



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

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»

Βιολογικά δραστικά μικροσυστατικά λιποειδής φύσης

Σμαραγδή Αντωνοπούλου, Καθηγήτρια Βιοχημείας

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Στο πλαίσιο της διάλεξης αυτής θα αναφερθούν εισαγωγικά στοιχεία για τα λιποειδικής φύσης συστατικά και την κατάταξή τους και στη συνέχεια θα ακολουθήσουν οι κάτωθι ενότητες:

1. Ιστορική αναδρομή και μέλλον των λιποειδών ως προς τη βιολογική τους δράση
2. Τρόποι απομόνωσης και διαχωρισμού αυτών
3. Τρόποι ταυτοποίησης της δομής λιποειδικών ενώσεων (ποιοτικοί και ποσοτικοί προσδιορισμοί)
4. Τρόποι αξιολόγησης βιολογικής δράσης (απλή αναφορά)
5. Εφαρμογή σε ελαιόλαδο και παραπροϊόντα ελαιουργίας. Ενσωμάτωσή τους σε τρόφιμα.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

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»

Βιολογικά δραστικά μικροσυστατικά λιποειδικής φύσης

Σμαραγδή Αντωνοπούλου
Καθηγήτρια Βιοχημείας
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

1. Εισαγωγή

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 (π.χ. έχουν λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες, γλυκερόλη, στερόλες, σάκχαρα, υδρογονάνθρακες, κ.λπ.). Έτσι, τα λιποειδή χαρακτηρίζονται τα αδιάλυτα στο νερό οργανικά βιομόρια, που διαλύονται όμως σε (μη πολικούς) οργανικούς διαλύτες, όπως το χλωροφόρμιο, το βενζόλιο ή και μίγματα μη πολικών και πολικών οργανικών διαλυτών, όπως μίγματα χλωροφορμίου-μεθανόλης (που αποτελεί και το γενικό διαλυτικό μέσο των λιποειδών). Σε γενικές γραμμές τα λιποειδή είναι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους και τα οποία είναι κυρίως υδρόφοβα και αμφίφιλα μόρια.

Τα λιποειδή είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση, τόσο στα ζώϊκά όσο και στα φυτικά κύτταρα και περιλαμβάνουν ένα **πολύ μεγάλο αριθμό ενώσεων**, χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι για τα φωσφολιποειδή μόνο, έχουν περιγραφεί περισσότερα από 1000 είδη. Το γεγονός αυτό αποτελεί πρόβλημα αλλά και πρόκληση για τη μελέτη της απομόνωσης, του διαχωρισμού, της ταυτοποίησης της δομής και του βιολογικού τους ρόλου.

Όλες αυτές οι τόσο διαφορετικές ενώσεις κατατάσσονται στην κατηγορία των λιποειδών λόγω κάποιων κοινών σημείων και βιολογικών δράσεων. Τα κοινά αυτά σημεία είναι:

- Ο μεταβολισμός τους (π.χ. όλα βιοσυντίθενται από ενεργοποιημένο οξικό οξύ). Αξίζει να αναφερθεί ότι η συντριπτική πλειοψηφία των λιποειδών παράγονται ενδογενώς αλλά επιπλέον μέρος αυτών προέρχεται και από τη διατροφή.
- 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 (σε συστατικά των περικυτταρικών και άλλων μεμβρανών) ώστε να είναι δυνατόν να αναπτύσσεται ηλεκτρικό δυναμικό ανάμεσα στις δύο επιφάνειες της μεμβράνης.
- Έχουν κάποιες πολύ σημαντικές βιολογικές δράσεις (ειδικές 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.

2. Κατάταξη λιποειδών

Ο περισσότερο ικανοποιητικός και αποδεκτός μέχρι σήμερα τρόπος κατάταξης είναι εκείνος που τα διαχωρίζει ανάλογα με τη δομή του σκελετού τους (backbone). Σύμφωνα με αυτόν (Πίνακας 1), διακρίνονται σε

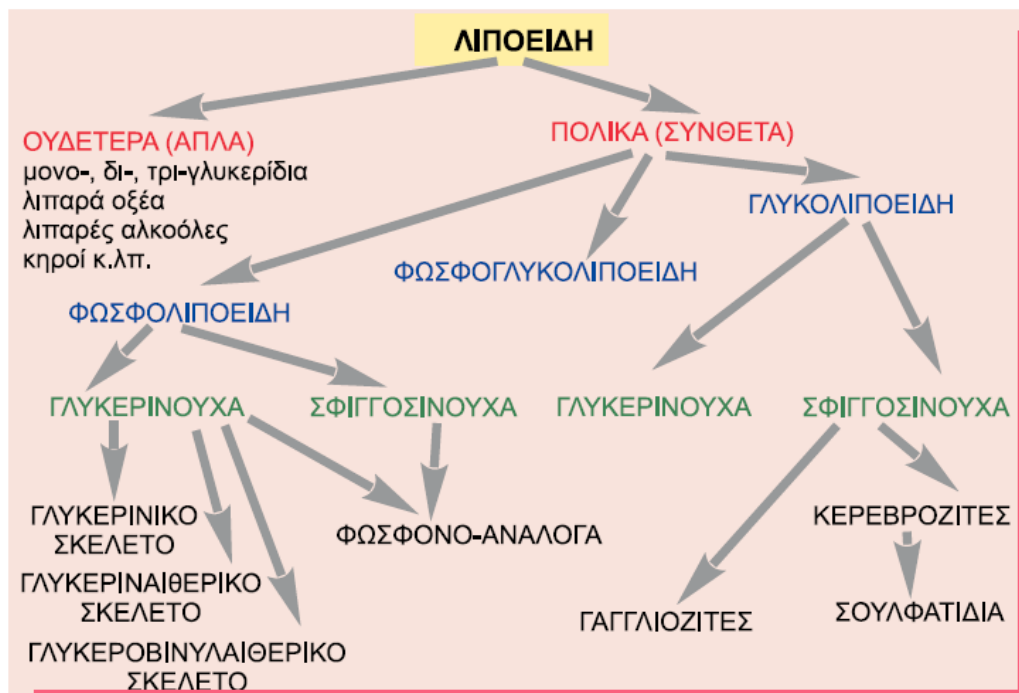
- απλά λιποειδή (simple lipids) ή ουδέτερα (neutral lipids) ή μη πολικά λιποειδή (nonpolar lipids) τα οποία αποτελούνται από μη σαπωνοποιήσιμες ενώσεις (π.χ.

υδρογονάνθρακες, λιπαρά οξέα, αλκοόλες κ.λπ.) ή απλούς εστέρες (π.χ. τριακυλογλυκερόλες, κηρούς, εστέρες χοληστερόλης, κ.λπ.) και σε

- σύνθετα λιποειδή (complex lipids) ή πολικά λιποειδή (polar lipids) τα οποία με υδρόλυση, δίνουν περισσότερα από δύο προϊόντα υδρόλυσης, όπως π.χ. τα φωσφολιποειδή, που με υδρόλυση δίνουν γλυκερόλη, λιπαρά οξέα, φωσφορικό οξύ και κάποια βάση (π.χ. χολίνη, αιθανολαμίνη, κ.λπ.).

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα λιποειδή δεν απαντούν, συνήθως, μόνα τους αλλά είναι συνδεδεμένα είτε με ομοιοπολικό δεσμό, είτε με ασθενείς μη χημικούς δεσμούς με άλλες τάξεις ενώσεων, όπως τις πρωτεΐνες (λιποπρωτεΐνες) ή τους υδατάνθρακες (γλυκολιποειδή).

Πίνακας 1: Κατάταξη λιποειδών



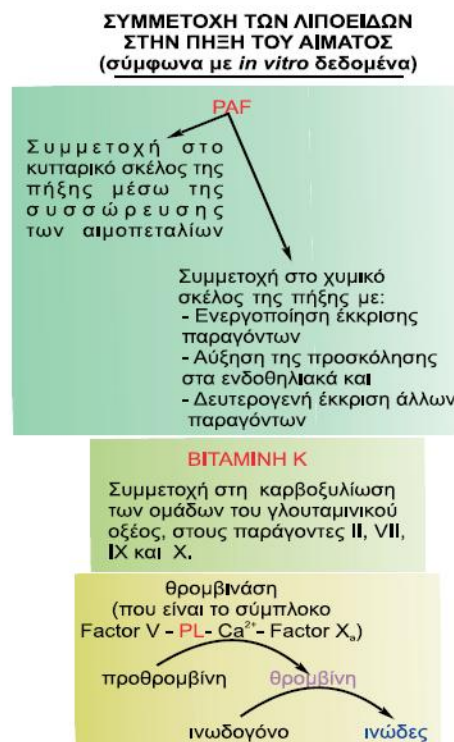
3. Ιστορική αναδρομή και μέλλον των λιποειδών ως προς τη βιολογική τους δράση
- Πρώτα αναγνωρίστηκαν σα **συστατικά των μεμβρανών**, που συμμετέχουν όχι μόνο στη δομή της, αλλά και στις λειτουργίες της, όπως στη διέλευση ενώσεων, στη μεταφορά ηλεκτρονίων, στις βιοσυνθετικές πορείες της κ.λπ.
 - Στη συνέχεια, απομονώθηκαν συγκεκριμένα λιποειδή με βιολογική δράση, όπως η ακετυλοχολίνη, οι προσταγλανδίνες, οι λιποδιαλυτές βιταμίνες, τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, χοληστερόλη, λιποπρωτεΐνες κ.λπ.
 - Ένας άλλος σημαντικός ρόλος τους είναι η **επίδρασή τους σε ενζυμικές αντιδράσεις**. Πιο συγκεκριμένα
 - α) Επιδρούν στα διαμεμβρανικά ένζυμα, αφού απομάκρυνση των λιποειδών οδηγεί σε μη δραστικό ένζυμο σε κάποιες αντιδράσεις.
 - β) Συμμετέχουν σα συνένζυμα και συμπαραγοντες.
 Για παράδειγμα, η Ca^{2+} - Mg^{2+} ΑΤΡάση των ερυθροκυττάρων του ανθρώπου (που ρυθμίζει τα επίπεδα του Ca^{2+} σ' αυτό), είναι δραστική μόνο παρουσία κάποιων

συγκεκριμένων φωσφολιποειδών ή ακόμα γνωστά συνένζυμα όπως το συνένζυμο Q, το λιποϊκό οξύ και άλλα είναι λιποειδικής φύσης.

γ) Τέλος μπορούν να επιδρούν και στους υπόλοιπους παράγοντες των ενζυμικών αντιδράσεων όπως στο υπόστρωμα, στους αναστολείς, στους ενεργοποιητές, στους συμπαράγοντες, στην ενέργεια ενεργοποίησης κ.λπ.

- Σημαντικότερη είναι και η δράση τους σαν **αντιοξειδωτικά**, με κυριότερο παράδειγμα τη βιταμίνη E. Τα τελευταία δε χρόνια, πλήθος φαινολικών ενώσεων, τα οποία απομονώνονται από φυσικές πηγές, αποκτούν όλο και περισσότερο ενδιαφέρον, λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και λοιπών σημαντικών ιδιοτήτων τους, με αποτέλεσμα να εμπλέκονται σε πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια κατηγορία χημικών ενώσεων η οποία μπορεί να συμπεριληφθεί στην ομάδα των λιποειδών, δεδομένου ότι διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες. Αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό χιλιάδων ενώσεων με αρκετά ετερογενείς δομές. Κοινό δομικό χαρακτηριστικό τους είναι η ύπαρξη ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου υποκατεστημένου με υδροξυλομάδα. Οι φαινολικές ενώσεις είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και βρίσκονται εντός αυτών ελεύθερα, ή ενωμένα με μόρια γλυκόζης ή άλλα σάκχαρα (γλυκοζίτες), αμινών, οργανικών οξέων ή άλλες τάξεις λιποειδών ή και άλλα συστατικά.
- Συνεχώς αυξανόμενης σημασίας είναι η **συμμετοχή τους στις λιποπρωτεΐνες** και ειδικότερα στις λιποπρωτεΐνες του αίματος.
- Στην **πήξη του αίματος** η συμμετοχή των λιποειδών είναι καθοριστική με τη δράση του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF), της βιταμίνης K και των φωσφολιποειδών (PL, με πιο σημαντική τη φωσφατιδυλοσερίνη) που είναι απαραίτητα στους διάφορους παράγοντες της πήξης, για να μετατραπεί η προθρομβίνη σε θρομβίνη και να συντελεσθεί ο καταρράκτης των αντιδράσεων της πήξης του αίματος (σχήμα 1).

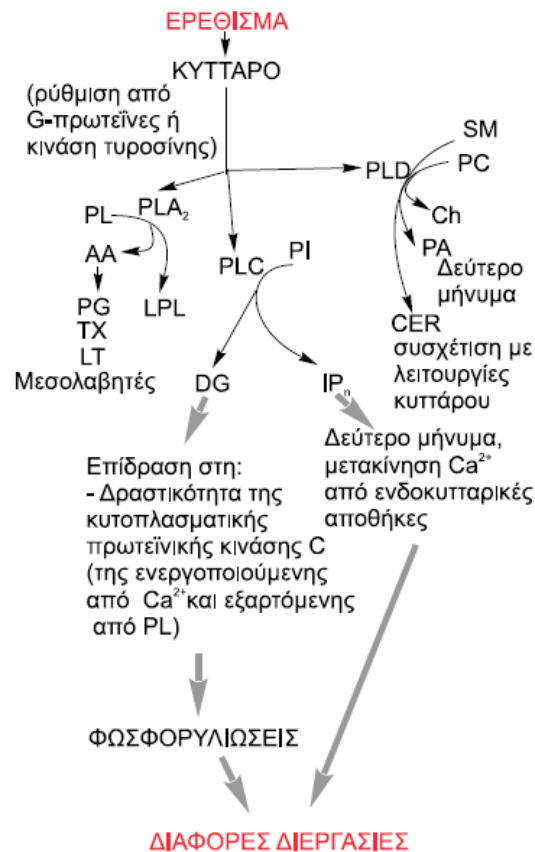
Σχήμα 1



- Η πρώτη κύρια δράση μέγιστης σημασίας, στην οποία συμμετείχαν τα λιποειδή, ήταν η **αλληλεπίδραση κυττάρου με κύτταρο** (cell – cell interaction), και πιο συγκεκριμένα η λήψη του σήματος, η αντίδραση του κυττάρου σε πολλούς αγωνιστές, η μετάδοση - μεταγωγή του σήματος (signal transduction) και γενικά η παραδοχή της συμμετοχής των λιποειδών στο μεταβολισμό και στο σύνολο των δράσεων του κυττάρου.

Το όλο θέμα της επικοινωνίας - διάδοσης σήματος ξεκίνησε το 1953, όταν ο Hokin δημοσίευσε ότι επίδραση με ακετυλοχολίνη σε κύτταρα παγκρέατος ενεργοποιεί μόνο το μεταβολισμό του φωσφατιδυλοϊνositη και του φωσφατιδικού οξέος από τα φωσφολιποειδή και όχι το μεταβολισμό των άλλων φωσφολιποειδών. Το 1975 ο Mitchell δημοσίευσε τη σημασία των φωσφολιποειδών με ινositη στις δράσεις των μεμβρανών και συγκεκριμένα στην είσοδο Ca^{2+} στο κύτταρο. Σήμερα είναι παραδεκτό ότι, όπως περιγράφεται στο σχήμα 2, ένα αδρανές πρόδρομο μόριο μετατρέπεται σε βιολογικά δραστικό προϊόν, με παράδειγμα το ρόλο των φωσφολιποειδών στις μεμβρανικές διεργασίες, μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από ένζυμα και οδηγούν στην παραγωγή δευτέρων μηνυμάτων, πολλά από τα οποία είναι λιποειδικής φύσης.

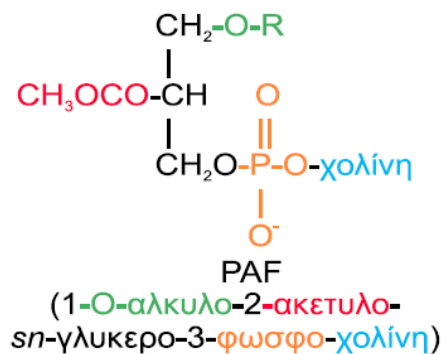
Σχήμα 2



PLA ₂ : φωσφολιπάση	PA: φωσφατιδικό οξύ
PLC: φωσφολιπάση	PG: προσταγλανδίνες
PLD: φωσφολιπάση	TX: θρομβοξάνια
PI: φωσφατιδυλοϊνositη	LT: λευκοτριένια
PL: φωσφολιποειδή	AA: αραχιδονικό οξύ
PC: φωσφατιδυλοχολίνη	DG: διγλυκερίδιο
Ch: χολίνη	IP ₃ : φωσφοϊνositη
SM: σφιγγομυελίνη	LPL: λυσο-φωσφολιποειδή
	CER: κηραμίδια

- Μέχρι τη δεκαετία του 1970, η ιδέα ύπαρξης φωσφολιποειδών σαν **αγωνιστών** δεν αποτελούσε θέμα ενδιαφέροντος, γιατί θεωρείτο απίθανη μια τέτοια περίπτωση. Η ανακάλυψη του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (Platelet-Activating Factor, PAF) το 1980, άλλαξε τα δεδομένα και άνοιξε νέες κατευθύνσεις στην έρευνα των λιποειδών. Και αυτό γιατί ο PAF (σχήμα 3) είναι ο ισχυρότερος μέχρι σήμερα γνωστός φλεγμονώδης και αλλεργιογόνος παράγοντας, σα γλυκεριναιθερικό λιποειδές εμπλέκεται στον καρκίνο με άγνωστη σημασία και φαρμακολογική δράση και γενικά εμπλέκεται σε πάρα πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις, διαδραματίζοντας πρωτεύοντα ρόλο. Δηλαδή, σήμερα είναι αποδεκτό ότι ο PAF είναι ένας αρχέγονος μεσολαβητής-ορμόνη ή κατ' άλλους ένας αρχέγονος-καθολικός κυτταρικός βιολογικός ρυθμιστής, που ανήκει σε μια οικογένεια μορίων με ανάλογη δράση και στην οποία είναι το πρώτο και το δραστηκότερο μόριο που ανακαλύφθηκε. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί και η συμμετοχή των γλυκεριναιθερικών λιποειδών κατά την εξέλιξη των οργανισμών. Πιστεύεται ότι οι αρχέγονοι οργανισμοί περιείχαν γλυκεριναιθερικά λιποειδή (λιποειδή με αιθερικούς δεσμούς αντί των εστερικών που συνήθως περιέχουν σήμερα) τα οποία είναι ανθεκτικά σε έντονες συνθήκες του περιβάλλοντος (ισχυρό όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον, υψηλές θερμοκρασίες κ.λπ.). Στη συνέχεια αντικαταστάθηκαν οι αιθερικοί δεσμοί με εστερικούς, αλλά κάποια σημαντικά γλυκεριναιθερικά λιποειδή, λόγω του βιολογικού τους ρόλου, παρέμειναν.

Σχήμα 3: Δομή του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (Platelet-Activating Factor, PAF)



- Επιπλέον, από τα ενδιάμεσα μόρια της βιοσύνθεσης των λιποειδών σημαντική βιολογική δράση αναγνωρίστηκε ότι διαθέτουν το φωσφατιδικό οξύ και το λυσοφωσφατιδικό οξύ. Το 1990 διαπιστώθηκε ότι οι αγωνιστές μέσω της μεταφοράς του σήματος προκαλούν παραγωγή φωσφατιδικού οξέος, ενώ το 1994 αναγνωρίστηκε ότι το λυσοφωσφατιδικό οξύ έχει **δράση ορμόνης** (hormone-like) καθώς και **δράση παράγοντα ανάπτυξης** (growth-factor-like). Το δε γλυκεριναιθερικό ανάλογο του λυσοφωσφατιδικού οξέος έχει δραστηκότητα σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του PAF.
- Ένα άλλο σημαντικό φωσφολιποειδές είναι και η φωσφοσφιγγοσίνη, η οποία πιστοποιήθηκε στα ερυθροκύτταρα το 1970. Το 1989 βρέθηκε ότι η σφιγγοσίνη είναι **αναστολέας της πρωτεϊνικής κινάσης C** και ότι η βιοσύνθεση της φωσφοσφιγγοσίνης ρυθμίζει τα επίπεδα της σφιγγοσίνης και συνεπώς και τη

δράση της πρωτεϊνικής κινάσης C. Σήμερα η φωσφοσφιγγοσίνη σχετίζεται με την υπερπλασία των κυττάρων, την κινητοποίηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , την απόπτωση και γενικά ανάλογες δράσεις με το λυσο-φωσφατιδικό οξύ, με το οποίο άλλωστε παρουσιάζουν παρόμοια δομή (η υδρόφοβη ομάδα μονογλυκεριδίου στο ένα, μπορεί να συσχετισθεί με την υδρόφοβη ομάδα της σφιγγοσίνης στο άλλο μόριο). Σήμερα, εκτός από τη φωσφο-σφιγγοσίνη, πολλά παράγωγα των σφιγγολιποειδών (φωσφο-κηραμίδια, σφιγγοζυλοφωσφοχολίνη, γλυκοζυλο-κηραμίδια παίζουν το ρόλο δεύτερου μηνύματος και αποτελούν σημαντικούς ενδοκυτταρικούς ρυθμιστές της απόπτωσης, διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων, συμμετέχοντας σε πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις.

- Η φωσφατιδυλογλυκερόλη πιστοποιήθηκε το 1960 και στη συνέχεια η καρδιολιπίνη η οποία υπάρχει στις μεμβράνες των ευκαρυωτικών κυττάρων (κυρίως της καρδιάς). Σχετίζεται με την παραγωγή ενέργειας, μέσω της δράσης της στην κυτοχρωμική οξειδάση, στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και με την ασθένεια αντικαρδιολιπιδικό/αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, όπου ο οργανισμός αναπτύσσει αντισώματα στην καρδιολιπίνη και σε άλλα φωσφολιποειδή.
- Μια άλλη νέα ομάδα λιποειδών είναι τα ενδοκανναβινοειδή, εστέρες ή αμίδια πολυακόρετων λιπαρών οξέων, που είναι ενδογενείς αγωνιστές των υποδοχέων των κανναβινοειδών, συμμετέχοντας στη ρύθμιση λειτουργιών όπως η όρεξη, η διάθεση, η μνήμη και η αίσθηση του πόνου.
- Μια πολλή σημαντική επίσης κατηγορία λιποειδών με ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων είναι τα εικοσανοειδή. Η ονομασία τους οφείλεται στο ότι είναι παράγωγα του αραχιδονικού οξέος που έχει είκοσι άτομα άνθρακα. Τα εικοσανοειδή αποτελούνται από τις προσταγλαδίνες, τα θρομβοξάνια και τα λευκοτριένια. Εκτός από τα παραπάνω μόρια τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί και άλλες ενώσεις που ανήκουν στην ομάδα των εικοσανοειδών, όπως οι ρεσολβίνες και οι λιποζίνες, οι οποίες έχουν αντιφλεγμονώδη δράση και πιστεύεται ότι εμπλέκονται στο τερματισμό της φλεγμονώδους απόκρισης. Παρόλο που τα εικοσανοειδή αποτελούν μια ομάδα ετερογενών μορίων με διαφορετικές και πολλές φορές αντικρουόμενες δράσεις παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις για αυτό το λόγο και πολλά φάρμακα στοχεύουν στην αναστολή της βιοσύνθεσής τους.
- Τέλος έχει εκτιμηθεί σαν ιδιαίτερα σημαντική η συμμετοχή των οξειδωμένων λιποειδών των λιποπρωτεϊνών στη δημιουργία αθηρωματικών πλακών.

4. Τρόποι απομόνωσης και διαχωρισμού των λιποειδικής φύσης ενώσεων

Το πρώτο σημαντικό βήμα για τη μελέτη των λιποειδικής φύσης ενώσεων είναι η επιλογή του κατάλληλου τρόπου απομόνωσής τους από το βιολογικό δείγμα (ιστός φυτικός ή ζωικός, κύτταρα) καθώς και ο τρόπος χειρισμού του δείγματος. Αξίζει να αναφερθεί ότι ανεξάρτητα από το είδος του βιολογικού δείγματος, η απομόνωση των λιποειδικής φύσης ενώσεων πρέπει σε ιδανικές συνθήκες να γίνεται άμεσα μετά τη λήψη του δείγματος κυρίως για να αποφευχθεί η δράση των λιπολυτικών ενζύμων καθώς και η λιποειδική υπεροξείδωση. Και οι δύο αυτοί παράγοντες οδηγούν σε σημαντικές διαφοροποιήσεις στις δομές των λιποειδικών ενώσεων. Σε όσες περιπτώσεις δεν είναι δυνατή η άμεση απομόνωση, συνιστάται το δείγμα να αποθηκεύεται σε κλειστά γυάλινα φιαλίδια σε ατμόσφαιρα αζώτου στους

-20°C και σε μερικές περιπτώσεις στους -60°C. Προφανώς και οι τρόποι δειγματοληψίας εμφανίζουν ιδιαιτερότητες ανάλογα το είδος του βιολογικού υλικού αλλά στην συγκεκριμένη παρουσίαση δεν κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούν.

Με τον όρο απομόνωση των λιποειδικής φύσης ενώσεων αναφερόμαστε σε **τρόπο εκχύλισης** αυτών.

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.

Σε γενικές γραμμές επιλέγεται ο τρόπος εκχύλισης, με τον οποίο:

- 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 δραστηριότητα των δειγμάτων.

Στις δε περιπτώσεις των βιολογικά δραστικών ενώσεων, οι οποίες συναντώνται σε πολύ μικρές ποσότητες, οι παραπάνω παράμετροι έχουν ιδιαίτερη βαρύτητα.

Αξίζει να υπενθυμίσουμε ότι η διαλυτότητα των λιποειδικής φύσης ενώσεων εξαρτάται από:

α) Την ύπαρξη υδρόφοβων λιπαρών αλυσίδων καθώς και από την παρουσία πολικών ομάδων, που είναι κυρίως υδρόφιλες όπως είναι η ομάδα του φωσφόρου και οι υδατανθρακικές ομάδες.

β) Τη συνύπαρξή τους ως σύμπλοκα με τις άλλες τάξεις βιομορίων, τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες.

Είναι λοιπόν κατανοητό ότι η μέθοδος εκχύλισης που θα επιλεγεί πρέπει να ξεπερνά κάποια προβλήματα που ανακύπτουν κατά την εκχύλιση των λιποειδών. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 2) καταγράφονται τα σημαντικότερα προβλήματα καθώς και οι κυριότεροι τρόποι αντιμετώπισης αυτών.

Πίνακας 2

Προβλήματα εκχύλισης	Τρόπος αντιμετώπισης
Σύνδεση λιποειδών με ομοιοπολικούς και μη ομοιοπολικούς δεσμούς με πρωτεΐνες και υδατάνθρακες	Εκχύλιση με πολικούς διαλύτες (αλκοόλες) οι οποίοι αποδιατάσσουν τις πρωτεΐνες και διασπούν τους δεσμούς υδρογόνου. Για τη διάσπαση των ομοιοπολικών δεσμών χρησιμοποιείται είτε όξινο είτε αλκαλικό διάλυμα
Παραλαβή μη λιποειδικών ενώσεων (αμινοξέα, σάκχαρα) στους οργανικούς διαλύτες εκχύλισης, λόγω 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	Αφυδάτωση του δείγματος πριν την

νερό που προϋπάρχει στο βιολογικό δείγμα	εκχύλιση.
Διαφορετική πολικότητα-διαλυτότητα λιποειδικών ενώσεων	Χρήση διαλυτών διαφορετικής πολικότητας ή/και μείγματα πολικών και ουδέτερων διαλυτών
Κάποιοι ιστοί περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα τα οποία είναι σταθερά και δραστικά ακόμα και σε οργανικούς διαλύτες	Βρασμός του ιστού, για αποδιάταξη πρωτεϊνών

Στη συνέχεια θα αναφερθούν οι πιο χαρακτηριστικοί μέθοδοι εκχύλισης λιποειδικής φύσης ενώσεων. Θα πρέπει επίσης να τονιστεί, από καθαρά πρακτική άποψη, ότι 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.

Παρά το μεγάλο αριθμό μεθόδων εκχύλισης που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία, μόνο δύο από αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως από πολλές ερευνητικές ομάδες και έχουν γίνει αποδεκτές, η μέθοδος Folch, Lees and Stanley (*J. Biol. Chem.* 226, 497-509, 1957) και η μέθοδος Bligh and Dyer (*Can. J. Physiol.* 37, 911-917, 1959).

➤ 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 (λιποειδικής 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.

Μετά την εκχύλιση των λιποειδών ακολουθεί ο διαχωρισμός τους σε τάξεις (Ουδέτερα, Πολικά λιποειδή), στη συνέχεια ο διαχωρισμός τους κατά είδη (π.χ. φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη) ενώ μπορούν να ακολουθήσουν διαχωρισμοί έως την ανάκτηση των προς ανάλυση λιποειδικών ενώσεων όσο το δυνατόν καθαρότερων.

Οι μέθοδοι διαχωρισμού των λιποειδών χωρίζονται κυρίως στις κάτωθι δύο κατηγορίες:

- Κλασμάτωση με διαλύτες

Οι πιο χαρακτηριστικές μέθοδοι στην κατηγορία αυτή είναι

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 μιας 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.

- Χρωματογραφικές μέθοδοι

α) Χρωματογραφία στήλης

Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό σε παρασκευαστική κλίμακα (>250mg). Η στατική φάση που χρησιμοποιείται καθορίζει το φυσικοχημικό φαινόμενο στο οποίο βασίζεται ο διαχωρισμός, το οποίο μπορεί να ανήκει σε μία από τις κάτωθι κατηγορίες:

Προσρόφηση

Η στατική φάση είναι κάποιο προσροφητικό υλικό και οι ενώσεις διαχωρίζονται με βάση τη σχετική πολικότητά τους. Προσροφητικά υλικά είναι: AlO_3 , MgO , MgO_3Si και το πυριτικό οξύ ($[SiO_x(OH)_{4-2x}]_n$), το οποίο φαίνεται να είναι το δραστηκότερο από όλα. Το πυριτικό οξύ εμφανίζει και φαινόμενα ιοντανταλλαγής αφού τα όξινα πολικά λιποειδή εκλούονται πρώτα αν και είναι μεγαλύτερης πολικότητας. Η γενική αρχή που χρησιμοποιείται είναι ότι η έκλυση της στήλης γίνεται με αυξανόμενης πολικότητας διαλύτες οπότε εκλούονται πρώτα τα μη πολικά και στη συνέχεια τα πολικά συστατικά.

Ιοντοανταλλαγή

Ο διαχωρισμός βασίζεται στη 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

Ο διαχωρισμός βασίζεται στο διαφορετικό στερεοχημικό μέγεθος των μορίων. Οι στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται είναι: το διακλαδισμένο πολυστυρένιο και η hydroxypropyl- Sephadex.

Η ανίχνευση των ενώσεων στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται οι τεχνικές της χρωματογραφίας στήλης μπορεί να γίνει με συλλογή κλασμάτων και χημικούς προσδιορισμούς, είτε με ανιχνευτή UV ή δείκτη διάθλασης ενωμένο με την έξοδο της στήλης.

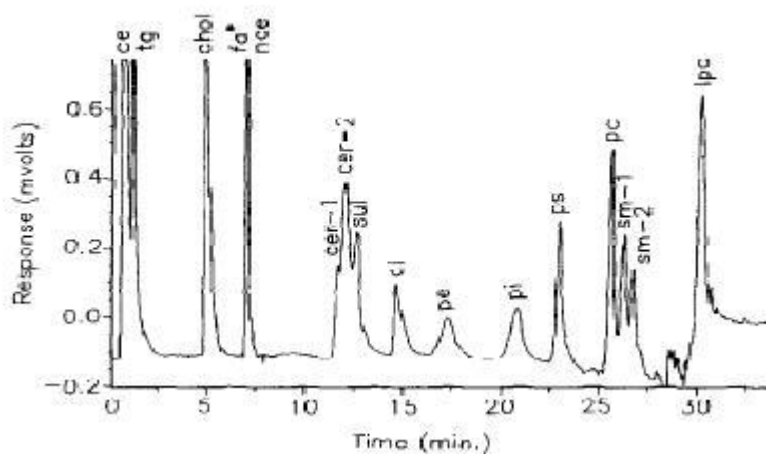
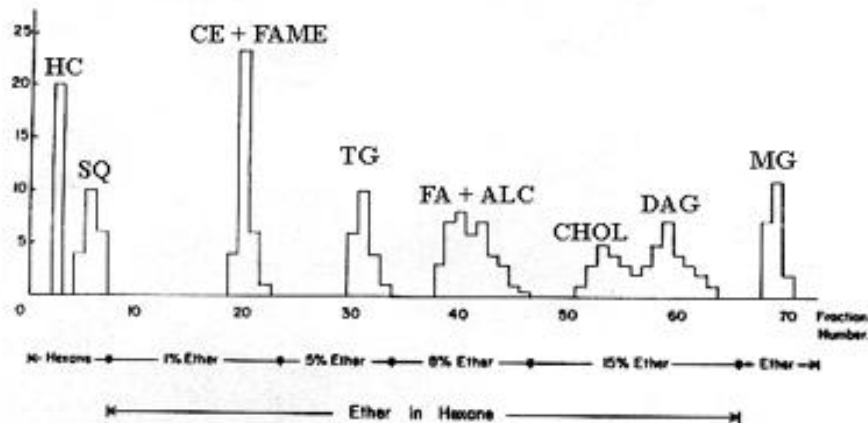
Στη συνέχεια ακολουθούν χαρακτηριστικά παραδείγματα διαχωρισμού λιποειδικής φύσης ενώσεων με τη χρήση της χρωματογραφίας στήλης.

Στήλη πυριτικού οξέος

Διαχωρισμός των TL σε NL, GL (γλυκολιποειδή), PL, με διαδοχική έκλυση της στήλης με χλωροφόρμιο, ακετόνη, μεθανόλη. Η σειρά έκλυσης είναι: HC(υδρογονάνθρακες) >Wax (κηροί) >St.E (εστέρες στερολών) >TG (τριακυλογλυκερόλες) >F.Alc (λιπαρές αλκοόλες) >F.A (λιπαρά οξέα) >St (στερόλες) >DG (διακυλογλυκερόλες) >MG (μονοακυλογλυκερόλες) >Cereb (κερεβροζίνες) >GL (γλυκολιποειδή) >PE (φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη) >L-PE (λυσο- φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη) >PC (φωσφατιδυλοχολίνη) >SM (σφιγγομυελίνη) >L-PC (λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη).

Διαχωρισμός NL σε τάξεις με συστήματα έκλυσης αυξανόμενης αναλογίας διαιθυλαιθέρα σε πετρελαιικό αιθέρα.

Διαχωρισμός PL σε τάξεις με συστήματα έκλυσης αυξανόμενης αναλογίας μεθανόλης σε χλωροφόρμιο.



β) Χρωματογραφία χάρτου

γ) Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography)

Η ευρύτερα διαδεδομένη χρωματογραφική τεχνική και μέθοδος ρουτίνας για το διαχωρισμό και ποιοτικό προσδιορισμό μίγματος λιποειδών λόγω του γεγονότος ότι είναι 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.

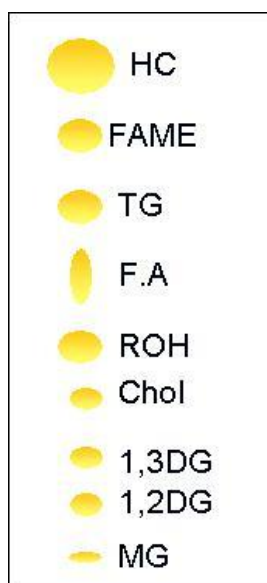
Εκτός από το φαινόμενο της προσρόφησης εμφανίζεται και κατανομή καθώς υπάρχει ένα λεπτό στρώμα διαλυτών προσροφημένο στη στερεά φάση.

Όσον αφορά τις τεχνικές και τα συστήματα ανάπτυξης που χρησιμοποιούνται, εμφανίζεται μία μεγάλη ποικιλία στη βιβλιογραφία, τα δε συστήματα ανάπτυξης διακρίνονται σε ουδέτερα, όξινα και βασικά.

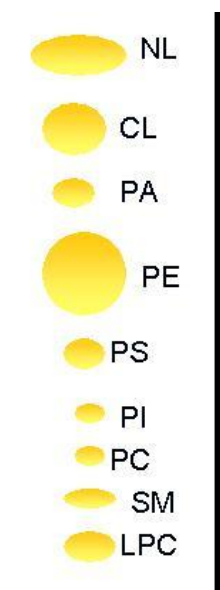
Στα NL χρησιμοποιούνται άπολοι διαλύτες μίγματα πετρελαϊκού αιθέρα/ αιθέρα/ οξικού οξέος, ενώ για τα PL χρησιμοποιούνται μείγματα πιο πολικών διαλυτών όπως χλωροφορμίου/μεθανόλης/νερού.

Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική των δύο διαστάσεων TLC (2D) κατά την οποία τα TL μπορούν αρχικά να αναπτυχθούν (κατά την μία διάσταση) σε πολικό σύστημα και να διαχωριστούν τα PL, ενώ τα NL θα πάνε στο μέτωπο. Η ίδια πλάκα στη συνέχεια μπορεί να αναπτυχθεί (κατά την άλλη διάσταση) με ένα άπολο σύστημα και να διαχωριστούν τα NL ενώ τα PL να παραμείνουν στη θέση τους.

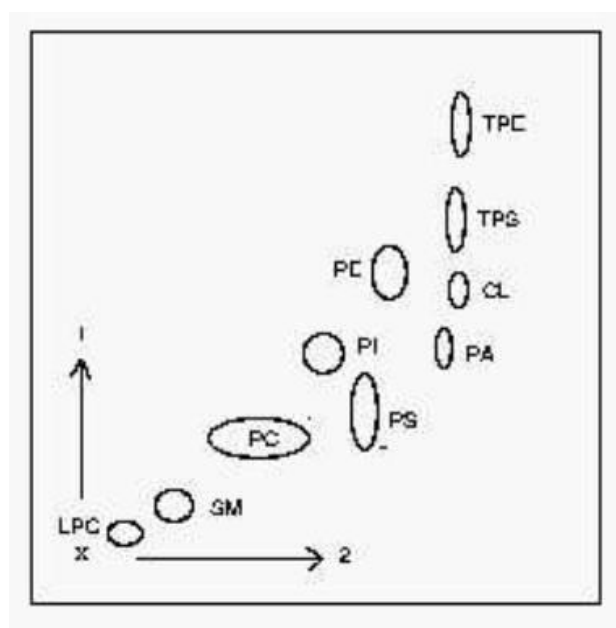
Οι αναλυτικές TLC έχουν πάχος 0,25mm και διαχωρίζουν 1-2mg λιποειδών ενώ οι παρασκευαστικές έχουν πάχος 1-2mm και διαχωρίζουν έως και 50mg λιποειδών. Τα διαχωρισμένα λιποειδή μπορούν να παραληφθούν με απόξεση του πυριτικού οξέος και εκχύλισής του κατά Bligh-Dyer. Στο σχήμα που ακολουθεί, στην περίπτωση A, διαχωρίζονται τα ουδέτερα λιποειδή με σύστημα ανάπτυξης πετρελαϊκού αιθέρα/ αιθέρα/ οξικού οξέος, 80:20:1 (v/v/v), στην περίπτωση B, διαχωρίζονται τα πολικά λιποειδή με σύστημα ανάπτυξης χλωροφορμίου/μεθανόλης/νερού, 65:25:4 (v/v/v) και στην περίπτωση 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

Η τεχνική της TLC είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, στις περιπτώσεις εκείνες όπου το λιποειδικό εκχύλισμα προέρχεται από φυτικές πηγές και συνυπάρχει με λιπόφιλες χρωστικές, όπως είναι οι χλωροφύλλες. Για την απομάκρυνση των χρωστικών αυτών έχει αναπτυχθεί διπλό σύστημα TLC, αρχικά 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. Στη συνέχεια τα PL και οι χρωστικές παραλαμβάνονται και 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.

Η ανίχνευση λιποειδών στη TLC μπορεί να βασιστεί είτε στο χρώμα των λιποειδών ή στο φθορισμό τους σε λάμπα UV. Έτσι, η πλάκα μετά την ανάπτυξη ψεκάζεται με κατάλληλο αντιδραστήριο και ακολουθεί εμφάνιση του χρώματος που προκύπτει. Τα αντιδραστήρια μπορεί να είναι καταστροφικά ή μη και γενικά ή ειδικά για συγκεκριμένα λιποειδή.

Στον Πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται γενικά αντιδραστήρια εμφάνισης καθώς και κάποια χαρακτηριστικά αυτών.

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

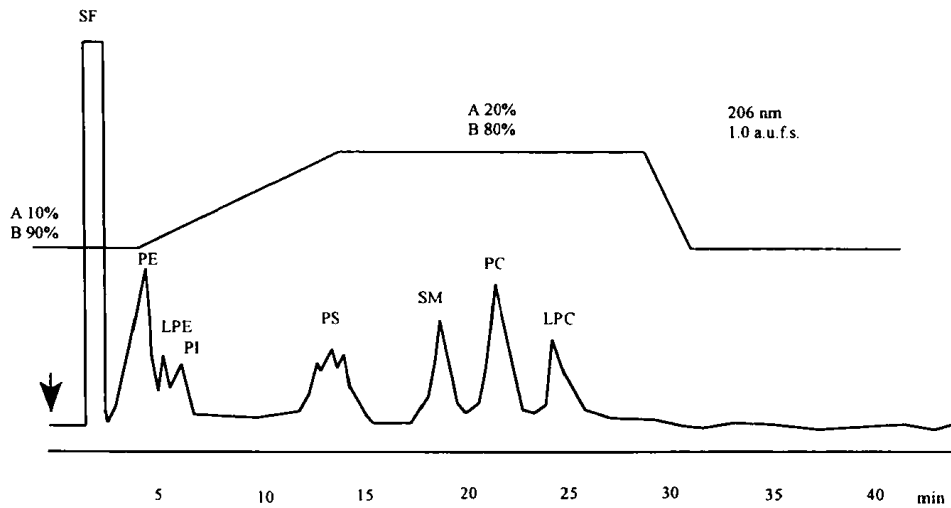
δ)Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HighPerformanceLiquidChromatography)

Η συγκεκριμένη μέθοδος εμφανίζει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, η δε αρχή μεθόδου του διαχωρισμού είναι ίδια με τις υπόλοιπες χρωματογραφικές τεχνικές, που έχουν ήδη αναφερθεί. Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι απαιτείται συνήθως ένας πρώτος διαχωρισμός του δείγματος πριν την ανάλυσή του με HPLC.

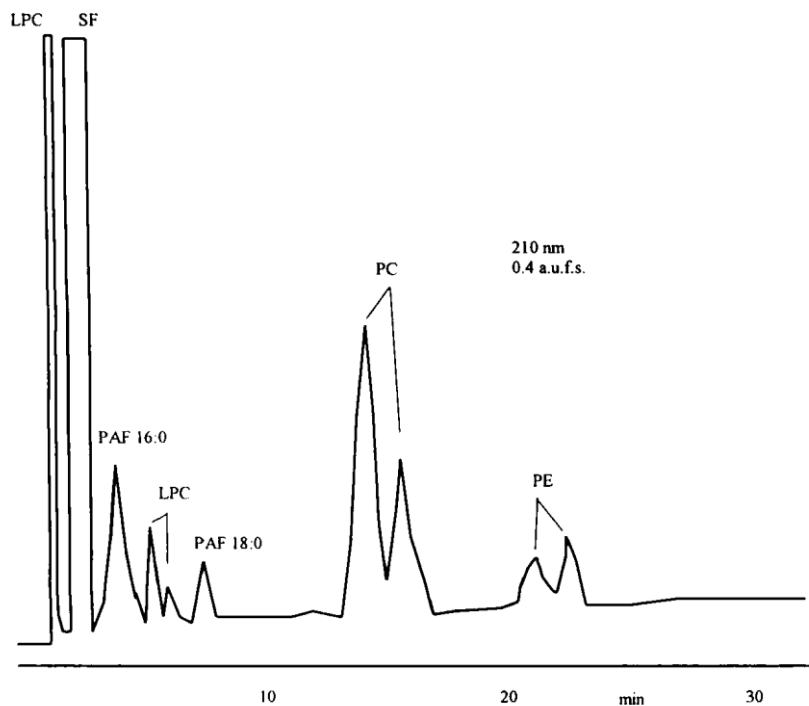
Σε γενικές γραμμές, οι στήλες πυριτικού οξέος και τα παράγωγά τους χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των NL και PL κατά τάξεις (οικογένειες) μορίων ενώ οι στήλες ανάστροφης φάσης διαχωρίζουν περαιτέρω τις διάφορες τάξεις μορίων σε μοριακά είδη δηλαδή ανάλογα το μήκος των λιπαρών αλυσίδων. Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι έχουν δημοσιευτεί και μέθοδοι, όπου έχουν χρησιμοποιηθεί στήλες ανάστροφης φάσης και για το διαχωρισμό των λιποειδικών μορίων κατά τάξεις.

Η ανίχνευση των λιποειδικών συστατικών στις περισσότερες περιπτώσεις γίνεται με τη χρήση ανιχνευτή UV (200-210nm), όπου απορροφούν οι ακόρεστοι δεσμοί. Είναι κατανοητό λοιπόν, ότι συστατικά του μίγματος που είναι προς διαχωρισμό, εάν δεν διαθέτουν διπλούς δεσμούς, δεν θα εμφανιστούν στα χρωματογραφήματα.

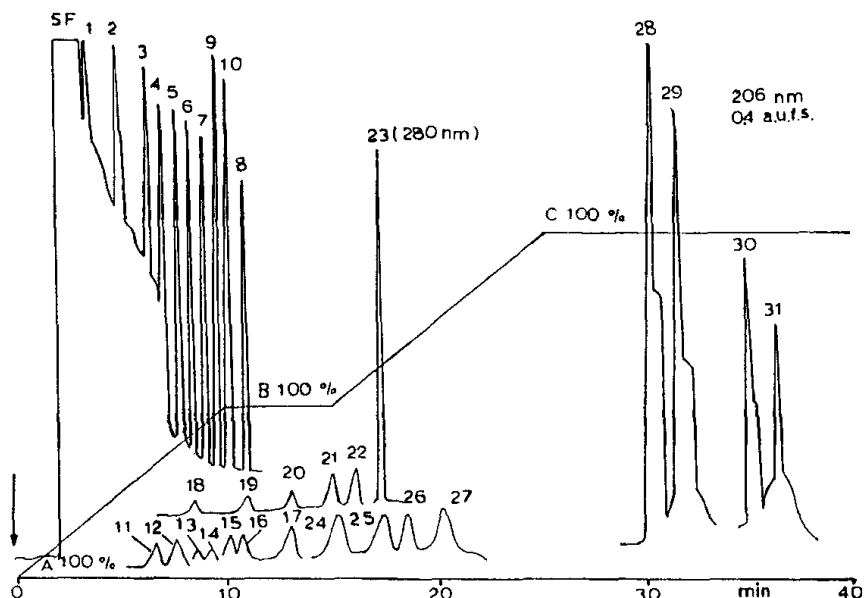
Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζεται διαχωρισμός των φωσφολιποειδών κατά τάξεις με στήλη HPLC silica B/5 και σύστημα ανάπτυξης όπου A διαλύτης είναι νερό και ο διαλύτης B είναι εξάνιο/ισοπροπανόλη (43:57) (Demopoulos, C.A., Antonopoulou, S., et al J. Liq. Chrom. & Rel. Technol., 19, 521-535, 1996).



Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζεται διαχωρισμός των φωσφολιποειδών κατά είδη με στήλη HPLC nucleosil-300 και ισοκρατικό σύστημα ανάπτυξης μεθανόλη/νερό/ακετονιτρίλιο (63:7:30) (Demopoulos, C.A., Antonopoulou, S., et al *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 19, 521-535, 1996).



Ο διαχωρισμός των ουδέτερων λιποειδών κατά τάξεις εμφανίζει μεγαλύτερο βαθμό δυσκολίας, λόγω μεγαλύτερου αριθμού ενώσεων. Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζεται διαχωρισμός πρότυπων ενώσεων που ανήκουν στα ουδέτερα λιποειδή με στήλη HPLC Nucleosil-300, C18, και σύστημα ανάπτυξης A μεθανόλη/νερό (80:20), B ακετονιτρίλιο/μεθανόλη (60:40), C ακετονιτρίλιο/τετραϋδροφουράνιο (99.5:0.5) και D ισοπροπανόλη/ακετονιτρίλιο (99:1) (Antonopoulou, S., et al *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 17(3), 633-648, 1994).



Στον Πίνακα που ακολουθεί, καταγράφονται οι πρότυπες ενώσεις που αντιστοιχούν στην ανωτέρω αρίθμηση των κορυφών καθώς και οι χρόνοι έκλουσης της κάθε ένωσης.

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	Di olein	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

ε) Αέρια χρωματογραφία (GC)

Με τη μέθοδο αυτή διαχωρίζονται πτητικές ενώσεις, λόγω της διαφορετικής κατανομής ή προσρόφησης 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.

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

Μετά τον καθαρισμό-απομόνωση των λιποειδών ακολουθούν οι αναλύσεις για την αποσαφήνιση της δομής τους. Ο προσδιορισμός της δομής αλλά και ο ποσοτικός προσδιορισμός ενός λιποειδούς γίνεται με τρεις κυρίως τρόπους:

A) Με τις προαναφερθείσες χρωματογραφικές τεχνικές

B) Με χημικούς/ενζυμικούς προσδιορισμούς, οι οποίοι βασίζονται κυρίως στη διάσπαση των λιποειδών στα δομικά συστατικά τους και ανάλυση αυτών

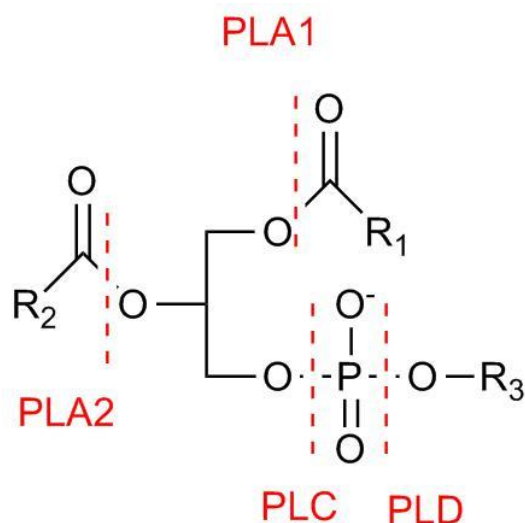
Γ) Με φυσικοχημικές τεχνικές (UV-Vis, IR, NMR, MS)

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

Στην κατηγορία των χημικών προσδιορισμών συναντά κανείς συνήθως τον υπολογισμό ξηρού βάρους, διότι λόγω αδυναμίας υπολογισμού του MB πολλών λιποειδών εκφράζονται σαν w/w αρχικού εκχυλίσματος, τον προσδιορισμό φωσφόρου (για τα φωσφολιποειδή), τον προσδιορισμό εστέρων, αζώτου, θείου, σακχάρων (για τα γλυκολιποειδή), αμινομάδων, χολίνης, γλυκεριναιθέρων, πλασμαλογόνων, χοληστερόλης, ακορεστότητας, και γλυκερόλης.

Επιπλέον, δομικές πληροφορίες λαμβάνονται με τη χημική ή ενζυμική υδρόλυση πιθανών δεσμών. Τα είδη των δεσμών που συναντώνται στις λιποειδικές ενώσεις είναι κυρίως εστερικοί δεσμοί αλλά και αμιδικοί, 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. Στις ενζυμικές υδρολύσεις χρησιμοποιούνται κυρίως λιπάσες και φωσφολιπάσες. Η ενζυμική διάσπαση των λιποειδών γίνεται σε συγκεκριμένους δεσμούς και θέσεις των λιποειδών και αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στην ανάλυσή τους. 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. 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)

τρανσφοσφατιδυλίωση: ανταλλαγή βάσης με αλκοόλες. Στο σχήμα που ακολουθεί εμφανίζονται τα σημεία δράσης της κάθε κατηγορίας φωσφολιπασών.

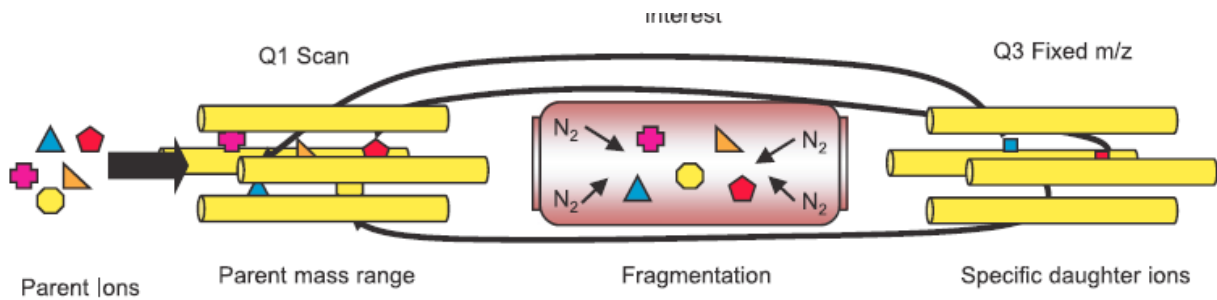


Από τις φυσικοχημικές τεχνικές που αναφέρθηκαν θα εστιάσουμε κυρίως στη φασματομετρία μάζας (MS). Με την τεχνική αυτή, τα μόρια ιονίζονται με την εκάστοτε χρησιμοποιούμενη μέθοδο, ενώ στη συνέχεια τα ιόντα οδηγούνται σε ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο όπου τα ιόντα διαχωρίζονται βάση του λόγου: μάζα/φορτίο (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. Την τελευταία κυρίως δεκαετία εμφανίζεται και στη βιβλιογραφία ο όρος (και η τεχνική) lipidomics. Η τελευταία ορολογία μέχρι περίπου το 2005 αφορούσε κυρίως την ανάπτυξη ευαίσθητων τεχνικών MS όπως για παράδειγμα την τεχνική του tandem electrospray ionization, που επέτρεπαν 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.

Τα lipidomics συνήθως χωρίζονται 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.

Κατά τη χρήση της 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 (μάζα προς συνολικό φορτίο της ένωσης), τα οποία δίνουν πληροφορίες για το συνολικό MB της ένωσης (parent ions) καθώς και δομικές πληροφορίες για «τμήματα» της ένωσης (daughter ions), τα οποία προκύπτουν μετά από διάσπαση της αρχικής ένωσης (collision-induced-fragmentation, CIF). Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζεται ένα παράδειγμα της βασικής αρχής ενός οργάνου LC/MS/MS.

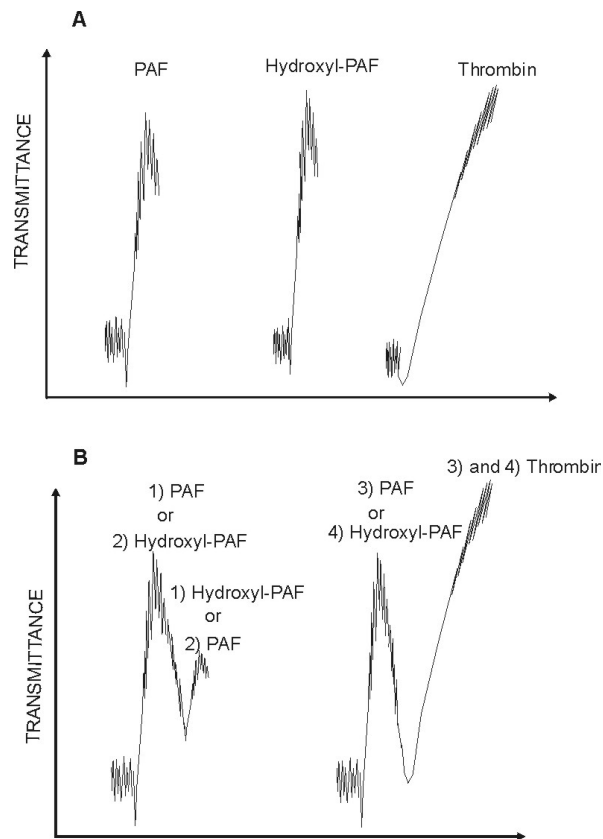


Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραπάνω τεχνική είναι κατάλληλη να χρησιμοποιηθεί, όταν στοχεύει σε συγκεκριμένες λιποειδικές ενώσεις και απαιτείται ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός. Τα parent ions των διαφόρων ενώσεων προκύπτουν συνήθως με τη μορφή $[M+NH_4]^+$ ή $[M+H]^+$ ή $[M+Na]^+$ και σπανίως –κάτω από κατάλληλες συνθήκες- με τη μορφή $[M-H]^-$. Επίσης σε αρκετές περιπτώσεις με τη τεχνική της CIF εμφανίζονται χαρακτηριστικά θραύσματα για κάθε ένωση, όπως για τις φωσφατιδυλογολίνες 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 $[M-141]^-$. Εξειδικευμένοι δικτυακοί τόποι και βάσεις δεδομένων έχουν δημιουργηθεί ειδικά για τις λιποειδικές ενώσεις, όπου μπορεί να ανατρέξει κάποιος για περισσότερες πληροφορίες (όπως Lipid Library: <http://lipidlibrary.aocs.org/> και Lipid Maps: <http://www.lipidmaps.org/>).

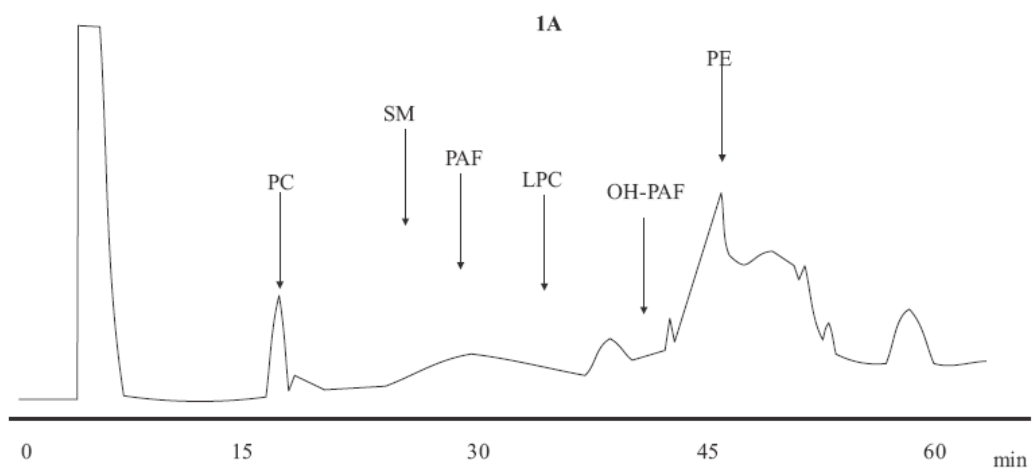
Σχεδόν όμως σε όλες τις περιπτώσεις όπου μελετώνται βιολογικά δραστικά συστατικά λιποειδικής φύσης απομονωμένα από φυσικές πηγές συμπεριλαμβανομένου και των βιολογικών δειγμάτων, απαιτείται συνδυασμός μεθόδων, πριν οδηγηθεί κανείς στη τεχνική LC/MS/MS.

Στη συνέχεια θα αναφερθεί ένα παράδειγμα συνδυασμού μεθόδων, το οποίο χρησιμοποιήθηκε, προκειμένου να διαλευκανθεί η δομή, ενός βιολογικά δραστικού λιποειδούς απομονωμένο από αίμα ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα (Antonopoulou, S., et al, *Biochem. J.*, 330, 791-794, 1998). Η μέθοδος εκτίμησης της βιολογικής δραστηριότητας έγινε με αξιολόγηση της ικανότητας της απομονωμένης ένωσης να προκαλεί συσσώρευση αιμοπεταλίων, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί, σε σύγκριση με γνωστούς συσσωρευτικούς παράγοντες (PAF και θρομβίνη). Χρησιμοποιήθηκαν επίσης ειδικοί αναστολείς, για να προσδιοριστεί ο υποδοχέας της αιμοπεταλιακής μεμβράνης, στον οποίο δεσμεύεται η δραστική ένωση.

Αρχικά συλλέχθηκαν mL αίματος από κάθε εθελοντή, τα οποία τοποθετήθηκαν άμεσα σε απόλυτη αιθανόλη, με σκοπό να απενεργοποιηθεί η Lp-PLA₂ (PAF-AH), η οποία υδρολύει ακετυλο-ομάδες και μικρής αλύσου λιπαρά οξέα από την sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού και ακολούθησε φυγοκέντρηση. Το ίζημα και το υπερκείμενο εκχυλίστηκαν με βάση τη μέθοδο Bligh-Dyer και ενώθηκαν οι χλωροφορμικές φάσεις.

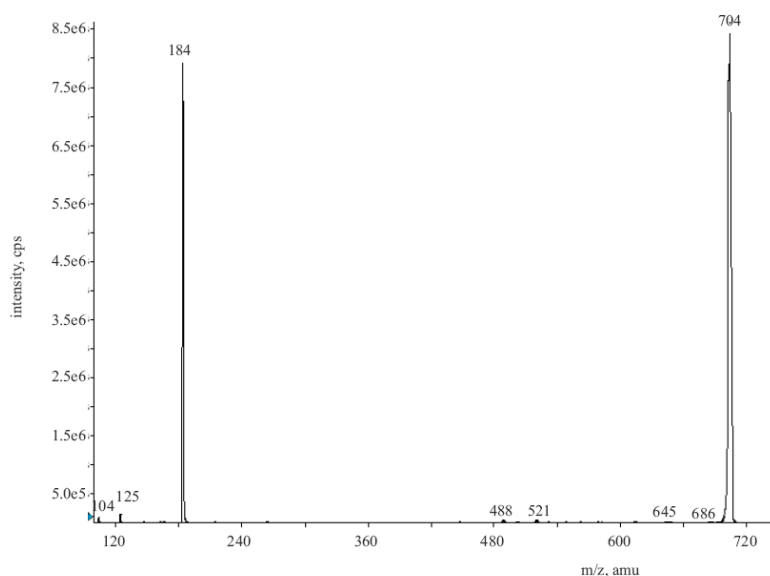


Στη συνέχεια ακολούθησε ένας πρώτος διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης, με σκοπό να παραληφθεί το κλάσμα των πολικών λιποειδών. Περαιτέρω διαχωρισμός έγινε με στήλη HPLC και σύστημα έκλουσης πολικών λιποειδών. Στο σχήμα που ακολουθεί, εμφανίζεται ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα, όπου η βιολογικά δραστική ένωση καταγράφεται ως OH-PAF.



Μέρος από το απομονωμένο από την HPLC δραστικό συστατικό, επεξεργάστηκε με την Lp-PLA₂ και φάνηκε ότι χάνεται η βιολογική του δραστικότητα, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπήρχε ακετυλο-ομάδα ή μικρής αλύσου λιπαρό οξύ

στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Επίσης σε μέρος από το απομονωμένο από την HPLC δραστικό συστατικό, ακολούθησε ήπια αλκαλική υδρόλυση, επανακετυλίωση και έλεγχος βιολογικής δράσης μετά από κάθε διεργασία. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη υδροξυλομάδας, στη λιπαρή αλυσίδα στην sn-1 θέση του γλυκερινικού σκελετού, η οποία ήταν αιθερικά συνδεδεμένη με το γλυκερινικό σκελετό. 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.



6. Τρόποι αξιολόγησης βιολογικής δράσης

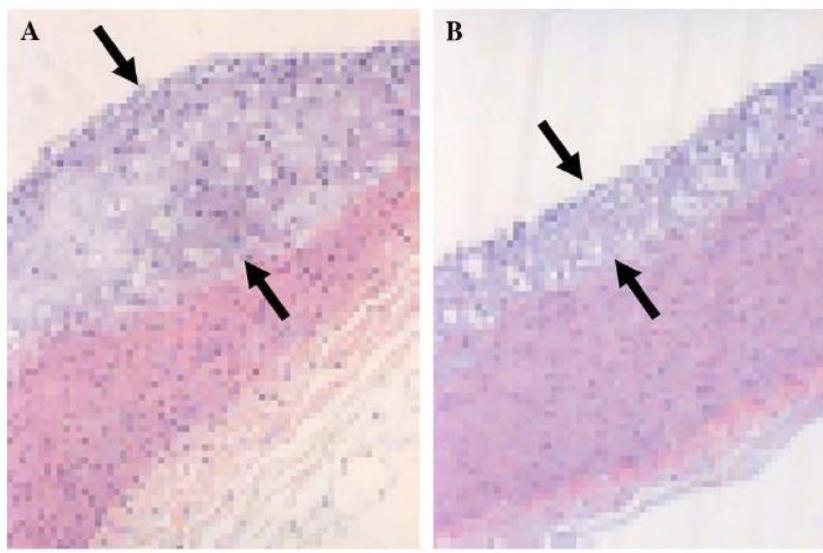
Υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία μεθόδων για την εκτίμηση της βιολογικής δράσης ενώσεων απομονωμένων από φυσικές πηγές, όπως αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης, αντιθρομβωτικής κλπ, οι οποίες θα αναλυθούν σε διάλεξη άλλου συναδέλφου.

7. Εφαρμογή σε ελαιόλαδο και παραπροϊόντα ελαιουργίας. Ενσωμάτωση σε τρόφιμα.

Στην προσπάθεια εξήγησης της ευεργετικής δράσης της Μεσογειακής διαίτας στα καρδιαγγειακά νοσήματα με βιοχημικό τρόπο, αναζητήθηκε η ύπαρξη λιποειδικών αναστολέων του PAF σε τρόφιμα της Μεσογειακής διαίτας, με χαρακτηριστικό εκπρόσωπο το ελαιόλαδο. Σε κάθε περίπτωση απομονώθηκαν λιποειδικά μόρια που ανέστειλαν τη δράση του PAF σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού ενώ ο γενικός κανόνας ήταν ότι τα πολικά λιποειδή ήταν καλύτεροι αναστολείς σε σχέση με τα ουδέτερα. Ακολούθησε μελέτη σε πειραματικό μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιού, ώστε να διευκρινιστεί ο ρόλος των αναστολέων του PAF από ελαιόλαδο σε *in vivo* συνθήκες (Karantonis, H.C., Antonopoulou S. et al, Nutr Metab Cardiovasc Dis., 16, 174-185, 2006).

Συγκεκριμένα αρσενικά λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας χωρίστηκαν σε 4 ομάδες οι οποίες τράφηκαν για 45 ημέρες με αθηρογόνο διαίτα που κατά περίπτωση εμπλουτίστηκε με ελαιόλαδο, με κλάσμα ελαιολάδου πλούσιο σε αναστολείς του PAF και με κλάσμα ελαιολάδου φτωχό σε αναστολείς του PAF. Μετρήθηκαν

διάφορες βιοχημικές παράμετροι στην αρχή και το τέλος της μελέτης καθώς και οι αθηρωματικές βλάβες στις αορτές των πειραματόζων κατά την λήξη του πειραματικού πρωτοκόλλου. Στις ομάδες οι οποίες κατανάλωσαν μαζί με την αθηρογόνο δίαιτα, ελαιόλαδο ή αναστολείς του PAF (σχήμα Β) -που απομονώθηκαν από ελαιόλαδο- υπήρξε αναστολή του σχηματισμού των αθηρωματικών βλαβών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (σχήμα Α).



Οι βιολογικά δραστικές ενώσεις με την αντι-αθηρογόνο δράση, ταυτοποιήθηκαν πλήρως. Στη συνέχεια απομονώθηκαν και εντοπίστηκαν και σε παραπροϊόντα ελαιουργίας, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν τα παραπροϊόντα ως πρώτη ύλη απομόνωσης αυτών. Οι βιολογικά δραστικές ενώσεις με την αντι-αθηρογόνο δράση, οι οποίες απομονώθηκαν από τα παραπροϊόντα ελαιουργίας εμφάνισαν και ικανότητα υποστροφής των αθηρωματικών πλακών, που είχαν ήδη σχηματιστεί (Tsantila N., et al, Nutr Metab Cardiovasc Dis., 20(10), 740-747, 2010). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι 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.