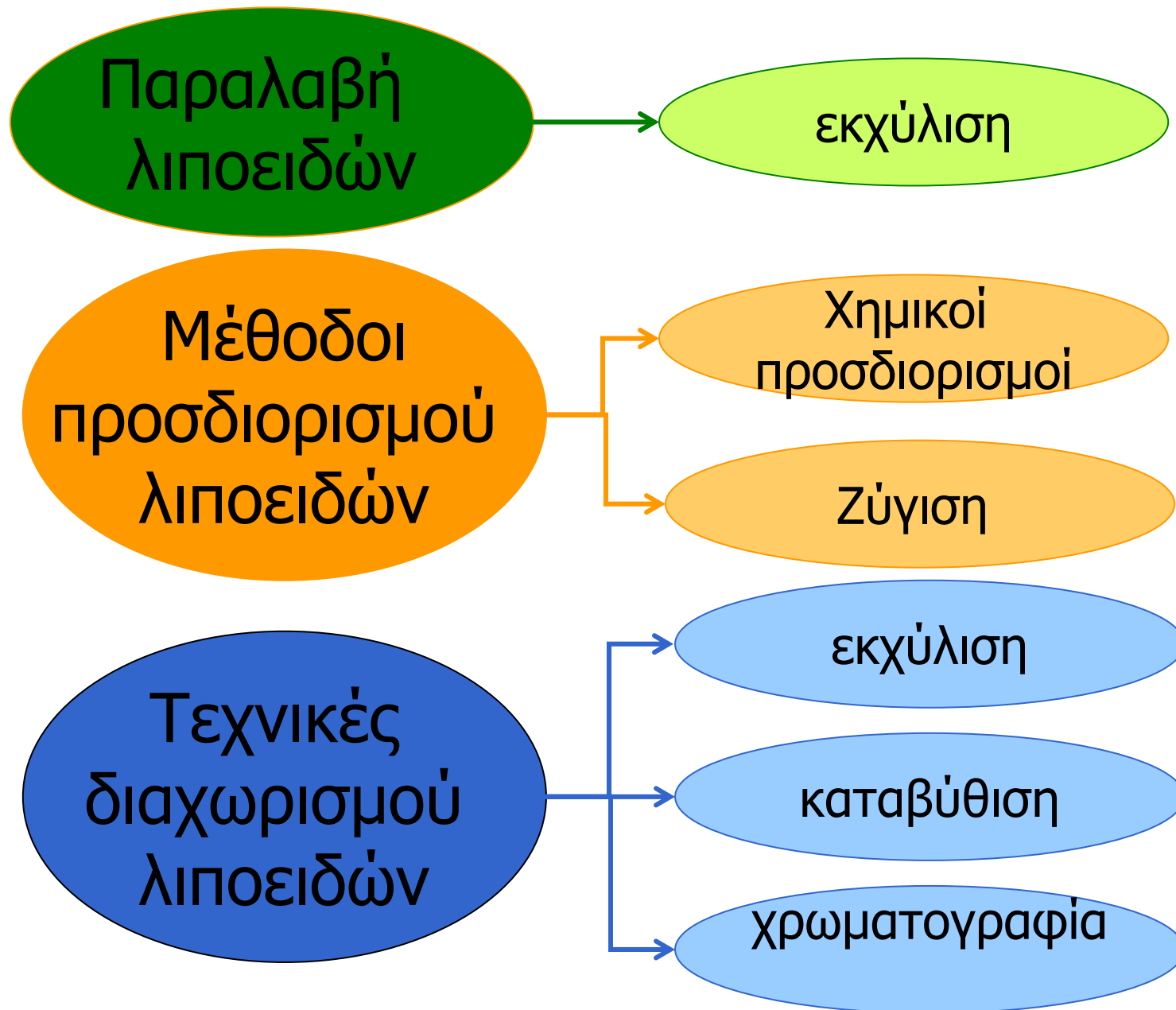
➤ Μελέτη δομής

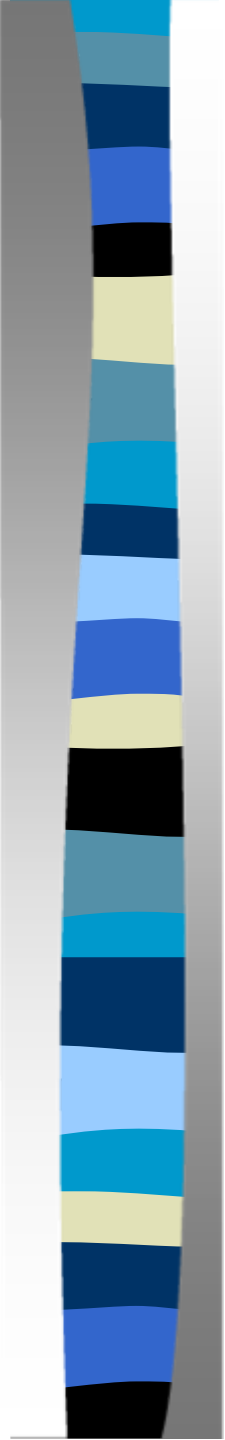
- Παραλαβή του λιποειδούς
- Διαχωρισμός από άλλα λιποειδή
- Χημικοί προσδιορισμοί για την εύρεση χαρακτηριστικών ομάδων (π.χ. σάκχαρα ή φωσφορική ομάδα)
- Φασματοσκοπικές τεχνικές (φασματοσκοπία μάζας MS, φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού NMR)

➤ Μελέτη λειτουργίας

- Καθορισμός βιολογικής δράσης (εμπλοκή στο μεταβολισμό κ.τ.λ)
- Σχέση δομής - βιολογικής δράσης
- Ρύθμιση βιολογικής δράσης

Μελέτη λιποειδών





Εκχύλιση

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

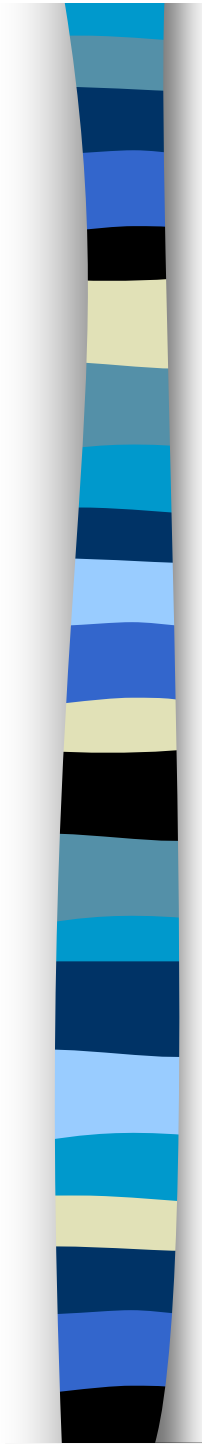
- εκχύλιση στερεού-υγρού (*solid-liquid extraction*)

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

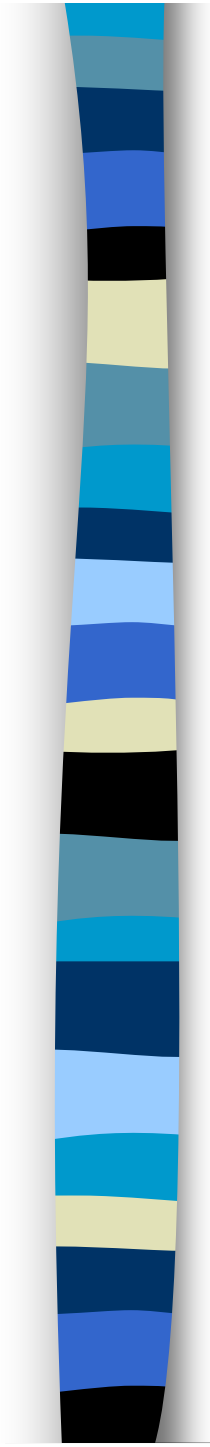
η διαλυτότητα του εκχυλιζόμενου συστατικού στον υγρό διαλύτη πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτή στο εκχυλιζόμενο μίγμα



Παραλαβή λιποειδών

Εκχύλιση Bligh-Dyer

- Εκχύλιση αρχικά με μονοφασικό σύστημα διαλυτών ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$, 1:2:0,8) επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών ενός βιολογικού δείγματος, καθώς και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ουσιών όπως αλάτων, αμινοξέων ή σακχάρων.
- Με τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$, 1:1:0,9), στη χλωροφορμική φάση κατανέμονται μόνο τα λιποειδή και στη δε υδατική κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά του βιολογικού δείγματος.



Τεχνικές Διαχωρισμού των λιποειδών

Εκχύλιση

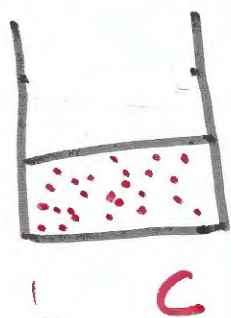
Συντελεστής κατανομής μίας ουσίας μεταξύ δύο μη μιγνυομένων διαλυτών

$$D = C_2/C_1$$

C_1 : συγκέντρωση της ουσίας στον διαλύτη 1

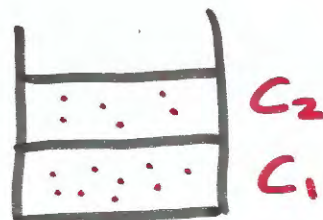
C_2 : συγκέντρωση της ουσίας στον διαλύτη 2

Κατά συνθήκη, όταν ένας εκ των δύο διαλυτών είναι το νερό, η εξίσωση γράφεται με το νερό στο παρανομαστή και τον οργανικό διαλύτη στον αριθμητή



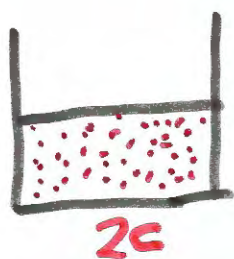
Διαλύτης 1
 V_1

Διαλύτης 2
 V_2



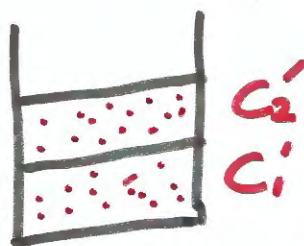
$$C = C_1 + C_2$$

$$D = \frac{C_2}{C_1}$$



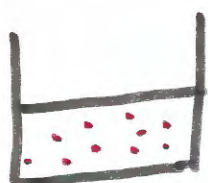
Διαλύτης 1
 V_1

Διαλύτης 2
 V_2



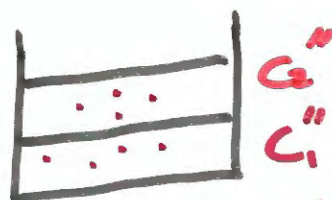
$$2C = C_1' + C_2'$$

$$D = \frac{C_2'}{C_1'} = \frac{C_2}{C_1}$$



Διαλύτης 1
 V_1

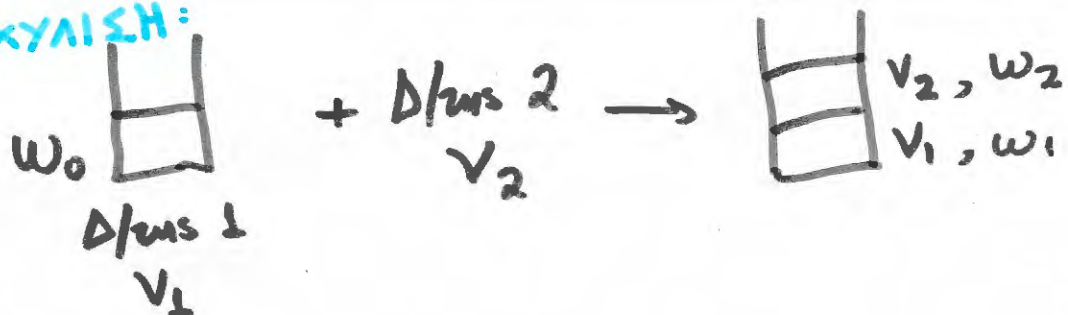
Διαλύτης 2
 V_2



$$\frac{C}{2} = C_1'' + C_2''$$

$$D = \frac{C_2''}{C_1''} = \frac{C_2'}{C_1'} = \frac{C_2}{C_1}$$

1^η ΕΚΧΥΛΙΣΗ:



$$W_0 = W_1 + W_2, \quad W_1 = C_1 V_2, \quad W_2 = C_2 V_2$$

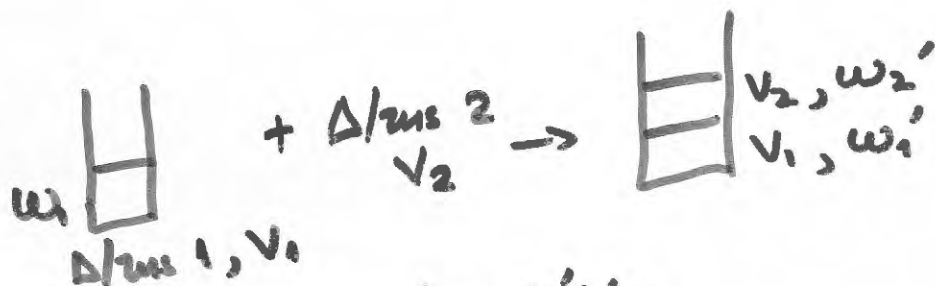
$$\left. \begin{aligned} W_0 &= C_1 V_1 + C_2 V_2 \\ D &= \frac{C_2}{C_1} \end{aligned} \right\} \Rightarrow \begin{aligned} W_0 &= C_1 V_1 + D C_1 V_2 \\ W_0 &= C_1 (V_1 + D V_2) \end{aligned}$$

Άρα η ποσότητα που έψηνε στο $\Delta/ms \ 1$ μετά τη πρώτη εκχύλιση είναι:

$$W_1 = C_1 V_1 \Rightarrow W_1 = \frac{W_0}{V_1 + D V_2} \cdot V_1 \Rightarrow W_1 = W_0 \left(\frac{V_1}{V_1 + D V_2} \right)$$

2^η ΕΚΧΥΛΙΣΗ:

Αρχική ποσότητα W_1



$$W_1 = W_1' + W_2', \quad W_1' = C_1' V_1, \quad W_2' = C_2' V_2$$

$$\left. \begin{aligned} W_1 &= C_1' V_1 + C_2' V_2 \\ D &= \frac{C_2'}{C_1'} \end{aligned} \right\} \Rightarrow \begin{aligned} W_1 &= C_1' V_1' + D C_1' V_2 \\ W_1 &= C_1' (V_1 + D V_2) \end{aligned}$$

Άρα η ποσότητα που έψηνε στο $\Delta/ms \ 1$ μετά από τη δεύτερη εκχύλιση είναι:

$$W_1' = C_1' V_1 \Rightarrow W_1' = \frac{W_1}{(V_1 + D V_2)} \cdot V_1 \Rightarrow W_1' = W_0 \left(\frac{V_1}{V_1 + D V_2} \right)^2$$

Τεχνικές Διαχωρισμού των λιποειδών

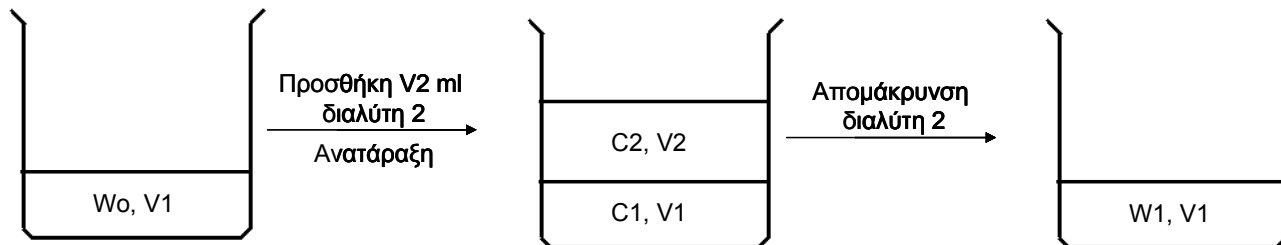
Εκχύλιση

$$D = C_2/C_1$$

$$W_o = C_1V_1 + C_2V_2$$

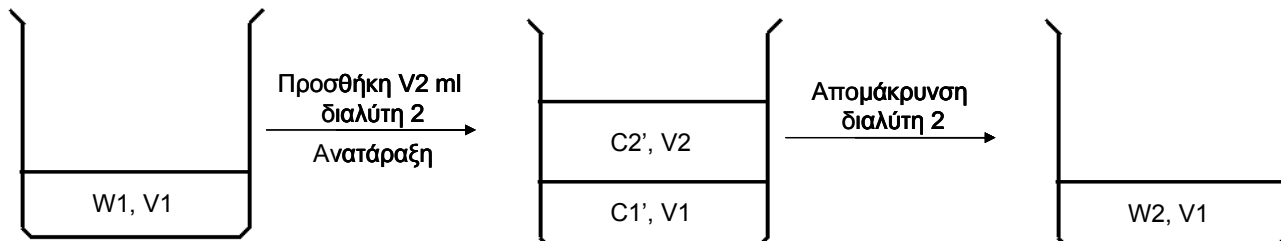
1η εκχύλιση

$$W_1 = W_o (V_1/(DV_2 + V_1))$$



2η εκχύλιση

$$W_2 = W_o (V_1/(DV_2 + V_1))^2$$



Τεχνικές Διαχωρισμού των λιποειδών

Εκχύλιση

Η ποσότητα μίας ουσίας που παραμένει στην αρχική φάση μετά από n εκχυλίσεις με το διαλύτη 2

$$W_n = W_o (V_1/DV_2 + V_1)^n$$

W_o : αρχική ποσότητα ουσίας στον διαλύτη 1

W_n : ποσότητα της ουσίας που παρέμεινε στον διαλύτη 1 μετά από n εκχυλίσεις

D : συντελεστής κατανομής

n : αριθμός εκχυλίσεων

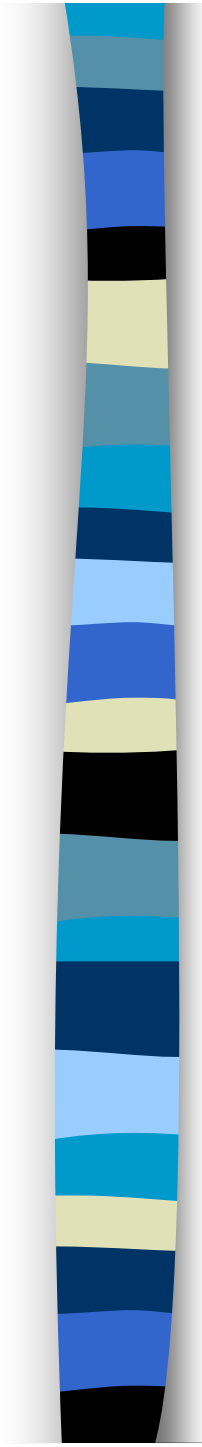
V_1 : όγκος διαλύτη 1

V_2 : όγκος διαλύτη 2

Η εκχυλισθείσα ποσότητα επί τοις εκατό μετά από n εκχυλίσεις $E\%$

$$E\% = (W_o - W_n)/W_o \cdot 100$$

$$\%E_n = [1 - (V_1/DV_2 + V_1)^n] \times 100$$

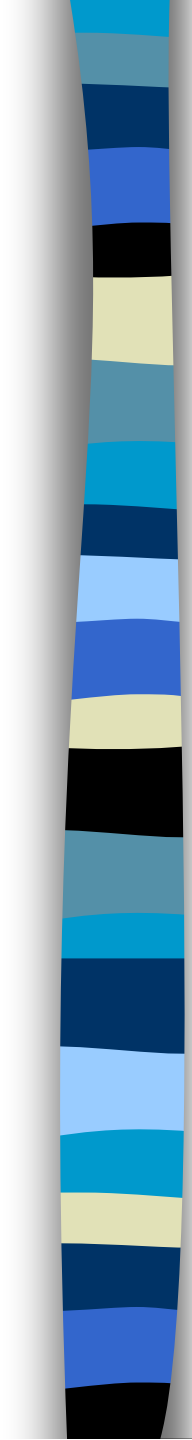


Τεχνικές Διαχωρισμού των λιποειδών

Εκχύλιση

Προϋποθέσεις εκχυλιστικού μέσου

- Να μην αναμιγνύεται με το διαλύτη του προς εκχύλιση μίγματος
- Να μην αντιδρά με την εκχυλιζόμενη ουσία
- Η διαλυτότητα της εκχυλιζόμενης ουσίας στο εκχυλιστικό μέσο πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη, ενώ η διαλυτότητα των ανεπιθύμητων ουσιών πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη
- Μετά την εκχύλιση πρέπει η στιβάδα του διαλύτη να διαχωρίζεται ταχέως από τη στιβάδα του προς εκχύλιση μίγματος
- Το εκχυλιστικό μέσο να έχει κατά το δυνατόν χαμηλότερο σημείο ζέσεως ώστε να μπορεί εύκολα να ανακτηθεί το εκχυλιζόμενο συστατικό με εξάτμιση
- Να μην έχει τάση σχηματισμού γαλακτώματος με το διαλύτη του προς εκχύλιση μίγματος
- Να μην είναι τοξικός, ούτε και εύφλεκτος

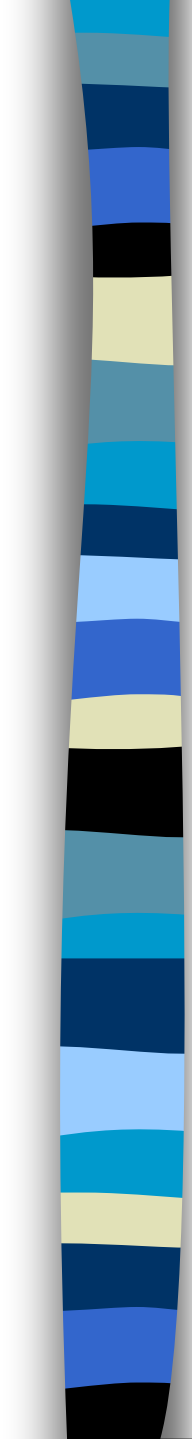


Διαχωρισμός ουδετέρων-πολικών λιπιδίων με κατανομή κατ'αντιρροή

Η μέθοδος βασίζεται στην διαφορετική κατανομή των πολικών και ουδετέρων λιποειδών σε οργανικούς διαλύτες.

Τα ολικά λιποειδή διαχωρίζονται σε προεξισορροπημένο διφασικό σύστημα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθανόλης 87%.

Στο σύστημα αυτό τα πολικά λιποειδή κατανέμονται στη φάση της αιθανόλης και τα ουδέτερα λιποειδή στην φάση του πετρελαϊκού αιθέρα. Για τον ποσοτικό διαχωρισμό (ποσοστό >97%) των δυο τάξεων, η πορεία επαναλαμβάνεται τουλάχιστον 8 φορές.



Προεξισορρόπηση Διαλυτών

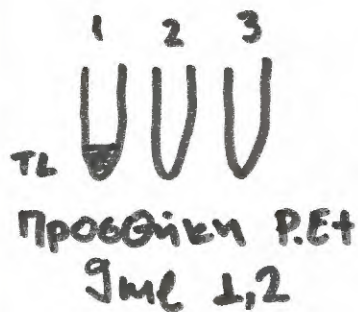
Πετρελαϊκός αιθέρας προεξισορροπημένος με 87% κ.ο. αιθανόλη και αιθανόλη 87% κ.ο. προεξισορροπημένη με πετρελαϊκό αιθέρα:

Ίσοι όγκοι πετρελαϊκού αιθέρα και αιθανόλης 87% κ.ο. μεταφέρονται σε διαχωριστική χοάνη και αναδεύονται ισχυρά.

Λαμβάνονται χωριστά η πάνω (πετρελαϊκός αιθέρας προεξισορροπημένος με αιθανόλη 87% κ.ο.) και η κάτω φάση (αιθανόλη 87% κ.ο. προεξισορροπημένη με πετρελαϊκό αιθέρα).

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ

NL - PL



Διαλύτες:

1. Προεπιγορροποιημένος Πετρελαϊκός Αιθέρας (P.Et)

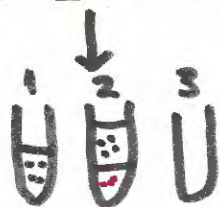
2. Προεπιγορροποιημένη Αιθανόλη 87% (EtOH)



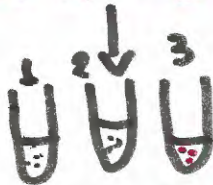
Προσθήκη EtOH
3ml 1, 2



Μεταφορά EtOH
από 1 → 2



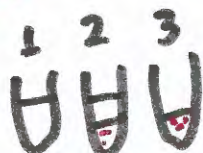
Μεταφορά EtOH
από 2 → 3



Προσθήκη EtOH
στον 1



Μεταφορά EtOH
από 1 → 2



Μεταφορά EtOH
από 2 → 3



1^η φορά

Συνολικά 8 φορές



Στο τέλος

Στον σωλήνα 1 & 2 ⇒ NL
(18ml)

Στον σωλήνα 3 ⇒ PL
(24ml)

2^η φορά