



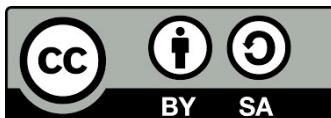
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΑΝΟΙΚΤΑ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΑ
ΜΑΘΗΜΑΤΑ



Εργαστήριο **Βιοχημείας**

**Προσδιορισμός λιπιδικού
φωσφόρου (Λιπίδια II)**

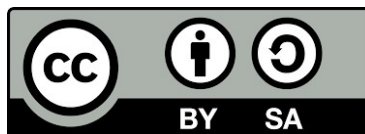
**Διδάσκοντες: Αναπλ. Καθ. Α. Ε.
Κούκκου, Καθ. Μ. Ε. Λέκκα, Αναπλ. Καθ.
Ε. Πάνου, Καθ. Ε. Παπαμιχαήλ, Καθ. Α.
Τσελέπης, Καθ. Δ. Τσουκάτος**



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



ΑΣΚΗΣΕΙΣ 2 και 3

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΖΩΟΥ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

1. Γενικό μέρος

2. Πειραματικό μέρος
 - Λιπίδια I (Άσκηση 2)
 - Λιπίδια II (Άσκηση 3)

3. Κατάταξη επικινδυνότητας ουσιών ασκήσεων λιπιδίων (I, II)
σύμφωνα με την νομοθεσία της Ε. Ε.

4. Βιβλιογραφία

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κατάταξη και ρόλος λιπιδίων

Τα λιπίδια ορίζονται ως η ετερογενής κατηγορία βιολογικών μορίων που είναι ευδιάλυτα σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες, (όπως βενζόλιο, αιθέρας/χλωροφόρμιο) και δεν διαλύονται σε πολικούς (νερό). Κάποια είδη λιπιδίων διαλύονται και σε διαλύτες με κάποια πολικότητα, όπως η μεθανόλη ή ακετόνη. Ανάλογα με το ρόλο τους διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

- Τα τριγλυκερίδια, λίπη και έλαια κυρίως αποθηκεύουν και μεταφέρουν τη μεταβολική ενέργεια.
- Οι κηροί, υδρογονάνθρακες και λιπαρές αλκοόλες, (τα περισσότερα μη πολικά λιπίδια), σχηματίζουν κυρίως προστατευτικές επιφάνειες στους ιστούς φυτών και ζώων, (αν και οι κηροί χρησιμεύουν σε μερικά υδρόβια ζώα αντί των τριγλυκεριδίων για αποθήκευση ενέργειας).
- Η πιο σημαντική ίσως κατηγορία λιπιδίων είναι αυτά που χρησιμεύουν σε δομικά συστατικά των βιολογικών μεμβρανών. Τέτοια είναι τα φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, σφιγγολιπίδια και στερόλες (τα δύο τελευταία δεν υπάρχουν στις βακτηριακές μεμβράνες). Περιέχουν ένα μη πολικό άκρο, συχνά αλυσίδα λιπαρών ακυλο-ομάδων και ένα πολικό.
- Τέλος, υπάρχει μια μεγάλη κατηγορία λιπιδίων σχετικά μικρού μοριακού βάρους (στεροειδή, τερπένια, προσταγλανδίνες και κινόνες) που παίζουν σπουδαίο ρόλο σαν ορμόνες, βιταμίνες, φωτοπαθείς χρωστικές κλ.π. στη ρύθμιση και έλεγχο του μεταβολισμού.

Τα λιπίδια έχουν ταξινομηθεί σε τρεις μεγάλες κατηγορίες (πιν.1)

- α. Ουδέτερα ή απλά λιπίδια (Neutral ή simple lipids)
- β. Αμφίφιλα λιπίδια, (Amphiphilic lipids), που παλιότερα απεδίδοντο με τους όρους πολικά ή σύμπλοκα λιπίδια, (polar ή complex lipids) και
- γ. Οξειδαναγωγικά λιπίδια, (Redox lipids):

Τα σπουδαιότερα και περισσότερα των δύο πρώτων τάξεων ανήκουν στην κατηγορία των γλυκερινούχων λιπιδίων (glycerolipids) που προέρχονται βασικά από τη συμπύκνωση λιπαρών οξέων με α-γλυκεροφωσφορικό οξύ, (α-GP). Το διακυλογλυκερινοφωσφορικό οξύ ή φωσφατιδικό οξύ (PA) που προκύπτει με τον τρόπο αυτό είναι πρόδρομος όλων των γλυκερινούχων φωσφολιπιδίων (πίνακας 2).

Με απόσπαση της φωσφορικής ομάδας από τα μόρια του φωσφατιδικού οξέος

προκύπτουν α , β -διγλυκερίδια (DC), από τα οποία σχηματίζονται τα τριγλυκερίδια. Όταν το ελεύθερο υδροξύλιο των α , β -διγλυκερίδια (DC), από τα οποία σχηματίζονται τα τριγλυκερίδια. Όταν το ελεύθερο υδροξύλιο των α , β -διγλυκεριδίων ενωθεί με σάκχαρα (συνήθως μέσω β -γλυκοζιτικού δεσμού), προκύπτουν τα γλυκερινούχα γλυκολιπίδια ή γλυκοζυλο-γλυκερίδια που βρίσκονται κυρίως στους χλωροπλάστες και τον εγκέφαλο.

Τέλος, όταν η φωσφορική ομάδα του φωσφατιδικού οξέος είναι εστεροποιημένη με σερίνη ή παράγωγά της (αιθανολαμίνη, χολίνη κλ.π.) ή με ινοσίτη κλ.π., προκύπτουν τα αντίστοιχα φωσφατιδυλο-παράγωγα που συνιστούν την τάξη των γλυκερινούχων φωσφολιπιδίων ή γλυκεροφωσφατιδίων, που είναι οι κύριοι δομικοί λίθοι των βιολογικών μεμβρανών.

Απομόνωση λιπιδίων

Το πρώτο βήμα για την κατεργασία των λιπιδίων είναι η εκχύλισή τους από τους ιστούς. Είναι μια διαδικασία περίπλοκη για τους εξής λόγους:

- α. Τα λιπίδια συχνά σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες των ιστών, με διάφορους βαθμούς σταθερότητας. Για να διασπαστούν τα σύμπλοκα αυτά απαιτούνται πολλές φορές συνθήκες που μετουσιώνουν ή καταστρέφουν τις πρωτεΐνες και τους πολυσακχαρίτες.
- β. Τα μίγματα λιπιδίων έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν μη λιπιδικές ουσίες στους οργανικούς διαλύτες (με ιοντικές αλληλεπιδράσεις), που ξαναβρίσκονται στα εκχυλίσματα (π.χ. αμινοξέα, σάκχαρα, ανόργανα άλατα κλ.π.)
- γ. Τα φωσφολιπίδια συχνά περιέχουν ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που αυτοξειδώνονται γρήγορα με την παρουσία αλάτων Cu^{++} ή Fe^{3+} . Τα άλατα αυτά έχουν την τάση να συγκρατούνται από τα λιποειδή. Έτσι, πολλές φορές η εκχύλιση πρέπει να γίνεται σε ατμόσφαιρα αζώτου, με διαλύτες ελεύθερους υπεροξειδίων ή παρουσία αντιοξειδωτικών.
- δ. Κατά την εκχύλιση ιστών που περιέχουν υγρασία, συχνά σχηματίζονται γαλακτώματα, οπότε πρέπει να προηγηθεί αφυδάτωση του ιστού. Αυτό όμως πολλές φορές έχει σαν αποτέλεσμα την μη αντιστρεπτή σύνδεση λιπιδίων με συστατικά του ιστού, οπότε δεν εκχυλίζονται ποσοτικά.
- ε. Οι διαλύτες έχουν διαφορετική εκχυλιστική ικανότητα για διαφορετικές κατηγορίες λιπιδίων. Έτσι, συχνά απαιτείται σειρά διαλυτών για την εκχύλιση.
- στ. Σε διάφορους ιστούς υπάρχουν ένζυμα που υδρολύουν τα λιπίδια. Μερικά από αυτά ενεργοποιούνται με οργανικούς διαλύτες και ο βαθμός ενεργοποίησης αυξάνει με τη

θέρμανση. Για τους λόγους αυτούς δεν μία υπάρχει μία μέθοδος εκχύλισης απόλυτα ικανοποιητική για κάθε είδος ιστού. Γενικά πάντως, θεωρείται ότι τα μίγματα χλωροφορμίου-μεθανόλης δίνουν τα πιο ικανοποιητικά και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, σύμφωνα με τις μεθόδους των Bligh-Dyer, των Folch-Lees-Sloane-Stanley ή μετατροπές τους.

Διαχωρισμός λιπιδίων

Παλιότερα ο διαχωρισμός γινόταν με κλασματώσεις των ολικών λιπιδίων με οργανικούς διαλύτες ή με εκχύλιση των διάφορων κλασμάτων των λιπιδίων με διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες. Αυτό, εκτός του ότι δεν αποτελούσε παρά γενικό διαχωρισμό μερικών λιπιδικών κλασμάτων και μάλιστα όχι σε καθαρή μορφή, πολλές φορές δεν μπορούσε να εφαρμοστεί γιατί η διαλυτότητα ενός κλάσματος λιποειδούς εξαρτάται από την παρουσία, ποιοτική και ποσοτική, των άλλων κλασμάτων.

Ο διαχωρισμός σε τάξεις γίνεται με τη βοήθεια της χρωματογραφίας στήλης. Για μίγματα ουδετέρων και πολικών λιπιδίων χρησιμοποιούνται στήλες από πυριτικό οξύ ή Florisil και σαν εκλουστικά μέσα, διαλύτες συνεχώς αυξανόμενης πολικότητας. Για τα πολικά λιπίδια χρησιμοποιούνται επίσης ιοανταλλακτικές στήλες με DEAE ή TEAE-κυτταρίνη. Με λιπόφιλη Sephadex (LH-20) μπορούμε επίσης να διαχωρίσουμε μεγάλες τάξεις λιπιδίων.

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η αεροχρωματογραφία (GLC) και η χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) αποτελούν τρεις πολύ ευαίσθητες και αποτελεσματικές μεθόδους επιλογής για τον διαχωρισμό των λιπιδίων σε αναλυτική κλίμακα.

Στην TLC λιπιδίων χρησιμοποιείται συνήθως πυριτικό οξύ σαν προσροφητικό μέσο (ισχυρά πολικό) και μη πολικοί διαλύτες για ανάπτυξη. Η ανάλυση συνδιάζει ταχύτητα, ευαισθησία και εξαιρετική διαχωριστική ικανότητα. Η εμφάνιση των λιπιδίων γίνεται ή με γενικά εμφανιστικά αντιδραστήρια (π.χ. ατμοί ιωδίου, υδατικό διάλυμα 0.0012% ροδαμίνης-G και εμφάνιση σε λάμπα UV, κλ.π.), ή με ειδικά αντιδραστήρια που εμφανίζουν χαρακτηριστικές ομάδες (π.χ. αντιδραστήριο νινυδρίνης για εμφάνιση $-NH_2$, κυανού του μολυβδαινίου για εμφάνιση $-PO_4^{=}$, αντιδραστήριο Schiff για εμφάνιση πλασμαλογόνων, κλπ.).

Με την αέρια χρωματογραφία τα σχετικά πτητικά λιπίδια όπως υδρογονάνθρακες, λιπαρές αλκοόλες, λιπαρά οξέα και εστέρες τους, στερόλες, κλπ. Η μέθοδος βασίζεται στην κατανομή των συστατικών του ατμοποιημένου μίγματος μεταξύ μιας κινητής,

αδρανούς αέριας φάσης και μιας στατικής μη πτητικής υγρής φάσης, προσροφημένης σε ένα αδρανές υπόστρωμα. Στο εμπόριο υπάρχει μεγάλη ποικιλία πληρωτικών υλικών. Υπάρχει επίσης η δυνατότητα επιλογής του κατάλληλου ανιχνευτή. Συνήθως σε αναλύσεις λιπιδίων χρησιμοποιείται ανιχνευτής φλόγας ιοντισμού (FID).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης έχει εφαρμοστεί τα τελευταία χρόνια στην ανάλυση ουδέτερων και πολικών λιπιδίων. Η αρχή λειτουργίας της είναι η ίδια με την απλή χρωματογραφία στήλης, με τη διαφορά ότι διαχωρισμοί γίνονται κάτω από πίεση. Τα πλεονεκτήματά της είναι μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, ο μικρός χρόνος ανάλυσης και ιδιαίτερα οι ήπιες συνθήκες. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η τεχνική αυτή δεν μπορεί να υποκαταστήσει την TLC, μπορεί όμως να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά, με πολύ καλά αποτελέσματα.

Συνήθως στην ανάλυση λιπιδίων χρησιμοποιούμε HPLC κανονικής φάσης, στην οποία το πληρωτικό υλικό της στήλης είναι πιο πολικό από τους διαλύτες έκλουσης. Έτσι διαχωρίζονται τα λιπίδια σε τάξεις. Με την HPLC ανάστροφης φάσης στην οποία το πληρωτικό υλικό είναι λιγότερο πολικό από τους διαλύτες διαχωρίζεται κάθε τάξη λιπιδίων ανάλογα με το είδος λιπαρών αλυσίδων που περιέχει.

Απομόνωση λιπιδίων

Είδαμε ότι δεν υπάρχει μια ικανοποιητική μέθοδος για την εκχύλιση των λιπιδίων, αλλά αυτή εξαρτάται τόσο από τη φύση του μίγματος λιπιδίων όσο και του προβλήματος που αντιμετωπίζουμε.

Τα λιπίδια κατά γενικό κανόνα διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες και κυρίως σε μίγματα CHCl_3 - CH_3OH . Πιο συγκεκριμένα:

- Τα ουδέτερα λιπίδια διαλύονται σε αιθέρα, χλωροφόρμιο, ακετόνη, πετρελαϊκό αιθέρα κλπ., ενώ είναι σχεδόν αδιάλυτα σε μεθανόλη και αιθανόλη (κυρίως τα τριγλυκερίδια). Εξάιρεση αποτελούν τα σχετικά πολικότερα ουδέτερα λιπίδια, όπως διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, λιπαρές αλκοόλες, χοληστερόλη, που διαλύονται σε μεθανόλη και αιθανόλη.
- Τα φωσφολιπίδια (PL) διαλύονται σε χλωροφόρμιο, ψυχρή αιθανόλη, μίγματά τους σε αιθέρα κλπ., ενώ είναι αδιάλυτα σε ακετόνη. Η ιδιότητα μάλιστα αυτή χρησιμοποιήθηκε πολύ για την απομόνωσή τους (παλιότερα).
- Τα γλυκολιπίδια διαλύονται σε οξεϊκό αιθυλεστέρα, πυριδίνη, αιθέρα (λίγο) ακετόνη (λίγο) και σε υδατικά διαλύματα 0.9% KCl.
- Τέλος, τα σφιγγοσίνουχα διαλύονται σε θερμό αιθέρα, χλωροφόρμιο, οξεϊκό οξύ,

θερμή πυριδίνη κλπ., ενώ είναι αδιάλυτα σε ακετόνη και σε ψυχρό αιθέρα, αλκοόλη και πυριδίνη.

Μια γρήγορη μέθοδος για απομόνωση και καθαρισμό των ολικών λιπιδίων αναπτύχθηκε από τον Folch που χρησιμοποίησε χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό. Οι Bligh και Dyer απλοποίησαν τη μέθοδο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

ΟΥΔΕΤΕΡΑ

- (1) Λιπαρά οξέα
- (2) Γλυκερίδια
- (3) Κηροί
- (4) Εστολίδια
- (5) Καροτινοειδή
- (6) Τερπενοειδή
- (7) Στεροειδή

ΑΜΦΙΦΙΛΑ

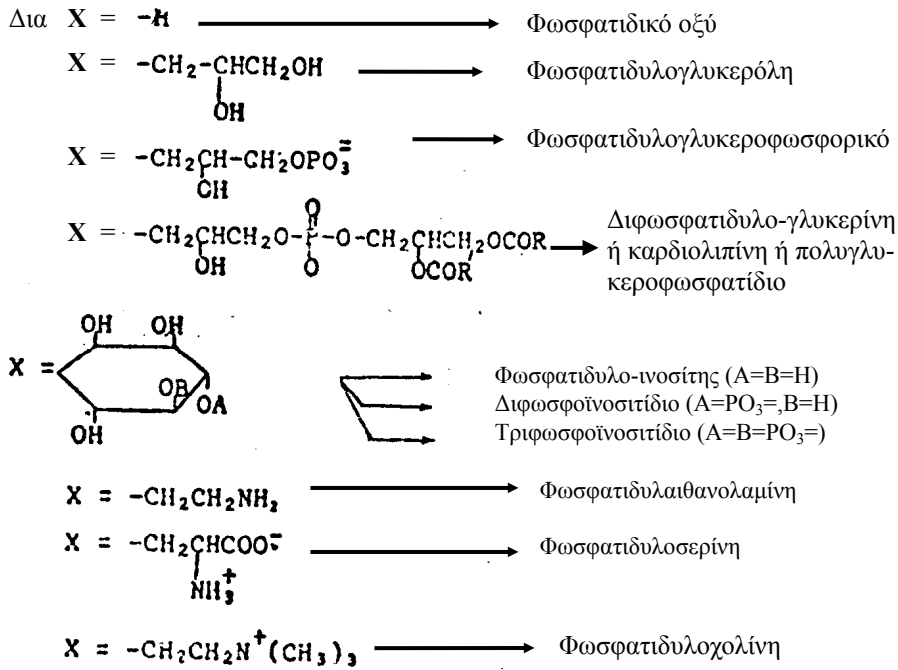
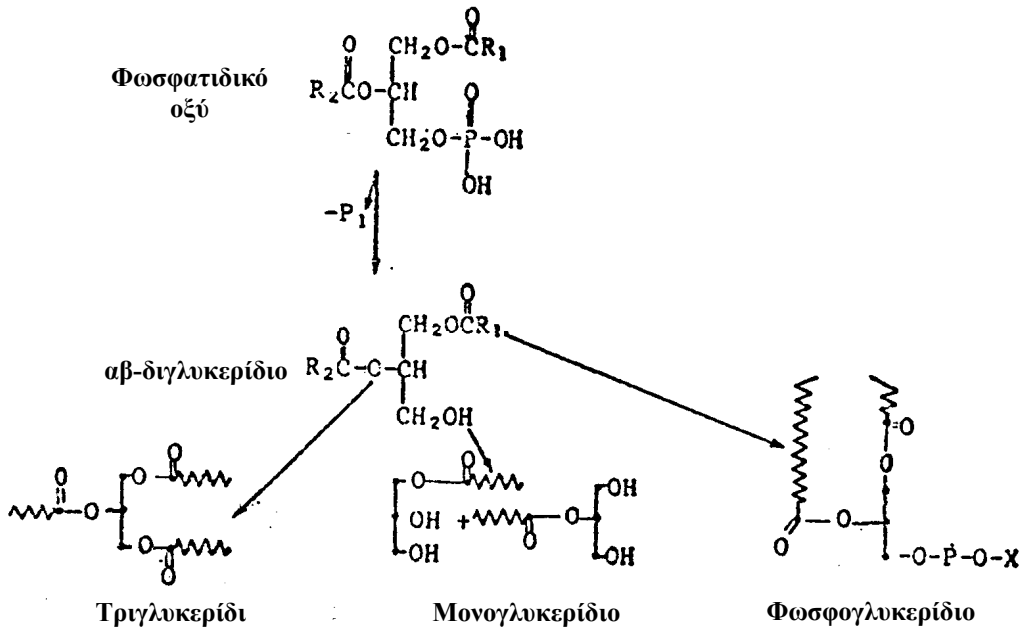
- | | | | |
|--------------------|---|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (1) Γλυκερολιπίδια | { | α) Φωσφογλυκερίδια
β) Γλυκοζυλογλυκερίδια | |
| (2) Σφιγγολιπίδια | { | α) Φωσφοσφιγγολιπίδια
β) Γλυκοσφιγγολιπίδια
γ) Γλυκοφωσφοσφιγγολιπίδια | { |
| | | | β ₁) Μονογλυκοζιτικά κηραμίδια
– κερεβροζίτες
– σουλφατίδια
β ₂) Ολιγογλυκοζιτικά κηραμίδια
– κυτοσίδια
– σφαιρολιπίδια |

- (3) Λιπαμινοξέα, λιποπεπτίδια
- (4) Άλλα γλυκολιπίδια

ΟΞΕΙΔΟ-ΑΝΑΓΩΓΙΚΑ

- (1) Κινόνες
- (2) Χρωμάνες

ΠΙΝΑΚΑΣ 2



2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΛΙΠΙΔΙΑ Ι

A. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BLIGH-DYER

Σε κωνική φιάλη αναμιγνύουμε 10 ml υδατικού εναιωρήματος κυττάρων *Tetrahymena pyriformis* (προέρχονται από 100 ml αρχικής καλλιέργειας) με τριπλάσιο όγκο χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:2, v/v). Αναδεύουμε περιοδικά για 10 min και προσθέτουμε ένα όγκο (10ml) χλωροφορμίου και μετά από ισχυρή ανάδευση ένα όγκο (10 ml) νερού.

Το διφασικό σύστημα διηθείται υπό κενό από ηθμό πορώδους πορσελάνης στον οποίο έχει τοποθετηθεί ομοιόμορφα στρώμα αδρανούς υλικού (celite) πάχους 2-3mm. Το υπόλειμμα στον ηθμό κατεργάζεται με 10 ml CHCl_3 . Η τελική αναλογία διαλυτών είναι CHCl_3 - CH_3OH - H_2O (3:2:2, v/v).

Τα ενωμένα διηθήματα μεταφέρονται προσεχτικά σε διαχωριστική χοάνη και παραμένουν για εξיסορρόπηση και διαχωρισμό των δύο φάσεων χωρίς ανατάραξη.

Παραλαμβάνουμε τη χλωροφορμική φάση (κατώτερη) και μετράμε τον όγκο της με ογκομετρικό κύλινδρο.

Στο χλωροφορμικό εκχύλισμα γίνονται οι παρακάτω αναλύσεις

- Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.
- Απομόνωση φωσφολιπιδίων με εκχύλιση κατ' αντιρροή.
- Προσδιορισμός φωσφόρου φωσφολιπιδίων.
- Προσδιορισμός εστέρων φωσφολιπιδίων και ολικών λιπιδίων.
- Αεριοχρωματογραφική ανάλυση λιπαρών οξέων.

Το υπόλοιπο φυλάσσεται για την επόμενη άσκηση σε βιδωτό δοκιμαστικό σωλήνα.

B. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Δύο δείγματα του 1 ml μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το υπόλειμμα επαναδιαλύεται με 3 σταγόνες χλωροφορμίου. Κάθε δείγμα τοποθετείται ποσοτικά σε μία λωρίδα της πλάκας. Στις δύο ακραίες λωρίδες τοποθετούνται πρότυπες ουσίες φωσφατιδυλαιθανολαμίνης και φωσφατιδυλοχολίνης (φυλάσσονται στο ψυγείο) ή εκχύλισμα αυγού, που περιέχει μίγμα

φωσφατιδυλαιθανολαμίνης και φωσφατιδυλοχολίνης. Η πλάκα αφήνεται να αναπτυχθεί σε θάλαμο χρωματογραφίας κορεσμένο με μίγμα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4, v/v/v) για μία ώρα.

Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της πλάκας απομονώνουμε τα φωσφολιπίδια με εκχύλιση κατ' αντιστροφή (παράγραφος 3).

- Μετά το τέλος της χρωματογραφίας σημειώνουμε με μολύβι το μέτωπο του διαλύτη και η πλάκα στεγνώνεται (στον απαγωγό, με ρεύμα ζεστού αέρα).
- Στη συνέχεια εμφανίζουμε την πλάκα σε ατμούς ιωδίου για 2 min και σημειώνουμε τις κηλίδες που εμφανίζονται. Μετράμε τα R_f και αντιστοιχούμε τα πρότυπα (PE την PC) με τις κηλίδες που εμφανίζονται στα δείγματά μας. Κατόπιν ψεκάζουμε με διάλυμα νινυδρίνης και τοποθετούμε την πλάκα σε φούρνο 100°C για 3 λεπτά. Τα λιπίδια που περιέχουν αμινομάδες (π.χ. η PE) εμφανίζονται σαν ροζ κηλίδες.
- Στη συνέχεια ψεκάζουμε με το διάλυμα εμφάνισης των φωσφολιπιδίων. Μέσα σε 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, τα φωσφολιπίδια εμφανίζονται σαν σκούρες μπλε κηλίδες.

Αποτελέσματα

1) Συμπληρώνουμε τον Πίνακα:

	R_f	Ιώδιο	Νινυδρίνη	Φώσφορος
PE				
PC				

2) Καταγράφουμε τους όγκους όλων των φάσεων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

α. Ατμοί ιωδίου

Η πλάκα τοποθετείται σε κλειστό, γυάλινο θάλαμο, που περιέχει κρυστάλλους ιωδίου. Εμφανίζονται παροδικά όλα τα είδη λιπιδίων.

β. Κυανούν του μολυβδαινίου

Το αντιδραστήριο εμφάνισης φωσφολιποειδών παρασκευάζεται ως εξής:

- Διάλυμα Α. 5.66 g $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ διαλύονται σε 35 ml H_2O με θέρμανση. Προστίθενται 15 ml π. H_2SO_4 και το διάλυμα βράζεται επί 30 min. Μετά τη ψύξη, το διάλυμα αραιώνεται στα 50 ml.

- Διάλυμα Β. 1.75 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ διαλύονται σε 20 ml H_2O . Προστίθενται 20 ml 1N NaOH και 15 ml διαλύματος 10% γλυκόζης. Το διάλυμα (μπλε με ίζημα) θερμαίνεται επί 3-5 min, μέχρι να σχηματισθεί Cu_2O (κεραμιδί χρώμα). Αν το χρώμα του διαλύματος δεν αλλάξει, προστίθενται μικρή ποσότητα διαλύματος γλυκόζης. Μετά την ψύξη και απόχυση του υπερκειμένου, το ίζημα πλένεται με 50 ml νερού, το οποίο απομακρύνεται με απόχυση.
- Διάλυμα Ι. Στο ίζημα Cu_2O προστίθενται 10 ml του διαλύματος Α και θερμαίνονται μέχρι βρασμού. Προστίθενται άλλα 15 ml του διαλύματος Α και 25 ml π. H_2SO_4 . Το διάλυμα βράζεται επί 15 min και μετά την ψύξη αραιώνεται στα 50 ml.
- Διάλυμα ΙΙ. Στα υπόλοιπα 25 ml του διαλύματος Α προστίθενται 25 ml π. H_2SO_4 .
- Το αντιδραστήριο προκύπτει με ανάμιξη ίσων όγκων των διαλυμάτων Ι και ΙΙ και αραιώση του διαλύματος αυτού με περίπου ίσο όγκο νερού, ώστε το χρώμα να διατηρηθεί μπλε. Αν μεταβληθεί σε πράσινο, προσθέτουμε λίγο διάλυμα Ι ή ΙΙ.
Η πλάκα ψεκάζεται με το κυανούν του μολυβδαινίου και τα φωσφολιποειδή εμφανίζονται με μπλε χρώμα.

γ. Αντιδραστήριο νινυδρίνης για εμφάνιση ελεύθερων αμινομάδων: 0.3 g νινυδρίνης διαλύονται σε 100 ml n-βουτανόλης. Στο διάλυμα προστίθενται 3 ml παγόμορφου οξεικού οξέος.

Γ. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΩΝ ΚΑΤ' ΑΝΤΙΠΡΟΗ

Μέρος του χλωροφορμικού εκχυλίσματος (5 ml) μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ατμόσφαιρα αζώτου.

- Το λιπιδικό υπόλειμμα αναδιαλύεται σε 5 ml πετρελαϊκού αιθέρα, μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και προστίθενται 5 ml 87% αιθανόλης. Το μίγμα αναταράσσεται και αφήνεται για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαμβάνεται η αιθανολική (κατώτερη) φάση και η αιθερική (ανώτερη φάση) ξαναπλένεται με 5 ml αιθανόλης 87%.
- Μετράμε τον όγκο των φάσεων. Οι ενωμένες αιθανολικές φάσεις περιέχουν τα ολικά φωσφολιπίδια, ενώ η αιθερική φάση περιέχει τα ουδέτερα λιπίδια. Οι φάσεις φυλάσσονται στην κατάψυξη σε βιδωτούς δοκιμαστικούς σωλήνες (η συνέχεια στην άσκηση ΙΙ).

ΛΙΠΙΔΙΑ II

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΚΟΥ ΦΩΣΦΟΡΟΥ

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά ιόντα μετά από καύση, στο σχηματισμό φωσφορομολυβδαινικού με την προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου και τέλος αναγωγή αυτού προς κυανού του φωσφομολυβδαινίου με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον. Σαν αναγωγικό χρησιμοποιείται αμινοναφθολο-σουλφονικό οξύ (ANSA).

(Μέθοδος Bartlett, G.R., J. Biol. Chem. 274, 466 (1959). Modified by Long, C. and Staples, D.A. J. Bioch. 78, 179, 1961).

Στο διάστημα της καύσης των δειγμάτων για προσδιορισμό φωσφόρου ετοιμάζουμε και τα δείγματα για παρασκευή μεθυλεστέρων, όπως περιγράφεται πιο κάτω.

Καύση δειγμάτων

α₁) Ολικά λιπίδια

Δύο δείγματα λιπιδίων περιεκτικότητας 1-5 μg φωσφόρου (1 ml χλωροφορμικού εκχυλίσματος) φέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες rytex και ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου.

α₂) Φωσφολιπίδια

Δύο δείγματα των 1 ml από την αιθανολική φάση φέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες rytex και ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου.

β) Φωσφολιπίδια μετά από TLC.

Αποξύνουμε προσεκτικά τις κηλίδες PE και PC από την TLC της άσκησης Λιπίδια I και τις μεταφέρουμε σε αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες.

Προσθέτουμε σε όλους τους σωλήνες (α₁, α₂, β) από 0.5 ml HClO₄ 70% αντίστοιχα και ακολουθεί καύση σε αμμόλουτρο 170-180°C για μία ώρα.

Αντιδραστήρια

1. 72% υπερχλωρικό οξύ
2. 0.4% μολυβδαινικό αμμώνιο: 2.125 g μολυβδαινικό αμμώνιο. 4H₂O διαλύονται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500 ml.

3. Διάλυμα ANSA: 30 g NaHSO_3 (ή 28.5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) και 6 g Na_2SO_3 διαλύονται σε 250 ml νερού. Σ' αυτό το διάλυμα των θειωδών αλάτων διαλύονται 0.5 g, 1,2,4-αμινο-ναφθο-σουλφονικού οξέος (ANSA). Αν σε 3 ώρες σχηματισθεί ίζημα, διηθείται και διατηρείται σε ψυγείο.
4. Αντιδραστήριο ANSA: Προκύπτει από ανάμιξη 4 ml διαλύματος ANSA με 6 ml νερό λίγο πριν από την εκτέλεση του πειράματος.
5. Πρότυπο διάλυμα φωσφορικών: Παρασκευάζεται διάλυμα KH_2PO_4 που περιέχει ακριβώς 4γ φωσφόρου/ml ή 1,7575mg KH_2PO_4 ανά 100 ml. Το KH_2PO_4 ξηραίνεται στους 105°C για μια ώρα πριν ζυγιστεί.

Εκτέλεση προσδιορισμού

Μετά το τέλος της καύσης, τα δείγματα αφήνονται να ψυχθούν και προστίθενται διαδοχικά 1 ml νερού, 3 ml μολυβδαινικού αμμωνίου και μετά από ισχυρή ανάδευση 0.5 ml αντιδραστηρίου ANSA. Ακολουθεί ανάδευση και θέρμανση σε υδρόλουτρο 100°C επί 15 min ακριβώς.

Οι σωλήνες ψύχονται και στα δείγματα που περιέχουν πυριτικό οξύ από την πλάκα προστίθενται 5 ml οξεικού αιθυλεστέρα. Μετά από ισχυρή ανάδευση των σωλήνων σε κυκλοαναδευτήρα Vortex, το μπλε σύμπλοκο εκχυλίζεται στην οργανική στιβάδα.

Πρότυπη καμπύλη

Ετοιμάζουμε δύο πρότυπες καμπύλες όπως περιγράφεται πιο κάτω:

Παίρνουμε έξι δοκιμαστικούς σωλήνες όπου προσθέτουμε από το πρότυπο διάλυμα KH_2PO_4 αντίστοιχα: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1.0 ml, συμπληρώνουμε με H_2O μέχρι το 1.0 ml, προσθέτουμε σε κάθε σωλήνα από 0.5 ml HClO_4 , 3 ml διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου και τέλος από 0.5 ml αντιδραστηρίου ANSA.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Μετά την προσθήκη *κάθε* αντιδραστηρίου αναδεύουμε ισχυρά. Ακολουθεί θέρμανση σε υδρόλουτρο 100°C για 15 min ακριβώς.

Τα δείγματα της μιας πρότυπης καμπύλης εκχυλίζονται με 5 ml οξεικού αιθυλεστέρα όπως περιγράφεται πιο πάνω.

Η φωτομέτρηση γίνεται στα 820 nm για τα δείγματα χωρίς εκχύλιση (α_1 , α_2), ενώ στα 780 nm για τα δείγματα μετά από εκχύλιση (β).

Κατασκευάζουμε πίνακα με τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης και χαράσσουμε την πρότυπη καμπύλη A_{820} , γ φωσφόρου).

Υπολογίζουμε την περιεκτικότητα κάθε άγνωστου δείγματος σε φώσφορο με βάση

την αντίστοιχη πρότυπη καμπύλη.

Προσοχή: Οι σωλήνες πρέπει να είναι πλυμένοι με χρωμοθειικό οξύ, επειδή τα απορρυπαντικά, που περιέχουν φωσφορικά άλατα, αφήνουν στα τοιχώματα ένα λεπτό φιλμ που περιέχει φωσφόρο.

ΠΙΝΑΚΑΣ

Αντιδραστήρια	T	1	2	3	4	5
KH ₂ PO ₄ (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
(γ φωσφόρου)	0	1	2	3	4	5.0
H ₂ O (ml)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
HClO ₄ 70% (ml)	0.5					
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O (ml)	3.0					
ANSA (ml)	0.5					
α) Απορρόφηση 820 nm						
β) Απορρόφηση 780 nm						

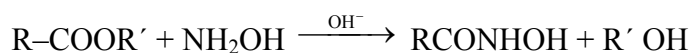
Αποτελέσματα

1. Περιεκτικότητα δειγμάτων σε φωσφόρο (μέσοι όροι)
2. Ολική ποσότητα φωσφολιπιδίων (σε moles ή mg φωσφόρου) ανά 10⁶ κύτταρα.
3. Απόδοση της εκχύλισης κατ' αντιρροή.
4. Επί τοις εκατό (%) περιεκτικότητα φωσφατιδυλαιθανολαμίνης και φωσφατιδυλοχολίνης στα φωσφορολιπίδια του *T. pyriformis*.

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΣΤΕΡΩΝ

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα της υδροξυλαμίνης να αντιδρά σε αλκαλικό περιβάλλον με εστέρες οργανικών οξέων προς υδροξαμικά οξέα.



Τα οξέα αυτά σχηματίζουν έγχρωμα σύμπλοκα του Fe³⁺.

Αντιδραστήρια

1. Άνυδρος υπερχλωρικός σίδηρος (non yellow), [Fe(ClO₄)₃].

2. Υπερχλωρικό οξύ 70%, [70% HClO₄].
3. Απόλυτη αιθανόλη.
4. Υδροχλωρική υδροξυλαμίνη [HONH₂·HCl].
[ΠΡΟΣΟΧΗ. Η ΧΡΗΣΗ ΜΟΝΟ ΜΕ ΓΑΝΤΙΑ].
5. Ακετόνη.
6. Καυστικό Νάτριο [NaOH].

Διαλύματα

1. Stock διάλυμα Fe(ClO₄)₃, 0.1441 M. Διαλύονται 5g Fe(ClO₄)₃ (non yellow) σε 10 ml HClO₄, 70%. Σ' αυτό προστίθενται 10 ml απεσταγμένου νερού, μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και συμπληρώνεται ο όγκος με ψυχρή απόλυτη αιθανόλη. Διατηρείται στο ψυγείο και είναι σταθερό για μερικούς μήνες.
2. Διάλυμα εργασίας: Σε 1 ml από το προηγούμενο διάλυμα προστίθενται 0.7 ml HClO₄ 70% και το μίγμα αραιώνεται με απόλυτη αιθανόλη στα 25 ml (παρασκευάζεται φρέσκο κάθε μέρα).
3. Διάλυμα 4% υπερχλωρικής υδροξυλαμίνης (0.575 N):
Διαλύονται 2 g HONH₂·HCl σε 2.5 ml απεσταγμένου νερού και αραιώνεται με απόλυτη αιθανόλη μέχρι όγκου 50 ml. Φυλάσσεται στο ψυγείο.
4. Αλκοολικό διάλυμα NaOH 2N: Διαλύονται 4g NaOH σε 5 ml H₂O και στη συνέχεια το μίγμα αραιώνεται στα 50 ml με απόλυτη αιθανόλη. Φυλάσσεται στο ψυγείο.
5. Αλκαλικό διάλυμα υδροξυλαμίνης: Αναμιγνύονται ίσοι όγκοι των 2 και 3. Το μίγμα διαθείται ή φυγοκεντρείται και παραλαμβάνεται το διαυγές υπερκείμενο. Παρασκευάζεται φρέσκο πριν από κάθε χρήση.
6. Πρότυπα διαλύματα τριελαΐνης.
 - 6-1. Stock διάλυμα: Αναλύονται 295 mg τριελαΐνης σε λίγο χλωροφόρμιο και στη συνέχεια αραιώνουμε στα 10 ml με χλωροφόρμιο.
 - 6-2. Διάλυμα εργασίας: 1 meq εστέρος/ml:
Από το προηγούμενο διάλυμα αραιώνουμε 1 ml στα 100 ml με CHCl₃.

Εκτέλεση προσδιορισμού

- Δύο δείγματα του 1 ml χλωροφορμικής φάσης και άλλα δύο του 1 ml αιθανολικής φάσης εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ατμόσφαιρα αζώτου.
- Προσθέτουμε από 1 ml αλκαλικού διαλύματος υδροξυλαμίνης.
- Θερμαίνουμε σε υδρόλουτρο 62-65°C για 2 min.

- Ψύχουμε τα δείγματα και προσθέτουμε από 3 ml αλκοολικού διαλύματος υπερχλωρικού σιδήρου.
- Μετά από 30 min μετράμε οπτική πυκνότητα στα 530 nm. Το χρώμα παραμένει σταθερό για 1 ώρα.
- Την ίδια διαδικασία ακολουθούμε για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς από τριελαΐνη (διάλυμα 5-2), σε δείγματα 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1.0 meq τριελαΐνης.

Προσοχή: Η τριελαΐνη έχει τρία meq εστέρων.

Αποτελέσματα

- Υπολογισμός δειγμάτων.
- Ολική ποσότητα εστέρων ανά 10^6 κύτταρα.
- Εύρεση αναλογίας φωσφολιπιδικού φωσφόρου προς εστέρινα και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Παραπομπή: M. Kates, Methods in Lipidology, Elsevier 1968.

ΑΕΡΙΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΑΛΥΣΙΔΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ

Αντιδραστήρια

Διάλυμα 20% $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (W/V)

Μέθοδος

Με την επίδραση του συμπλόκου $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ υδρολύονται τα εστεροποιημένα στα γλυκερίδια λιπαρά οξέα και σχηματίζουν μεθυλεστέρες.

Δείγμα λιπιδίων περιεκτικότητας 5-20 μmoles γλυκεριδίων (1 ml χλωροφορμικού εκχυλίσματος) φέρεται σε βιδωτό δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου. Τα λιπίδια αναδιαλύονται σε 1 ml $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$, ο σωλήνας πωματίζεται και θερμαίνεται σε υδρόλουτρο 100°C επί 90 min.

Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 1 ml νερού. Οι μεθυλεστέρες εκχυλίζονται στο δοκιμαστικό σωλήνα με 2 ml πετρελαϊκού αιθέρα, δύο φορές. Τα ενωμένα πετρελαϊκά εκχυλίσματα πλένονται τρεις φορές με 4 ml νερού, για πλήρη απομάκρυνση του οξέος, που ελέγχεται με pH μετρικό χαρτί. Στη συνέχεια ξηραίνονται με άνυδρο

θειϊκό νάτριο και μετά από διήθηση και έκπλυση του ηθμού με πετρελαϊκό αιθέρα, ο διαλύτης εξατμίζεται πλήρως. Οι μεθυλεστέρες αναδιαλύονται τελικά σε μικρό όγκο πετρελαϊκού αιθέρα (περίπου 30-50 μl) και φυλάσσονται στο ψυγείο για ανάλυση με αέρια χρωματογραφία.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Συνθήκες χρωματογραφίας

Στήλη: Ατσάλινη, σπειροειδής, μήκους 2 μέτρων και εσωτερικής διαμέτρου 1/8' (=2,2 mm).

Πληρωτικό υλικό: 15% DEGS (ηλεκτρικός εστέρας της διαιθυλενο-γλυκόλης) σε στατική φάση Chromosorb W, AW, 80/100 (γη διατόμων, πλυμένη με οξύ).

Ανιχνευτής: φλόγας ιονισμού (FID).

Θερμοκρασία στήλης, θαλάμου εξαέρωσης και ανιχνευτή: 170, 240 και 270°C, αντίστοιχα (ισόθερμη ανάλυση).

Ταχύτητα φέροντος αερίου (αζώτου): 30 ml/min.

Ευαισθησία ανιχνευτή 8-64 x 10⁻¹¹.

Ανάλυση

Στον αέριο χρωματογράφο γίνονται ενέσεις των δειγμάτων μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων, όγκου 1 λ . Ο ποιοτικός προσδιορισμός των κορυφών του δείγματος γίνεται με σύγκριση των χρόνων κατακράτησής τους, με τους χρόνους κατακράτησης πρότυπων μεθυλεστέρων. Το ισοδύναμο μήκος της αλυσίδας άγνωστου μεθυλεστέρα, υπολογίζεται από το χρόνο κατακράτησής του. Το εμβαδόν της κάθε κορυφής, που αντιστοιχεί στην ποσότητα του μεθυλεστέρα, υπολογίζεται με ολοκληρωτή-υπολογιστή, ή με βάση το χρόνο κατακράτησης και το ύψος της κορυφής.

3. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ (I, II) ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΤΗΣ Ε.Ε.

ΟΥΣΙΑ	R	S
Χλωροφόρμιο	22-38-40-48/20/22	36/37
Μεθανόλη	11-23/25	2-7-16-24
Νιτυδρίνη	11-23/24/25	7-16-23
Μολυβδαινικό αμμώνιο	20/21/22-36/37/38-40	26-36/37-39
H ₂ SO ₄	35	26-30
CuSO ₄ ·5H ₂ O	22-36/38	22
NaOH	34-20/21/22	45-26-28-36/37-39
n-βουτανόλη	10-20	16
Οξεϊκό οξύ	10-35	23-26
Πετρελαϊκός αιθέρας	12-23/25-36/37/38	16-3/7-26-36
Αιθανόλη	11	7-16
HClO ₄	5-8-35	26-36-23
ANSA	20/21/22-36/37/38	26-36
Οξεϊκός αιθυλεστέρας	»	16-23-29-33
Fe(ClO ₄) ₃	8-36/37/38	
NH ₂ OH · HCl	34-20/21/22-5-40	15-26-27-36/37/39

Σημασία των R και των S

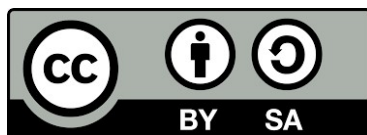
- R₂₂** : βλαβερό αν το καταπιείς
- R₃₈** : ερεθιστικό στο δέρμα
- R₄₀** : πιθανός κίνδυνος μη αντιστρεπτών επιδράσεων
- R_{48/20/22}** : βλαβερό κίνδυνος από επικίνδυνη βλάβη στην υγεία, από παρατεταμένη έκθεση μέσω εισπνοής και πιθανής κατάπωσης
- R₁₁** : πολύ εύφλεκτο
- R_{23/25}** : τοξικό με την εισπνοή και αν το καταπιείς
- R_{23/24/25}** : τοξικό με εισπνοή, σ' επαφή με το δέρμα και με κατάπωση
- R₃₅** : προκαλεί ισχυρά εγκαύματα
- R_{36/38}** : ερεθιστικό για τα μάτια και το δέρμα
- R₃₄** : προκαλεί εγκαύματα
- R_{20/21/22}** : βλαβερό με την εισπνοή, σ' επαφή με το δέρμα και με κατάπωση
- R₁₀** : εύφλεκτο
- R₂₀** : βλαβερό με εισπνοή
- R₅** : με θέρμανση πιθανόν να προκαλέσει έκρηξη
- R₈** : επαφή με καύσιμο υλικό μπορεί να προκαλέσει φωτιά
- R_{36/37/38}** : ερεθιστικό στα μάτια, στο αναπνευστικό σύστημα και στο δέρμα
- R₁₂** : εξαιρετικά εύφλεκτο
- S_{36/37}** : φοράτε κατάλληλη προστατευτική ενδυμασία και γάντια

- S₂ : μακριά από παιδιά
- S₇ : κρατήστε τη φιάλη ερμητικά κλειστή
- S₁₆ : μακριά από πηγές ανάφλεξης - απαγορεύεται το κάπνισμα
- S₂₄ : αποφυγή επαφής με το δέρμα
- S₂₃ : μην αναπνέεται αέρια/καυσαέρια/ατμός/σπρέυ. Κατάλληλες οδηγίες να δοθούν από τον κατασκευαστή
- S₂₆ : σε περίπτωση επαφής με τα μάτια ξεπλύνετε αμέσως με άφθονο νερό και αναζητήστε ιατρική συμβουλή
- S₃₀ : μην προσθέτετε νερό σ' αυτό το προϊόν
- S₂₂ : μην εισπνέετε σκόνη
- S₄₅ : σε περίπτωση ατυχήματος ή αν δεν νιώθετε καλά αναζητήστε ιατρική συμβουλή αμέσως. Δείξτε την ετικέτα αν είναι εύκολο
- S₂₈ : μετά την επαφή με το δέρμα πλυθείτε αμέσως με άφθονο νερό και αναζητήστε ιατρική συμβουλή. Να διευκρινιστεί από τον κατασκευαστή
- S_{36/37/39} : φορέστε προστασία για μάτια και πρόσωπο
- S₃₆ : φορέστε κατάλληλη προστατευτική ενδυμασία
- S₂₉ : Μην το αδειάζετε στις αποχετεύσεις
- S₃₃ : Λάβετε προστατευτικά μέτρα ενάντια στη στατική εκφόρτιση
- S_{3/7} : Διατηρήστε τη φιάλη ερμητικά κλειστή σε δροσερό μέρος
- S₁₇ : Να μη βρίσκεται κοντά σε καύσιμο υλικό.
- S₂₇ : Βγάλτε αμέσως τα μολυσμένα ρούχα.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bligh EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37: 911-917.
2. Bartlett, GR (1959). J. Biol. Chem. 234: 466-468.
3. «Laboratory techniques in biochemistry & Mol. Biology: Techniques of lipidology», M. Kates (ed.), El sevier Publishing Co, N.Y. p. 358.
4. Morrison, WR, A Smith, LM (1964) «Preparation of fatty acid methyl ester, and dimethylacetals from lipids with boron fluoride - methanol». J. Lipid Res. 5: 600-608.

Τέλος Ενότητας



Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



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

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
Πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Σημειώματα

Σημείωμα Ιστορικού Εκδόσεων Έργου

Το παρόν έργο αποτελεί την έκδοση 1.0.

Έχουν προηγηθεί οι κάτωθι εκδόσεις:

- Έκδοση 1.0 διαθέσιμη εδώ.

<http://ecourse.uoi.gr/course/view.php?id=1374>.

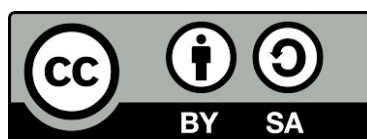
Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,
Διδάσκοντες: Αναπλ. Καθ. Α. Ε. Κούκκου,
Καθ. Μ. Ε. Λέκκα, Αναπλ. Καθ. Ε. Πάνου,
Καθ. Ε. Παπαμιχαήλ, Καθ. Α. Τσελέπης,
Καθ. Δ. Τσουκάτος. «Εργαστήριο
Βιοχημείας. Προσδιορισμός λιπιδικού
φωσφόρου (Λιπίδια II)». Έκδοση: 1.0.
Ιωάννινα 2014. Διαθέσιμο από τη
δικτυακή διεύθυνση:

<http://ecourse.uoi.gr/course/view.php?id=1374>.

Σημείωμα Αδειοδότησης

- Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά Δημιουργού - Παρόμοια Διανομή, Διεθνής Έκδοση 4.0 [1] ή μεταγενέστερη.



- [1] <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>.