

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-
ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το
περιβάλλον και τη διατροφή»*



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Βιολογικά δραστικά μικροσυστατικά λιποειδικής φύσης

Σμαραγδή Αντωνοπούλου

Καθηγήτρια Βιοχημείας

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο



Λιποειδή

✓ Η διατύπωση ορισμού για τα λιποειδή (lipids) είναι δύσκολη γιατί, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες ή τους υδατάνθρακες, που αποτελούνται από παρόμοιες δομικές μονάδες (αμινοξέα και μονοσάκχαρα αντίστοιχα), τα λιποειδή **δεν έχουν ομοιογενείς δομικές μονάδες**

✓ Λιποειδή χαρακτηρίζονται **τα αδιάλυτα στο νερό** οργανικά βιομόρια, που **διαλύονται όμως σε οργανικούς διαλύτες**

π.χ. το **χλωροφόρμιο**, το βενζόλιο

ή μίγματα **χλωροφορμίου-μεθανόλης** (που αποτελούν και το γενικό διαλυτικό μέσο των λιποειδών).



Δράσεις λιποειδών

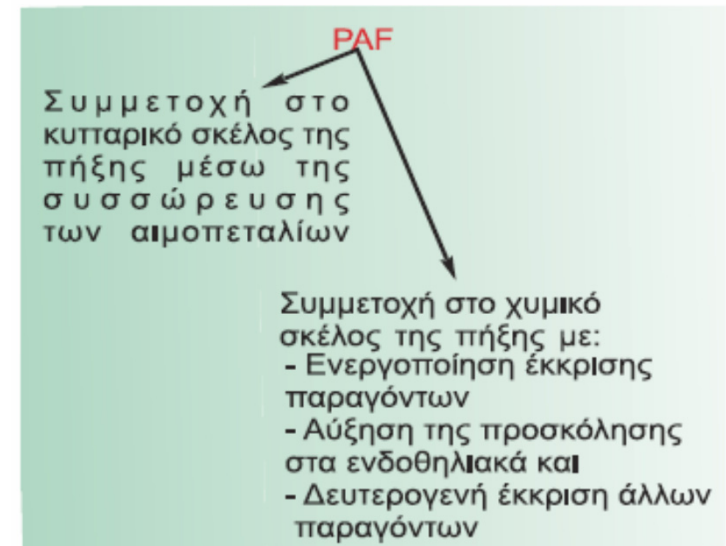
- ✓ Ο **μεταβολισμός** τους (π.χ. όλα βιοσυντίθενται από ενεργοποιημένο οξικό οξύ)
- ✓ Αποτελούν **δομικά συστατικά των μεμβρανών** και συμμετέχουν στις διάφορες διεργασίες (π.χ. διαπερατότητα) που γίνονται μέσω μεμβρανών
- ✓ Αποτελούν **πηγές ενέργειας** αλλά και ενώσεις **αποθήκευσης** ενέργειας
- ✓ Δρουν σαν **προστατευτικός μανδύας** στην επιφάνεια πολλών οργανισμών και οργάνων για τη θερμική μόνωση αυτών, αλλά και για την ηλεκτρική μόνωση των κυττάρων (ως συστατικά των περικυτταρικών και άλλων μεμβρανών)
- ✓ Έχουν κάποιες πολύ σημαντικές **βιολογικές δράσεις**, όπως είναι η συμμετοχή τους στην κυτταρική αναγνώριση (cell recognition), στην ιστική ανοσία (tissue immunity) ενώ δρουν και ως ορμόνες ή βιταμίνες κ.λπ.

Λιποειδή – Ιστορική αναδρομή

ως προς τη βιολογική τους δράση

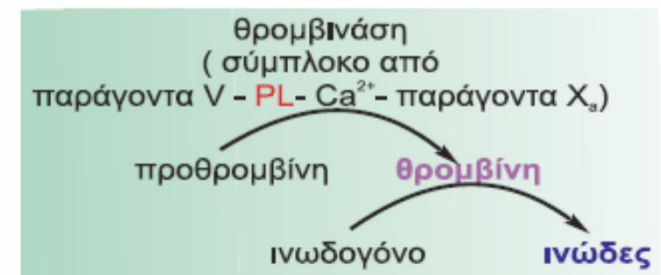
- ✓ **συστατικά των μεμβρανών**
- ✓ απομονώθηκαν διάφορα λιποειδή με **βιολογική δράση** (ακετυλοχολίνη, προσταγλανδίνες, λιποδιαλυτές βιταμίνες, απαραίτητα λιπαρά οξέα, κτ.λ)
- ✓ η εμπλοκή τους σε **ενζυμικές αντιδράσεις** (συνένζυμα και συμπαραγόντες)
- ✓ **αντιοξειδωτικά**, με κυριότερο παράδειγμα τη βιταμίνη E, φαινολικές ενώσεις
- ✓ στην **πήξη του αίματος** η συμμετοχή των λιποειδών είναι καθοριστική με τη δράση του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF), της βιταμίνης K και των φωσfolιποειδών

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΠΗΞΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ (σύμφωνα με *in vitro* δεδομένα)

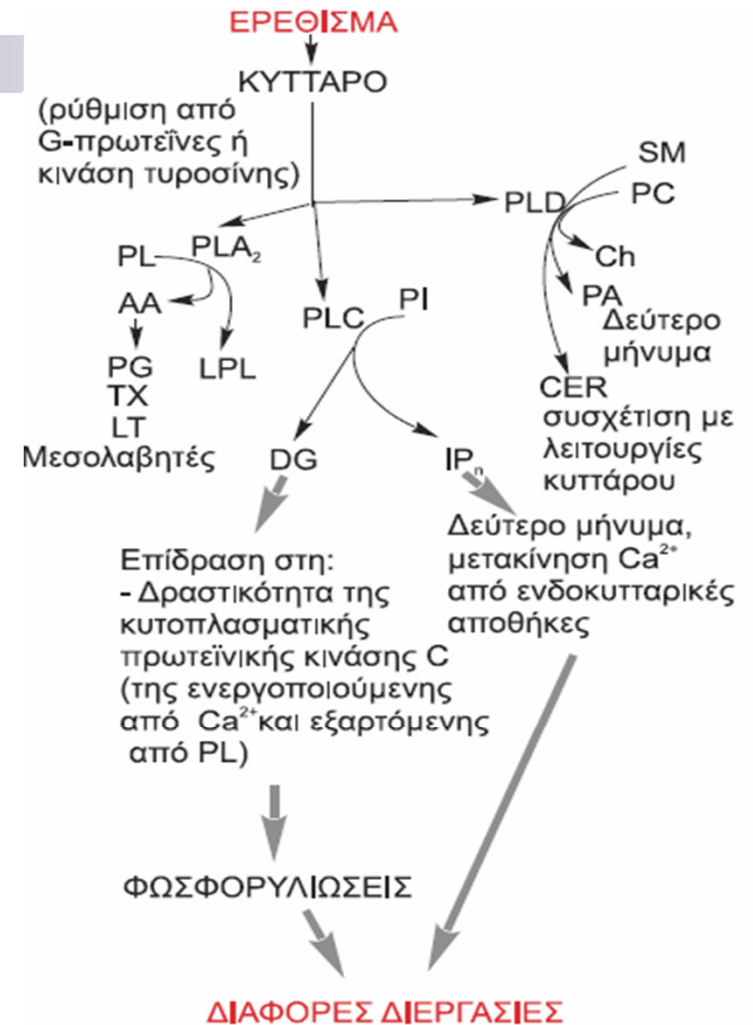


ΒΙΤΑΜΙΝΗ K

Συμμετοχή στην καρβοξυλίωση των ομάδων του γλουταμινικού οξέος, στους παράγοντες II, VII, IX και X.

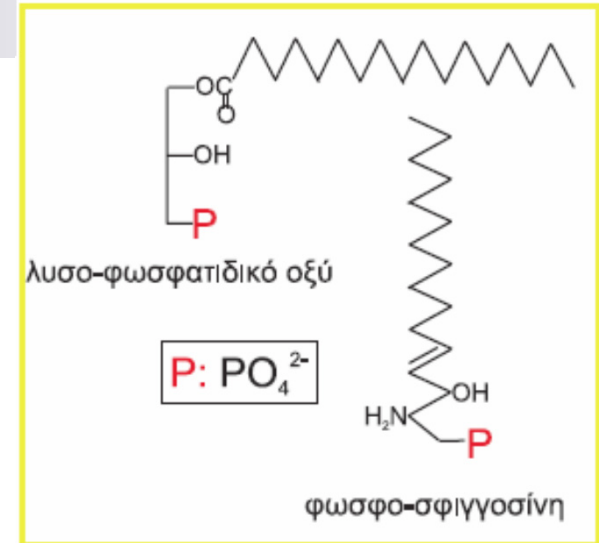


- ✓ η παραδοχή της **συμμετοχής των λιποειδών στο μεταβολισμό** και στο σύνολο των δράσεων του κυττάρου
- ✓ εμπλοκή στην **επικοινωνία - διάδοση σήματος**
ακετυλοχολίνη => ενεργοποιεί μόνο το μεταβολισμό του φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη και του φωσφατιδικού οξέος από τα φωσfolιποειδή και όχι το μεταβολισμό των άλλων φωσfolιποειδών
- ✓ το 1975 ο Mitchell δημοσίευσε τη σημασία των **φωσfolιποειδών με ινοσιτόλη στις δράσεις των μεμβρανών και συγκεκριμένα στην είσοδο Ca^{2+} στο κύτταρο**
- ✓ ως πολύ σημαντικά ενδιάμεσα της βιοσύνθεσης των λιποειδών αναγνωρίστηκαν το **φωσφατιδικό οξύ** και το **λυσολιποειδικό οξύ**
=> έχει δράση ορμόνης (hormone-like) και δράση αυξητικού παράγοντα (growth factor-like)



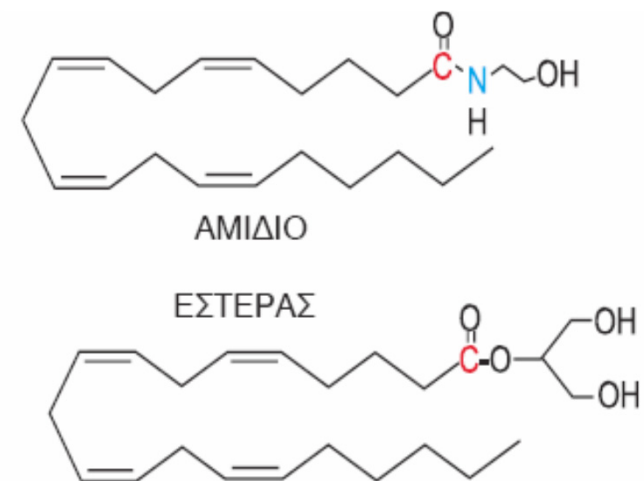
PLA ₂ : φωσfolιπάση A ₂	PA: φωσφατιδικό οξύ
PLC: φωσfolιπάση C	PG: προσταγλανδίνες
PLD: φωσfolιπάση D	TX: θρομβοξάνια
PI: φωσφατιδυλο- ινοσιτόλη	LT: λευκοτριένια
PL: φωσfolιποειδή	AA: αραχιδονικό οξύ
PC: φωσφατιδυλο- χολίνη	DG: διακυλο-γλυκερόλη
Ch: χολίνη	IP _n : φωσφοϊνοσιτόλη
SM: σφιγγομυελίνη	LPL: λυσο-φωσfolιποειδή
	CER: κηραμίδια

- ✓ ένα άλλο σημαντικό φωσφολιποειδές είναι και η **φωσφο-σφιγγοσίνη** η οποία πιστοποιήθηκε στα ερυθροκύτταρα το 1970 => **με την υπερπλασία των κυττάρων, την κινητοποίηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , την απόπτωση**



- ✓ Η **φωσφατιδυλογλυκερόλη** πιστοποιήθηκε το 1960 και στη συνέχεια η **καρδιολιπίνη** η οποία υπάρχει στις μεμβράνες των κυττάρων κυρίως της καρδιάς => **παραγωγή ενέργειας και με την ασθένεια αντικαρδιολιπιδικό/αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο**

- ✓ τα ενδοκανναβινοειδή, εστέρες ή αμίδια πολυακόρετων λιπαρών οξέων, είναι ενδογενείς αγωνιστές των υποδοχέων των κανναβινοειδών, => **ρύθμιση λειτουργιών όπως η όρεξη, η διάθεση, η μνήμη και η αίσθηση του πόνου**

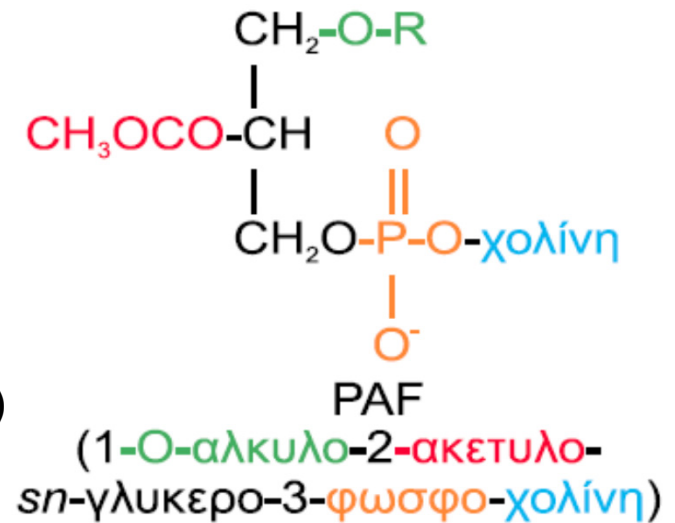


■ ύπαρξη φωσφολιπιδίων σαν αγωνιστών

Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (Platelet-Activating Factor, PAF) , **γλυκεριναιθερικό** λιπιδές

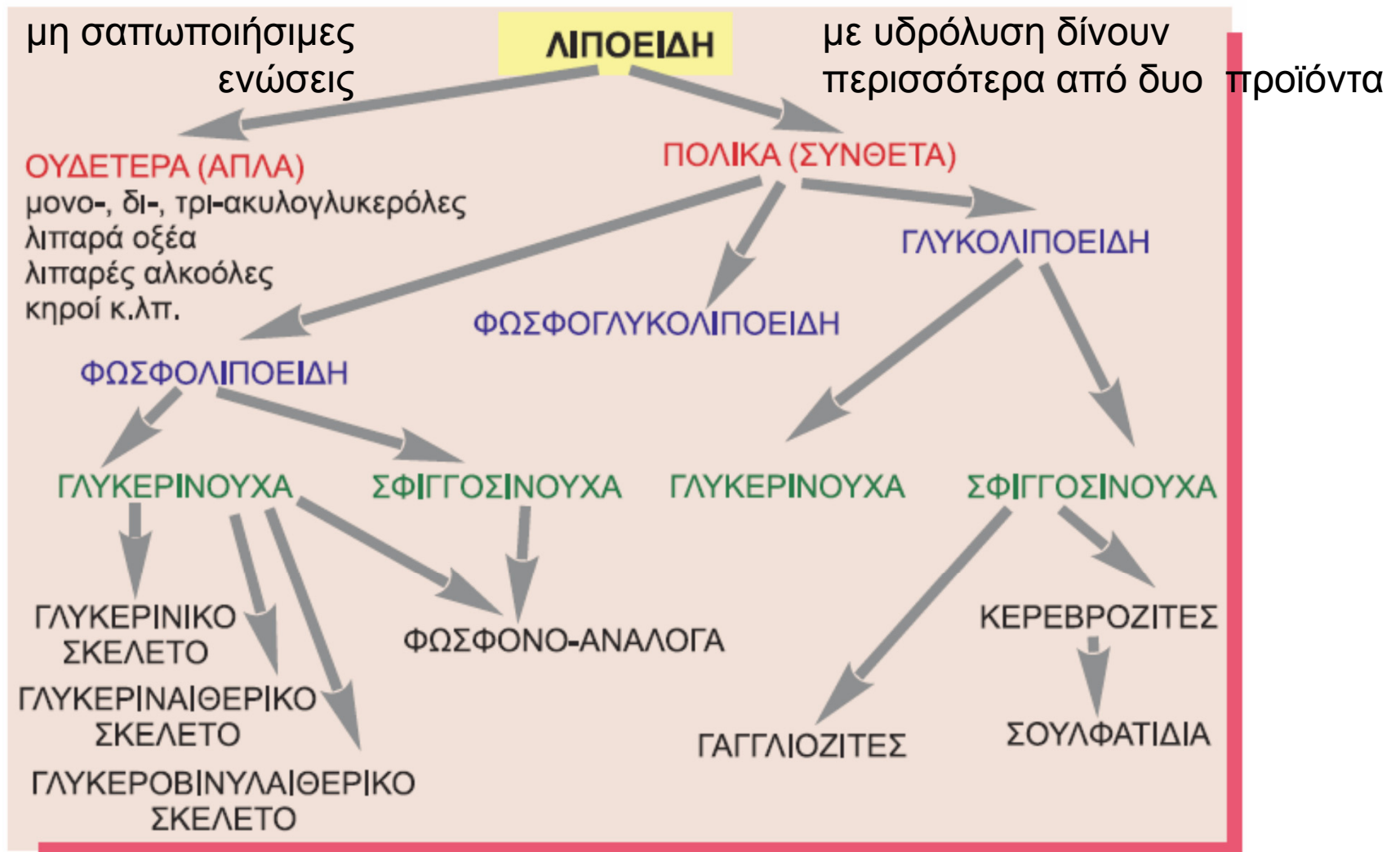
εξέλιξη των οργανισμών

εικοσανοειδή (παράγωγα του αραχιδονικού οξέος)
προσταγλαδίνες,
θρομβοξάνια
λευκοτριένια
ρεσολβίνες
λιποξίνες,
αντιφλεγμονώδη δράση τερματισμό της φλεγμονώδους απόκρισης



Κατάταξη λιποειδών

Ο πιο ικανοποιητικός τρόπος κατάταξης των λιποειδών είναι με βάση τη δομή του σκελετού τους





Κατάταξη λιποειδών

τα λιποειδή δεν απαντούν, συνήθως, μόνα τους αλλά είναι **συνδεδεμένα** είτε με ομοιοπολικό δεσμό, είτε με ασθενείς μη χημικούς δεσμούς **με άλλες τάξεις ενώσεων**

- με πρωτεΐνες => **λιποπρωτεΐνες**
- με υδατάνθρακες => **γλυκολιποειδή**



Τρόποι απομόνωσης και διαχωρισμού

- ✓ επιλογή του κατάλληλου τρόπου απομόνωσής τους από το βιολογικό δείγμα
- ✓ τρόπος χειρισμού του δείγματος

άμεσα μετά τη λήψη του δείγματος κυρίως για να αποφευχθεί η **δράση των λιπολυτικών ενζύμων** καθώς και η **λιποξειδική υπεροξειδωση**.

δείγμα να αποθηκεύεται σε κλειστά γυάλινα φιαλίδια σε ατμόσφαιρα αζώτου στους -20°C και σε μερικές περιπτώσεις στους -60°C .



Τρόποι απομόνωσης και διαχωρισμού

Εκχύλιση

Η επιλογή του τρόπου εκχύλισης επηρεάζεται από δύο βασικές παραμέτρους:

- α) Τη φύση του βιολογικού δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί (ιστός φυτικός ή ζωικός, κύτταρα κ.λ.π.) και
- β) Το είδος (χημική δομή) της ένωσης που ενδιαφερόμαστε να απομονώσουμε καθώς και το σύνολο των πληροφοριών που επιθυμούμε να συλλέξουμε για την υπό μελέτη ένωση. Το σύνολο της πληροφορίας καθορίζει την ποσότητα της ένωσης που πρέπει να απομονωθεί.

- Παραλαμβάνεται ποσοτικά η υπό μελέτη ένωση
- Αποφεύγεται η διάσπασή της, η υδρόλυσή της, η οξειδωσή της και γενικότερα η αποικοδόμησή της και τέλος
- Αποφεύγονται όσο το δυνατόν οι προσμίξεις από άλλα βιομόρια, τα οποία μπορεί να επηρεάσουν τη μελέτη αλλά και τη βιολογική δραστικότητα των δειγμάτων.

Τρόποι απομόνωσης και διαχωρισμού

Προβλήματα εκχύλισης	Τρόπος αντιμετώπισης
Σύνδεση λιποειδών με ομοιοπολικούς και μη ομοιοπολικούς δεσμούς με πρωτεΐνες και υδατάνθρακες	Εκχύλιση με πολικούς διαλύτες (αλκοόλες) (αποδιατάσσουν πρωτεΐνες), διασπούν δεσμούς υδρογόνου. Χρησιμοποιείται είτε όξινο είτε αλκαλικό διάλυμα
Παραλαβή μη λιποειδικών ενώσεων (αμινοξέα, σάκχαρα) στους οργανικούς διαλύτες εκχύλισης, λόγο ιονικών αλληλεπιδράσεων με τα πολικά λιποειδή	Έκπλυση οργανικής φάσης με την υδατική φάση ή καθαρισμός με χρωματογραφικές τεχνικές
Οξειδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (αυτοοξειδωση, κατάλυση από μέταλλα μεταπτώσεως)	Εκχύλιση και αποθήκευση σε ατμόσφαιρα N ₂ , χαμηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης, σε σκουρόχρωμες φιάλες, πιθανή χρήση αντιοξειδωτικών
Δημιουργία σταθερών γαλακτωμάτων από το νερό που προϋπάρχει στο βιολογικό δείγμα	Αφυδάτωση του δείγματος πριν την εκχύλιση
Διαφορετική πολικότητα-διαλυτότητα λιποειδικών ενώσεων	Χρήση διαλυτών διαφορετικής πολικότητας ή/και μείγματα πολικών και ουδετέρων διαλυτών
Κάποιοι ιστοί περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα τα οποία είναι σταθερά και δραστικά ακόμα και σε οργανικούς διαλύτες	Βρασμός του ιστού, για αποδιάταξη πρωτεϊνών

Τρόποι απομόνωσης και διαχωρισμού

Χρησιμοποιούνται πάντα γυάλινα σκεύη κατά τη διαδικασία της εκχύλισης λόγω της ύπαρξης πλαστικοποιητών στα αντίστοιχα πλαστικά σκεύη, οι οποίοι παραλαμβάνονται από τους οργανικούς διαλύτες και δημιουργούν σοβαρά προβλήματα, στα επόμενα στάδια διαχωρισμού και ταυτοποίησης

Μέθοδος Folch, Lees and Stanley:

Ομογενοποίηση του ιστού με μείγμα χλωροφορμίου/ μεθανόλης 2:1 (v/v) απομάκρυνση αδιάλυτων ουσιών με φυγοκέντρηση.

Στη συνέχεια προστίθενται 0,2 όγκοι NaCl 0,9%, σχηματίζεται διφασικό σύστημα και παραλαμβάνεται η κάτω φάση (λιπιδωδικής φύσης ενώσεις).

Μέθοδος Bligh-Dyer:

Παραλλαγή της Folch στην οποία υπολογίζεται το νερό που υπάρχει στο δείγμα και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλυτών έως αναλογίας χλωροφορμίου/ μεθανόλης /νερού: 1:2:0,8 (v/v/v), στη συνέχεια μετατροπή σε διφασικό σύστημα με προσθήκη κατάλληλου όγκου χλωροφορμίου και νερού για να επιτευχθεί τελική αναλογία χλωροφορμίου/ μεθανόλης /νερού: 1:1:0,9.



Τρόποι διαχωρισμού

Κλασμάτωση με διαλύτες

- α) Καταβύθιση με ακετόνη: Η προσθήκη ακετόνης σε δείγμα ολικών λιποειδών (Total Lipids, TL) διαλυτοποιεί τα Ουδέτερα Λιποειδή (Neutral Lipids, NL), ενώ τα Πολικά Λιποειδή (Polar lipids, PL) καταβυθίζονται και μπορούν να διαχωριστούν με μια απλή φυγοκέντρηση. Στο ίζημα περιέχεται το 95% του ολικού φωσφόρου.
- β) Κατανομή κατ' αντιρροή: Το μείγμα κατανέμεται μεταξύ δύο μη αναμειγνυόμενων φάσεων, μίας πολικής και μίας άπολης, όπου στην άπολη φάση παραλαμβάνονται τα ουδέτερα λιποειδή και στη δε πολική φάση, τα πολικά λιποειδή. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα διφασικά συστήματα. Ένα χαρακτηριστικό σύστημα που χρησιμοποιείται είναι το σύστημα πετρελαϊκού αιθέρα και αιθανόλης 87%, με την τεχνική του λουτρού, όπου μόνο μια από τις 2 φάσεις ανανεώνεται και συγκεκριμένα, η φάση της αιθανόλης 87%.

Οι μέθοδοι της κλασμάτωσης με διαλύτες είναι για αρχικούς διαχωρισμούς (παρασκευαστικούς) και πρέπει να ακολουθήσει μια χρωματογραφική μέθοδος διαχωρισμού.



Τρόποι διαχωρισμού

Χρωματογραφικές μέθοδοι

α) Χρωματογραφία στήλης

β) Χρωματογραφία χάρτου

γ) Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography)

δ) Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
(High Performance Liquid Chromatography)

ε) Αέρια χρωματογραφία (GC)

Τρόποι διαχωρισμού

Χρωματογραφικές μέθοδοι

α) Χρωματογραφία στήλης

Διαχωρισμός σε παρασκευαστική κλίμακα (>250mg)

Η στατική φάση που χρησιμοποιείται καθορίζει το φυσικοχημικό φαινόμενο στο οποίο βασίζεται ο διαχωρισμός



Προσρόφηση

- ✓ στατική φάση προσροφητικό υλικό
- ✓ οι ενώσεις διαχωρίζονται με βάση τη σχετική πολικότητά τους
- ✓ Προσροφητικά υλικά είναι: AlO_3 , MgO , MgO_3Si και το πυριτικό οξύ ($[\text{SiO}_x(\text{OH})_{4-2x}]_n$), το οποίο φαίνεται να είναι το δραστικότερο από όλα.
- ✓ Η γενική αρχή που χρησιμοποιείται είναι ότι η έκλυση της στήλης γίνεται με **αυξανόμενης πολικότητας διαλύτες** οπότε εκλύονται πρώτα τα μη πολικά και στη συνέχεια τα πολικά συστατικά.

Τρόποι διαχωρισμού

Χρωματογραφικές μέθοδοι

α) Χρωματογραφία στήλης



Ιοντοανταλλαγή

- ✓ Διαφορετική συγγένεια φορτισμένων ιόντων ή μορίων με αδρανείς φορτισμένες στατικές φάσεις.
- ✓ Χρησιμοποιούνται κυρίως ασθενείς ανιονανταλλακτικές ρητίνες που έχουν πολυσακχαρικό σκελετό ύστερα από επεξεργασία των υδροξυλίων τους.
- ✓ Η ιονανταλλαγή χρησιμοποιείται κυρίως για το διαχωρισμό των PL σε τάξεις.



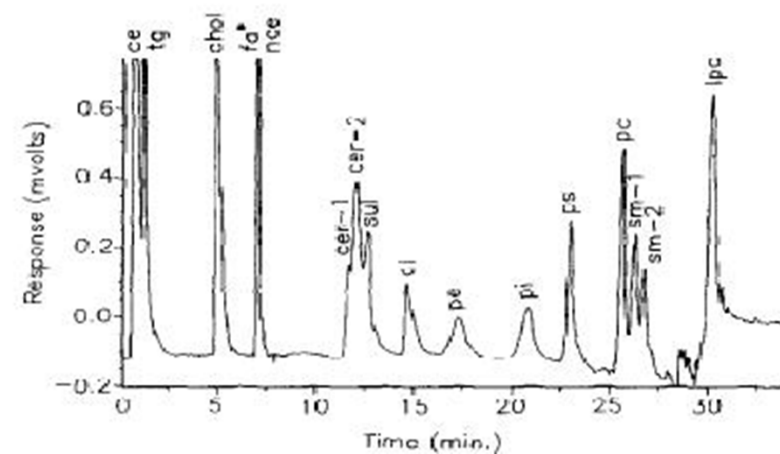
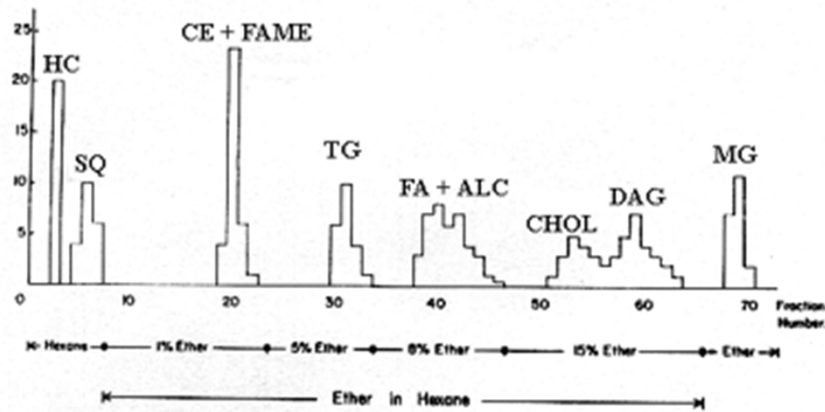
Μοριακή διήθηση

- ✓ Διαφορετικό στερεοχημικό μέγεθος των μορίων.
- ✓ Οι στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται είναι: το διακλαδισμένο πολυστυρένιο και η hydroxypropyl- Sephadex.

Τρόποι διαχωρισμού

Χρωματογραφικές μέθοδοι

α) Χρωματογραφία στήλης



Η ανίχνευση των ενώσεων μπορεί να γίνει με συλλογή κλασμάτων και χημικούς προσδιορισμούς, είτε με ανιχνευτή UV ή δείκτη διάθλασης ενωμένο με την έξοδο της στήλης.

Τρόποι διαχωρισμού

Χρωματογραφικές μέθοδοι

β) Χρωματογραφία χάρτου

γ) Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography)

- ✓ Διαχωρισμό και ποιοτικό προσδιορισμό μίγματος λιποειδών
- ✓ εύκολη μέθοδος, γρήγορη, έχει πολύ καλή διαχωριστική ικανότητα και τέλος είναι οικονομική.

Συνήθως χρησιμοποιούνται τα ίδια υλικά με τη χρωματογραφία στήλης. Σε αυτά τα προσροφητικά υλικά μπορεί να ενσωματωθούν και άλλα συστατικά τα οποία επιτρέπουν συγκεκριμένους διαχωρισμούς όπως:

A) Argentation chromatography: Η στατική φάση περιέχει 5-10% AgNO_3 οπότε σχηματίζονται κατά την ανάπτυξη σύμπλοκα των ακόρεστων δεσμών με τα ιόντα Ag^+ , δηλαδή διαχωρίζονται με βάση την ακορεστότητα τους.

B) Βορικό οξύ: Σχηματίζονται σύμπλοκα μεταξύ των πολυ-υδροξυ - λιποειδών και της στατικής φάσης, δηλαδή μπορούν να διαχωριστούν τα MG, DG και GL.

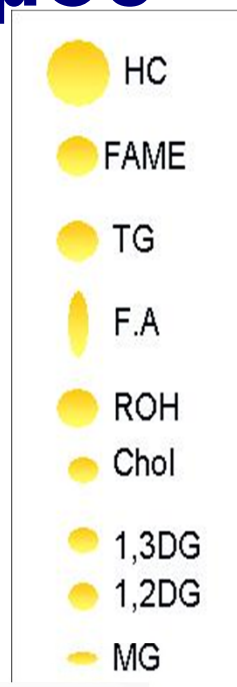
Τρόποι διαχωρισμού

Χρωματογραφικές μέθοδοι

γ) Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

(Thin Layer Chromatography)

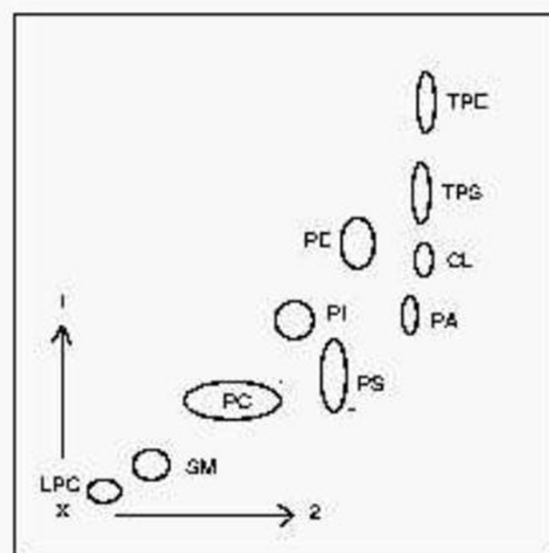
- **A** : ουδέτερα λιποειδή με σύστημα ανάπτυξης πετρελαϊκού αιθέρα/ αιθέρα/ οξικού οξέος, 80:20:1 (v/v/v),
- **B**: διαχωρίζονται τα πολικά λιποειδή με σύστημα ανάπτυξης χλωροφორμίου/μεθανόλης/νερού, 65:25:4 (v/v/v)
- **Γ** παρουσιάζεται μία δύο διαστάσεων TLC με συστήματα ανάπτυξης χλωροφόρμιο/μεθανόλη/αμμωνία (65/35/4) και βουτανόλη/οξικό οξύ/νερό (60/20/20).



A



B



Γ



Τρόποι διαχωρισμού

Χρωματογραφικές μέθοδοι

γ)Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (ThinLayerChromatography)

Διαχωρισμός χρωστικών (χλωροφυλλών) από φυτικά εκχυλίσματα

- **A:** το εκχύλισμα αναπτύσσεται σε πετρελαϊκό αιθέρα/ βενζόλιο/ οξικό οξύ 30:70:2 (v/v/v), όπου τα PL και οι χρωστικές παραμένουν στην αρχή της πλάκας ενώ τα NL διαχωρίζονται κατά τάξεις
- **B:** τα PL και οι χρωστικές αναπτύσσονται σε σύστημα ακετόνη/μεθανόλη/νερό 40:20:1 (v/v/v), οι χρωστικές παραλαμβάνονται στο μέτωπο του διαλύτη ενώ τα PL διαχωρίζονται κατά τάξεις.

Τρόποι διαχωρισμού

Χρωματογραφικές μέθοδοι

γ)Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (ThinLayerChromatography)

Γενικά αντιδραστήρια εμφάνισης	Αντίδραση	Επίδραση στα λιποειδή
H ₂ SO ₄ 50%, Θ	Απανθράκωση λιποειδών	Καταστροφική
Ατμοί I ₂	Κυρίως τα ακόρεστα	Μη Καταστροφική
Μολυβδαινικό αμμώνιο	Αντίδραση με φωσφόρο, PL	Καταστροφική
2,7-dichlorofluorescein	Κάτω από λάμπα UV Κίτρινα τα NL	Μη Καταστροφική
Νινυδρίνη	Αμινολιποειδή, αντιδρά με αμινομάδες	Καταστροφική
Dragendorff	PL, με χολίνη	Καταστροφική
A-ναφθόλη, Θ	GL μπλε-ιώδες, PL κίτρινα, Chol κόκκινο	Καταστροφική



Τρόποι διαχωρισμού

Χρωματογραφικές μέθοδοι

δ) Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

(High Performance Liquid Chromatography)

- στήλες **πυριτικού οξέος** και τα παράγωγά τους για το διαχωρισμό των NL και PL κατά τάξεις (οικογένειες) μορίων
- στήλες **ανάστροφης φάσης** διαχωρίζουν περαιτέρω τις διάφορες τάξεις μορίων σε μοριακά είδη δηλαδή ανάλογα το μήκος των λιπαρών αλυσίδων.

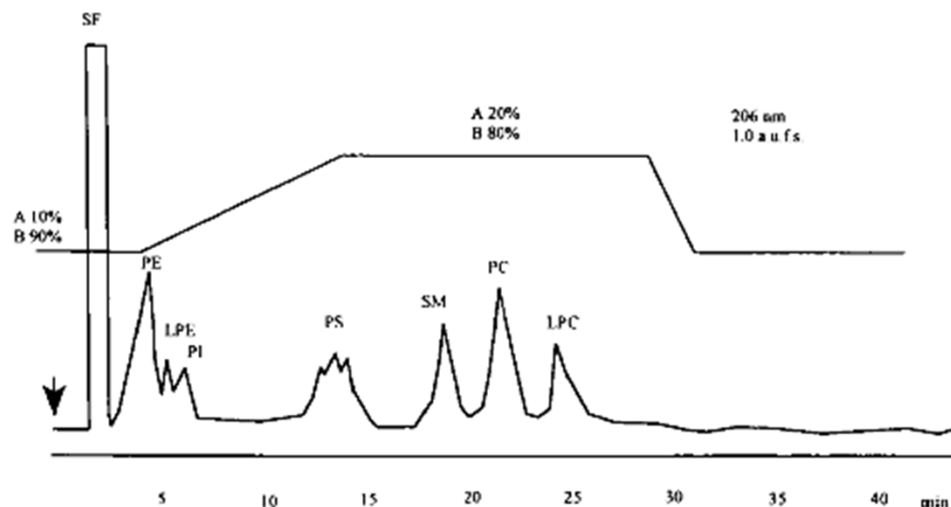
Η ανίχνευση των λιποειδικών συστατικών στις περισσότερες περιπτώσεις με τη χρήση ανιχνευτή UV (200-210nm), όπου απορροφούν οι ακόρεστοι δεσμοί.

Τρόποι διαχωρισμού

Χρωματογραφικές μέθοδοι

δ) Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

(High Performance Liquid Chromatography)



Διαχωρισμός των φωσφολιποειδών κατά τάξεις

με στήλη HPLC silica B/5

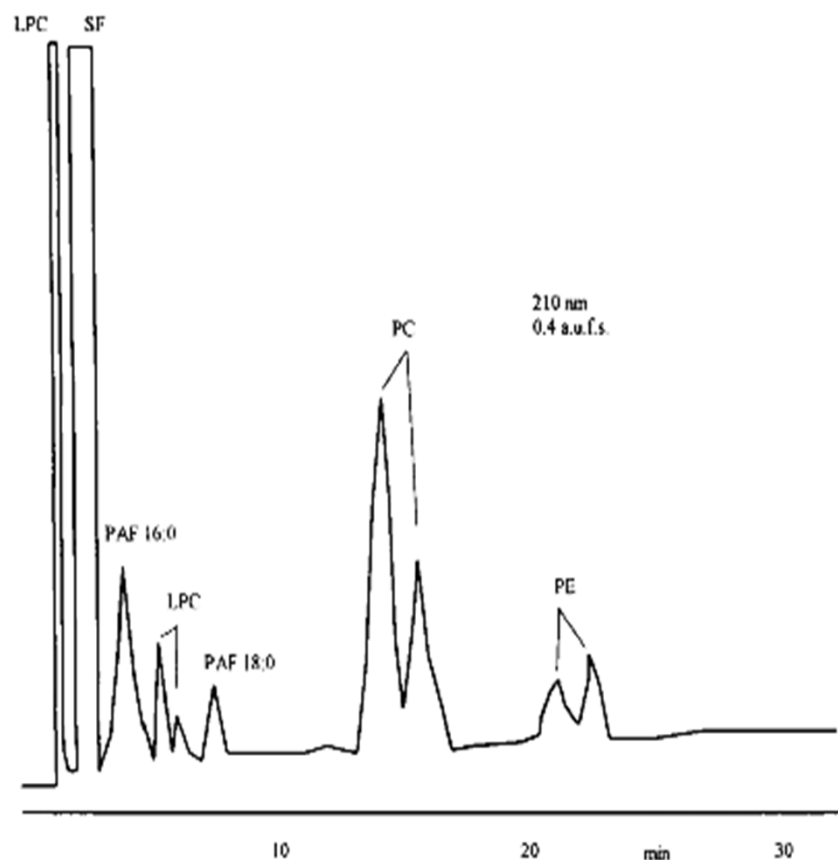
σύστημα ανάπτυξης όπου A διαλύτης είναι νερό και ο διαλύτης B είναι
εξάνιο/ισοπροπανόλη (43:57)

Τρόποι διαχωρισμού

Χρωματογραφικές μέθοδοι

δ) Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
(High Performance Liquid Chromatography)

Διαχωρισμός των φωσfolιποειδών
κατά είδη με στήλη nucleosil-300
ισοκρατικό σύστημα ανάπτυξης
μεθανόλη/νερό/ακετονιτρίλιο (63:7:30)



Τρόποι διαχωρισμού

Χρωματογραφικές μέθοδοι

δ)Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

(HighPerformanceLiquidChromatography)

Διαχωρισμός πρότυπων ενώσεων που ανήκουν στα ουδέτερα λιποειδή

με στήλη HPLC Nucleosil-300,C18,

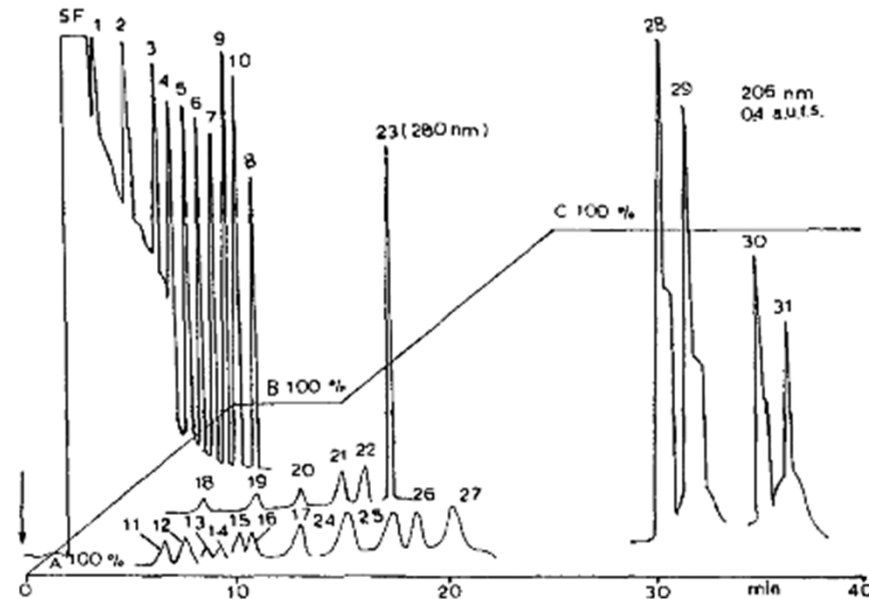
σύστημα ανάπτυξης

A μεθανόλη/νερό (80:20),

B ακετονιτρίλιο/μεθανόλη (60:40),

C ακετονιτρίλιο/τετραϋδροφουράνιο (99.5:0.5)

D ισοπροπανόλη/ακετονιτρίλιο (99:1)



No	Classes	Species	RT(min)
1	W	Cetiolate	3.50
2	RH	Cycloheptane	5.28
3	RH	Cyclododecane	6.85
4	RH	Cyclodecatriene	7.00
5	FA	Linoleic acid	7.51
6	FA	Palmitoleic acid	7.90
7	FA	Oleic acid	8.44
8	FA	Arachidic acid	10.40
9	FAME	Methylpalmitate	9.14
10	FAME	Methylstearate	9.80
11	MG	α -Monopalmitine	6.73
12	MG	α -Monostearine	8.05
13	F.AL	Cetyl alcohol	8.61
14	F.AL	Behenyl alcohol	9.63
15	GE	Celachyl alcohol	9.74
16	GE	Chimyl alcohol	11.80
17	GE	Batyl alcohol	13.20
18	ST	Desmosterol	8.69
19	ST	Ergosterol	11.30
20	ST	Cholesterol	13.00
21	ST	Stigmasterol	15.00
22	ST	β -Sitosterol	16.34
23	VIT.E	Vitamin E	17.00
24	DG	Diolen	15.62
25	DG	(α, β)-Dipalmitine	17.80
26	DG	(α, γ)-Dipalmitine	18.84
27	DG	(α, β)-Distearine	20.55
28	TG	Trilinolein	30.00
29	TG	Triolein	31.60
30	ST.E	Cholesteryl linoleate	34.80
31	ST.E	Cholesteryl palmitate	36.20



Τρόποι διαχωρισμού

Χρωματογραφικές μέθοδοι

ε) Αέρια χρωματογραφία (GC)

- ✓ Διαχωρίζονται πτητικές ενώσεις, λόγω της διαφορετικής κατανομής ή προσρόφησής τους μεταξύ μιας υγρής φάσης ακινητοποιημένης σε αδρανές στερεό υπόστρωμα και μιας κινητής αέριας φάσης.
- ✓ Ως στατικές φάσεις χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στήλες από γυαλί ή μέταλλο, πάνω στις οποίες είναι ακινητοποιημένοι HC ή πολυεστέρες χαμηλής ή υψηλής πυκνότητας. Οι στήλες φτάνουν σε μήκος ακόμα και τα 50m αυξάνοντας δραματικά τη διαχωριστική ικανότητά τους.
- ✓ Οι ανιχνευτές είναι είτε Θερμικής αγωγιμότητας (ο οποίος δεν καταστρέφει το δείγμα) και FID, ο οποίος είναι ο πιο διαδεδομένος αλλά το δείγμα δεν ανακτάται. Στην GC είναι απαραίτητη η προσθήκη εσωτερικού προτύπου.
- ✓ Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμογές στον προσδιορισμό των FA σαν FAME (μετεστεροποίηση), στον προσδιορισμό ROH, RCHO ύστερα από μετατροπή τους σε πτητικά παράγωγα καθώς και στη μετατροπή των σακχάρων σε TMS παράγωγα. Η ταυτοποίηση μιας ένωσης γίνεται αποτελεσματικότερη με συνδυασμό GC-MS.

Τρόποι ταυτοποίησης της δομής λιποειδικών ενώσεων (ποιοτικοί και ποσοτικοί προσδιορισμοί)

Ο προσδιορισμός της δομής αλλά και ο ποσοτικός προσδιορισμός ενός λιποειδούς γίνεται με τρεις κυρίως τρόπους:

- ❑ Με τις προαναφερθείσες χρωματογραφικές τεχνικές
- ❑ Με χημικούς/ενζυμικούς προσδιορισμούς, οι οποίοι βασίζονται κυρίως στη διάσπαση των λιποειδών στα δομικά συστατικά τους και ανάλυση αυτών
- ❑ Με φυσικοχημικές τεχνικές (UV-Vis, IR, NMR, MS)

Για να χαρακτηριστεί πλήρως ένα λιποειδικό μόριο συνήθως χρειάζεται συνδυασμός των παραπάνω μεθόδων



Τρόποι ταυτοποίησης της δομής λιποειδικών ενώσεων

Χημικοί προσδιορισμοί

- ✓ υπολογισμός ξηρού βάρους, διότι λόγω αδυναμίας υπολογισμού του MB πολλών λιποειδών εκφράζονται σαν w/w αρχικού εκχυλίσματος,
- ✓ προσδιορισμός φωσφόρου (για τα φωσφολιποειδή)
- ✓ προσδιορισμός εστέρων, αζώτου, θείου,
- ✓ σακχάρων (για τα γλυκολιποειδή),
- ✓ αμινομάδων, χολίνης, γλυκεριναιθέρων, πλασμαλογόνων,
- ✓ χοληστερόλης, ακορεστότητας, και γλυκερόλης.



Τρόποι ταυτοποίησης της δομής λιποειδικών ενώσεων

Χημικοί/Ενζυμικοί προσδιορισμοί

Τα είδη των δεσμών που συναντώνται στις λιποειδικές ενώσεις είναι κυρίως **εστερικοί** δεσμοί αλλά και **αμιδιικοί, αιθερικοί, βινυλαιθερικοί, φωσφοεστερικοί και γλυκοζιτικοί**.

Οι δεσμοί αυτοί υδρολύονται χημικά είτε με ήπια αλκαλική και όξινη υδρόλυση (διάσπαση εστερικών δεσμών) είτε με ισχυρή αλκαλική και όξινη υδρόλυση.

Οι **λιπάσες** που χρησιμοποιούνται είναι φυτικής (σπόροι σιταριού) ή ζωϊκής προέλευσης (παγκρεατική λιπάση) και υδρολύουν αρχικά τα ακραία FA των TG.

Από τις **φωσφολιπάσες** κυρίως αυτές που χρησιμοποιούνται ανήκουν στις κατηγορίες A₁, A₂, C, και D. Η PLB είναι μίγμα των A₁ και A₂.

Τρόποι ταυτοποίησης της δομής λιποειδικών ενώσεων

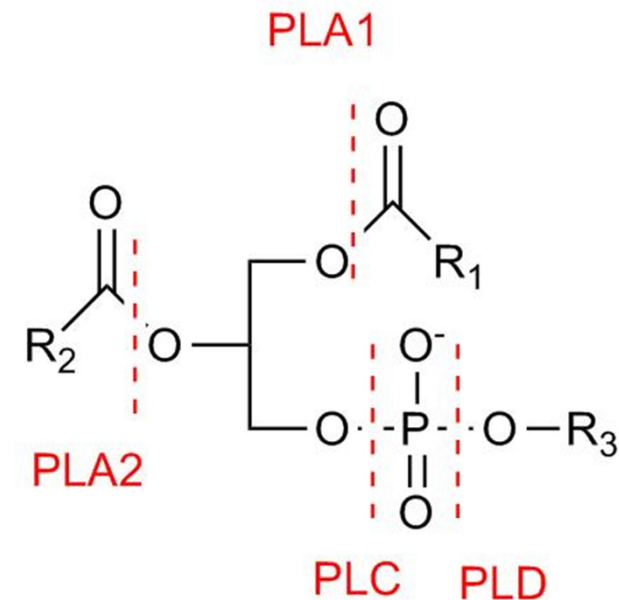
Χημικοί/Ενζυμικοί προσδιορισμοί

Η **PLA₂** απαντάται σε δηλητήρια φιδιών και μελισσών.

Υδρολύει τα FA της sn-2 θέσης, λειτουργεί σε γαλακτώματα, ενώ η προσθήκη αιθέρα βελτιώνει τη δράση της.

Η **PLC** (*Bacillus cereus*) καταλύει την υδρόλυση του εστερικού δεσμού μεταξύ της φωσφορικής ομάδας και της γλυκερόλης. Πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν διαφορετικές PLC για τις διαφορετικές πολικές κεφαλές.

Η **PLD** έχει δύο δράσεις: 1) φωσφοδιεστεράσης και χρησιμοποιείται για δομικές αναλύσεις και 2) τρανσφωσφατιδυλίωση: ανταλλαγή βάσης με αλκοόλες.





Τρόποι ταυτοποίησης της δομής λιποειδικών ενώσεων

Με φυσικοχημικές τεχνικές (UV-Vis, IR, NMR, MS)

Φασματομετρία μάζας (MS)

- ❑ τα μόρια ιονίζονται με την εκάστοτε χρησιμοποιούμενη μέθοδο, ενώ στη συνέχεια τα ιόντα οδηγούνται σε ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο όπου τα ιόντα διαχωρίζονται βάση του λόγου: **μάζα/φορτίο (m/z)**.
- ❑ Η τεχνική αυτή έχει πολλές εφαρμογές τα τελευταία χρόνια και κυρίως όταν συνδυάζεται με GC και HPLC, δηλαδή με τεχνικές που επιτρέπουν και το διαχωρισμό ενώσεων από μίγματα.
- ❑ **Lipidomics.** ανάπτυξη ευαίσθητων τεχνικών MS όπως για παράδειγμα την τεχνική του tandem electrospray ionization, που επιτρέπουν τη μελέτη ενώσεων μικρών ποσοτήτων σε βιολογικά δείγματα. Κυρίως οι τεχνικές αυτές αναπτύχθηκαν για να καλύψουν τα μειονεκτήματα που εμφάνιζαν οι πιο παλιές μεθοδολογίες όπως για παράδειγμα τη χαμηλή ευαισθησία των χρωματογραφικών τεχνικών (TLC, HPLC), την μετατροπή σε παράγωγα (GC) ή τη χρήση ραδιοϊσοτόπων.



Τρόποι ταυτοποίησης της δομής λιποειδικών ενώσεων

Με φυσικοχημικές τεχνικές (UV-Vis, IR, NMR, MS)

Φασματομετρία μάζας (MS)

□ Lipidomics.

σε δύο διαφορετικές μεθοδολογικές προσεγγίσεις:

- Τη τεχνική της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με tandem MS (**LC/MS/MS**), η οποία εμφανίζει υψηλή ευαισθησία και επιτρέπει και ποσοτικό προσδιορισμό και
- Τη λεγόμενη τεχνική “**shotgun lipidomics**”, η οποία όμως σε ένα μίγμα ανιχνεύει μόνο τις ενώσεις εκείνες που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία.

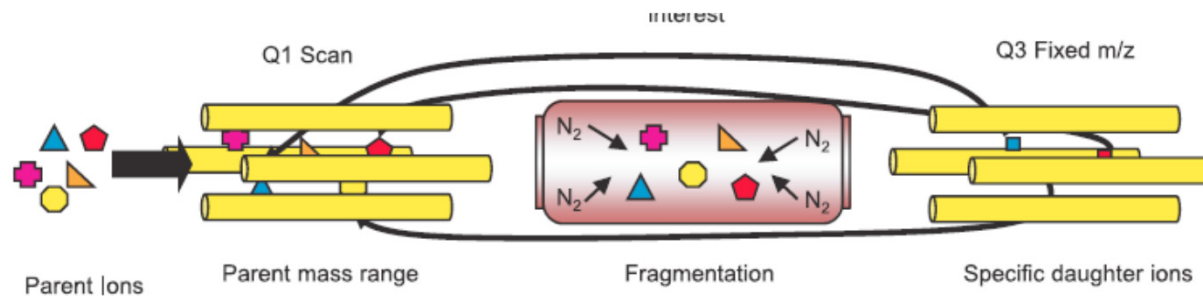
Τρόποι ταυτοποίησης της δομής λιποειδικών ενώσεων

Φασματομετρία μάζας (MS)

LC/MS/MS

αρκετά μοριακά είδη μπορούν να αναλυθούν στο ίδιο δείγμα μετά από διαχωρισμό με την υγρή χρωματογραφία (LC) και με την εμφάνιση χαρακτηριστικών θραυσμάτων m/z

- ✓ συνολικό ΜΒ της ένωσης (**parent ions**)
- ✓ για «τμήματα» της ένωσης (**daughter ions**), τα οποία προκύπτουν μετά από διάσπαση της αρχικής ένωσης (collision-induced-fragmentation, CIF).



Τρόποι ταυτοποίησης της δομής λιποειδικών ενώσεων

Φασματομετρία μάζας (MS)

LC/MS/MS

Στοχεύει σε συγκεκριμένες λιποειδικές ενώσεις και απαιτείται ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός.

Τα parent ions των διαφόρων ενώσεων προκύπτουν συνήθως με τη μορφή $[M+NH_4]^+$ ή $[M+H]^+$ ή $[M+Na]^+$ και σπανίως –κάτω από κατάλληλες συνθήκες- με τη μορφή $[M-H]^-$.

Επίσης με τη τεχνική της CIF εμφανίζονται χαρακτηριστικά θραύσματα για κάθε ένωση, όπως για τις φωσφατιδυλοχολίνες και τις σφιγγομυελίνες, το θραύσμα στο m/z 184, το οποίο αντιστοιχεί στην πολική κεφαλή της φωσφοχολίνης.

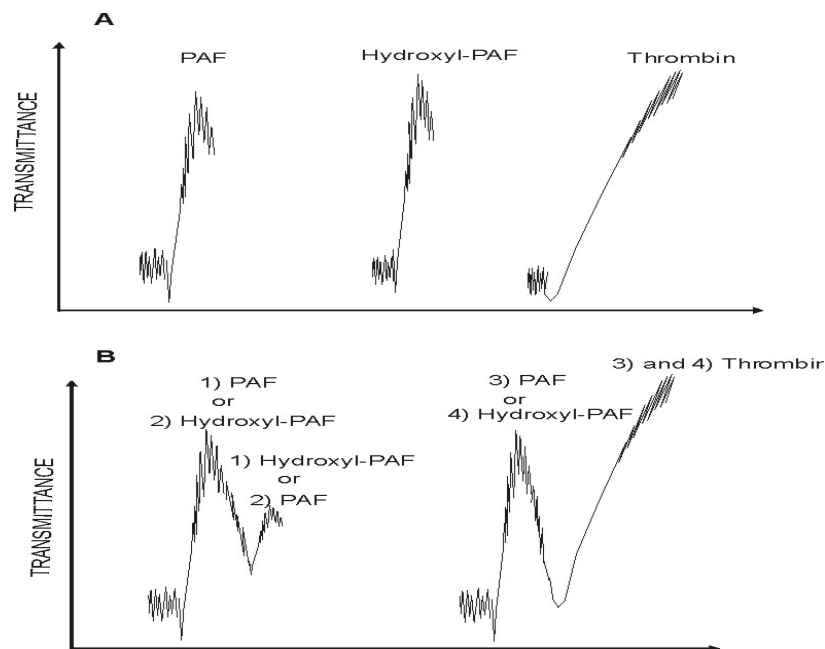
Σε άλλες περιπτώσεις δεν εμφανίζεται θραύσμα της πολικής κεφαλής αλλά το θραύσμα του MB χωρίς την πολική κεφαλή, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης με το m/z $[M-141]^-$

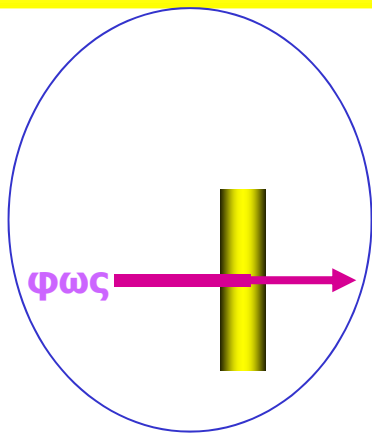
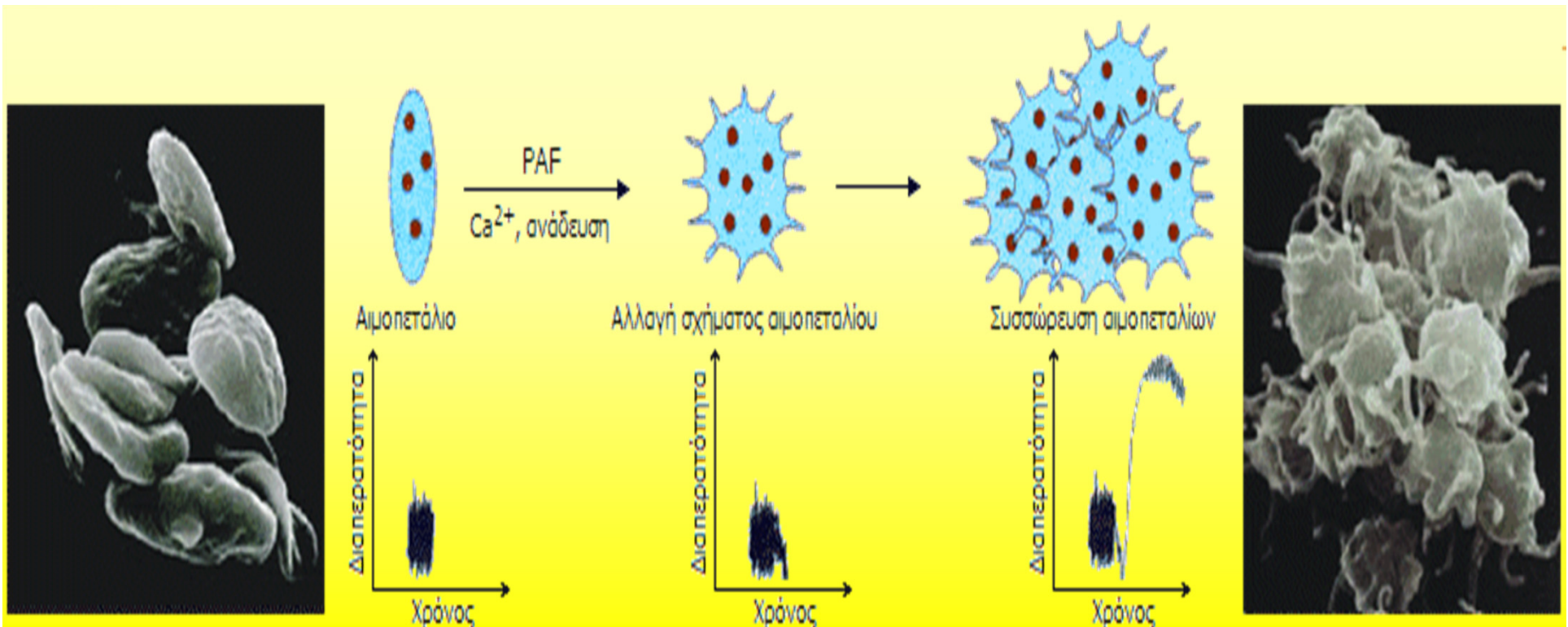
Τρόποι ταυτοποίησης της δομής ΛΙΠΟΕΙΔΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

παράδειγμα συνδυασμού μεθόδων

το οποίο χρησιμοποιήθηκε, προκειμένου να διαλευκανθεί η δομή, ενός βιολογικά δραστικού λιποειδούς απομονωμένο από αίμα ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα

- ✓ μέθοδος εκτίμησης της βιολογικής δραστηριότητας έγινε με αξιολόγηση της ικανότητας της απομονωμένης ένωσης να προκαλεί συσώρευση αιμοπεταλίων



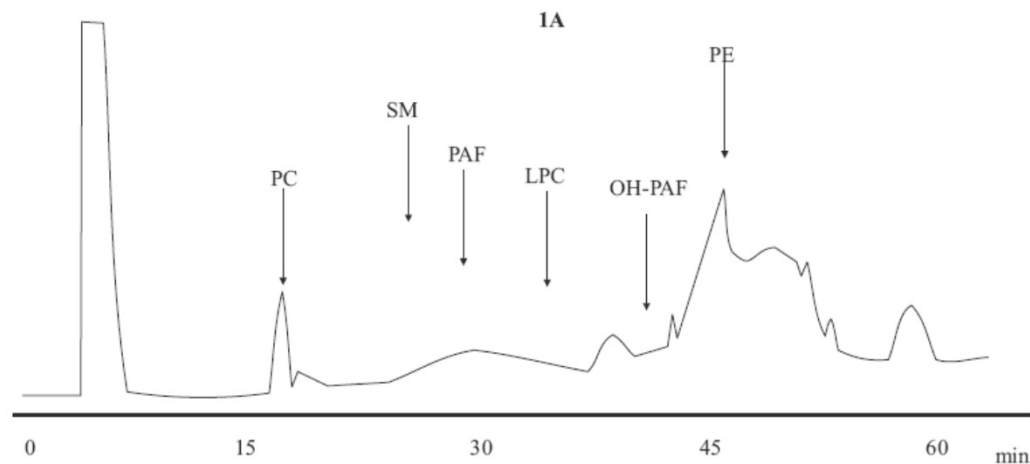


Συσσώρευση αιμοπεταλίων σε aggregometer

Τρόποι ταυτοποίησης της δομής ΛΙΠΟΕΙΔΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

παράδειγμα συνδυασμού μεθόδων

- Συλλογή αίματος σε απόλυτη αιθανόλη, απενεργοποίηση Lp-PLA₂ (PAF-AH)
- Φυγοκέντρηση. Το ίζημα και το υπερκείμενο εκχυλίστηκαν με βάση τη μέθοδο Bligh-Dyer, παραλαβή χλωροφορμικών φάσεων
- Χρωματογραφία στήλης, παραλαβή κλάσματος πολικών λιποειδών.
- Περαιτέρω διαχωρισμός με στήλη HPLC και σύστημα έκλουσης πολικών λιποειδών.



Τρόποι ταυτοποίησης της δομής ΛΙΠΟΙΔΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

παράδειγμα συνδυασμού μεθόδων

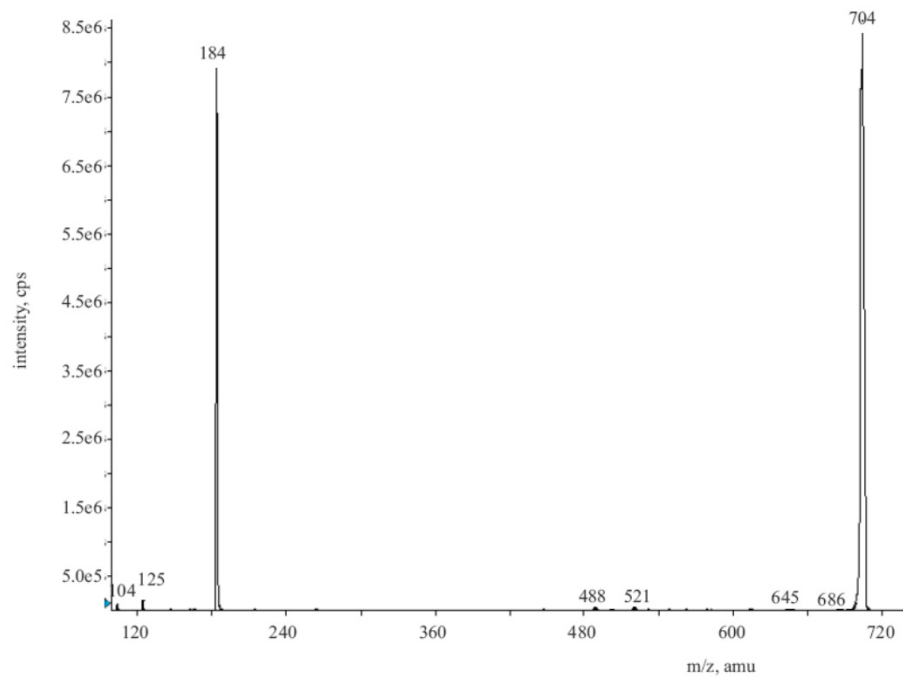
το απομονωμένο από την HPLC δραστικό συστατικό

- επεξεργάστηκε με την Lp-PLA₂ και φάνηκε ότι χάνεται η βιολογική του δραστηριότητα \longrightarrow ύπαρξη ακετυλο-ομάδας ή μικρής αλύσου λιπαρό οξύ (sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού)
- 'Ηπια αλκαλική υδρόλυση, επανακετυλίωση και έλεγχος βιολογικής δράσης μετά από κάθε διεργασία \longrightarrow ύπαρξη υδροξυλομάδας (sn-1 θέση του γλυκερινικού σκελετού)
- Η ταυτοποίηση της δομής του ολοκληρώθηκε με MS, όπου εμφανίστηκαν τα θραύσματα [M+H]⁺, [M+Na]⁺ και [2M+H]⁺ καθώς και το θραύσμα m/z 184, χαρακτηριστικό της φωσφοχολίνης. Με βάση όλα τα αποτελέσματα, η ένωση ταυτοποιήθηκε ως **μονο-υδροξυ-ανάλογο του PAF**.

Τρόποι ταυτοποίησης της δομής ΛΙΠΟΙΔΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

παράδειγμα συνδυασμού μεθόδων

το απομονωμένο από την HPLC δραστικό συστατικό



Antonopoulou, S., et al, Biochem. J., 330, 791-794, 1998



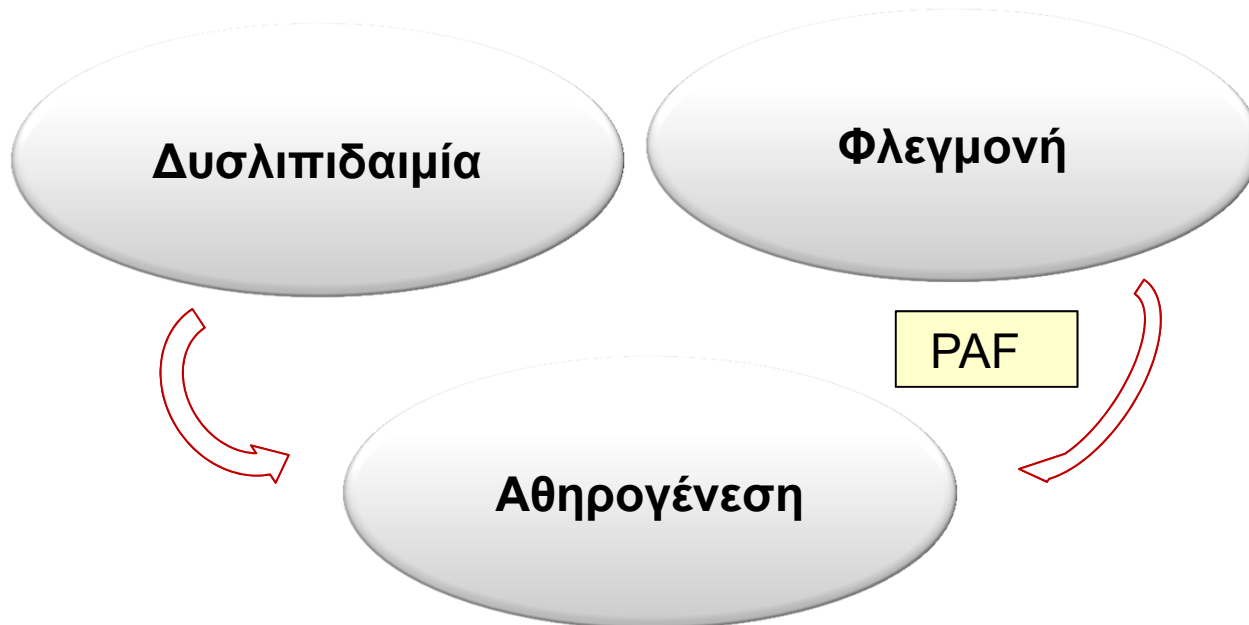
Τρόποι αξιολόγησης βιολογικής δράσης

Υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία μεθόδων για την εκτίμηση της βιολογικής δράσης ενώσεων απομονωμένων από φυσικές πηγές, όπως αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης, αντιθρομβωτικής κλπ

Εφαρμογή σε ελαιόλαδο και παραπροϊόντα ελαιουργίας.

- Εξήγηση της ευεργετικής δράσης της Μεσογειακής διαίτας στα καρδιαγγειακά νοσήματα με βιοχημικό τρόπο

Διαδικασία της ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης στις αρτηρίες μεσαίου και μεγάλου μεγέθους.





Εφαρμογή σε ελαιόλαδο και παραπροϊόντα ελαιουργίας.

- ❑ Αναζητήθηκε η ύπαρξη λιποειδικών αναστολέων του PAF σε τρόφιμα της Μεσογειακής δίαιτας, με χαρακτηριστικό εκπρόσωπο το ελαιόλαδο.
- ❑ Απομονώθηκαν λιποειδικά μόρια που ανέστειλαν τη δράση του PAF σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού
- ❑ Τα πολικά λιποειδή ήταν καλύτεροι αναστολείς σε σχέση με τα ουδέτερα.
- ❑ Μελέτη σε πειραματικό μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιού, ώστε να διευκρινιστεί ο ρόλος των αναστολέων του PAF από ελαιόλαδο σε in vivo συνθήκες

Εφαρμογή σε ελαιόλαδο και παραπροϊόντα ελαιουργίας.

Αρσενικά λευκά κουνέλια

Νέας Ζηλανδίας σε 4 ομάδες

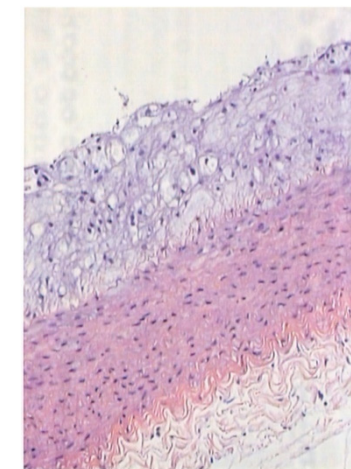
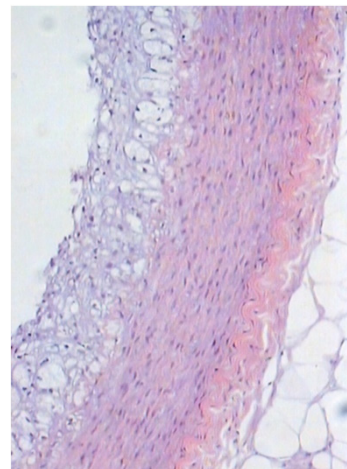
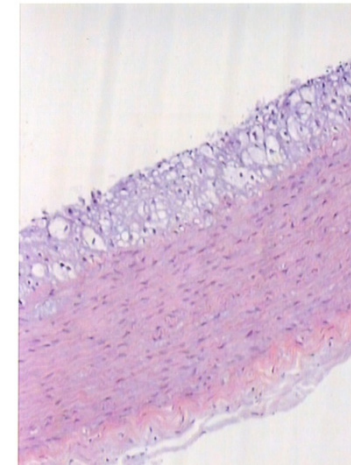
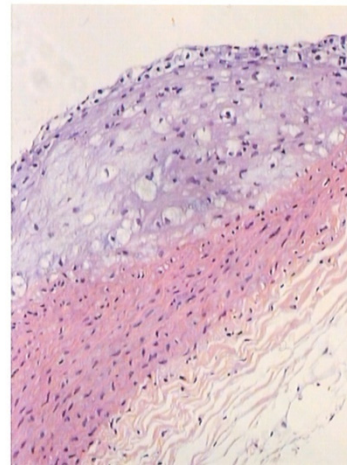
τρέφθηκαν για 45 ημέρες

με αθηρογόνο δίαιτα

+ με ελαιόλαδο

+ κλάσμα ελαιολάδου πλούσιο
σε αναστολείς του PAF (PL)

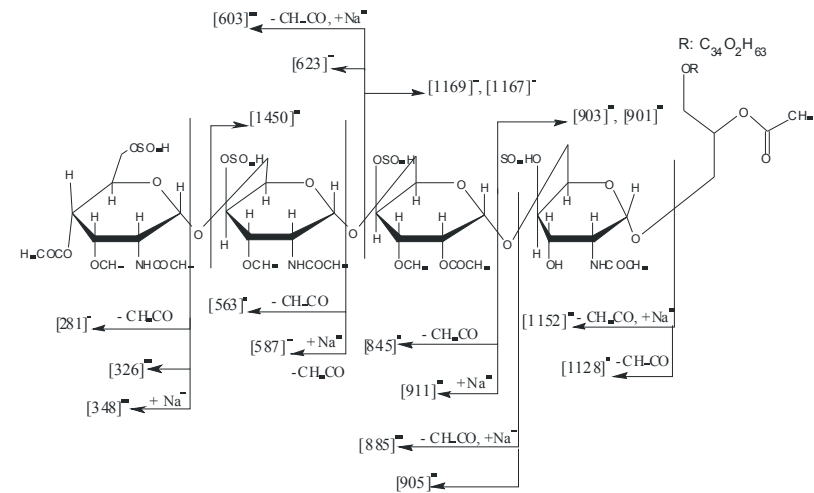
+ με κλάσμα ελαιολάδου φτωχό
σε αναστολείς του PAF (NL)



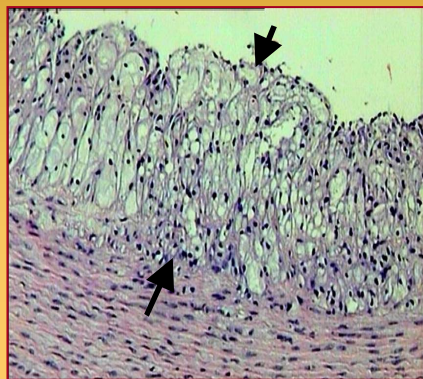
Karantonis, H.C., Antonopoulou s. et al,
Nutr Metab Cardiovasc Dis., 16, 174-
185, 2006

Εφαρμογή σε ελαιόλαδο και παραπροϊόντα ελαιουργίας.

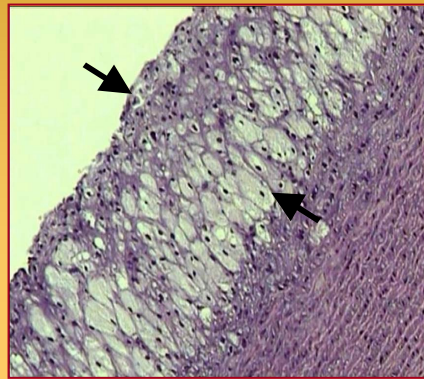
- Οι βιολογικά δραστικές ενώσεις με την αντι-αθηρογόνο δράση, ταυτοποιήθηκαν πλήρως.
- Απομονώθηκαν και εντοπίστηκαν και σε παραπροϊόντα ελαιουργίας.
- Ανάλογο το τρόφιμο, στο οποίο πρόκειται να ενσωματωθούν, με βάση τη νομοθεσία τροφίμων, χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση διαλύτες που επιτρέπονται.
- Η μελέτη αξιολόγησης της δράσης τροφίμων εμπλουτισμένων με τα αντι-αθηρογόνα συστατικά από τα παραπροϊόντα ελαιουργίας είναι σε εξέλιξη, στο τελευταίο στάδιο της διατροφικής παρέμβασης σε εθελοντές.



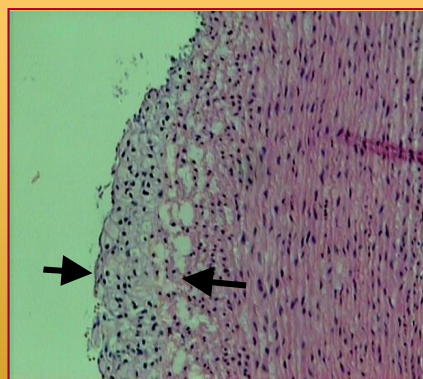
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΡΑΦ ΑΠΟ ΕΛΑΙΟΠΥΡΗΝΑ ΥΠΟΣΤΡΕΦΟΥΝ ΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ ΟΠΩΣ ΚΑΙ ΟΙ ΣΤΑΤΙΝΕΣ



A Αθηρογόνος
δίαιτα



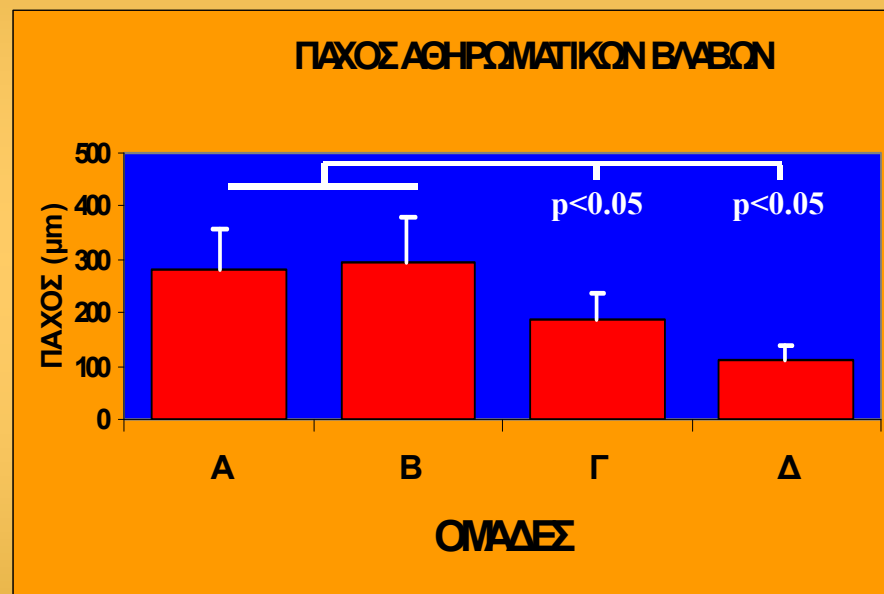
B + Τυπική
τροφή



Γ + Αναστολείς
Ελαιοπυρήνα



Δ +
Σιμβαστατίνη



**p*
Δοκιμασία Mann Whitney.