



Δευτερογενείς μεταβολίτες: βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος

Ενότητα 8:

Χημική ανάλυση δευτερογενών μεταβολιτών.

Αικατερίνη Καραμανώλη
Τμήμα Γεωπονίας



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

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.



Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης» 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.





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΑΝΟΙΚΤΑ
ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΑ
ΜΑΘΗΜΑΤΑ



Χημική ανάλυση δευτερογενών μεταβολιτών



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Περιεχόμενα ενότητας (1)

1. Στάδια χημικής ανάλυσης.
2. Παραλαβή πτητικών συστατικών - Απόσταξη.
3. Χρωματογραφία - Γενικά.
4. Αέριος Χρωματογραφία.
5. Αέριος Χρωματογραφία - Φασματογραφία Μάζας (GC-MS).
6. Παραδείγματα χρωματογραφημάτων.



Περιεχόμενα ενότητας (2)

7. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.
8. Χρωματογραφία στήλης.
9. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.



Στάδια χημικής ανάλυσης (1)

Η επιλογή μεθοδολογίας (τεχνικές) θα εξαρτηθεί από:

1. Δομή και ιδιότητες του υπό διερεύνηση συστατικού.
2. Φύση-μέγεθος δείγματος.
3. Χρόνος-κόστος-δυνατότητες εργαστηρίου.
4. Στόχος της χημικής ανάλυσης.



Στάδια χημικής ανάλυσης (2)

1. Παραλαβή από φυτικούς ιστούς.
2. Καθαρισμός δειγμάτων.
3. Διαχωρισμός μιγμάτων.
4. Ταυτοποίηση.
 - Τα στάδια:
 - Δεν πραγματοποιούνται πάντοτε όλα.
 - Δεν είναι πάντα διακριτά μεταξύ τους π.χ. χημική ανάλυση αιθερίων ελαίων.



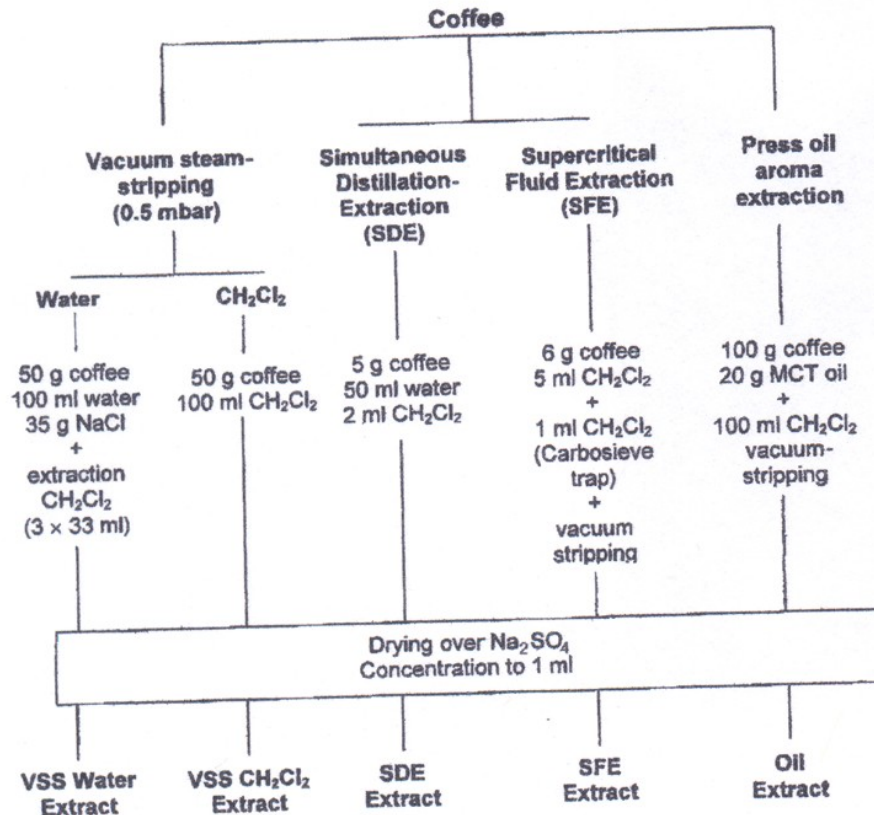
Στάδια χημικής ανάλυσης (3)

Παραλαβή συστατικών από τους φυτικούς ιστούς:

- Εκχύλιση: Τεχνική διαχωρισμού ουσιών που βασίζεται στην ισορροπία κατανομής τους μεταξύ δύο διαφορετικών φάσεων που δεν αναμιγνύονται:
 - Εκχύλιση υγρής φάσης - υγρού.
 - Εκχύλιση στερεής φάσης - υγρού (εκχύλιση Soxhlet).
 - Διαχωρισμός με προσρόφηση.
- Απόσταξη.
- Μηχανική πίεση.



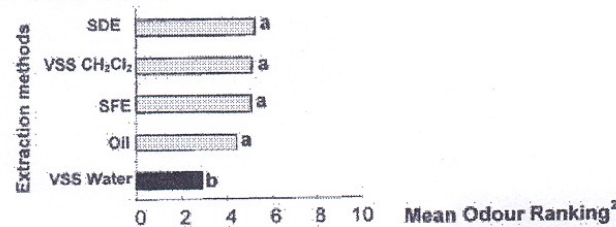
Στάδια χημικής ανάλυσης (4)



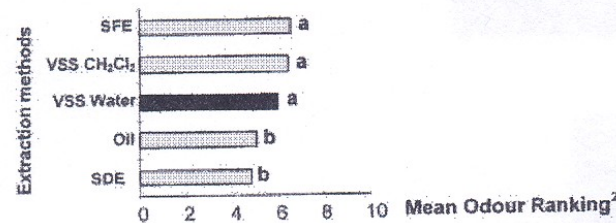
Σύγκριση διαφορετικών τεχνικών εκχύλισης των πτητικών συστατικών που διαμορφώνουν το άρωμα του καφέ

Στάδια χημικής ανάλυσης (5)

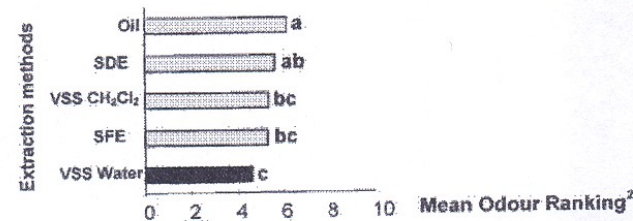
A : Green coffee



B : Light-roast coffee



C: Medium-roast coffee

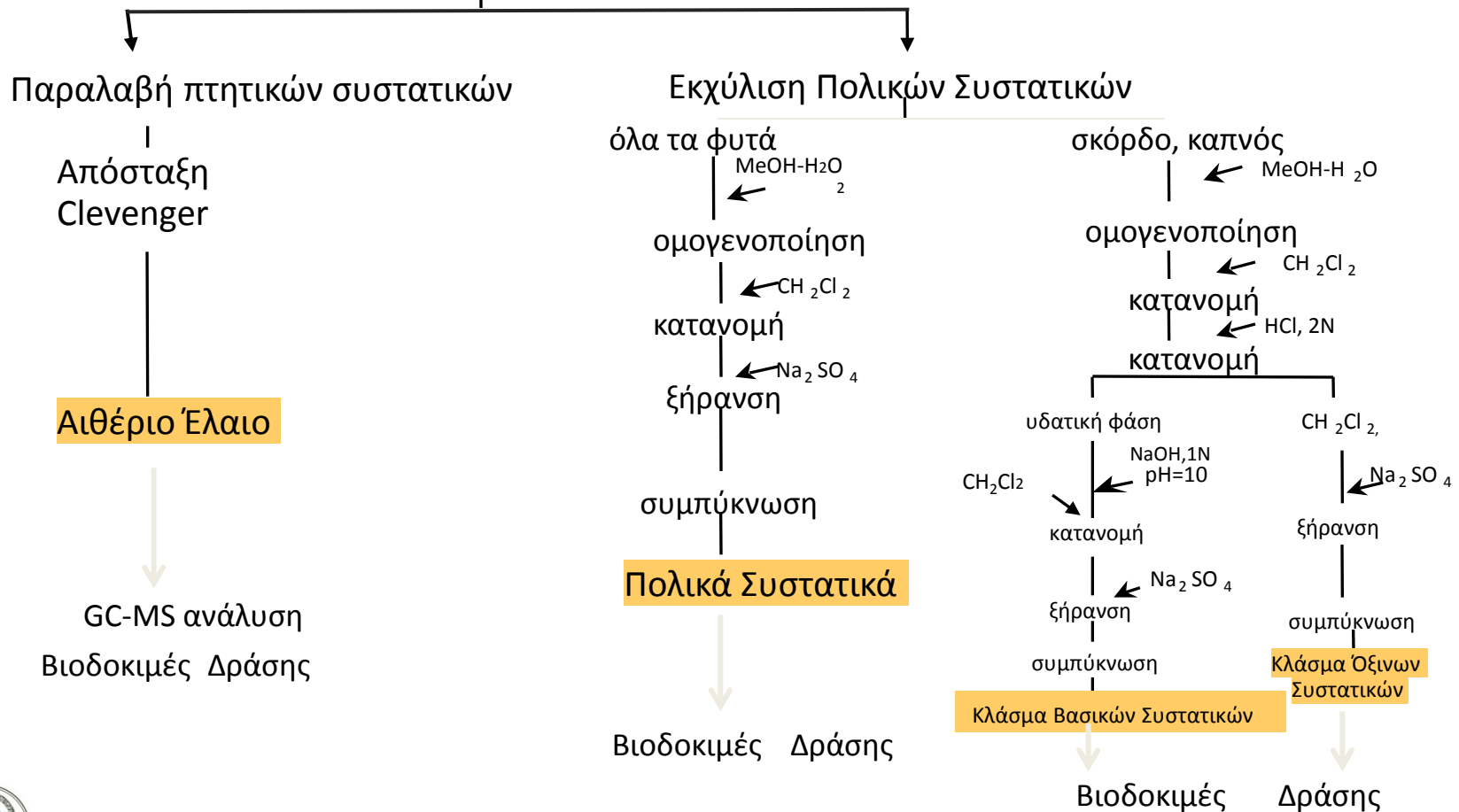


Σύγκριση διαφορετικών τεχνικών εκχύλισης των πτητικών συστατικών που διαμορφώνουν το άρωμα του καφέ.



Στάδια χημικής ανάλυσης (6)

Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από τη φυλλόσφαιρα.

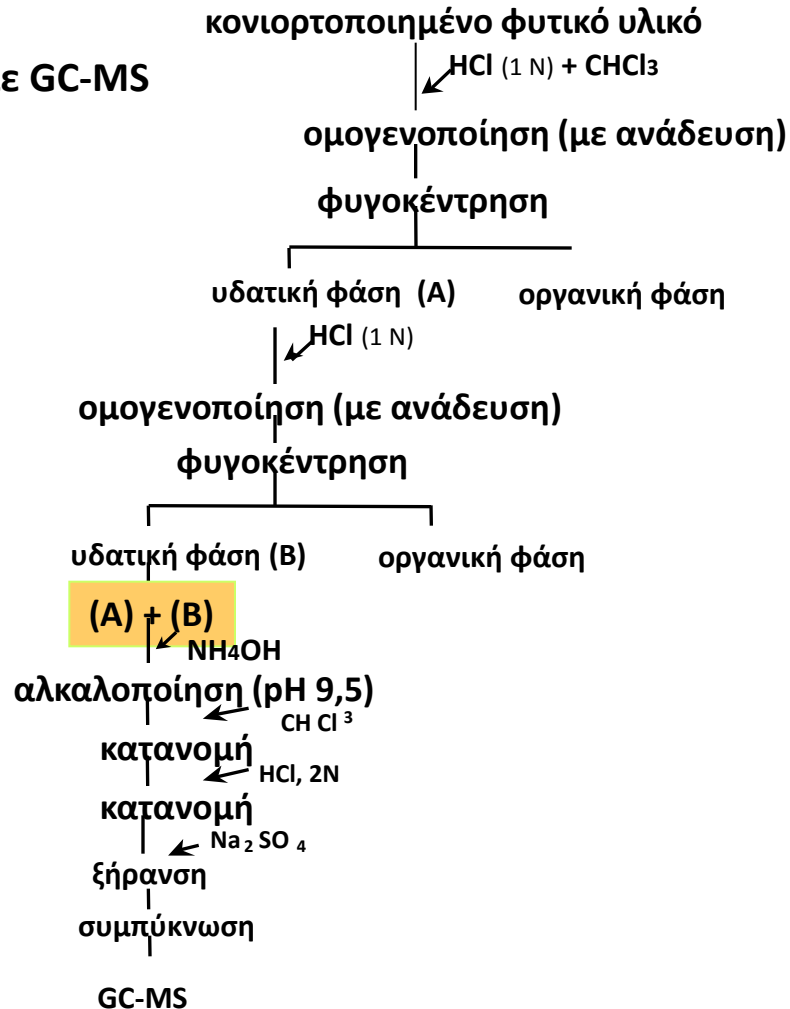


Στάδια χημικής ανάλυσης (7)

Προσδιορισμός αλκαλοειδών κινολιζιδίνης με GC-MS



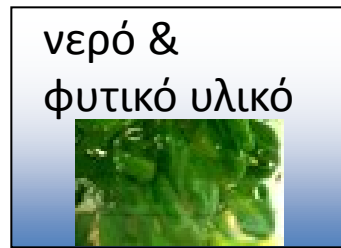
Αλκαλοειδή λούπινου



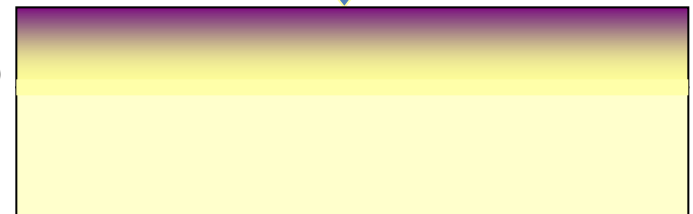
Στάδια χημικής ανάλυσης (8)

Παραλαβή πτητικών συστατικών- απόσταξη με υδρατμούς

Αιθέρια Έλαια



Οι ατμοί ψύχονται,
συμπυκνώνονται
πάνω από το νερό
& συγκεντρώνεται το
αιθέριο έλαιο χωρίς
να αναμειγνύεται
με αυτό.



θερμότητα



GC-MS ανάλυση





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Απόσταξη αιθερίων ελαίων

Απόσταξη αιθερίων ελαίων (1)



Δευτερογενείς μεταβολίτες: Βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος

Τμήμα Γεωπονίας

Απόσταξη αιθερίων ελαίων (2)



Δευτερογενείς μεταβολίτες: Βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος

Τμήμα Γεωπονίας



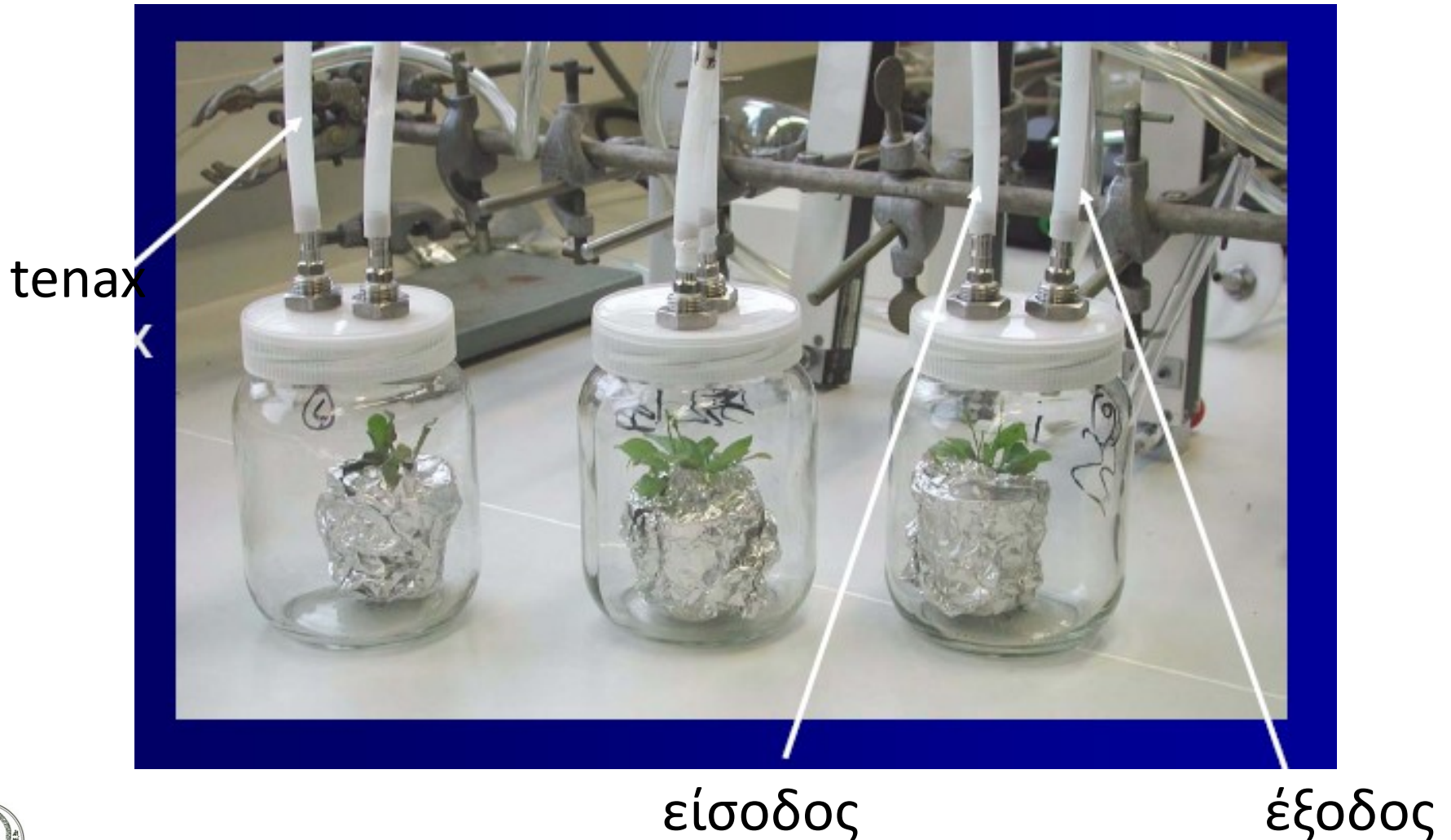
Απόσταξη αιθερίων ελαίων (3)



Δευτερογενείς μεταβολίτες: Βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος

Τμήμα Γεωπονίας

Εκχύλιση υπερκείμενης φάσης (Headspace extraction)





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Χρωματογραφία

Χρωματογραφία - Γενικά (1)

Είναι οι τεχνικές διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος που στηρίζονται σε φυσικές διεργασίες κατανομής και προσρόφησης κάθε συστατικού μεταξύ μιας **στατικής** και μιας **κινητής** φάσης.

Στατική φάση είναι ένα στερεό ή ημίρευστο υλικό διαμέσου του οποίου περνά η κινητή φάση και τα υπό ανάλυση συστατικά και αναφέρεται ως στήλη.

Κινητή φάση είναι ένα αέριο ή υγρό στο οποίο διοχετεύεται το υπό ανάλυση μίγμα και εισάγεται στη στατική φάση για να αρχίσει ο διαχωρισμός.

Η χρωματογραφία με τις διάφορες εφαρμογές της θεωρείται η πλέον κατάλληλη τεχνική για το διαχωρισμό οργανικών μορίων.



Χρωματογραφία - Γενικά (2)

Κατάταξη χρωματογραφικών τεχνικών σύμφωνα με:

1. Τη φύση της στατικής και κινητής φάσης:

ΣΤΕΡΕΟΥ-ΥΓΡΟΥ, ΥΓΡΟΥ – ΑΕΡΙΟΥ , ΥΓΡΟΥ- ΥΓΡΟΥ

2. Τη μορφή της στατικής φάσης:

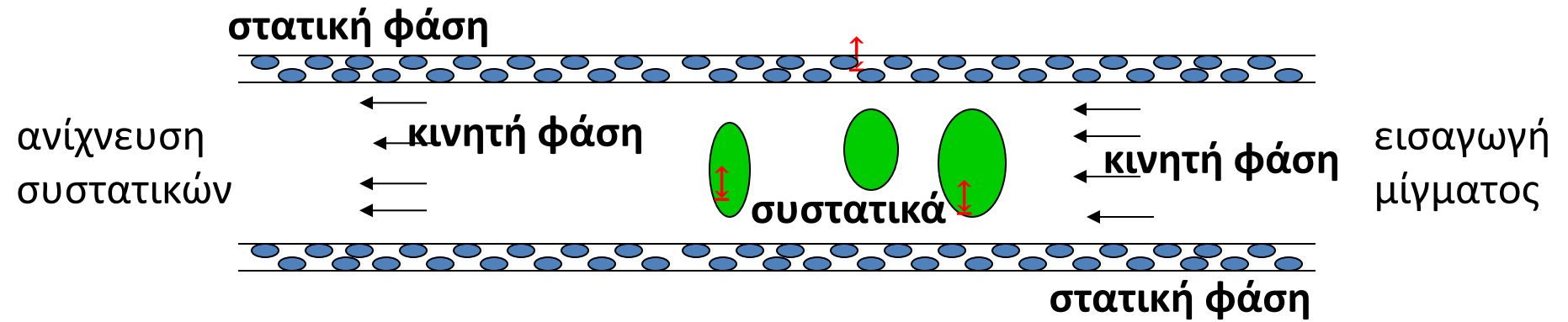
χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, χρωματογραφία χάρτου,
χρωματογραφία στήλης

3. Το μηχανισμό διαχωρισμού:

χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής κ.λπ.



Χρωματογραφία - Γενικά (3)





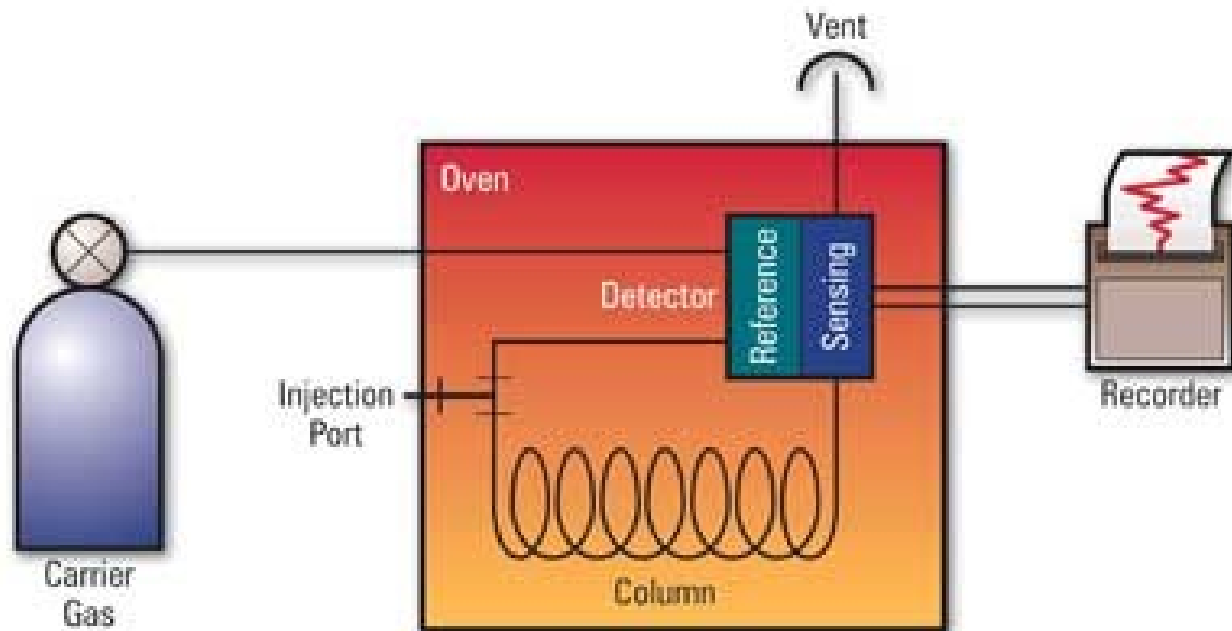
ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Αέριος Χρωματογραφία (GC)

Αέριος Χρωματογραφία (GC) (1)

Η κινητή φάση είναι αέριο.

για την ανάλυση πτητικών ουσιών: σε τρόφιμα φάρμακα κ.λπ.
για αιθέρια έλαια, ρύπους κ.λπ.



Αέριος Χρωματογραφία (GC) (2)

Καθώς τα συστατικά μετακινούνται δια μέσου της στήλης εγκαθίσταται μια ισορροπία ανάμεσα στη συγκέντρωση συστατικού που βρίσκεται προσροφημένο στη στατική και αυτής που βρίσκεται σε διάλυση στην κινητή φάση.

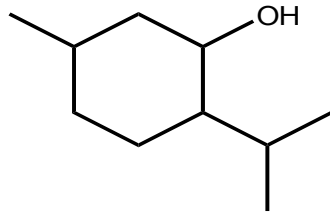
$$K = \frac{\text{[συστατικό στην κινητή φάση]}}{\text{[συστατικό στη στατική φάση]}} \text{ Συντελεστής κατανομής}$$

Υψηλή K, το συστατικό **εκλούεται** γρήγορα, έχει χαμηλό **χρόνο συγκράτησης**.

Χαμηλή K, το συστατικό **εκλούεται** αργά, έχει υψηλό **χρόνο συγκράτησης**.

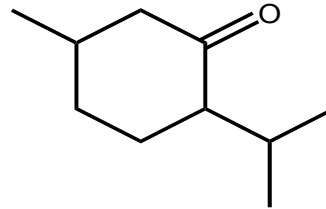


Με ποια σειρά θα εκλουστούν οι τρεις ενώσεις;



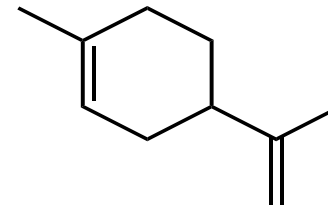
bp 212 C

A



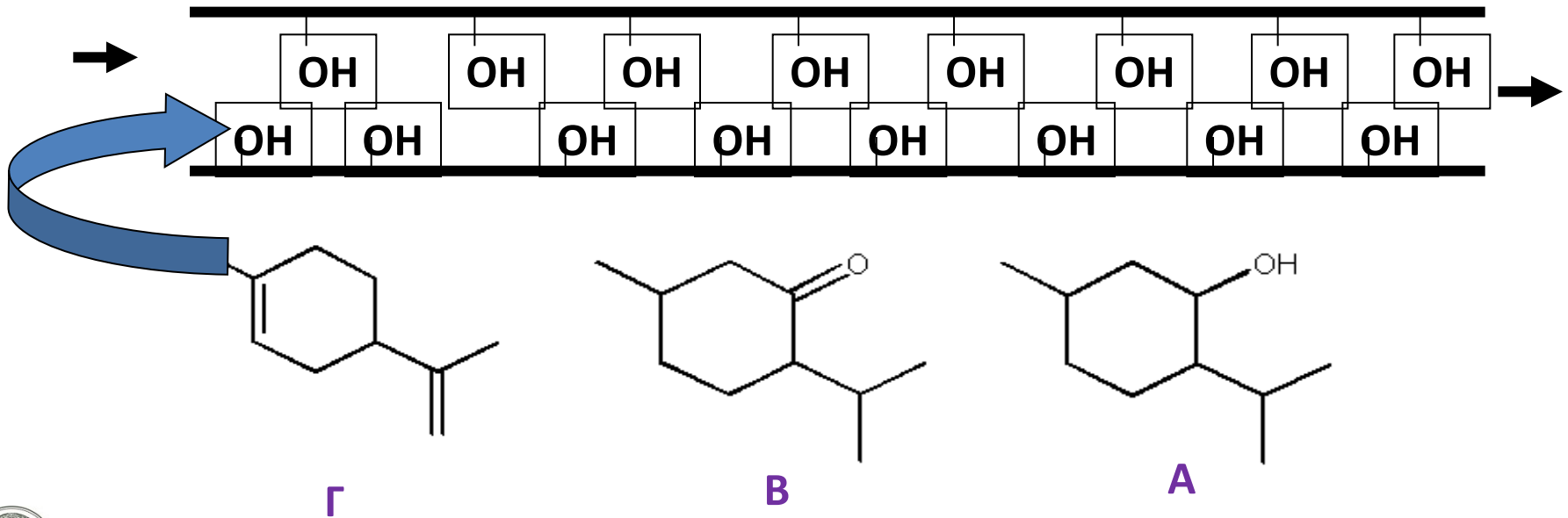
bp 207 C

B



bp 177 C

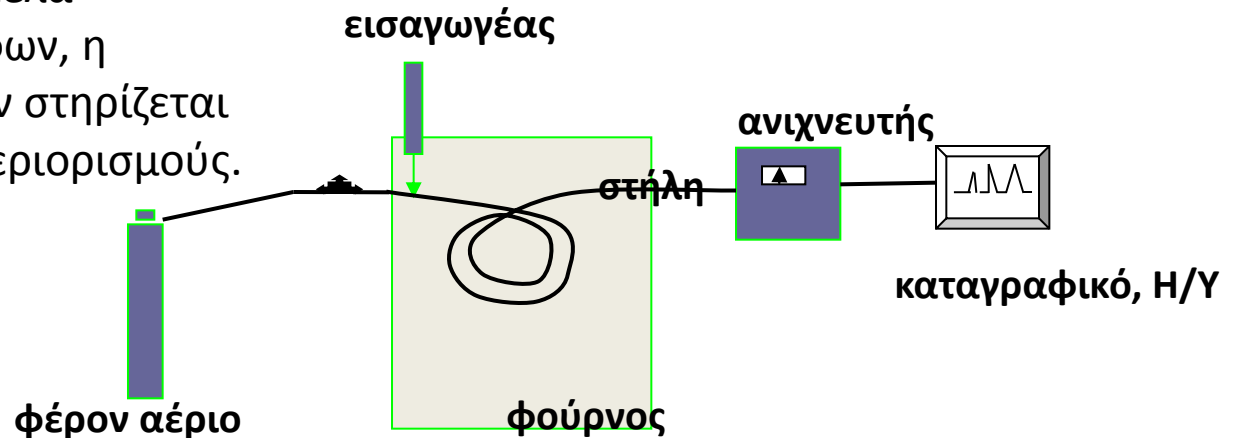
Γ



Αέριος Χρωματογραφία (GC) (3)

Εφαρμόζεται για διαχωρισμούς πτητικών μιγμάτων.

Υπάρχουν πολλά μοντέλα αερίων χρωματογράφων, η λειτουργία όμως όλων στηρίζεται σε κοινές αρχές και περιορισμούς.



Ο βασικός περιορισμός της μεθόδου είναι ότι όλα τα συστατικά του υπό ανάλυση μίγματος πρέπει να μπορούν να κινηθούν μέσω μιας αδρανούς κινούμενης αέριας φάσης.

Αέριος Χρωματογραφία (GC) (4)

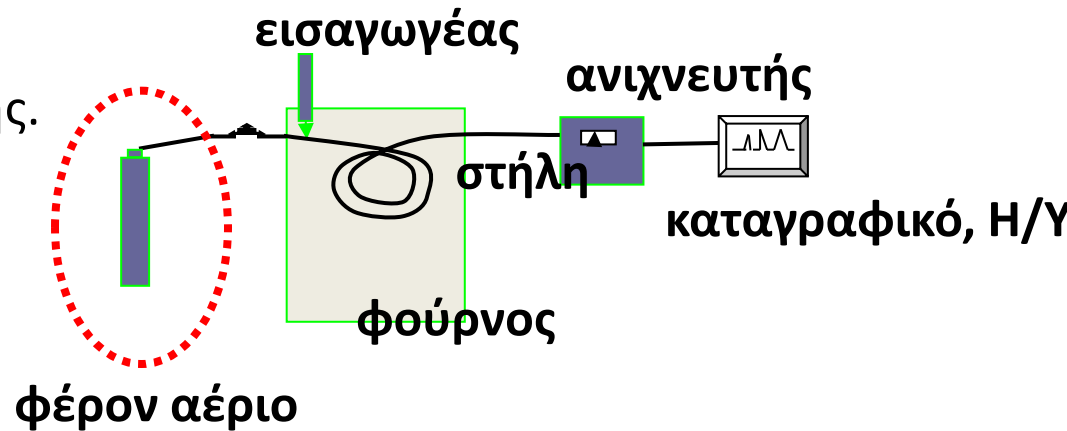
1. Φέρον αέριο

Πρόκειται για τη πηγή κινητής φάσης.

Τα συνηθέστερα αέρια που χρησιμοποιούνται ως κινητή φάση είναι το υδρογόνο, το ήλιο και το άζωτο σε υπερκάθαρη κατάσταση.

Η βασική τους ιδιότητα είναι ότι τα αέρια αυτά είναι αδρανή και δεν αντιδρούν με τη περισσότερα οργανικά μίγματα.

Η πίεση που εφαρμόζεται κυμαίνεται από 10-100 psi.

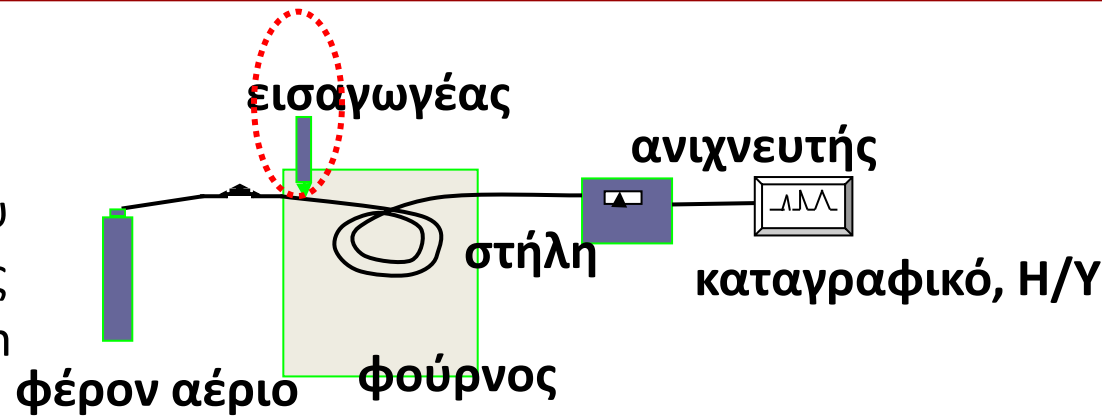


Αέριος Χρωματογραφία (GC) (5)

2. Είσοδος

Το δείγμα εισάγεται στην είσοδο του χρωματογράφου με τη βοήθεια μιας γυάλινης σύριγγας μέσω του septum (silicone rubber) όπου αμέσως εξαερώνεται.

Η ποσότητα εισαγωγής εξαρτάται από το τύπο της στήλης και την επιθυμητό διαχωρισμό, συνήθως 1-10 μl .



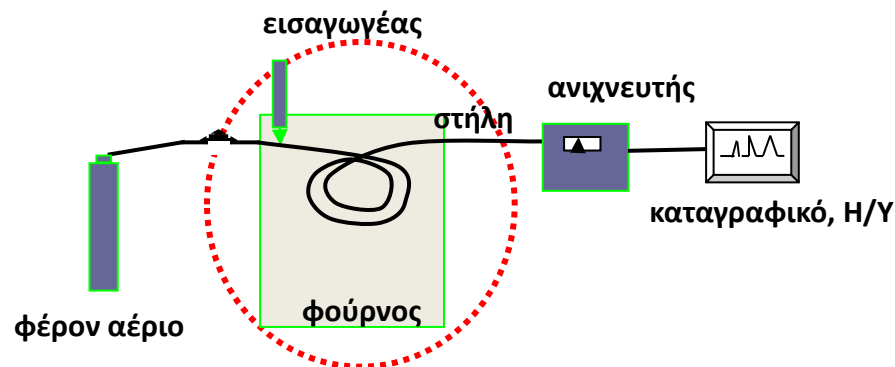
Αέριος Χρωματογραφία (GC) (6)

3. Φούρνος

Ο φούρνος χρησιμοποιείται για να διατηρηθεί η θερμοκρασία στήλης στα επιθυμητά επίπεδα τα οποία διαμορφώνονται μέσω προγραμματισμού στο όργανο.

Κατά τον προγραμματισμό αυτό μπορούμε να ορίσουμε την αρχική, την τελική θερμοκρασία, το χρόνο διάρκειας τους καθώς και το ρυθμό μεταβολής.

Ο προγραμματισμός θερμοκρασίας εξαρτάται από το υπό ανάλυση μίγμα και βοηθάει στο διαχωρισμό ουσιών διαφορετικής πτητικότητας



Αέριος Χρωματογραφία (GC) (7)

4. Στήλη

(στατική φάση)

Υπάρχουν πολλοί τύποι στηλών, χωρίζονται όμως σε δύο βασικές κατηγορίες:

(ι) Πληρωμένες στήλες (packed columns).

(ii) Τριχοειδείς στήλες (capillary columns).

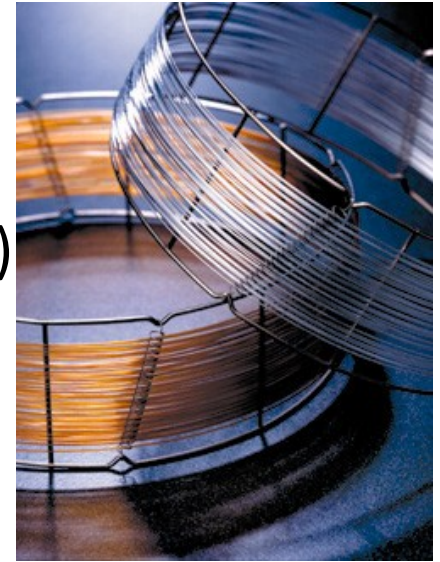
Η στήλη είναι τοποθετημένη σε φούρνο για ρύθμιση και διατήρηση της επιθυμητής θερμοκρασίας.



Αέριος Χρωματογραφία (GC) (8)

Τριχοειδής στήλη (Capillary column)

- Διάμετρος 0.05-0.1 mm και μήκος 10-100 m.
- Γυάλινη σωλήνωση με επένδυση κάποιου προσροφητικού ή μη-πτητικού υγρού (στατική φάση)
- Το μέγεθος του δείγματος που εισάγεται με τη μικροσύριγγα μπορεί να είναι λιγότερο από 0.1 μl .
- Χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό των αιθερίων ελαίων.



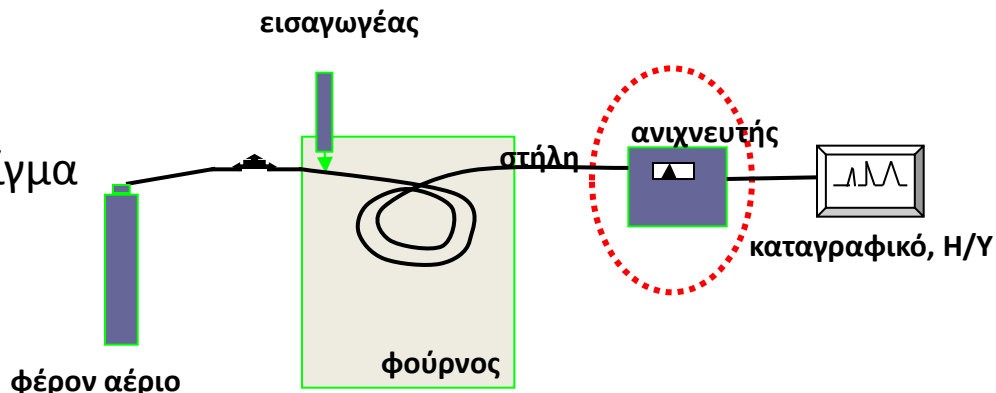
Αέριος Χρωματογραφία (GC) (9)

5. Ανιχνευτής

Χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί ο χρόνος συγκράτησης (R_t) ενός συστατικού που διαχωρίστηκε από το μίγμα από τη στήλη και η ποσότητα της σε σχέση με τα υπόλοιπα του δείγματος.

Υπάρχουν δύο είδη ανιχνευτών:

1. Απλοί ανιχνευτές προσδιορίζουν χρόνο και ποσότητα, όπως ο ανιχνευτής ιονισμού φλογός (FID).
2. Φασματογραφικοί ανιχνευτές: προσδιορίζουν το φάσμα του υπό ανάλυση συστατικού διευκολύνοντας την ταυτοποίηση όπως ο φασματογράφος μάζας (MS) με τον οποίο μπορεί να προσδιοριστεί το πλήρες φάσμα μαζών για κάθε συστατικό που εκλύεται από τον αέριο χρωματογράφο.



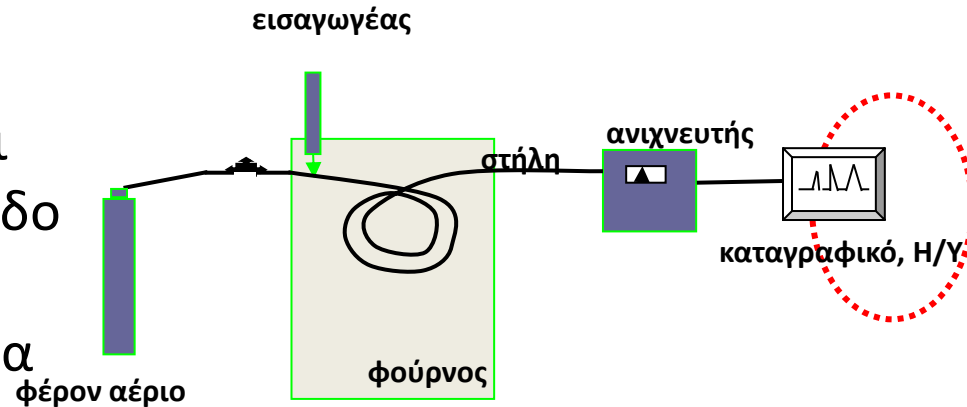
Συνδυασμένη τεχνική αέριας χρωματογραφίας –φασματοσκοπίας μαζών (GC-MS)

Αέριος Χρωματογραφία (GC) (10)

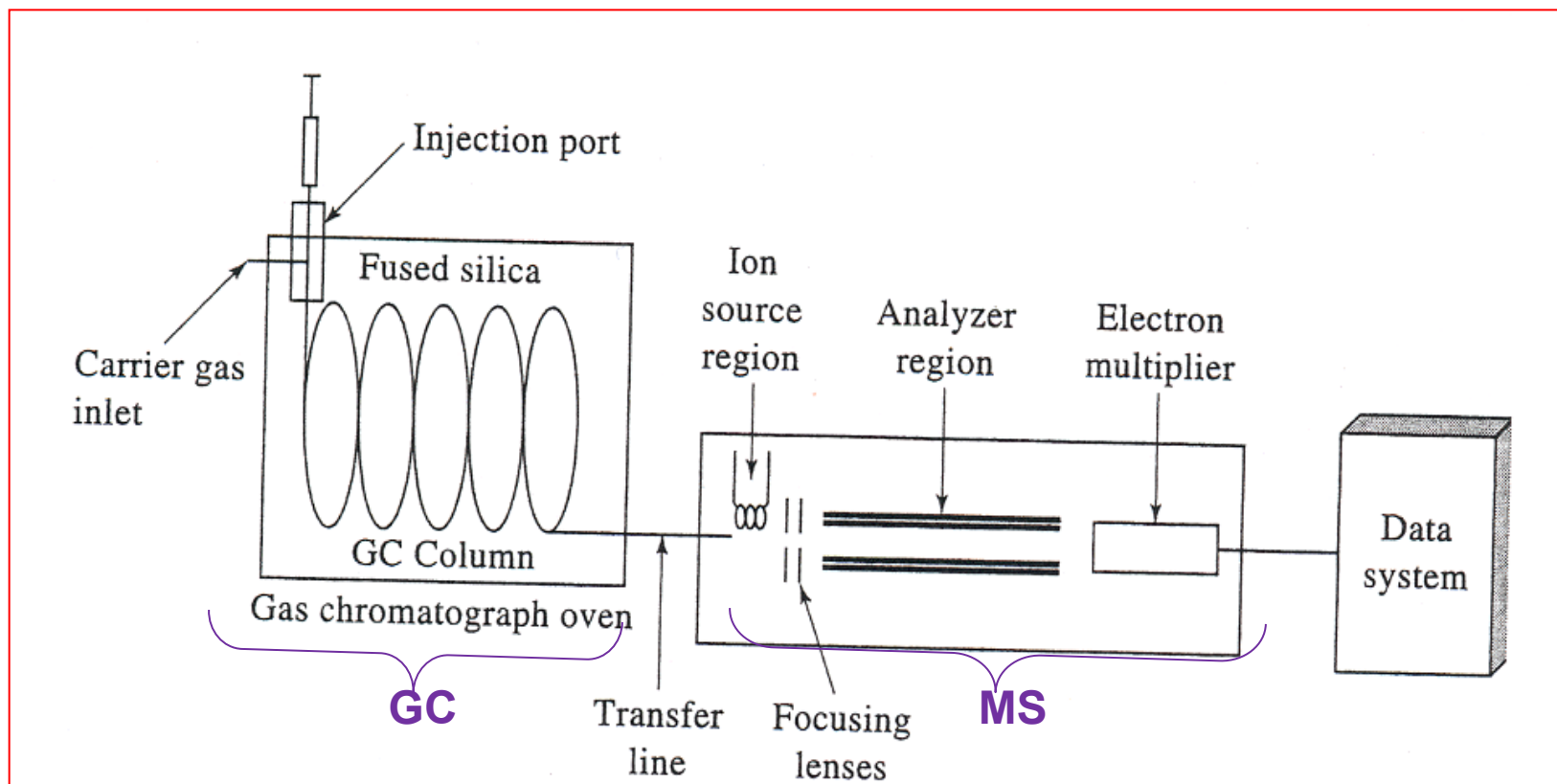
6. Καταγραφικό/ΗΥ

Το σήμα του ανιχνευτή καταγράφεται αφού ενισχυθεί στο επιθυμητό επίπεδο με τη παρεμβολή ενός ενισχυτή από έναν υπολογιστή ή παλιότερα από ένα απλό καταγραφικό, συνήθως ως το μέγεθος της απόκρισης σε κάθε χρονική στιγμή.

Κάθε συστατικό σχηματίζει μια κατανομή κατά Gauss με γύρω από το χρόνο συγκράτησης της, την κορυφή της.



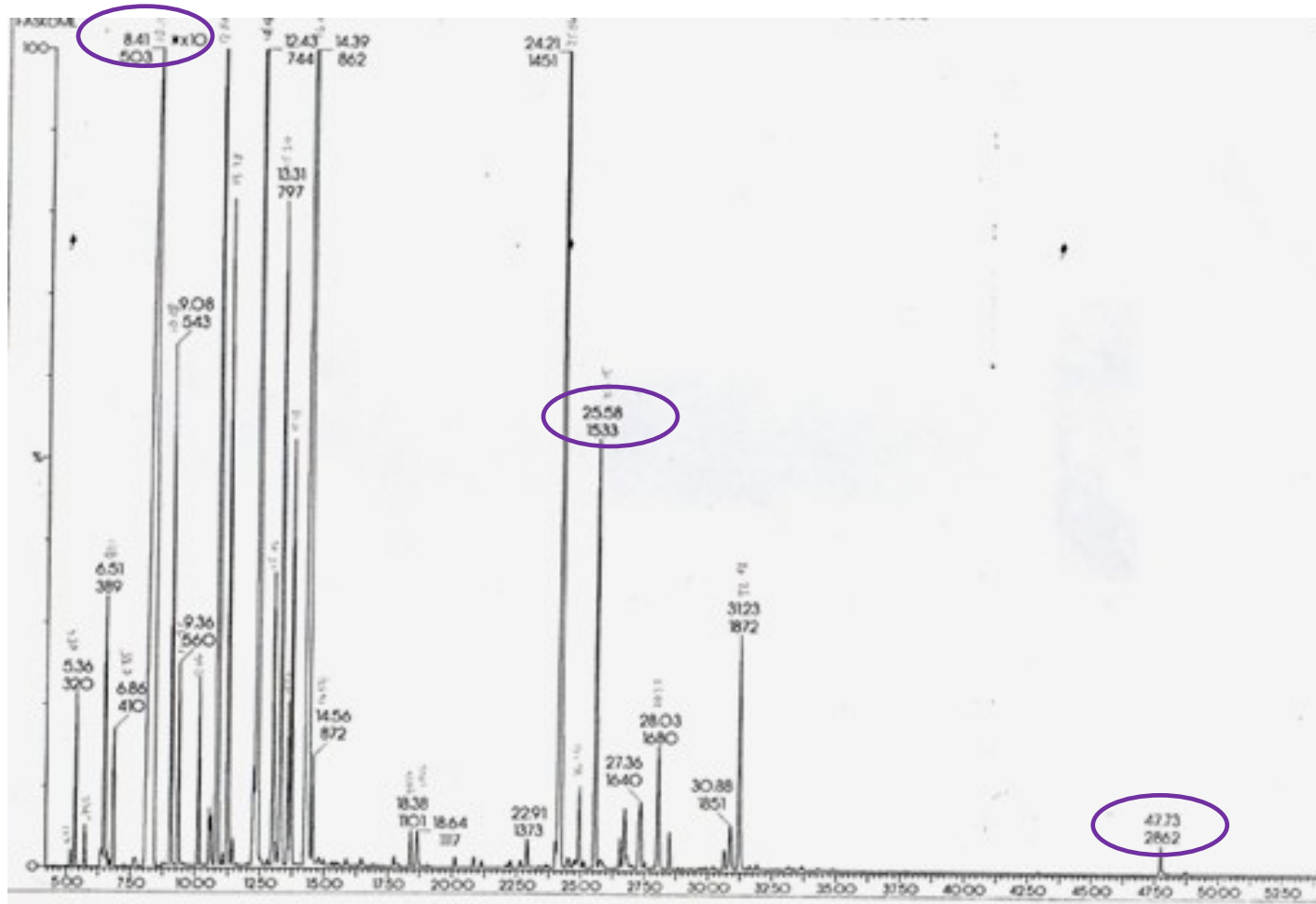
Αέριος Χρωματογραφία- Φασματογραφία Μάζας (GC-MS)



Τυπικό σύστημα αερίου χρωματογράφου με φασματογράφο μάζας GC-MS



Χρωματογράφημα αιθερίων ελαίων φύλλων ευκαλύπτου



time

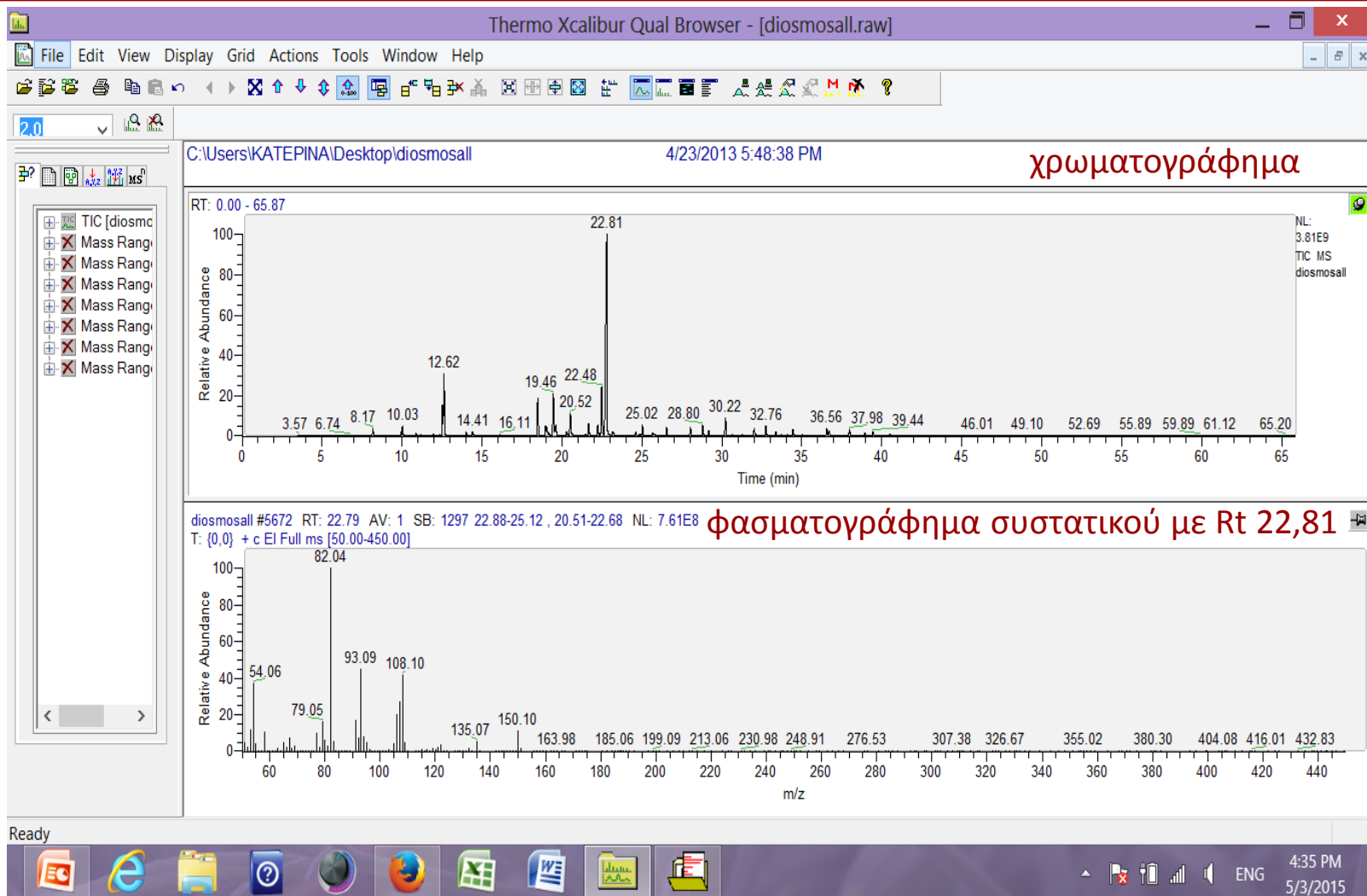
Χρόνος συγκράτησης (Rt)

Δευτερογενείς μεταβολίτες: Βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος

Τμήμα Γεωπονίας

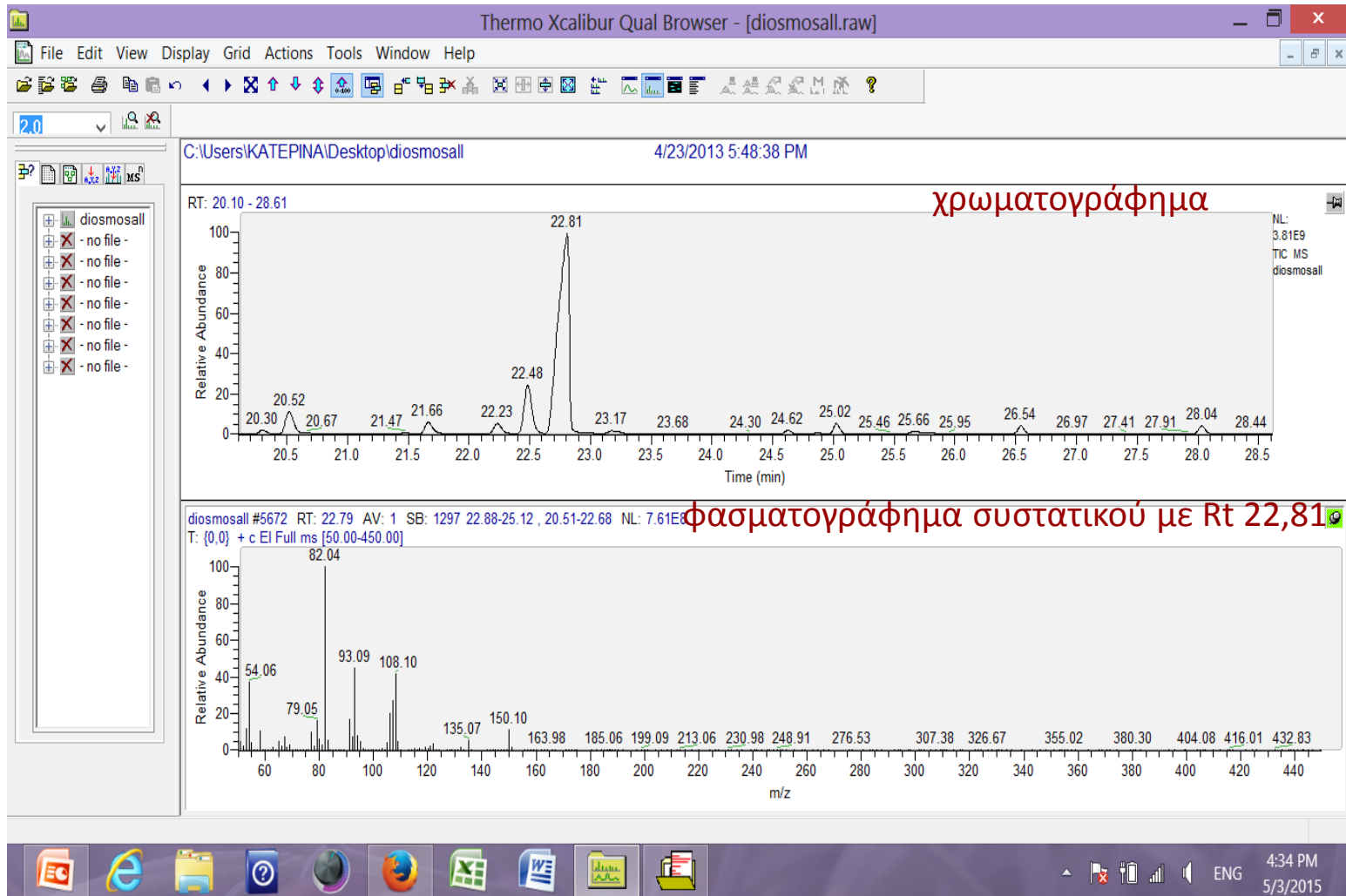
Χρωματογράφημα

Φασματογράφημα συστατικού με Rt 22,81 (1)



Χρωματογράφημα

Φασματογράφημα συστατικού με Rt 22,81 (2)



Δευτερογενείς μεταβολίτες: Βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος

Τμήμα Γεωπονίας



Αναγνώριση συστατικών με χρήση ηλεκτρονικής βιβλιοθήκης NIST

The screenshot displays the NIST MS Search 2.0 interface. The main window shows a search for '1. diosmosal#5672 RT: 22.79 AV: 1'. The search results table lists several matches, with the top match being 'Carvone' (Lib: M, Match: 929, R.Match: 951, Prob.: 35.9). The interface also shows mass spectra plots for both the search and the hit, along with chemical structure information for Carvone (C₁₀H₁₄O).

#	Lib	Match	R.Match	Prob. (...)	Name
1	M	929	951	35.9	Carvone
2	R	928	928	34.5	(-)-Carvone
3	R	922	931	27.1	D-Carvone
4	R	921	942	35.9	Carvone
5	M	911	917	34.5	(-)-Carvone
6	R	897	897	27.1	D-Carvone
7	M	893	893	27.1	D-Carvone
8	R	888	891	34.5	(-)-Carvone
9	R	861	875	35.9	Carvone
10	M	733	735	0.41	Cyclohexane, 4-m...
11	M	727	755	0.32	2-Cyclohexen-1-o...
12	M	719	719	0.24	5-(1-Bromo-1-met...
13	M	709	709	0.17	Cyclohexene, 2,4-...
14	M	699	699	0.12	6-Methyl-3,5,8-a...
15	M	695	697	0.10	1H-2-Benzopyran...
16	M	693	693	0.09	Bicyclo[3.3.0]octa...

Δευτερογενείς μεταβολίτες: Βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος

Τμήμα Γεωπονίας

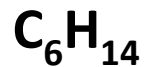


Αλκάνιο

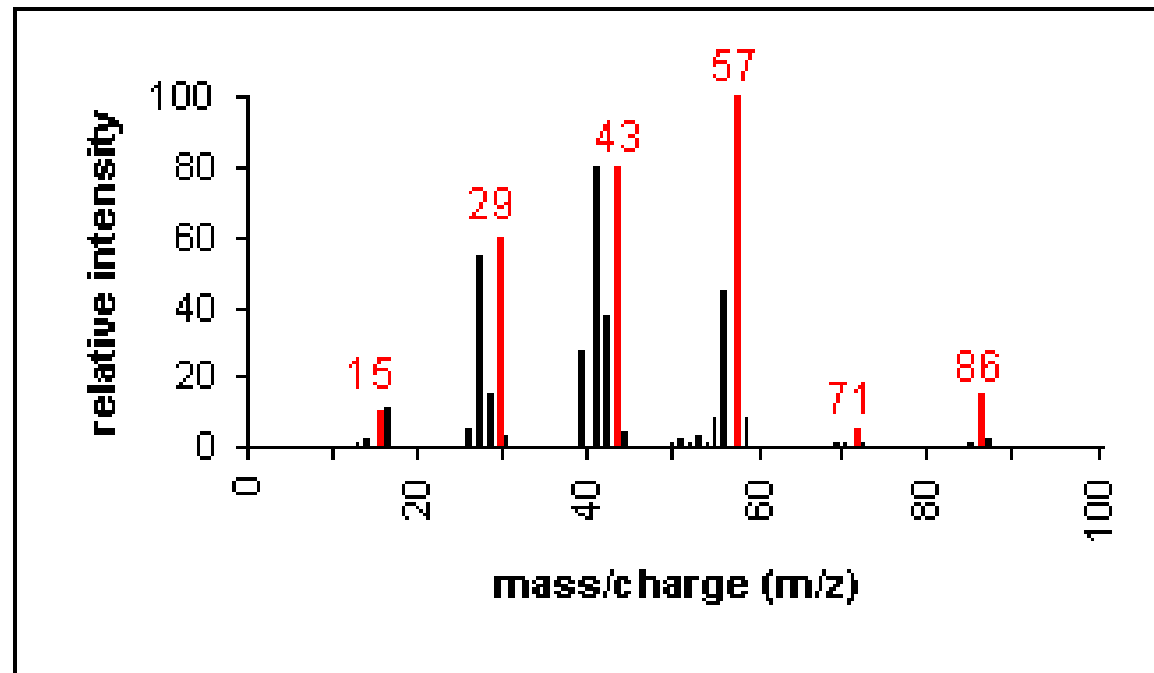
Alkane

Molecular ion peaks are present, possibly with low intensity. The fragmentation pattern contains clusters of peaks 14 mass units apart (which represent loss of $(\text{CH}_2)_n \text{CH}_3$).

Hexane



MW = 86.18

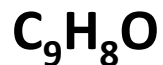


Αλδεΐδη

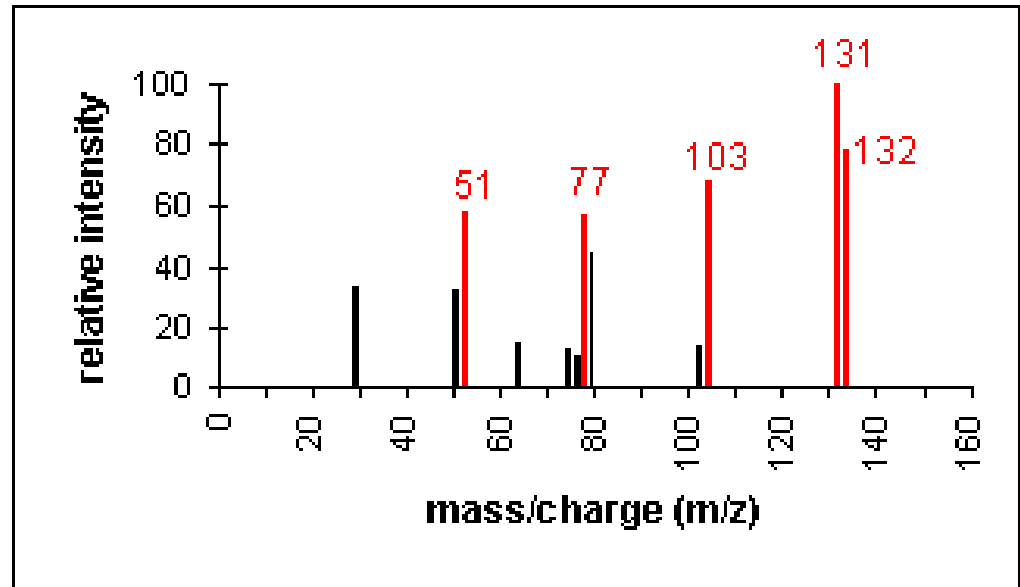
Aldehyde

Cleavage of bonds next to the carboxyl group results in the loss of hydrogen (molecular ion less 1) or the loss of CHO (molecular ion less 29).

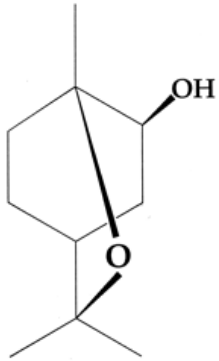
3-Phenyl-2-propenal



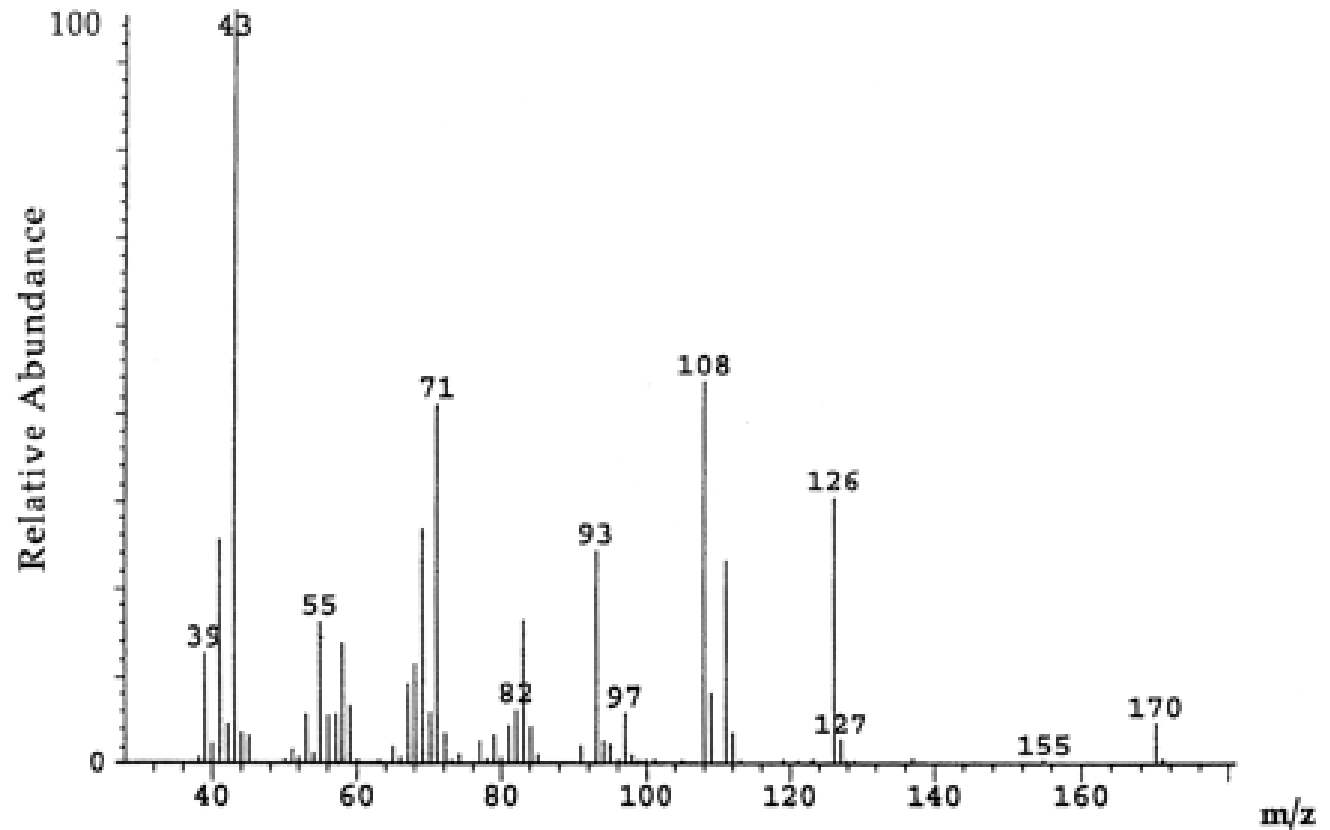
MW = 132.16



2-exo-hydroxy-1,8-cineole



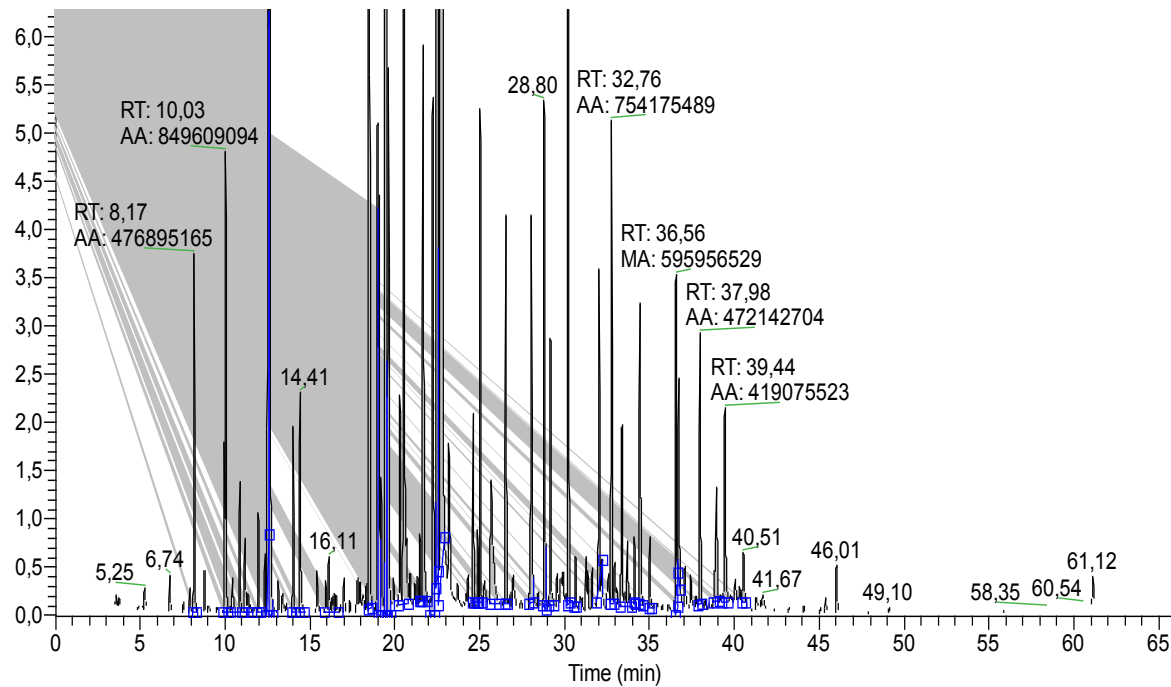
2-exo-hydroxy-1,8-cineole



Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου *Mentha spicata*

GC-MS

RT: 0,00 - 65,87

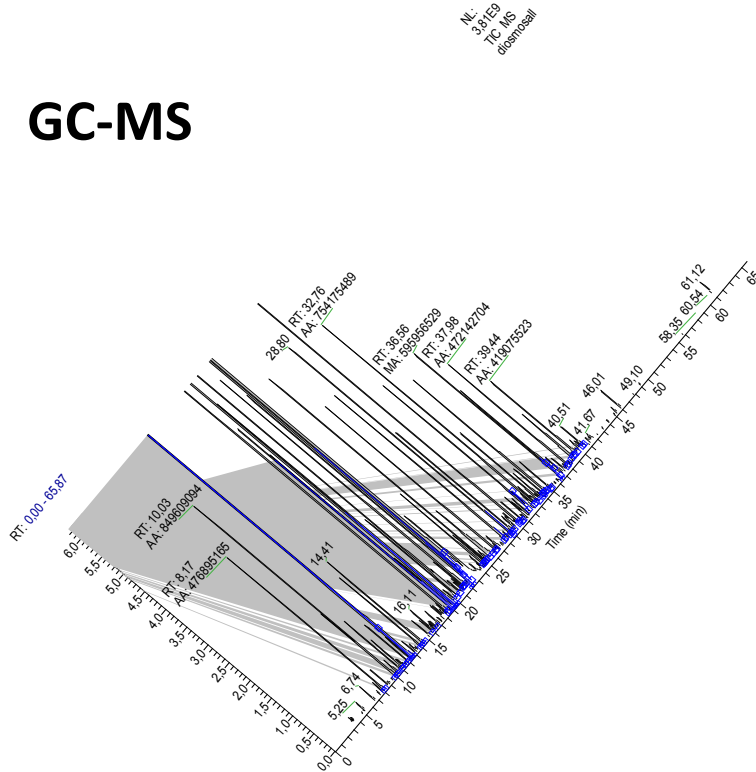


NL:
3,81E9
TIC MS
diosmosall



Συστατικά αιθερίου ελαίου *Mentha spicata* (1)

GC-MS



Apex RT	RI	Area	%Area	compound
8,17	932	4,77E+08	0,78	α-pinene
8,78	945	60421637	0,1	camphene
9,95	972	1,97E+08	0,32	sabinene
10,03	974	6,53E+08	1,06	β-pinene
10,87	993	1,84E+08	0,3	myrcene
11,96	1016	1,39E+08	0,23	α-terpinene
12,35	1024	79635966	0,13	p-cymene
12,53	1028	2,1E+09	3,41	d-limonene
12,62	1030	4,43E+09	7,21	cineol
14	1058	2,62E+08	0,43	γ-terpinene
14,41	1067	3,48E+08	0,57	cis-β-Terpineol
16,11	1102	95728703	0,16	α-linalool
18,49	1152	3,57E+09	5,81	menthone
19,06	1164	6,99E+08	1,14	borneol
19,17	1166	2,32E+08	0,38	cis-menthan-3-on
19,46	1172	3,23E+09	5,25	Menthof, (±)
19,62	1176	1,12E+09	1,82	(-)-Terpinen-4-ol
20,3	1190	3,53E+08	0,57	α-Terpineol
20,52	1195	2,04E+09	3,32	Dihydrocarveol
20,67	1198	1,49E+08	0,24	Anethole
21,66	1220	2,04E+09	3,32	cis-Carveol
22,48	1238	4,22E+09	6,87	(±)-Pulegone
22,81	1245	2,38E+10	38,66	carvone
23,17	1253	4,56E+08	0,74	Piperitone
25,02	1240	7,2E+08	1,17	Menthyl acetate
25,66	1308	5,28E+08	0,86	carvacrol
26,54	1329	5,76E+08	0,94	Neodihydrocarveol
28,04	1364	6,89E+08	1,12	trans-Carvyl acetate
28,8	1381	8,45E+08	1,37	β-Bourbonene
29,16	1390	4,28E+08	0,7	(-)-β-Elemene
30,22	1415	1,39E+09	2,26	β-Caryophyllene
32,76	1478	7,54E+08	1,23	D-Germacrene
34,1	1511	95834331	0,16	γ-Cadinene
34,43	1520	5,67E+08	0,92	δ-Cadinene
35,02	1535	1,07E+08	0,17	α-Muurolene
36,56	1575	5,98E+08	0,97	(-)-Spathulenol
36,72	1579	4,62E+08	0,75	β-Caryophyllene oxide
37,98	1613	4,72E+08	0,77	(-)-Cubanol
39,44	1655	4,08E+08	0,66	α-Cadinol
			96,87	

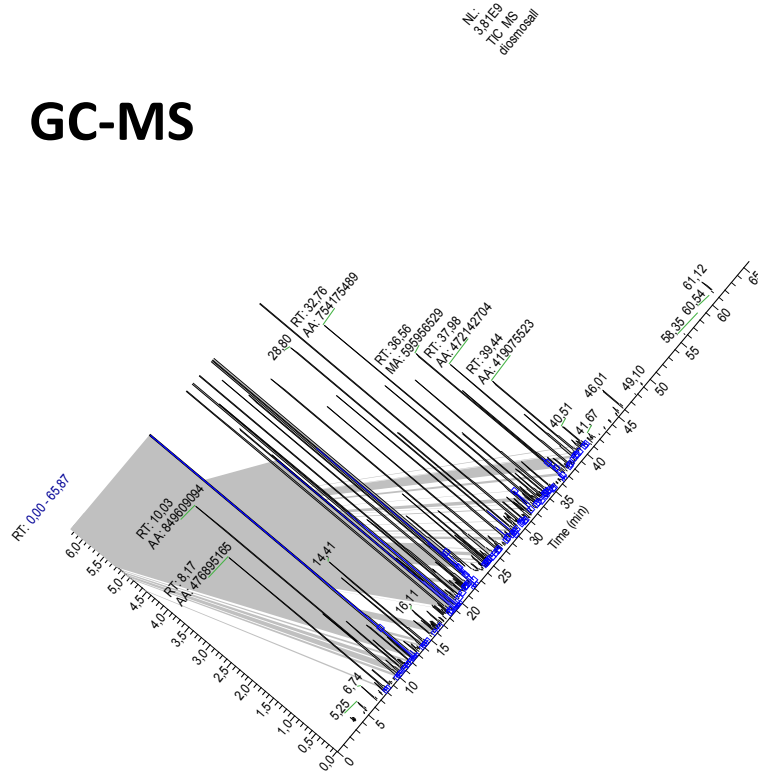
Δευτερογενείς μεταβολίτες: Βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος

Τμήμα Γεωπονίας



Συστατικά αιθερίου ελαίου *Mentha spicata* (2)

GC-MS



Apex RT	RI	Area	%Area	compound
8,17	932	4,77E+08	0,78	α-pinene
8,78	945	60421637	0,1	camphene
9,95	972	1,97E+08	0,32	sabinene
10,03	974	6,53E+08	1,06	β-pinene
10,87	993	1,84E+08	0,3	myrcene
11,96	1016	1,39E+08	0,23	α-terpinene
12,35	1024	79635966	0,13	p-cymene
12,53	1028	2,1E+09	3,41	d-limonene
12,62	1030	4,43E+09	7,21	cineol
14	1058	2,62E+08	0,43	γ-terpinene
14,41	1067	3,48E+08	0,57	cis-β-Terpeneol
16,11	1102	95728703	0,16	α-linalool
18,49	1152	3,57E+09	5,81	menthone
19,06	1164	6,99E+08	1,14	borneol
19,17	1166	2,32E+08	0,38	cis-menthan-3-on
19,46	1172	3,23E+09	5,25	Menthol, (±)
19,62	1176	1,12E+09	1,82	(-)-Terpinen-4-ol
20,3	1190	3,53E+08	0,57	α-Terpeneol
20,52	1195	2,04E+09	3,32	Dihydrocarveol
20,67	1198	1,49E+08	0,24	Anethole
21,66	1220	2,04E+09	3,32	cis-Carveol
22,48	1238	4,22E+09	6,87	(±)-Pulegone
22,81	1245	2,38E+10	38,66	carvone
23,17	1253	4,56E+08	0,74	Piperitone
25,02	1240	7,2E+08	1,17	Menthyl acetate
25,66	1308	5,28E+08	0,86	carvacrol
26,54	1329	5,76E+08	0,94	Neodihydrocarveol
28,04	1364	6,89E+08	1,12	trans-Carvyl acetate
28,8	1381	8,45E+08	1,37	β-Bourbonene
29,16	1390	4,28E+08	0,7	(-)-β-Elemene
30,22	1415	1,39E+09	2,26	β-Caryophyllene
32,76	1478	7,54E+08	1,23	D-Germacrene
34,1	1511	95834331	0,16	γ-Cadinene
34,43	1520	5,67E+08	0,92	δ-Cadinene
35,02	1535	1,07E+08	0,17	α-Muurolene
36,56	1575	5,98E+08	0,97	(-)-Spathulenol
36,72	1579	4,62E+08	0,75	β-Caryophyllene oxide
37,98	1613	4,72E+08	0,77	(-)-Cubanol
39,44	1655	4,08E+08	0,66	α-Cadinol
			96,87	

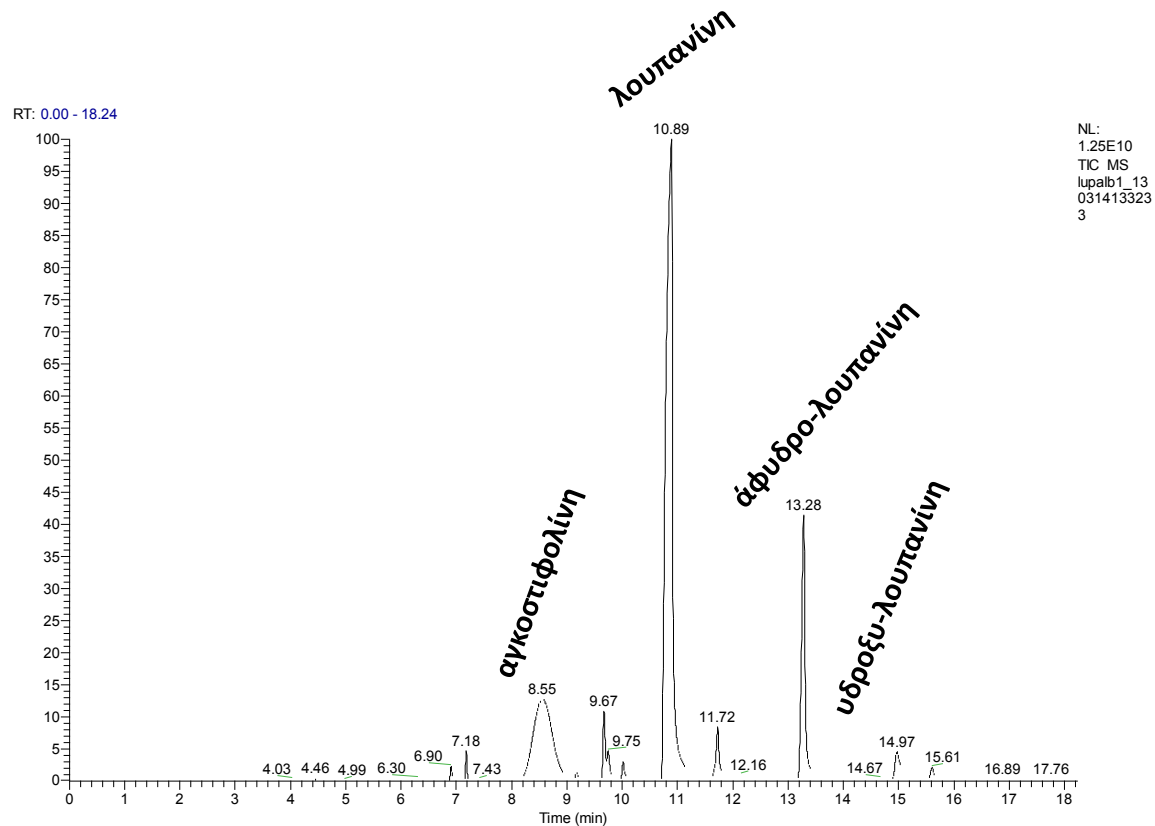
Δευτερογενείς μεταβολίτες: Βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος

Τμήμα Γεωπονίας



Χρωματογράφημα καρπών από το φυτό *Lupinus albus*

GC-MS



Δευτερογενείς μεταβολίτες: Βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος

Τμήμα Γεωπονίας

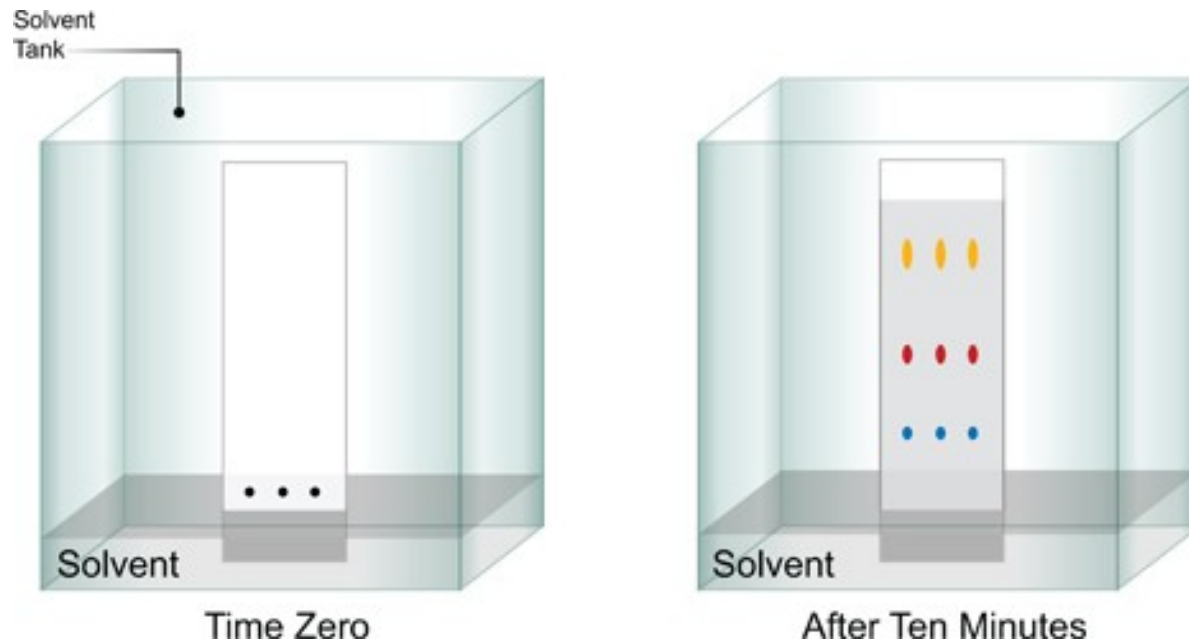




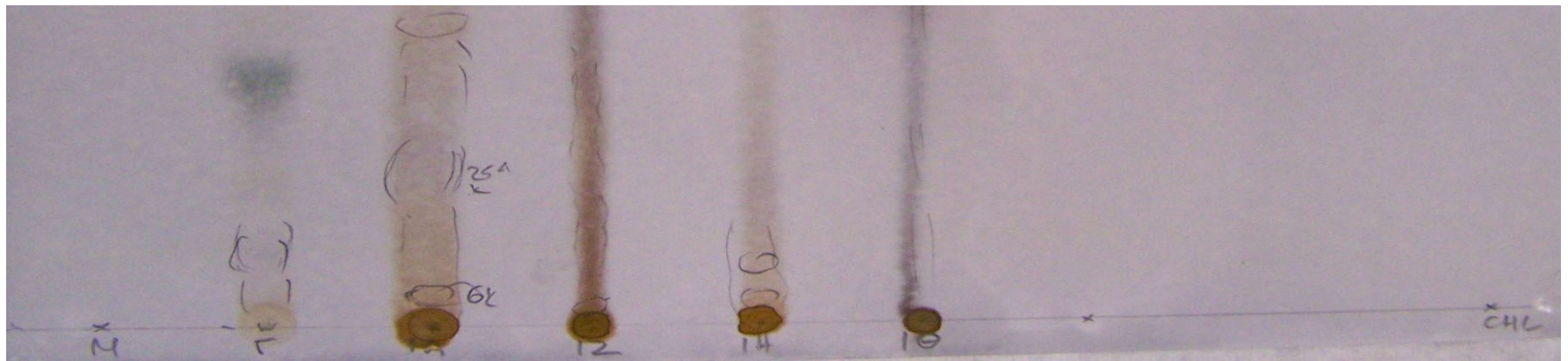
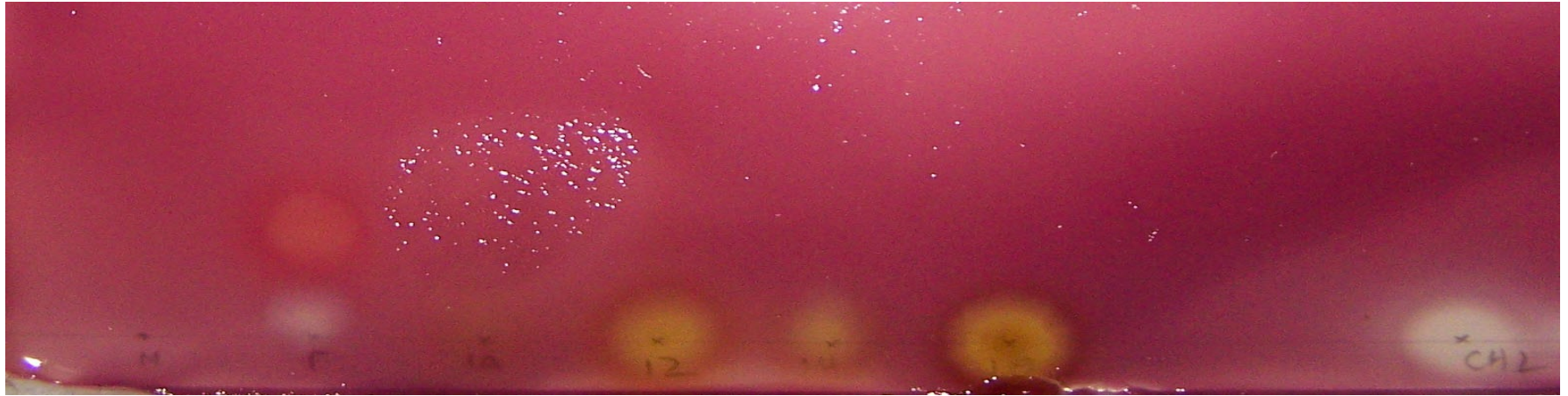
ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)

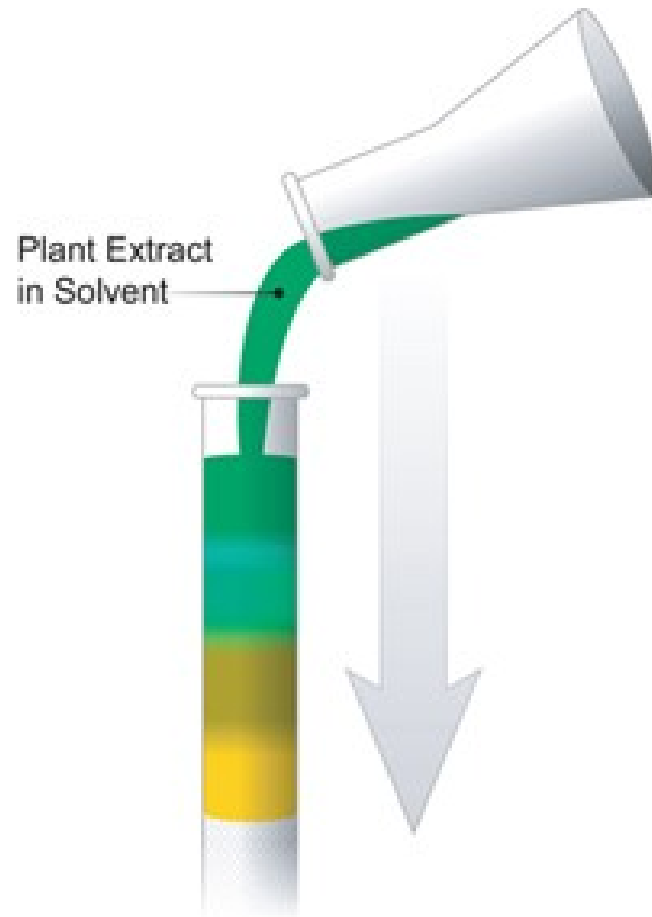
Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)



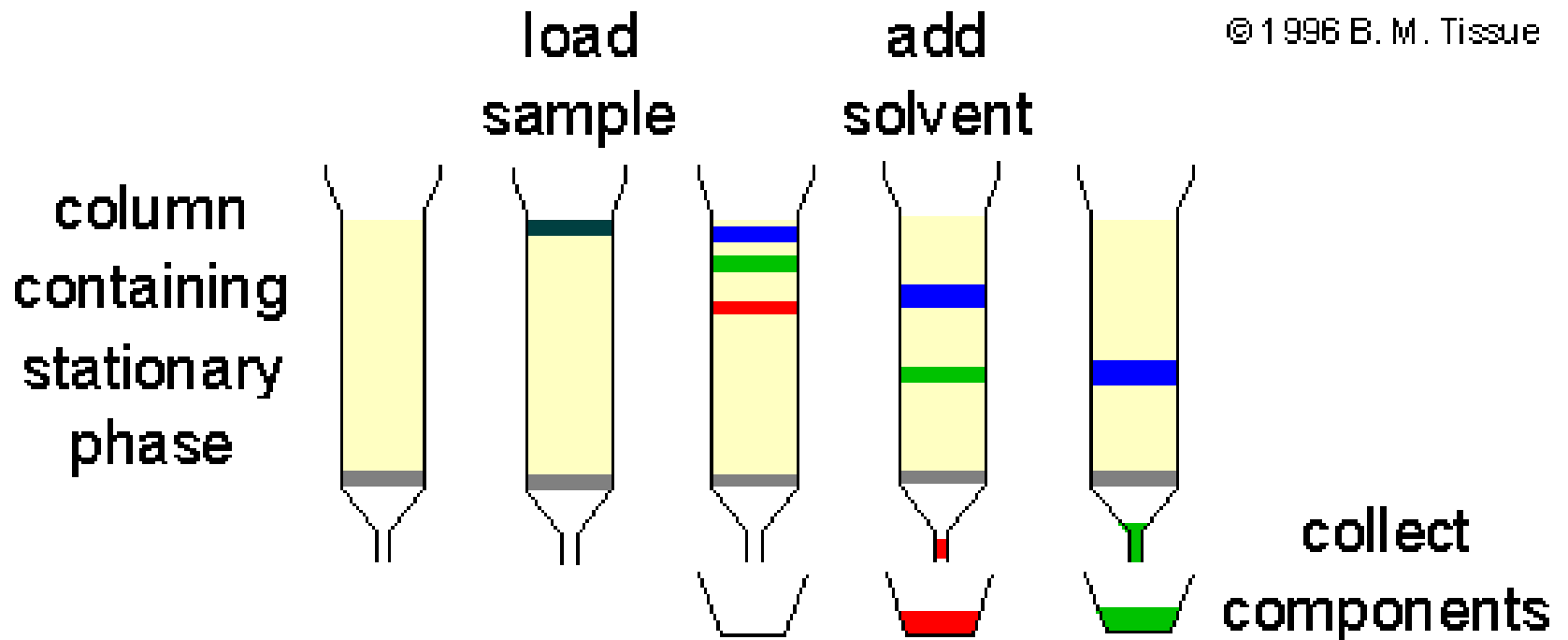
Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) + βιοδοκιμή



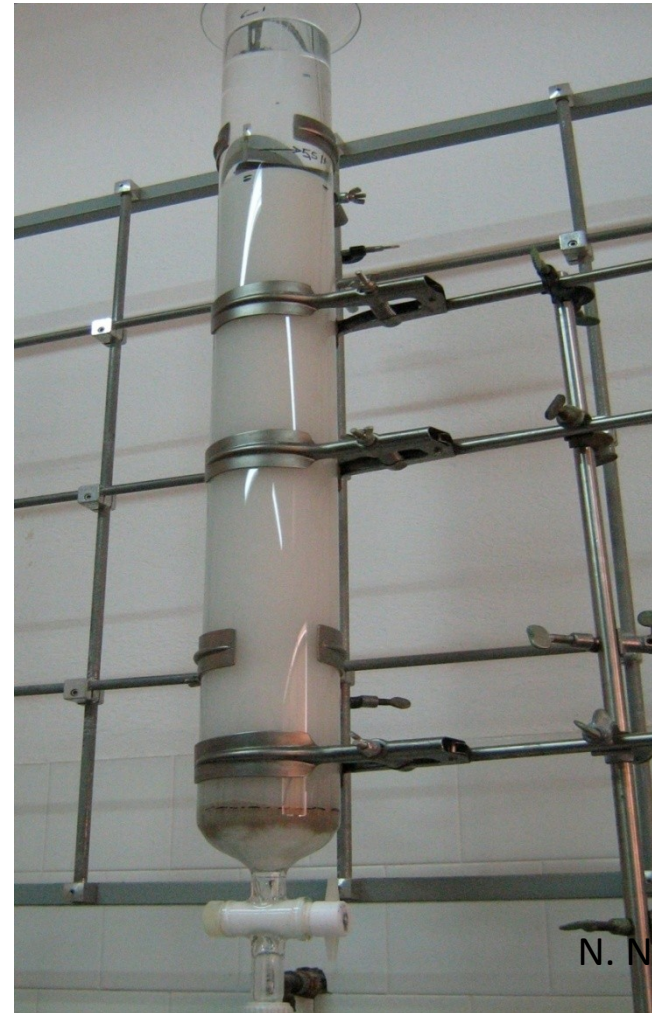
Χρωματογραφία στήλης (1)



Χρωματογραφία στήλης (2)



Χρωματογραφία στήλης (3)



N. Ντάλη, 2010

Δευτερογενείς μεταβολίτες: Βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος

Τμήμα Γεωπονίας

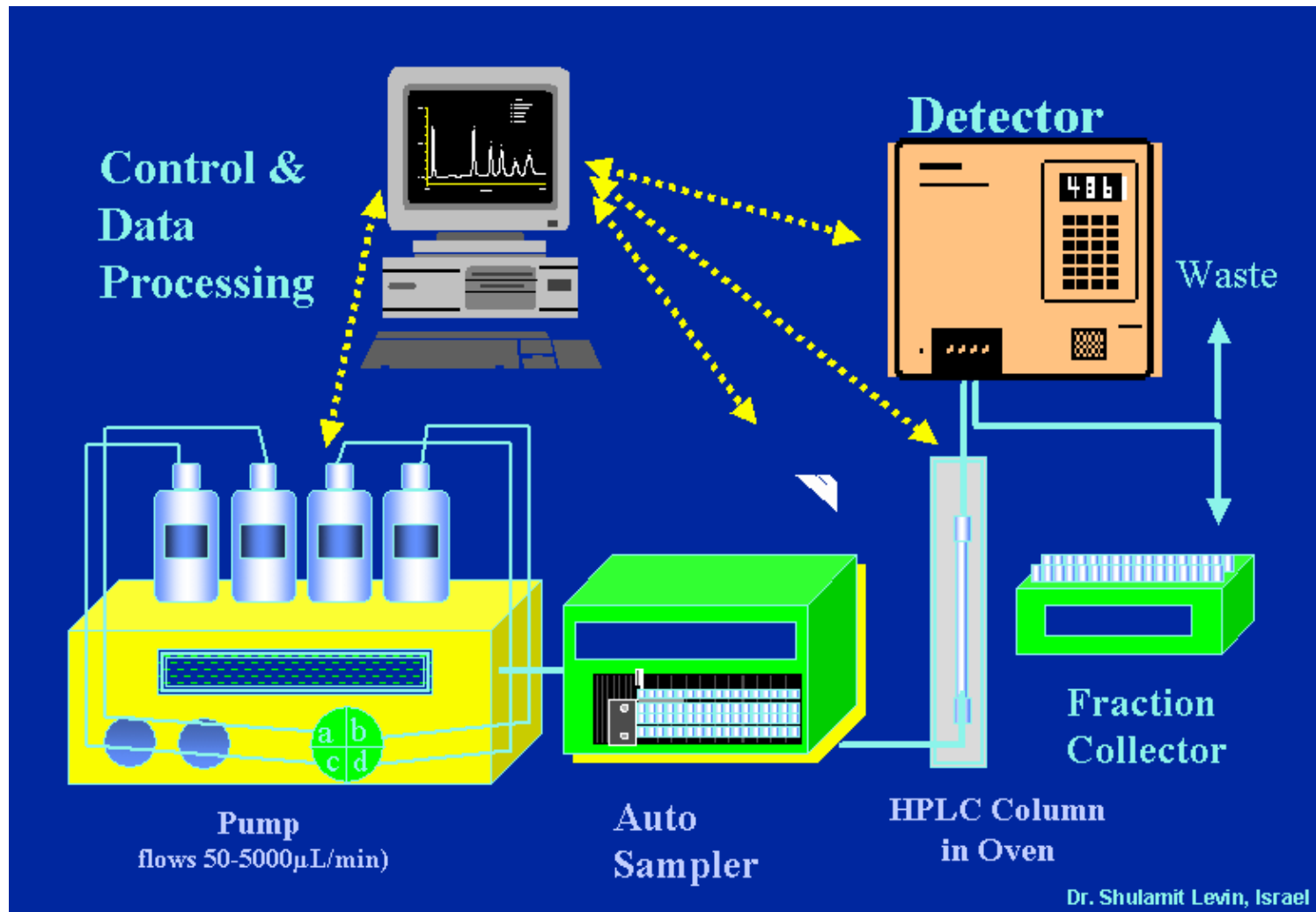




ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Σχηματική απεικόνιση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)



Dr. Shulamit Levin, Israel



Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (1)

- Η κινητή φάση είναι υγρή (συνήθως μίγμα διαλυτών) και υπό πίεση.
- Χρησιμοποιείται για περίπου 60% των αναλύσεων.
- Εφόσον τα περισσότερα φυσικά προϊόντα δεν είναι επαρκώς πτητικά για να ανιχνευτούν με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας.



Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (2)

Χρωματογραφία κανονικής φάσης (Normal Phase Chromatography):

- Στατική φάση: πολική και κινητή φάση: μη πολική.
- Λιγότερο πολικές ουσίες εκκλύονται πρώτες.

Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reverse Phase Chromatography):

- Στατική φάση: μη πολική και κινητή φάση: πολική.
- Περισσότερο πολικές ουσίες εκκλύονται πρώτες.



Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (3)

Ισοκρατική έκλυση:

- Η κινητή φάση έχει την ίδια σύνθεση καθ' όλη την πορεία της ανάλυσης.

Βαθμωτή έκλυση:

- Η σύνθεση της κινητής φάσης αλλάζει κατά την εξέλιξη της ανάλυσης, σύμφωνα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των υπό διαχωρισμό ουσιών.



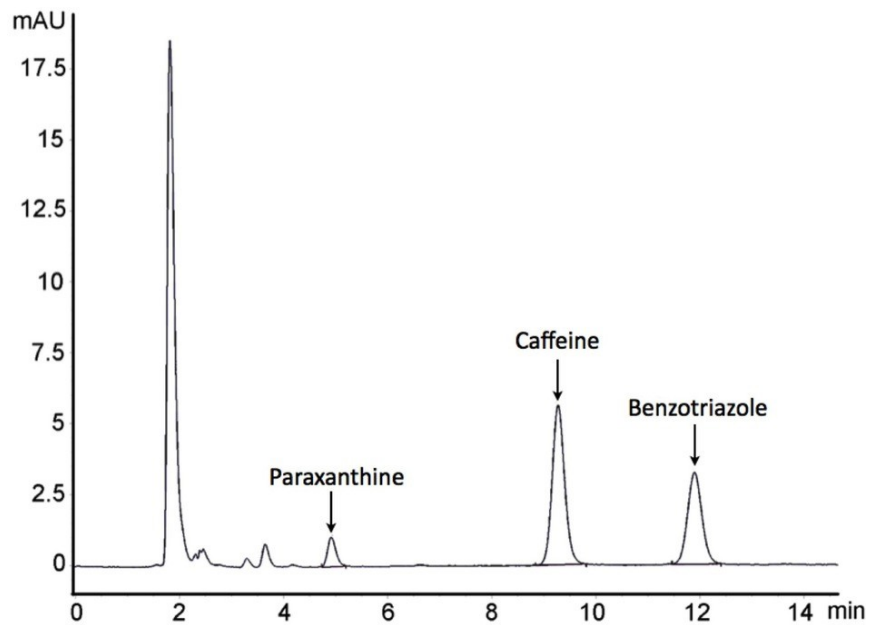
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (4)

Ανιχνευτές:

1. Φωτομετρικοί
 - Ορισμένου μήκους κύματος UV/VIS.
 - Παράταξης φωτοδιόδων UV/VIS.
2. Φθορισμού.
3. Αγωγιμότητας .
4. Διάθλασης.
5. Φασματογράφου μαζών.



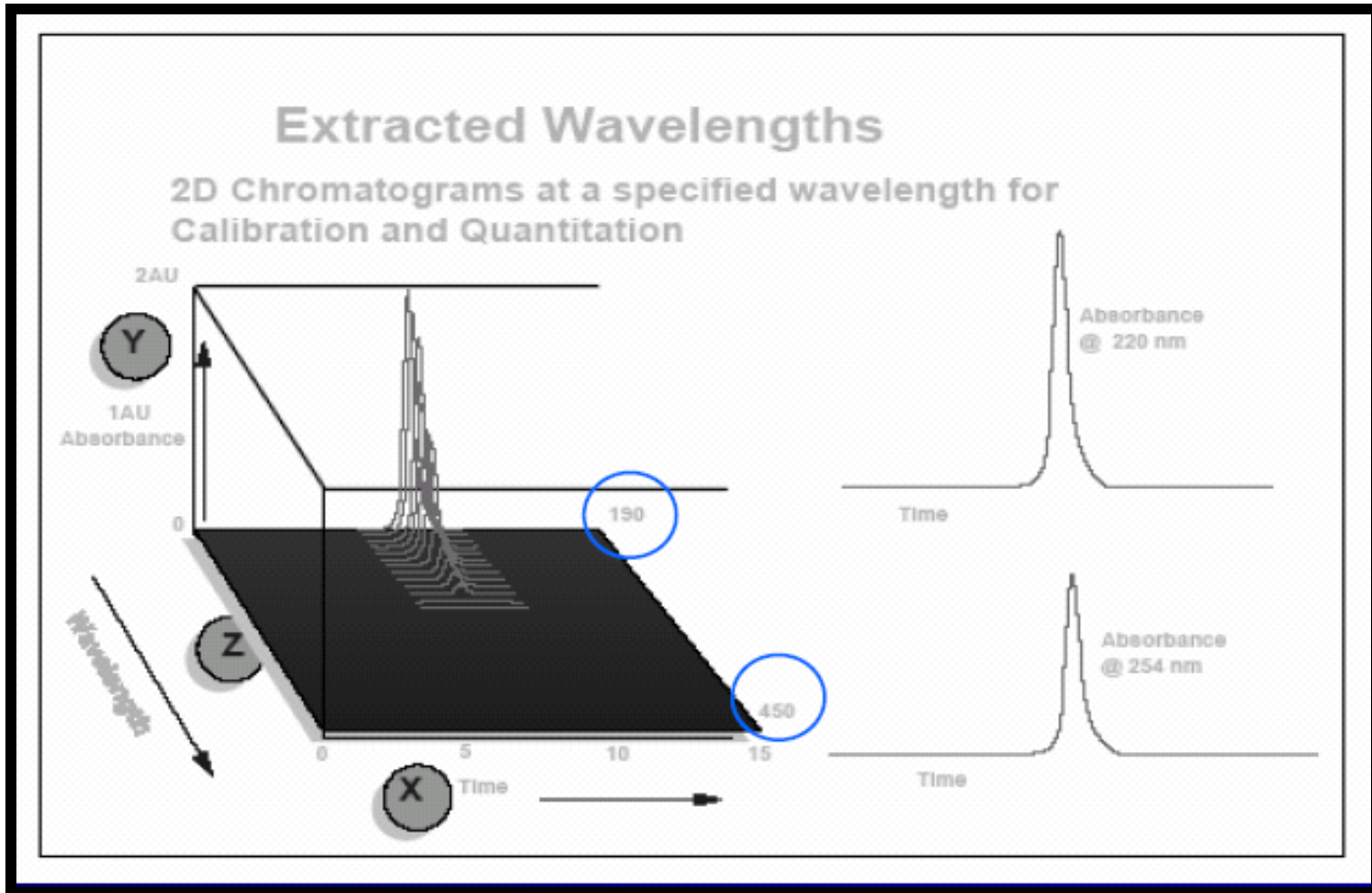
Ανιχνευτής ορισμένου μήκους κύματος (280 nm)



Trace shows distinct peaks for caffeine, paraxanthine and benzotriazole. Units are in milli Absorbance Units (mAU) at 280 nm.



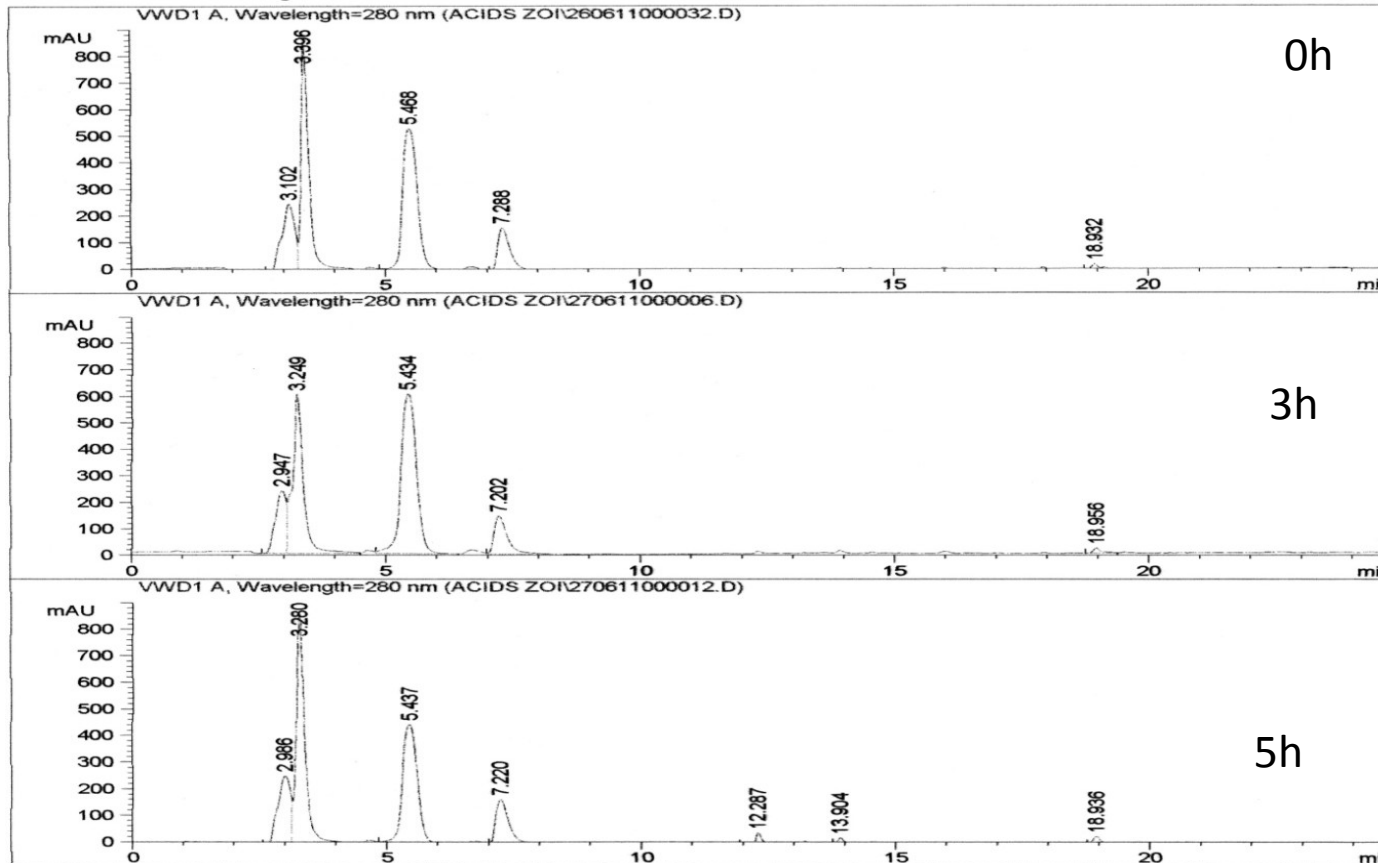
Ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων



Συσκευή αυτοδειγματοληψίας για προπαρασκευαστική υγρή χρωματογραφία



Χρωματογράφημα HPLC φαινολικών οξέων (1)



5 κορυφές

5 κορυφές

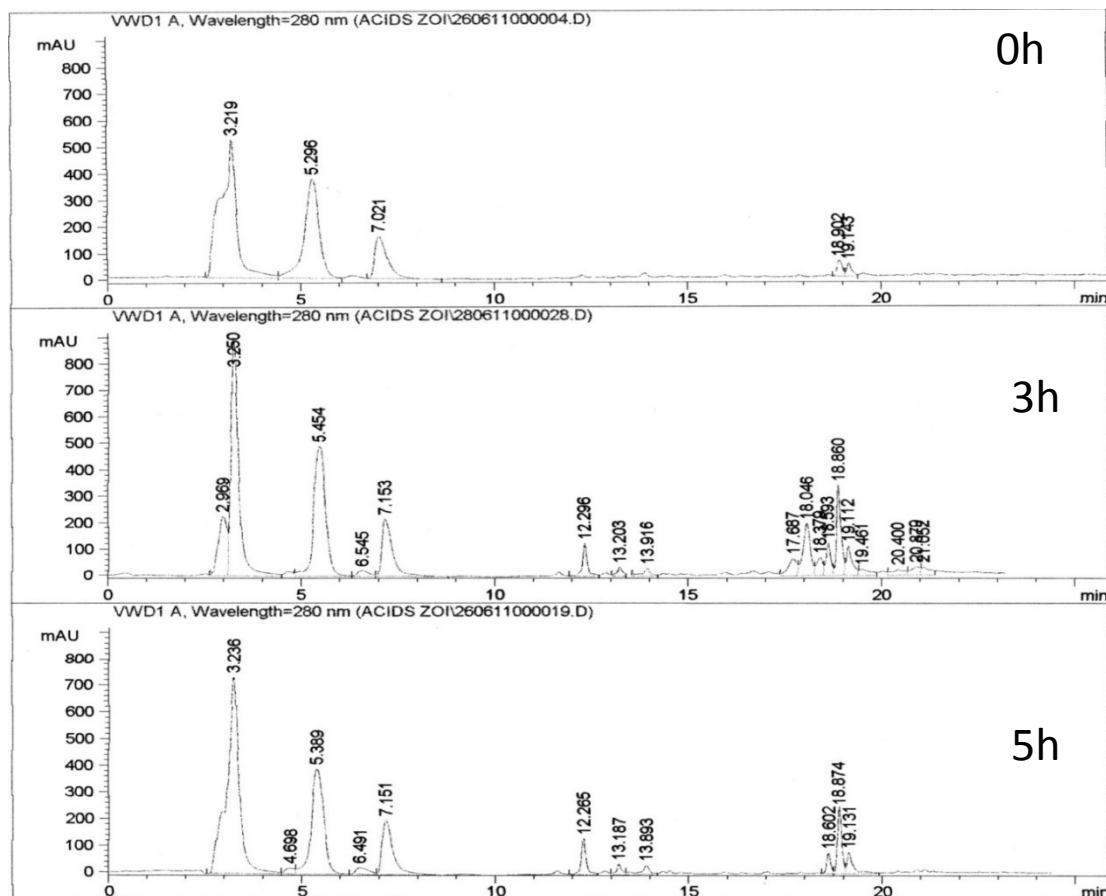
7 κορυφές

Χριστοδούλου, 2012

Χρωματογράφημα HPLC σε ιστούς σπαραγγιού εκτιθεμένων στο ηλιακό φως για 0, 3 και 5 ώρες αμέσως μετά τη συγκομιδή.



Χρωματογράφημα HPLC φαινολικών οξέων (2)



Χρωματογράφημα HPLC σε ιστούς σπαραγγιού εκτιθεμένων στο ηλιακό φως για 0, 3 και 5 ώρες, μετά από αποθήκευση 24 ωρών στο σκοτάδι.

Χριστοδούλου, 2012

Δευτερογενείς μεταβολίτες: Βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος

Τμήμα Γεωπονίας



GC-MS vs LC-MS

GC-MS

Alkylsilyl derivatives
Eicosanoids

LC-MS

Organic Acids
Organic Amines
Nucleosides
Ionic Species
Nucleotides
Polyamines



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (1/7)

- Το Έργο αυτό κάνει χρήση των ακόλουθων έργων:
- Εικόνες/Φωτογραφίες
- Εικόνα 1: Μέθοδοι εκχύλισης που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του αρώματος του καφέ. Sarrazin, et al. 2000; Food Chemistry 70: 99-106.
- Εικόνα 2: Δοκιμές ομοιότητας οσμής εκχυλισμάτων με διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης. Sarrazin, et al. 2000; Food Chemistry 70: 99-106.
- Εικόνα 3: Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από τη φυλλόσφαιρα. Α. Καραμανώλη.
- Εικόνα 4: Αλκαλοειδή λούπινου.
https://en.wikipedia.org/wiki/Lupinus_angustifolius
- Εικόνα 5: Αποστακτήριο αιθέριων ελαίων.steam-distilled essential oils



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (2/7)

- Εικόνα 6: Μονάδα απόσταξης.
<http://www.sanjivaniphytopharma.com/herbal-and-oleoresin-extraction-plants.html>
- Εικόνα 7: Οικιακό αποστακτήριο.
<https://www.pinterest.com/pin/514677063638964401/>
- Εικόνα 8: Εκχύλιση υπερκείμενης φάσης.
<http://www.plantcell.org/content/15/12/2866/F1.expansion>
- Εικόνα 9: Εργαλείο αέριας χρωματογραφίας.
<http://www.machinerylubrication.com/Read/352/gas-chromatography>



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (3/7)

- Εικόνα 10: Πληρωμένες στήλες. <http://www.drachrom.com>
- Εικόνα 11,12: Τριχοειδείς στήλες. <http://www.labchemicals.in/chromatography.asp>
- Εικόνα 13: Τυπικό σύστημα αερίου χρωματογράφου με φασματογράφο μάζας GC-MS. <http://web.uconn.edu/rusling/StuartGC.pdf>
- Εικόνα 14: Χρωματογράφημα αιθερίων ελαίων φύλλων ευκαλύπτου. Α. Καραμανώλη.
- Εικόνα 15,16: Χρωματογράφημα Φασματογράφημα συστατικού με Rt 22,81. Α. Καραμανώλη.
- Εικόνα 17: Βιβλιοθήκη NIST. Α. Καραμανώλη.



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (4/7)

- Εικόνα 18: Αλκάνιο.
[http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical Chemistry/Instrumental Analysis/Mass Spectrometry/Mass Spec/Mass Spectroscopy %3A Fragmentation Patterns](http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/Mass_Spec/Mass_Spectroscopy%3A_Fragmentation_Patterns)
- Εικόνα 19: Αλδεΐδη.
http://www.chem.arizona.edu/massspec/example_html/examples.html
- Εικόνα 20: 2-exo-hydroxy-1,8-cineole. Mitsuo Miyazawa, 2001.
- Εικόνα 21: Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου *Mentha spicata*. Α. Καραμανώλη.



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (5/7)

- Εικόνα 22: Χρωματογράφημα αλκαλοειδών καρπών λούπινου. Α. Καραμανώλη.
- Εικόνα 23: Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).
http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=zh_CN&cid=10048919
- Εικόνα 24: Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και βιοδοκιμή. Α. Καραμανώλη.
- Εικόνα 25: Χρωματογραφία στήλης.
http://www.waters.com/waters/en_GR/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?cid=10048919&locale=en_GR



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (6/7)

- Εικόνα 26: Χρωματογραφία στήλης. B.M. Tissue, 1996, <http://pt.slideshare.net/mprasadnaidu/chromatography-32911083/6?smtNoRedir=1>
- Εικόνα 27: Το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. N. Ντάλη, 2010.
- Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Dr. Sulamit Levin, Israel <http://www.forumsci.co.il/HPLC/modes/modes1.htm>
- Εικόνα 29: Ανιχνευτής ορισμένου μήκους κύματος. http://www.nature.com/neuro/journal/v17/n2/fig_tab/nn.3623_SF1.html



Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (7/7)

- Εικόνα 30: Ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων.
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/950216.pdf>
- Εικόνα 31: Συσκευή αυτοδειγματοληψίας για προπαρασκευαστική υγρή χρωματογραφία. <http://brc.boisestate.edu/dna-and-protein-isolation-and-characterization/>
- Εικόνα 32: Χρωματογράφημα HPLC σε ιστούς σπαραγγιού εκτιθεμένων στο ηλιακό φως για 0, 3 και 5 ώρες αμέσως μετά τη συγκομιδή. Χριστοδούλου, 2012.
- Εικόνα 33: Χρωματογράφημα HPLC σε ιστούς σπαραγγιού εκτιθεμένων στο ηλιακό φως για 0, 3 και 5 ώρες, μετά από αποθήκευση 24 ωρών στο σκοτάδι. Χριστοδούλου, 2012.



Σημείωμα Αναφοράς

- Copyright Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Αικατερίνη Καραμανώλη. «Δευτερογενείς μεταβολίτες: βιοσυνθετικές οδοί και βιολογικός ρόλος. Χημική ανάλυση δευτερογενών μεταβολιτών». Έκδοση: 1.0. Θεσσαλονίκη 2014. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <https://opencourses.auth.gr/courses/OCRS510/>



Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά - Παρόμοια Διανομή [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

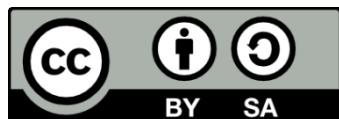
[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>





Τέλος ενότητας

Επεξεργασία: Χρυσάνθη Χαρατσάρη
Θεσσαλονίκη, Εαρινό εξάμηνο 2013-2014



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Σημειώματα

Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει)

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.

