임상 화학(Clinical Chemistry)

Lecture 2. Lipids, Lipoproteins-2

Prof. Choi Jeong Su
E-mail : guesschjs@korea.ac.kr
H.P : 010-6314-3910

Lecture 2. Lipids, Lipoproteins-2

■ 중성지방(Triglyceride)

1)3가 Alcohol의 Glycerol 1분자와 3분자의 Fatty acid의 Ester 결합으로 이루어진 지질

2)혈청이 뿌옇게 되는 원인 인자

3)중성지방 (Neutral Lipid)은 Monoglyceride , Diglyceride , Triglyceride의 총칭.
그러나 혈청 중에는 90~95%가 Triglyceride로 존재하기 때문에 통상 Triglyceride와 중성지방은 같은 의미로 사용된다

4) 정상치 (성인 공복시) : 50 - 150 mg/dl

5) 동맥경화, 관상동맥경화, 죽상 경화증과 관련

Lecture 2. Lipids, Lipoproteins-2

■ 지방산 (Fatty acid)

1) 화학식은 R-COOH를 가진 가장 단순한 형태의 지질.
2) 지방산들은 에너지원으로 사용될 수 있으며 주로 중성지방의 형태로 저장
3) 포화지방산은 이중결합이 없는 알킬기 사슬을 가진다.
4) 단일불포화지방산은 하나의 이중결합이 있고 다중불포화지방산은 한 개 이상의 이중결합을 가진다.
5) 체내에서 대부분의 지방산은 합성할 수 있으나 리놀렌과 리놀렌산은 필수지방산이라 하여 직접 섭취해야한다.

■ 콜레스테롤 (Cholesterol)

1) 인체는 하루에 약 0.5 ~ 1.0g의 Cholesterol을 합성, 가장 많은 양을 간에서 합성

2) 생물막을 구성, 담즙산염 (Bile Salt)과 Steroid Hormone 합성에 필요한 전구체

3) 뇌에 다량 함유하고 있으며 간에서 담즙관을 거쳐 배설

4) Total Cholesterol = Free Cholesterol (30%) + Ester Cholesterol (70%)

5) 지방산과 콜레스테롤은 LCAT(lecithin cholesterol acyltransferase) 작용-->Ester결합

6) 주로 내인성 경로(간의 합성)으로 조절된다.

7) 정상치

- Total Cholesterol : 150 ~ 250㎎/㎗
- Free Cholesterol : 50 ~ 80㎎/㎗
- Ester Cholesterol : 80 ~ 170㎎/㎗
- Ester Ratio : 65 ~ 80% 간실질 장애의 지표가 된다, LCAT 합성 저하

8) 노인성 질환, 동맥경화, 관상동맥성 심질환등과 관련

Lecture 2. Lipids, Lipoproteins-2

■ 인지질 (Phospholipid)

1) 인지질은 세포막을 구성하고, 지방의 유화 및 흡수, 혈액응고, 산염기 평형, Cholin 대사에 관여한다. * Cholin : 지질 안정화 대사에 중요한 역할을 한다.

2) 혈청 인지질은 지질대사 이상으로 증감하나 Cholesterol과 평행해서 변동하는 경우가 많고 Cholesterol 측정에 많이 이용된다.

3) 인지질은 Cholesterol 농도와 비례하여 변화한다.

* Cholesterol X 1.1 = Phospholipid

4) 주요구성성분
- Cephalin : 5%
- Lecithin : 60 ~ 70%
- Sphingomyelin : 20%
- Lysolecithin : 5 ~ 10%

5) 인지질 합성장소 : 간 (일부는 장점막에서 합성된다.)

6) 정상치 : 150 ~ 250㎎/㎗

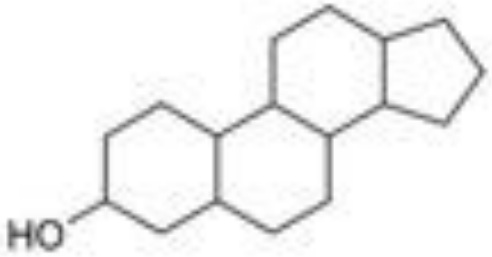
7) 폐쇄성 황달의 경우 Lecithin 증가로 수치가 증가한다

Lecture 2. Lipids, Lipoproteins-2

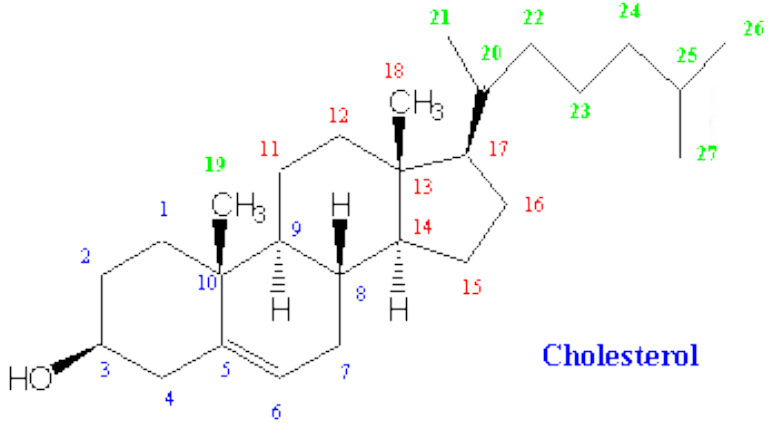
■ 지질(Lipids)

1) 물에는 안 녹으며 Alcohol , Ether , Acetone 같은 유기용매에 용해되는 생물학적으로 중요한 유기화합물
2) 생물의 구성성분 존재하거나 생물체에 에너지로 이용될 수 있는 것
3) 지질들은 체내에서 단백질과 결합 (Lipoprotein) 되어야 운반이 가능하다
4) 혈중의 지질은 단백질과 결합되어 있어서 수용성 지질이며 수화성이 있다
5) 혈중의 지질을 추출할 때는 탈수성 Acetone, Methanol, Ethanol등이 쓰인다
6) 지질은 혈중에 Lipoprotein의 상태로 존재하므로 Lipid를 전기영동 한다는 것은 Lipoprotein(VLDL, LDL, HDL)을 전기영동 한다는 것과 동일
7) 공복일 때 정상인 혈청 중에는 일반적으로 VLDL, LDL, HDL의 3종류 리포단백이 존재하며 식후에는 Chylomicron (CM)이 증가한다.

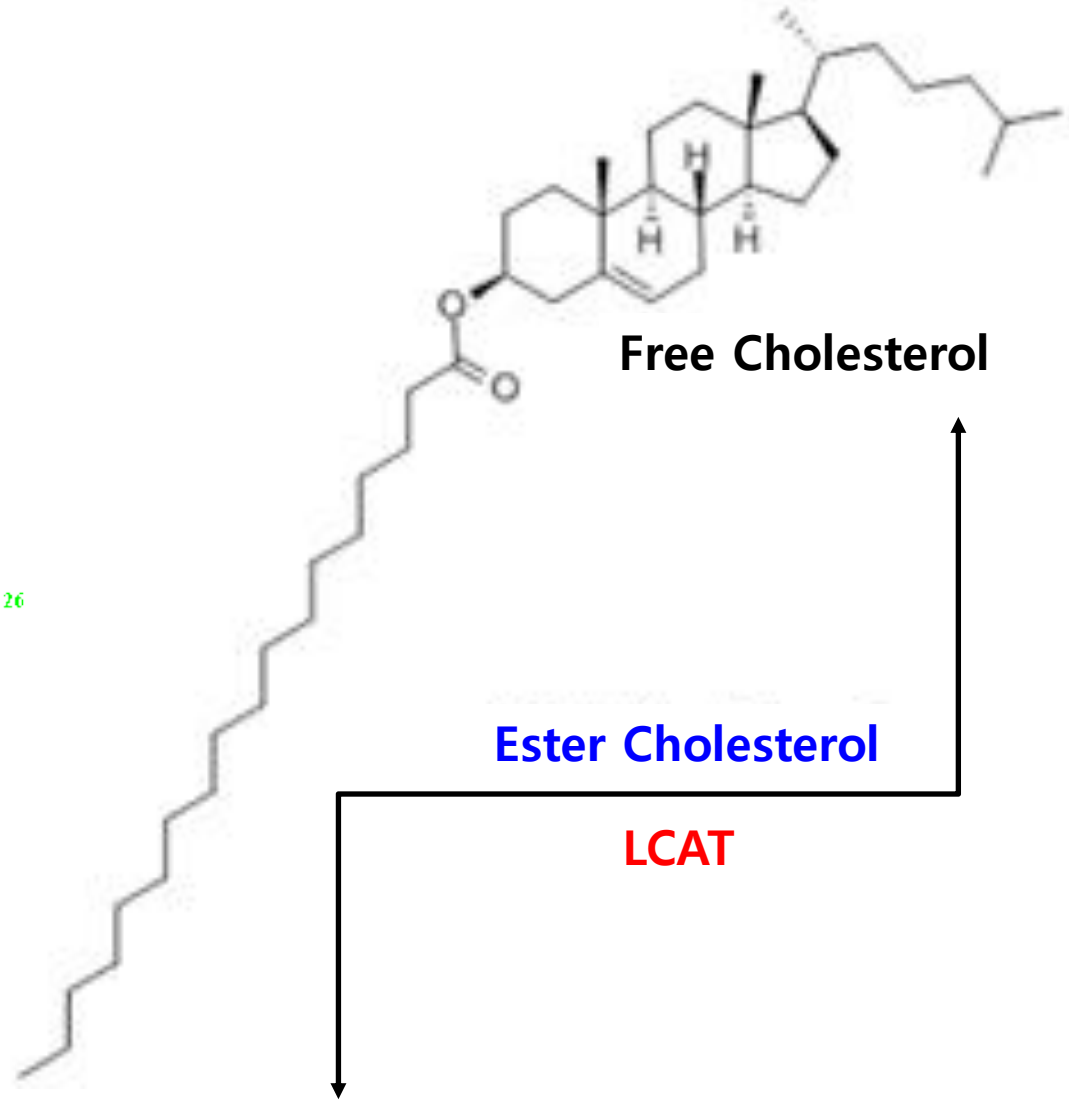
■ 콜레스테롤 (Cholesterol) 구조



Sterol



Cholesterol



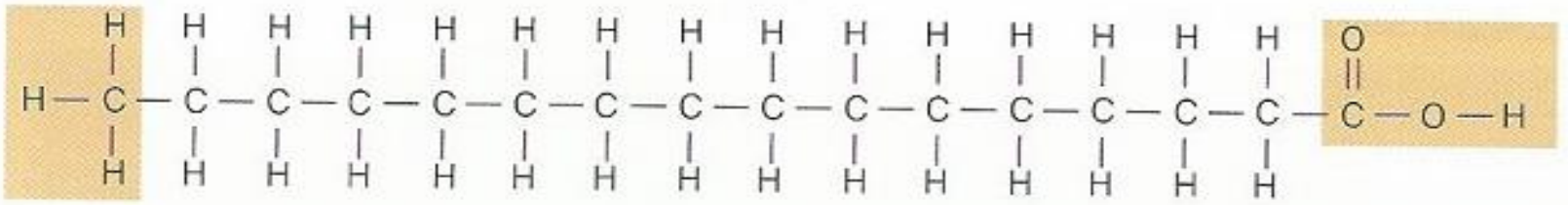
Free Cholesterol

Ester Cholesterol

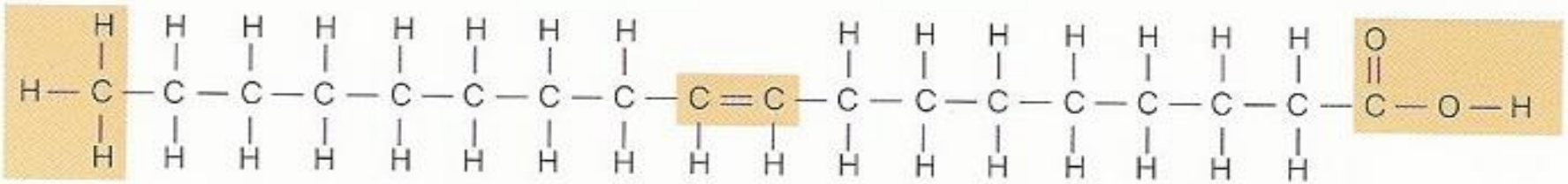
LCAT

Fatty acid

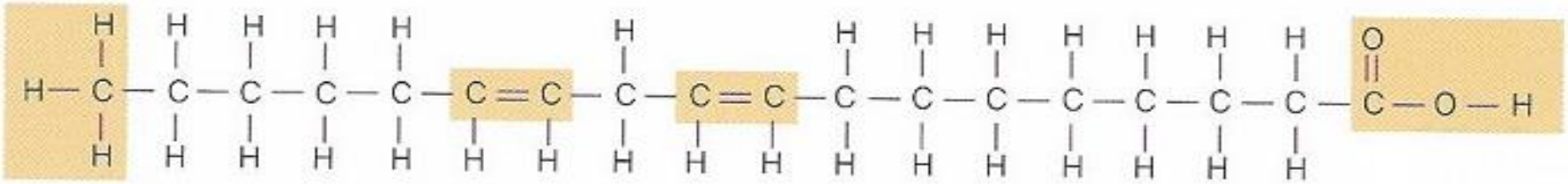
■ 지방산 (Fatty acid) 구조



(a) 포화지방산(팔미틴산, C16 : 0)

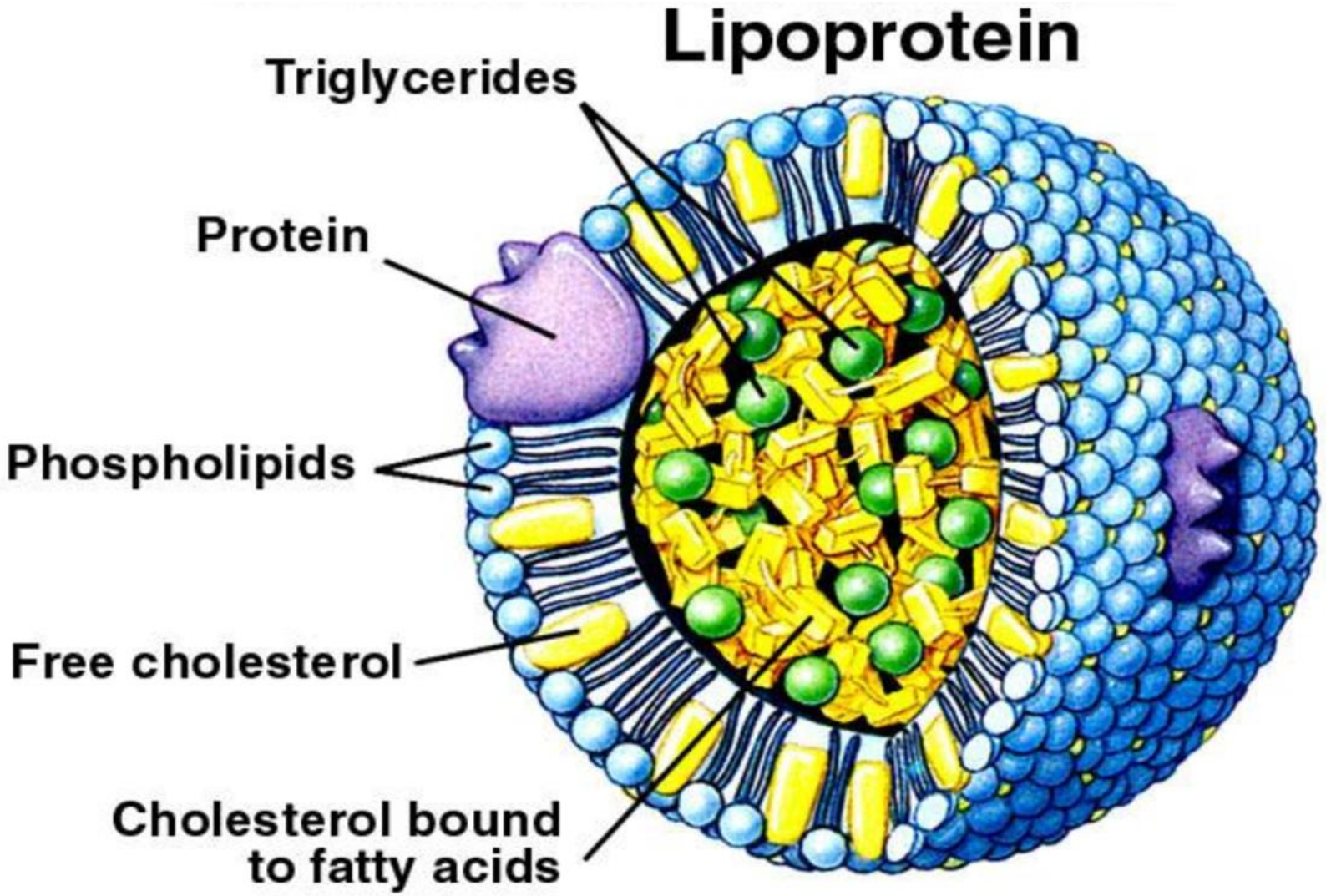


(b) 단일 불포화지방산(올레산, C18 : $1\Delta^{9}$, ω−9)



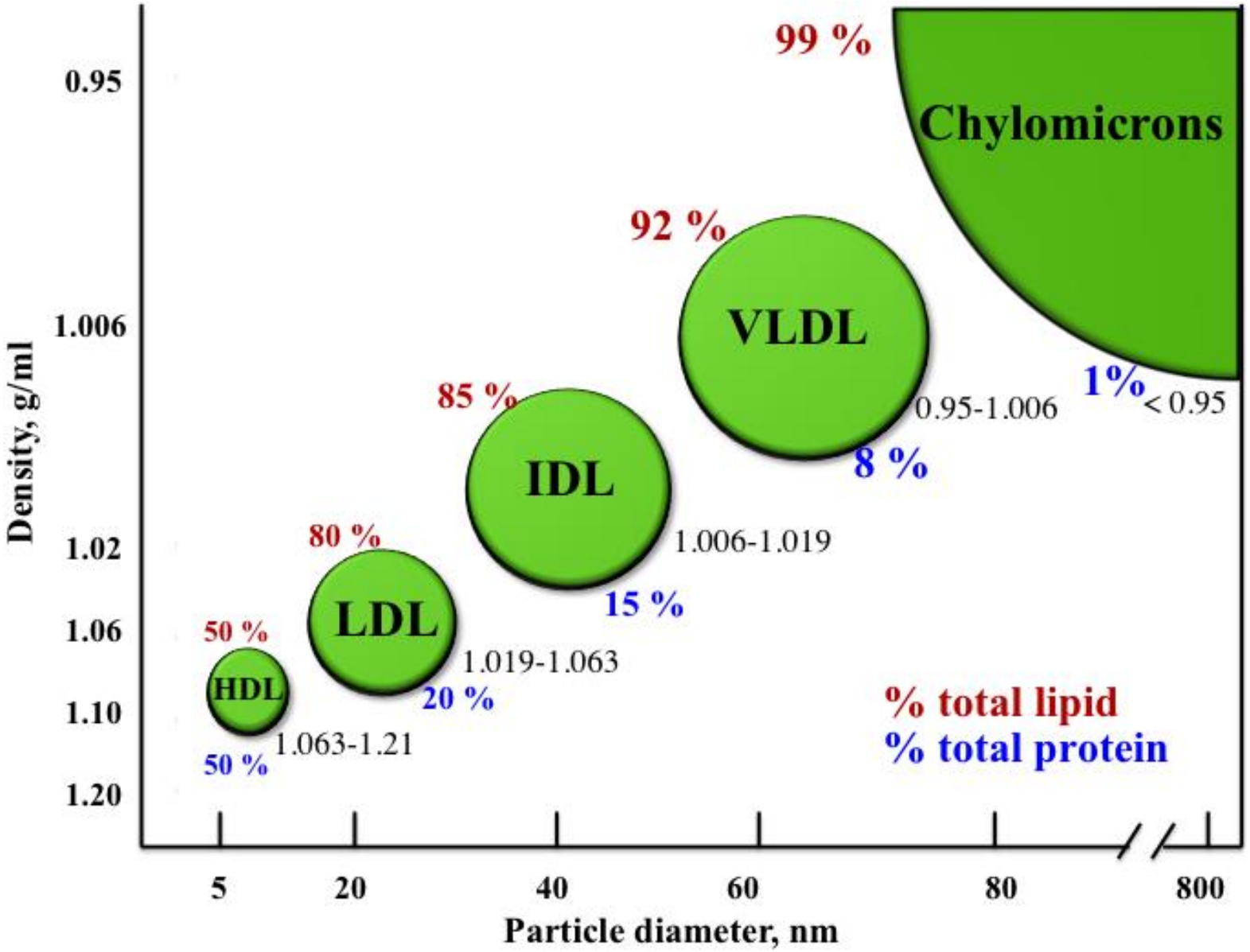
(c) 다가 불포화지방산(리놀레산, C18 : $2\Delta^{9,12}$, ω−6)

■ 지질단백질(Lipoprotein)의 구조



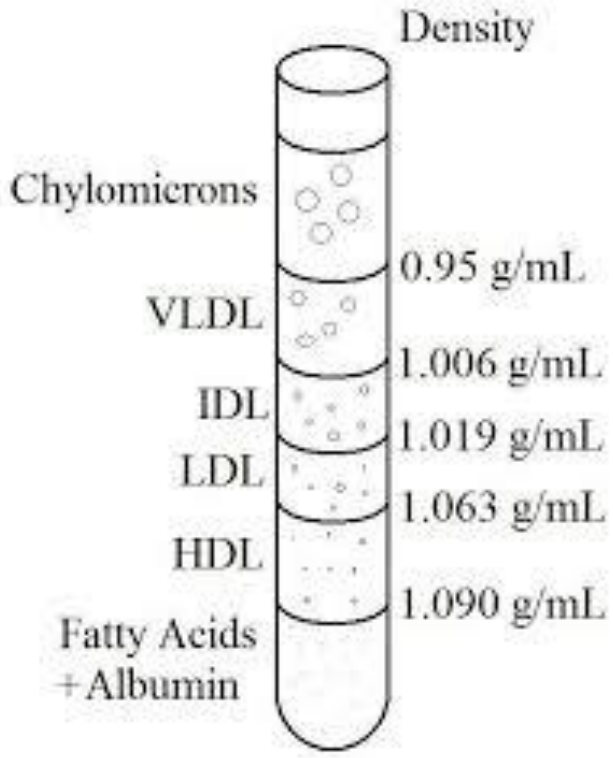
- 표면은 극성(친수성, 물에 녹음), 내부는 비극성(소수성, 물에 녹지않음)

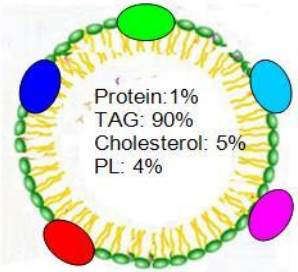
■ 지질단백질(Lipoprotein)의 분류



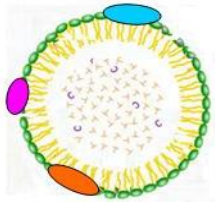
Lecture 2. Lipids, Lipoproteins-2

■ 지질단백질(Lipoprotein)의 분리

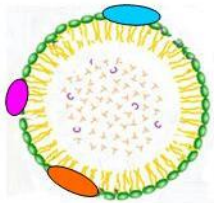




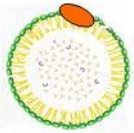
Lipoprotein type: Chylomicron
Density: <0.950 g/mL
Diameter: 80-1000 nm
Major lipids: dietary triacylglycerols
Apolipoproteins: B48, A1, A2, C, E



Lipoprotein type: VLDL
Density: 0.950-1.006 g/mL
Diameter: 30-80 nm
Major lipids: endogenous triacylglycerols
Apolipoproteins: B100, C, E



Lipoprotein type: IDL
Density: 1.006-1.019 g/mL
Diameter: 25-30 nm
Major lipids: endogenous triacylglycerols and cholesterol
Apolipoproteins: B100, C, E

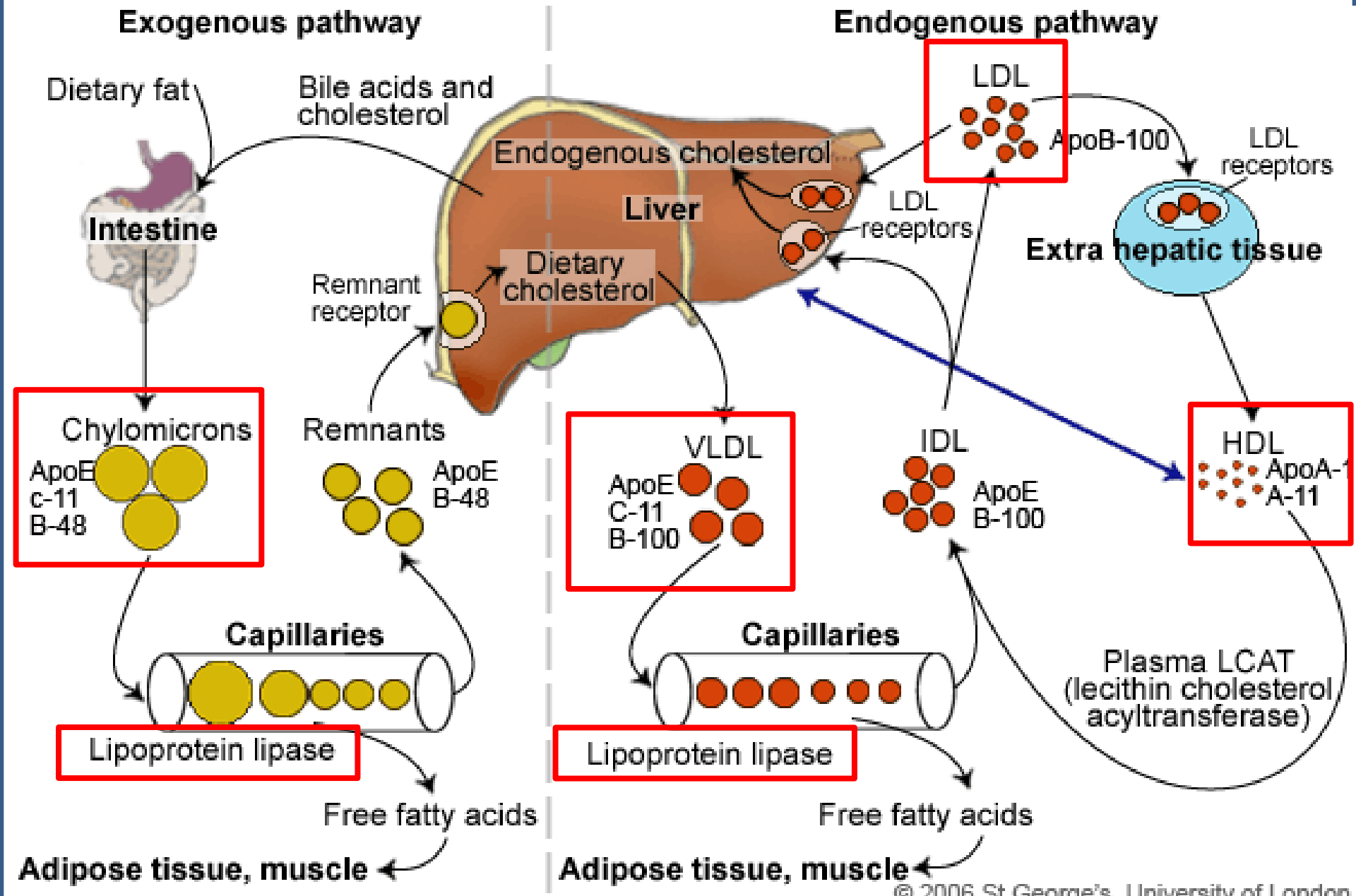


Lipoprotein type: LDL
Density: 1.019-1.063 g/mL
Diameter: 20-22 nm
Major lipids: cholesterol and cholesteryl ester
Apolipoproteins: B100



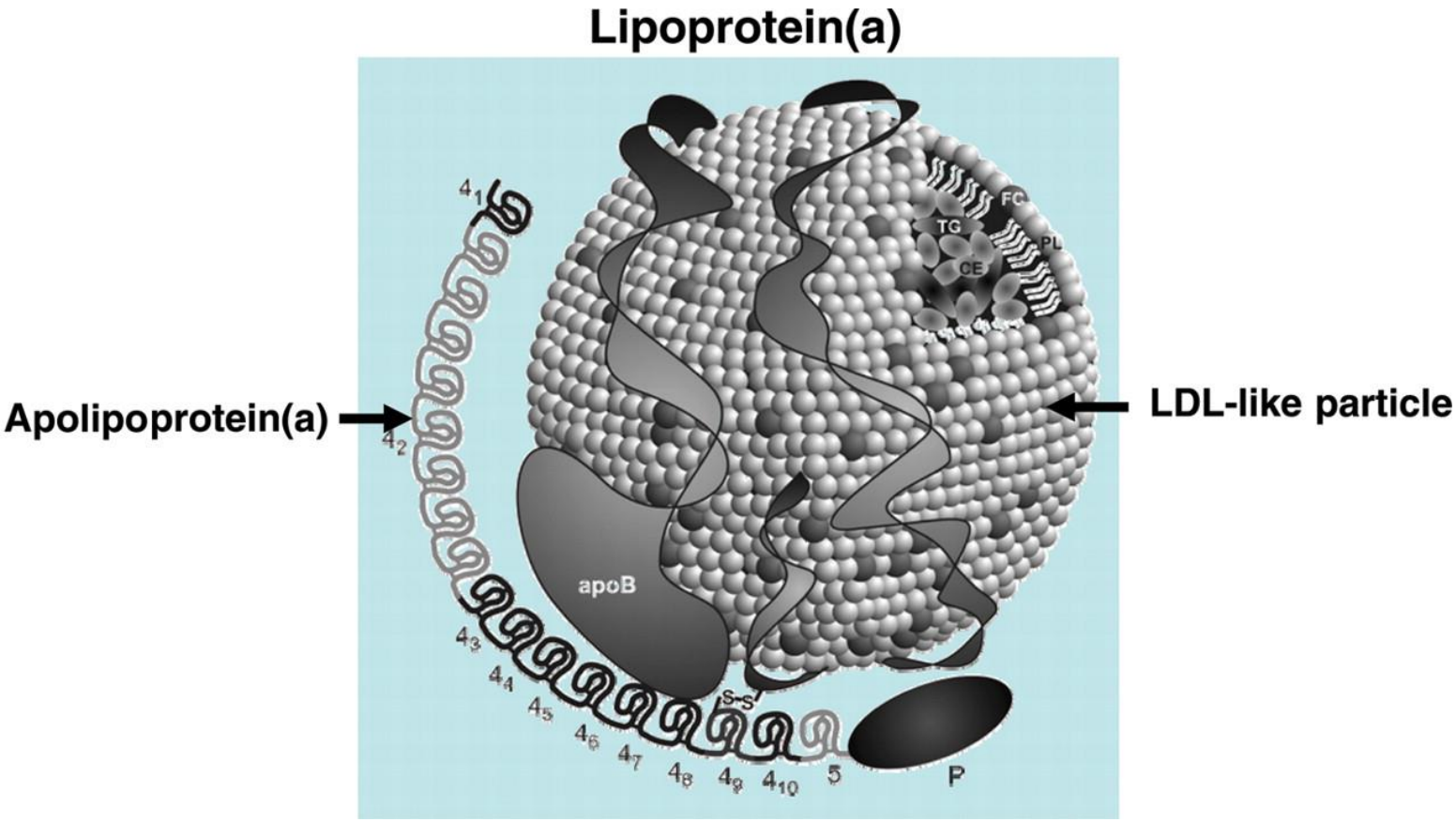
Lipoprotein type: HDL
Density: 1.063-1.090 g/mL
Diameter: 9-15 nm
Major lipids: cholesteryl ester and phospholipid
Apolipoproteins: A1, A2, C, E

Lecture 2. Lipids, Lipoproteins-2



© 2006 St George's, University of London

■ 기타 지질단백 - Lipoprotein(a)



- 비중은 HDL_2에 가깝지만 입자크기는 LDL과 비슷한(약간 큼) Lipoprotein
- apo(a) 라는 특이 아포지단백을 포함하고 있는 것이 특징
- 플라스미노겐과 유사한 구조를 하고 있어 섬유소와 경쟁적으로 결합하여 혈전용해를 억제하여 관상동맥질환의 위험을 높인다.

Lecture 2. Lipids, Lipoproteins-2

■ 총지질 (Total lipid) 측정

- 혈중 지질의 총량
- Total lipid = Triglyceride + Cholesterol + Phospholipid + Free fatty acid
- 정상치 : 400 ~ 800 mg/dl
- 측정법

1) Sulfophosphovanillin 법 (SPV법)

Serum + H_2SO_4 + H_3PO_4 + Vanillin ---------> complex (Pink)

표준액 : Olive oil

2) Kunkel 법

Lipid + Phenol --------> 혼탁정도 측정

3) Bragdon 법

Folch 지질 추출액 (chloroform : methanol = 2:1) 사용

중크롬산칼리를 발색제로 사용하여 종말색은 녹색

■ 중성지방(Triglyceride) 측정

1) 화학적인 방법 : 조작이 복잡하고 정량법으로 문제가 있기 때문에 현재 사용 X

- 추출 : Serum + 추출제 + Zeolite + $Cu(OH)_2$ → TG
- 추출제 : 혈청으로부터 TG 추출 : Chloroform, Isoprophyl alcohol
- Zeolite : 인지질 흡착
- $Cu(OH)_2$, $CuSO_4$, Al_2SiO_3: 당흡착
- 검화 : T.G + KOH ----------→ Glycerol
- 산화 : Glycerol + $2NaIO_4$ ----------→ Formaldehyde
- 발색 : 발색시약으로 산화에 의해 생성된 Formaldehyde를 비색정량
  - a) Van handel 반응 : 발색시약 Chromic acid (청자색, 570nm)
  - b) Hanztsch 반응 : 발색시약 Acetylacetone (황색, 410nm)

■ 중성지방(Triglyceride) 측정

2) 효소법 : 현재 널리 사용되고 있는 방법

- Serum(Free Glycerol) + ATP ---Glycerol Kinase(GK)---→ G-3-P + ADP
- G-3-P + O_2 ---G-3-P Oxidase(G3OD)---→ H_2O_2 + dihydroxyacetonephosphate(DAP)
- $2H_2O_2$ ---Catalase---> $2H_2O$ + O_2 : 혈장 내에 존재하는 내인성 F.G 제거
- TG + H_2O ---LipoProteinLipase(LPL)---→ Glycerol + Fatty acid
- Glycerol + ATP ---Glycerol Kinase(GK)---→ G-3-P + ADP
- G-3-P + O_2 ---G-3-P Oxidase(G3OD)---→ H_2O_2 + dihydroxyacetonephosphate(DAP)
- H_2O_2 + 4-AAP + Phenol ---Peroxidase---→ Quinone (Red, 550nm)

■ 중성지방(Triglyceride) 측정

3) UV법 : 효소법 응용

- TG + H_2O ---LipoProteinLipase(LPL)---→ Glycerol + Fatty acid

- Glycerol + ATP ---Glycerol Kinase(GK)---→ G-3-P + ADP

- ADP + Phosphoenolpyruvate(PEP) ---Pyruvate Kinase(PK)---> Pyruvate

- Pyruvate + NADH + H^+ ---Lactate Dehydrogenase(LDH)---> Lactate + NAD (340nm)

- 340nm에서 감소한 NADH양을 측정

■ 콜레스테롤 (Cholesterol) 측정

1) 화학적인 방법

a) 1 단계 : 혈청 + 발색

- 신속하다는 것 외에는 별로 해결된 점이 없다

b) 2 단계 : 혈청 + 추출 + 발색 (Lieberman-Burchard법)

- 단백질이나 그 외 유사반응 물질은 제거 되었으나, 정제된 것은 아니다.

c) 3 단계 : 혈청 + 추출 + 감화 + 발색 (Abell-kendall법)

- 모두 유리형으로 전환시켜 발색의 차이를 극복하였다.

d) 4 단계 : 혈청 + 추출 + 감화 + Digitonin + 발색 (Sperry법)

- 반응간섭물질 완전배제

■ 콜레스테롤 (Cholesterol) 측정

1) 화학적인 방법

a) Lieberman-Burchard법 (2단계)

- 추출 : Serum + 추출시약 ----------> Cholesterol 추출
- 추출시약 (Bloor solution) : Ethanol : Ether = 3 : 1
- 발색 : Cholesterol + H_2SO_4 + 빙초산 + 무수초산(발색시약) ---> 청록색 (620nm)
- Ester형과 Free형 간의 발색차이에 의한 문제점

b) Abell kendall법 (3단계)

- 추출 : Serum + Alcohol(추출시약) ------→ Cholesterol
- 감화 : Cholesterol(Free + Ester) + KOH -----→ Free Cholesterol
- 발색 (Lieberman-Burchard 반응 이용)
  Free Cholesterol + H_2SO_4 + 빙초산 + 무수초산 ----→ 청록색 (620nm)
- 감화를 통해 Ester형과 Free형 간의 발색차이에 의한 문제점 해결

■ 콜레스테롤 (Cholesterol) 측정

1) 화학적인 방법

c) Sperry법 (4단계)

- 추출 : Serum + Alcohol(추출시약) ------→ Cholesterol
- 감화 : Cholesterol(Free + Ester) + KOH -----→ Free Cholesterol
- 침전 : Digitonin을 추가하여 Free cholesterol을 침전시킨다
- 발색 (Lieberman-Burchard 반응 이용)
  Ester Cholesterol + H_2SO_4 + 빙초산 + 무수초산 ----→ 청록색 (620nm)

d) Killiani법

- 발색 : Cholesterol + H_2SO_4 + 빙초산 + $FeCl_3$ --------> 적갈색 (560nm)

■ 콜레스테롤 (Cholesterol) 측정

2) 효소법

- Ester Cholesterol + H_2O ---(Cholesterol esterase)---> Free cholesterol + Fatty acid
- Free Cholesterol + H_2O + O_2 ---(Cholesterol Oxidase)---> Cholest-4-en-3-one + H_2O_2
- H_2O_2 + 4AAP + Phenol ---(Peroxidase)---> Quinone (Red, 520nm)
- Cholesterol Esterase를 첨가하지 않으면 Free Cholesterol만 측정된다

3) UV법 : 효소법 응용

- Ester Cholesterol + H_2O ---(Cholesterol esterase)---> Free cholesterol + Fatty acid
- Free Cholesterol + NAD^+ ---(CDH)---> Cholest-4-en-3-one + NADH + H^+
- 340nm에서 흡광도 측정

■ 기타지방질 측정

2) HDL-Cholesterol (유리지방산)

- HDL중 포함되어 있는 Cholesterol을 의미
- HDL은 혈관이나 말초조직에 축적된 유리형 Cholesterol을 HDL-Cholesterol 형태로 받아드려 간으로 운반, LDL의 세포내로 축적 방지하여 항동맥경화 작용을 한다.
- 운동시 LDL이 HDL로 변화한다.
- 초원심분리법
- 침전법 : ApoB를 포함하는 지질단백 [CM, VLDL, IDL, LDL, Lp(a)] 을 침전시켜 상층에 남은 HDL을 가지고 효소법으로 Cholesterol 측정
  - a) Heparin-Mn법
  - b) Dextran-$MgSO_4$법