

Laboratorium z biochemii

DLA STUDENTÓW BIOLOGII, BIOTECHNOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA

Praca zbiorowa pod redakcją *Antoniego Polanowskiego*
Poprawki do wydania III wprowadzone pod redakcją
Justyny Ciuraszkiwicz i Elżbiety Gocek

8. Lipidy

Autorzy: Jerzy Gubernator, Arkadiusz Kozubek, Franciszek Tłuszcik (ed. Justyna Ciuraszkiwicz)

8.1	Charakterystyka niektórych olejów roślinnych	5
8.2	Ekstrakcja lipidów	5
8.3	Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)	7
8.3.1	Detekcja lipidów w chromatografii cienkowarstwowej	8
8.3.2	Identyfikacja rozdzielanych związków	10
8.4	Ekstrakcja i analiza lipidów z materiału biologicznego	11
8.4.1	Ekstrakcja surowych lipidów z jaja	11
8.4.2	Izolacja i oczyszczanie lecytyny z żółtek jaj kurzych	11
8.4.3	Ekstrakcja lipidów z materiału roślinnego	13
8.4.3.1	Ekstrakcja lipidów z liści rzodkiewki	13
8.4.3.2	Przygotowanie ekstraktu z wysuszonych i sproszkowanych korzeni marchwi	14
8.5	Metody identyfikacji lipidów w chromatografach	15
8.5.1	Detekcja nieswoista lipidów w chromatogramach po TLC	15
8.5.2	Detekcja swoista lipidów w chromatogramach po TLC	15
8.5.2.1	Detekcja fosforu fosfolipidów	15
8.5.2.2	Detekcja grup aminowych w lipidach	15
8.5.2.3	Detekcja grup cholinowych lipidów	16
8.5.2.4	Detekcja reszt cukrowych glikolipidów	16
8.5.2.5	Detekcja reszt kwasu sjałowego gangliozydów	17
8.5.2.6	Detekcja sterydów i ich estrów	17
8.5.2.7	Detekcja lipidów i związków fenolowych	17
8.5.2.8	Detekcja lipidów rezorcynolowych	18
8.6	Kolorymetryczne metody oznaczania lipidów	18
8.6.1	Oznaczanie cholesterolu całkowitego	18
8.6.2	Oznaczanie fosforu w fosfolipidach	19
8.6.3	Oznaczanie stężenia fosfolipidów w roztworach zawierających fosforany nieorganiczne	20
8.6.4	Oznaczanie cholesterolu całkowitego zestawem diagnostycznym stosowanym w laboratoriach medycznych	21
8.6.5	Oznaczanie lipidów całkowitych metodą wanilinową	22

Lipidy to wyjątkowo różnorodna grupa związków organicznych trudna do jednolitego zdefiniowania pod względem chemicznym. Są to związki powszechnie występujące w organizmach żywych, nierozpuszczalne lub bardzo słabo rozpuszczalne w wodzie, a dobrze rozpuszczające się w rozpuszczalnikach organicznych. Szczegółowy ich opis łącznie z podziałem na 16 klas tych związków i ich bliższa charakterystyka znajduje się w skrypcie do ćwiczeń pt. „Molekularna organizacja komórki. II. Lipidy, liposomy i błony biologiczne” pod redakcją: A. Kozubek, A.F. Sikorski, Jan Szopa. Wyd. Uniwersytet Wrocławski. 1993r.

Zasadniczo lipidy pełnią funkcje jako:

Materiał zapasowy – utlenianie 1 grama lipidu dostarcza organizmowi 9 kilokalorii, czyli, około 37 kJ energii, podczas gdy utlenienie innego materiału zapasowego organizmu, a mianowicie glikogenu, tylko 4 kcal. Glikogen występuje w organizmie w postaci silnie uwodnionej (około 65% masy glikogenu stanowi woda), w rzeczywistości więc 1 gram lipidu dostarcza organizmowi nieomal $7 \times$ więcej energii niż 1 gram glikogenu. Tłuszcz jest deponowany w cytoplazmie komórek tłuszczowych we wszystkich tkankach, jest więc rozproszony, w przeciwieństwie do glikogenu, który jest magazynowany w wątrobie.

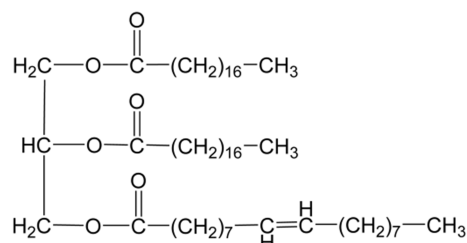
Składniki błon biologicznych – w ich budowie uczestniczą przede wszystkim fosfolipidy, glikolipidy i cholesterol.

Substancje o aktywności biologicznej – hormony kory nadnerczy (kortyzol aldosteron), hormony płciowe (testosteron, estradiol), witaminy (A, E, K, D), prostaglandyny.

Materiał ochronny – na zewnętrznych powierzchniach roślin i zwierząt, składniki ochronne ścian komórkowych wielu bakterii i komórek roślinnych.

Spośród wszystkich klas lipidów najbardziej rozpowszechnione są triacyloglicerole (tłuszcze proste, tłuszcze właściwe, tłuszcze obojętne, acyloglicerydy).

Triacyloglicerole (nazywane zwyczajowo trójglicerydami) są estrami alkoholu glicerolu i kwasów tłuszczowych o przykładowym wzorze:



Rys. 8.1. Wzór 1,2-distearoilo-3-oleilo-glicerolu

Spośród kwasów tłuszczowych, jako składnik triacylogliceroli najczęściej występują kwasy tłuszczowe z szesnasto- i osiemnastowęglowym łańcuchem, czyli odpowiednio kwas palmitynowy i stearynowy oraz jego nienasycone analogi - kwas oleinowy, linolowy i linolenowy (Tab. 8.1).

Biorąc pod uwagę liczbę atomów węgla w cząsteczce kwasu tłuszczowego, liczbę i położenie wiązań podwójnych, łańcuch prosty lub rozgałęziony, obecność innych podstawników (grupy hydroksylowe, ketonowe, epoksydowe) oraz różne kombinacje tych cech łatwo zauważyć, że ilość możliwych rodzajów kwasów tłuszczowych jest olbrzymia.

Kwasy tłuszczowe pochodzenia naturalnego mają z reguły parzystą liczbę atomów węgla.

W organizmach żywych kwasy tłuszczowe nie występują w stanie wolnym.

Uwaga! W kwasach tłuszczowych atomy węgla numerujemy od strony grupy karboksylowej. Tak, więc zapis kwas 6, 9, 12 oktadekatrienowy wskazuje, że położenie podwójnego wiązania

Tab. 8.1. Najczęściej występujące kwasy tłuszczowe. Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.

symbol	nazwa zwyczajowa	nazwa systematyczna	wzór	temp. topnienia [°C]
12:0	laurynowy	dodekanowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	44,2
14:0	mirystynowy	tetradekanowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	52
16:0	palmitynowy	heksadekanowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	63,1
18:0	stearynowy	oktadekanowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	69,6
20:0	arachidowy	eikozanowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	75,4
22:0	behenowy	dokozanowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	81
24:0	ligocerynowy	tetrakozanowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	84,2
16:1	palmitolejowy	9-heksadekenowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-0,5
18:1	oleinowy	9-oktadekenowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-13,4
18:2	linolowy	9,12-oktadekadienowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	-9
18:3	α -linolenowy	9,12,15-oktadekatrienowy	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	-17
18:3	δ -linolenowy	6,9,12-oktadekatrienowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	-
20:4	arachidonowy	5,8,11,14-eikozatetraenowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	-49,5
22:1	erukowy	13-dokozenowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	34,7

Tab. 0.1 Charakterystyka niektórych tłuszczów spożywczych

rodzaj tłuszczu	zawartość oleju w nasionach [%]	kwasy tłuszczowe nasycone [%]	oleinowy 18:1	linolowy 18:2	linolenowy 18:3	erukowy 22:1
rzepakowy	30–50	do 3	20–40	11–15	1–4	40–60
lniany	25–45	8–12	2–20	22–60	17–50	–
słonecznikowy	40–56	5–10	33–42	52–60	–	–
arachidowy	40–51	13–22	52–82	7–25	–	–
sojowy	15–26	12–15	25–35	50–60	2–6	–
olej z oliwek	do 58	9–20	69–87	4–23	–	–
smalec wieprzowy	–	34–53	41–60	1–13	–	–

znajduję się między 6 i 7, 9 i 10, 12 i 13 atomem węgla licząc jako pierwszy węgiel grupy karboksylowej.

Kwasy tłuszczowe nasycone w temperaturze pokojowej są ciałami stałymi, a kwasy nienasycone w tych warunkach są w stanie płynnym. Cecha ta jest przenoszona na triacyloglicerole. Tak więc tłuszcze roślinne (oleje) są z reguły płynne gdyż w składzie ich triacylogliceroli większy jest procentowy udział jedno- i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, niż w tłuszczach zwierzęcych (Tab. 8.2). Zarówno w materiałach roślinnych jak i zwierzęcych przynajmniej jeden z kwasów tłuszczowych w triacyloglicerolu jest prawie zawsze nienasycony. Triacyloglicerol, w składzie którego wszystkie kwasy tłuszczowe są nasycone np. tristearoiloglicerol nie jest w temp. pokojowej ciałem mazistym tak jak tłuszcze zwierzęce, ale ciałem stałym w dotyku przypominającym talk lub wysuszone mydło.

8.1. CHARAKTERYSTYKA NIEKTÓRYCH OLEJÓW ROŚLINNYCH

Olej rzepakowy – jego wyróżnikiem jest wysoka zawartość kwasu erukowego, który jest szkodliwy w żywieniu, dlatego od wielu lat prowadzi się intensywne badania nad odmianami o niskiej zawartości tego związku. Olej rzepakowy konsumpcyjny pochodzi z odmian o niskiej zawartości kwasu erukowego (zawiera około 2% kwasu erukowego – podczas gdy normalny olej rzepakowy zawiera tego kwasu 40–60%). Kwas erukowy jest szczególnie szkodliwy dla dzieci i może być przyczyną uszkodzenia mięśnia sercowego.

Olej lniany – jest wyjątkowy pod względem zawartości trójnienasyconego kwasu tłuszczowego (kwasu linolenowego). Nadzwyczaj cenny w żywieniu i rzadko spotykany w handlu jako olej spożywczy gdyż wysoka zawartość tego kwasu sprawia, że bardzo szybko podlega procesom degradacji. Olej lniany należy do tzw. olejów schnących. Rozprowadzony cienką warstwą, przy udziale tlenu powietrza „wysycha” tworząc na powierzchni elastyczną twardą i odporną na wpływy atmosferyczne błonę. Ta cecha sprawia, że od dawna jest stosowany do produkcji farb olejnych oraz zabezpieczania drewna przed gniciem i wpływami atmosferycznymi. Wysychanie oleju lnianego można przyspieszyć niektórymi dodatkami i w tej postaci występuje w handlu pod nazwą pokostu lnianego.

Olej z nasion wiesiolka lub ogórecznika lekarskiego – w odróżnieniu od olejów spożywczych zawierają około 10% kwasu gammalinolenowego (GLA). Kwas ten jest niezbędny w organizmie dla syntezy jednej z serii prostaglandyn. Ze względu na właściwości lecznicze znalazł zastosowanie jako lek wspomagający, stosowany w przypadkach egzem atopowej, syndromie przedmiesiączkowym, syndromie suchości oczu i śluzówek, przy artretyzmie, dla zmniejszenia poziomu cholesterolu we krwi i przy schorzeniach skóry.

Do olejów spożywczych używanych na szerszą skalę należy jeszcze olej sezamowy, palmowy oraz bawełniany. Poza użyciem do bezpośredniej konsumpcji, oleje spożywcze służą do wyrobu margaryn, a także do celów technicznych (przede wszystkim do wyrobu mydła).

8.2. EKSTRAKCJA LIPIDÓW

Dla rozpuszczalności tłuszczu w rozpuszczalniku organicznym zasadnicze znaczenie ma stopień polarności lipidu.

Generalnie lipidy apolarne (karotenoidy, estry steroli, sterole, woski, triacyloglicerole) lepiej rozpuszczają się w rozpuszczalnikach o małej polarności (chloroform, heksan, benzen) a lipidy bardziej polarne (kwasy tłuszczowe, lipidy fenolowe) w acetonie, eterze etylowym, octanie etylu, alkoholu propylowym, acetonitrylu.

Związki zawierające silnie polarną grupę i długie hydrofobowe łańcuchy np. fosfolipidy źle się rozpuszczają w pojedynczych rozpuszczalnikach:

- niepolarnych ze względu na silnie polarną grupę np. fosforanową
- polarnych, ze względu na długie hydrofobowe łańcuchy boczne np. kwasów tłuszczowych

Tego typu związki najlepiej rozpuszczają się w mieszaninach rozpuszczalników polarnych z niepolarnymi np. heksanu z alkoholem propylowym lub chloroformu z metanolem.

Ekstrakcja lipidów z materiałów suchych – takich jak nasiona roślin, nastęcza mniej kłopotów i wymaga mniejszej objętości rozpuszczalników niż ekstrakcja z materiałów zawierających wodę np. części zielone roślin, tkanki i narządy zwierzęce. Ekstrakcję tę można prowadzić pojedynczym rozpuszczalnikiem, co umożliwia pewną jej wybiórczość w stosunku do niektórych klas lipidów.

Ekstrakcja z materiałów zawierających wodę – rozpuszczalnikami mieszającymi się z wodą (metanol, alkohol etylowy, aceton) ma sens tylko wówczas jeśli użyjemy dużego nadmiaru rozpuszczalnika (co najmniej dwudziestokrotnego) w stosunku do objętości próby, a to dlatego, że nawet niewielki procent wody drastycznie zmniejsza rozpuszczalność lipidów. W tym wypadku ekstrakcję najlepiej przeprowadzić układem mieszających się w dowolnym stosunku rozpuszczalników np. chloroform : metanol, heksan : izopropanol. Obecność wody w próbce, sprawia, że mieszanina ta rozwarstwia się tworząc po ekstrakcji dwie fazy: metanolowo-wodną i chloroformowo-metanolową (lub izopropanol : woda i heksan : propanol). Po ekstrakcji tymi mieszaninami często tworzy się emulsja, aby przyspieszyć utworzenie się dwóch faz, ekstrakt należy odwirować.

Tab. 8.3. Charakterystyka najczęściej używanych rozpuszczalników

nazwa rozpuszczalnika	ciężar właściwy w 15°C	temp. wrzenia	mieszalność z wodą	uwagi
aceton	0,79	56,2	nieograniczona	palny
etanol	0,79	78,3	nieograniczona	palny
metanol	0,796	64,6	nieograniczona	palny, silnie trujący
propanol	0,80	97,2	nieograniczona	palny
izopropanol	0,79	82,0	nieograniczona	palny
chloroform	1,5	61,2	nie miesza się	palny, narkotyczny, toksyczny
tetrachlorometan	1,58	76,7	nie miesza się	niepalny, trujący
eter etylowy	0,72	34,6	w 100ml wody rozpuszcza się ok. 8ml eteru	palny, wybuchowy, narkotyczny
octan etylu	0,89	77,1	jak wyżej	palny, narkotyczny
heksan	0,69	68,5	nie miesza się	palny
pentan	0,62	36,0	nie miesza się	palny
acetonityl	0,78	81,6	nieograniczona	palny, trujący

Zaletą stosowania tego rodzaju mieszanin do ekstrakcji, jest to, że do fazy zawierającej wodę przechodzi cały szereg związków, które nie są lipidami a rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych. Uzyskany ekstrakt można powtórnie wytrząsać z wodą usuwając z niego zanieczyszczenia.

Mieszaniny typu: polarny rozpuszczalnik z niepolarnym rozpuszczalnikiem charakteryzują się tym, że dobrze rozpuszczają wiele lipidów i w tym sensie ekstrakcja jest najpełniejsza.

Można nimi ekstrahować także materiały suche. Jeśli to konieczne, dla lepszego oczyszczenia uzyskanego ekstraktu można dodać do niego wodę. Z reguły stosuje się mieszaniny o proporcjach polarnego rozpuszczalnika do niepolarnego jak 1:1, 1:2, 2:1.

Uwagi do Tabeli 8.3:

Chloroform – pod wpływem tlenu z powietrza oraz światła rozkłada się m.in. na fosgen (silnie trujący gaz) i kwas solny. Chloroform znajdujący się w handlu zawiera 1% bezwodnego alkoholu etylowego, który silnie spowalnia proces rozkładu.

Eter etylowy – najczęściej korzysta się z eteru kupowanego w aptekach (eter *pro narcosi*). Jest to eter pozbawiony silnie trujących i reaktywnych nadtlenuków. Podobnie jak chloroform, pod wpływem tlenu z powietrza i na świetle ulega rozkładowi na aldehyd i kwas octowy oraz tworzą się nadtlenuki.

Heksan, pentan są materiałami łatwo palnymi. Dla przypomnienia: benzyna jest mieszaniną węglowodorów o ilości atomów węgla od 5 do 9. Tak więc pentan i heksan (C_5 i C_6) są jej najbardziej lotnymi i palnymi składnikami.

Etanol, metanol, aceton są rozpuszczalnikami, które nie denaturują wielu białek, szczególnie tych o małej masie cząsteczkowej. Obok typowego zastosowania tj. do ekstrakcji lipidów, często stosujemy je do odtłuszczania materiału biologicznego, z którego dopiero po odtłuszczeniu można wydajnie ekstrahować białka. Po odparowaniu rozpuszczalnika taki odtłuszczony i pozbawiony wody materiał (tzw. proszek acetonowy) można długo przechowywać bez obawy o utratę np. aktywności enzymatycznej.

8.3. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA (TLC)

Chromatografia ta wykonywana jest na płytkach wykonanych z folii aluminiowej, plastikowej lub ze szkła, powleczonych cienką warstwą nośnika (płytki analityczne – grubość nośnika do 0,2 mm, płytki preparatywne około 2 mm). Nośnikiem jest drobno sproszkowany (średnica ziaren 5–20 μm) tlenek glinu, poliamid, celuloza lub dwutlenek krzemu (żel krzemionkowy).

Płytki pokryte wymienionymi powyżej nośnikami są powszechnie dostępne w handlu. Ze względu na wyjątkową uniwersalność najczęściej używane są płytki pokryte żel krzemionkowym.

Nośniki są tak przygotowane w toku produkcji, aby miały jak największą ilość wewnętrznych por i kanalików, co zwiększa powierzchnię sorpcyjną 1 g żelu od 50 do 300 m^2 , a przy tym średnica kanalików wewnętrznych może być standaryzowana. Oznaczenie np. – „żel krzemionkowy 60” – oznacza, że przeciętna średnica kanalików wynosi 6 nm.

Podłoże, na którym jest naniesiony nośnik nie ma żadnego wpływu na rozdział, ale należy je dobierać w zależności od przewidywanego sposobu uwidocznienia rozdzielonych związków. Podłoże z plastiku nie może być ogrzewane w temp. 120°C, a podłoże z folii aluminiowej nie może być spryskiwane wywołaczami zawierającymi stężone kwasy lub zasady.

Chromatografia na żelu krzemionkowym jest najczęściej chromatografią typu ciecz – ciało stałe. Rozdział następuje pomiędzy ciekłą fazą ruchomą (układem rozwijającym), a stałą fazą stacjonarną, na której adsorbują się cząsteczki rozdzielanych związków.

Cząsteczki rozpuszczalnika konkurują z cząsteczkami substancji rozdzielanych o aktywne miejsce na powierzchni adsorbenta w wyniku czego ustala się równowaga:



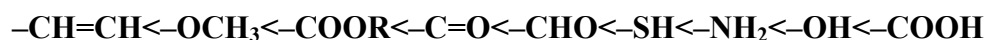
Warto tu zauważyć, że szybkość ustalenia się tej równowagi w odniesieniu do całej powierzchni ziarna adsorbenta zależy od jego wielkości, a więc czasu jaki jest potrzebny aby rozdzielany związek „wdyfundował” i „wydyfundował” z systemu wewnętrznych kanalików. Im mniejsze ziarna nośnika tym krótszy jest ten czas i tym lepszy rozdział.

Żel krzemionkowy jak i tlenek glinu są adsorbentami polarnymi. Im bardziej polarny jest rozdzielany związek tym większe powinowactwo do powierzchni adsorbenta. Duże powinowactwo wykazują również związki posiadające grupy zdolne do tworzenia wiązań wodorowych.

W przypadku związków aromatycznych i związków o dużej masie cząsteczkowej – czyli łatwo polaryzujących się, mechanizm polega na oddziaływaniu indukowanych dipoli z powierzchnią adsorbenta.

Prześledźmy zachowania się w czasie chromatografii dwóch związków: np. fosfolipidu (polarny) i estru cholesterolu (mało polarny), w dwóch rozpuszczalnikach – chloroformie (mało polarny) oraz izopropanolu (polarny). Jeśli chromatogram rozwijamy chloroformem, który ma słabe powinowactwo do nośnika nie będzie on przenosił fosfolipidów, ale estry cholesterolu będą przenoszone wraz z rozpuszczalnikiem, gdyż ich powinowactwo do powierzchni adsorbenta jest jeszcze mniejsze niż chloroformu. Rozwijając chromatogram w izopropanolu zauważymy, że obydwa związki są przenoszone. Estrы cholesterolu wędrują z czołem rozpuszczalnika, a fosfolipidy ze względu na silniejszą polarność zdecydowanie wolniej. Oczywiście, w wielu przypadkach mechanizm jest o wiele bardziej skomplikowany, ale podany tu schemat doskonale ułatwia przewidywanie i planowanie rozdziałów. Dodatkowo taki obraz rozdziału jest podany na Rys. 8.2.

Pod względem powinowactwa do powierzchni adsorbenta grupy funkcyjne można uszeregować następująco:



Rozpuszczalniki pod względem siły eluowania są zestawione w tak zwany szereg eluotropowy. Stwierdzono, że siła elucyjna rozpuszczalnika jest proporcjonalna do jego stałej dielektrycznej.

8.3.1. Detekcja lipidów w chromatografii cienkowarstwowej

Istnieje olbrzymia ilość różnorodnych przepisów na wykazywanie w chromatogramach różnych związków, różnych grup związków, różnych grup funkcyjnych lub też wysoce specyficznych dla pojedynczego składnika.

Te związki, które mają właściwości fluorescencyjne (ewentualnie po spryskaniu fluoresceiną lub rodaminą) można ujawniać pod lampą UV. Płytki znajdujące się w handlu z reguły są produkowane w dwóch wariantach bez i ze wskaźnikiem fluorescencyjnym. Pod lampą UV w tym przypadku na fluoryzującym tle widać ciemne plamy tych związków, które pochłaniają w UV.

Jedną z najbardziej uniwersalnych (ujawniających wszystkie związki organiczne) metod „wywoływania” chromatogramu jest spryskiwanie płytki stężonym kwasem siarkowym (VI) lub kwasem siarkowym (VI) z dichromianem potasu i ogrzewanie w temp. 180–220°C. W tych warunkach dochodzi do zwęglenia związków organicznych (czarne plamy na białym tle).

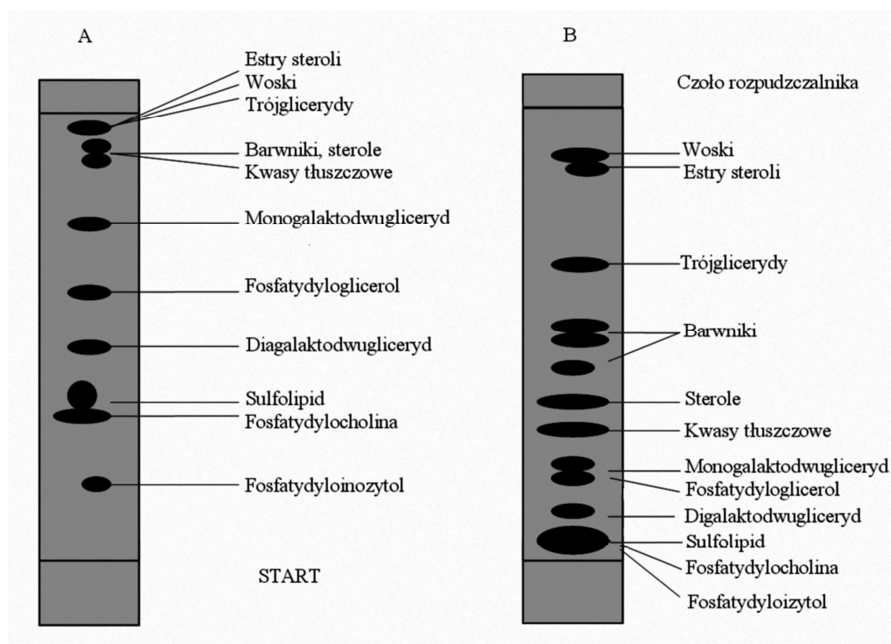
Inną uniwersalną metodą jest wywoływanie parami jodu (do komory, na dnie której znajduje się kilka kryształków jodu, wkładamy suchy chromatogram i przykrywamy komorę). Jod adsorbuje się na całej powierzchni płytki, ale znacznie szybciej na związkach organicznych, w efekcie po kilkunastu minutach na żółtym tle pojawiają się brązowe plamy rozdzielanych związków. Po wyciągnięciu chromatogramu z komory należy zaznaczyć np. poprzez obrysowanie, lokalizację poszczególnych plam, gdyż jod stosunkowo szybko odsublimowuje z powierzchni. Taką płytkę można powtórnie wywołać w inny sposób.

Wywołanie parami jodu jest jedną z nieniszczących metod ujawniania związków. Wadą tej metody jest jej niska czułość.

Ze względu na prostotę i dobrą czułość, do wywoływania lipidów najczęściej stosuje się wywoływanie kwasem fosfomolibdenowym (5–10% etanolowy roztwór kwasu fosfomolibdenowego – spryskać płytkę i ogrzewać w 105–129°C przez 5–20 minut). Plamy rozdzielanych związków mają ciemnoniebieski lub szary kolor na żółtym tle. Reakcję tę wykazują też związki organiczne, które ulegają redukcji pod wpływem tlenu kwasu fosfomolibdenowego. Nasycone kwasy tłuszczowe nie wybarwiają się w tej metodzie.

Tab. 0.2 Stałe dielektryczne rozpuszczalników

rozpuszczalnik	stała dielektryczna ϵ [w temp. 20 °C]
pentan	1,84
heksan	1,89
tetrachlorek węgla	2,24
eter dietylowy	4,24
chloroform	4,81
octan etylu	6,1
kwas octowy	6,15
izopropanol	19,0
propanol	20,8
aceton	21,2
etanol	25,1
metanol	33,6
acetonitryl	38,8
woda	80,4



Rys. 8.2. Przybliżony schemat rozdziału tego samego ekstraktu z materiału roślinnego na żelu krzemionkowym rozwijanego w dwóch różnych układach

A – układ polarny (chloroform : aceton : metanol : kwas octowy : woda w stosunku 50:20:10:10:5),

B – układ niepolarny (chloroform : aceton w stosunku 95:5)

8.3.2. Identyfikacja rozdzielanych związków

Regułą jest, że na jednym chromatogramie rozdzielamy związki należące do tej samej grupy (np. lipidy, cukry, garbniki, alkaloidy). Identyfikacja polega w tym wypadku na określeniu np. jakie cukry znajdują się na chromatogramie. Możemy tego dokonać poprzez:

1. Oznaczenie R_f czyli stosunku odległości na jakiej znajduje się dany związek od miejsca startu, do odległości między startem a czołem rozpuszczalnika. Oczywiście wartość R_f musimy znać lub też ją wyznaczyć. Ponieważ R_f zależy od wielu czynników, to jego powtarzalność jest niska, dlatego w chromatografii cienkowarstwowej w tej chwili jest rzadko używany.
2. Porównanie ze standardami. W handlu znajduje się dziś olbrzymia ilość wzorców różnych substancji. Rozwijając chromatogram, obok rozdzielanych związków jedną „ścieżkę” (najczęściej w środku chromatogramu) przeznaczamy dla standardu, a następnie identyfikujemy rozdzielone lipidy poprzez porównanie ich położenia na płycie TLC względem znanych standardów.

Oczywiście jeśli dysponujemy jakimś specyficznym wywoływaczem dla danego związku, do identyfikacji nie jest nam potrzebny standard czy znajomość R_f .

8.4. EKSTRAKCJA I ANALIZA LIPIDÓW Z MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

8.4.1. Ekstrakcja surowych lipidów z jaja

Postępowanie

1. Oddzielić dokładnie żółtko od białka i odważyć 1 g żółtka w niewielkiej kolbie stożkowej (materiał pobrać pipetą pasterowską z szerokim wypływem).
2. Do próbki dodać 4 ml metanolu i dokładnie wymieszać. Następnie dodać 8 ml chloroformu i wytrząsać przez 15 minut na wytrząsarce.
3. Ekstrakt przesączyć przez bibułę.
4. Klarowny przesącz zachować do badań w szczelnie zamkniętej probówce.

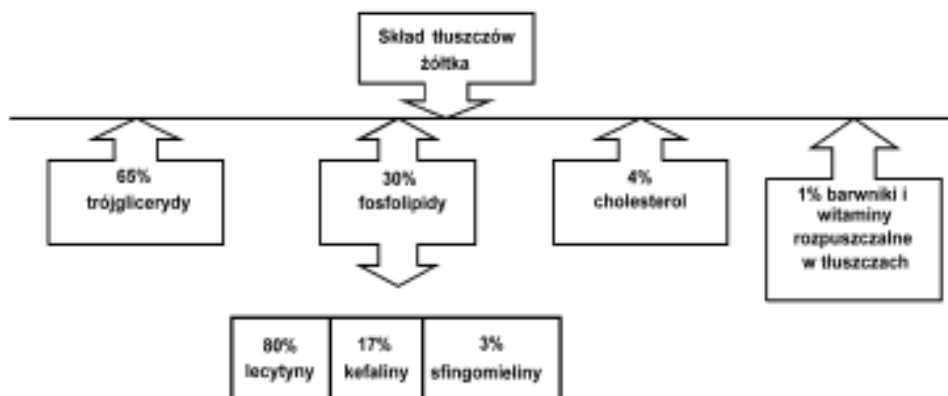
Materiały i odczynniki

- jajo kurze
- chloroform
- metanol
- bibuła filtracyjna
- lejek szklany
- kolba stożkowa
- pipety Pasteura

8.4.2. Izolacja i oczyszczanie lecytyny z żółtek jaj kurzych

Zasada metody

Żółtka jaj są wygodnym i bogatym źródłem lecytyny. Przeciętna masa żółtka jaja kurzego wynosi 16 g, z tego 50% stanowi sucha masa. Z kolei 65% suchej masy stanowią tłuszcze a 33% białka (Rys. 8.3).



Rys. 8.3. Skład procentowy lipidów z żółtka jaja kurzego

W opisanej poniżej metodzie uzyskuje się z dobrą wydajnością lecytynę o czystości powyżej 95%. W pierwszym etapie ekstrahujemy żółtka acetonem. Aceton jest doskonałym rozpuszczalnikiem tłuszczów, ale bardzo źle rozpuszcza fosfolipidy, i praktycznie nie rozpuszcza lecytyn, dzięki temu odsączając ekstrakt pozbywamy się niemal całkowicie

triacylogliceroli, barwników i witamin oraz znaczącej ilości cholesterolu. Pozostałość na sączku składa się głównie z białka oraz fosfolipidów, które wymywamy mieszaniną chloroformu z metanolem. Po zagęszczeniu tego ekstraktu dalsze oczyszczanie lecytyny prowadzimy na kolumnie z żelem krzemionkowym.

Postępowanie

Uwaga! Na każdym etapie preparacji pozostawić próbki do późniejszej analizy.

1. Oddzielić dokładnie 2 żółtka od białek i umieścić je w 250 ml kolbie stożkowej.
2. Kolbę stożkową umieścić na mieszadle mechanicznym i ciągle mieszając dodawać małymi porcjami 100 ml acetonu.
3. Mieszać około 5 min i przesączyć pod próżnią przez sączek ze spiekem lub sączek w lejku Büchnera.
4. Osad na sączku przemywać małymi porcjami acetonu, aż do uzyskania zupełnie bezbarwnego przesączu. Bezbarwny przesącz uzyskuje się stosunkowo szybko jeśli osad ma formę drobnej kaszki, jeśli jest w postaci grud wymycie materiału balastowego trwa długo, a bezbarwny przesącz w tym przypadku może fałszować rzeczywisty obraz.
5. Z zebranego z sączka białego osadu ekstrahować fosfolipidy trzykrotnie porcjami po 50 ml mieszaniny chloroformu z metanolem (1:1).
6. Ekstrakty połączyć i jeszcze raz przesączyć.
7. Odparować w rotacyjnej wyparce próżniowej dodając 50 ml izopropanolu i pod koniec odparowywania dodać powtórnie 50 ml izopropanolu (izopropanol zapobiega pienieniu, oraz ułatwia odparowanie wody).
8. Odparowane fosfolipidy rozpuścić w jak najmniejszej objętości chloroformu i nanieść na zrównoważoną w chloroformie kolumnę z żelem krzemionkowym. Eluować chloroformem aż do wymycia barwnego materiału.
9. Lecytynę eluować układem chloroform : metanol : amoniak (68:28:4), zbierając 10 ml frakcje.
10. Zebrane frakcje pozostawić pod wyciągiem do odparowania.
11. Czystość otrzymanej lecytyny określić w chromatografii cienkowarstwowej.

Materiały i odczynniki

- 2 jaja kurze
- aceton cz.
- metanol cz.d.a.
- chloroform
- 25% amoniak
- kolba stożkowa
- sączek ze spiekem G4, lub lejek Büchnera
- rotacyjna wyparka próżniowa
- kolumna szklana (200 × 20 mm) wypełniona żelem krzemionkowym o średnicy ziaren 40–60 μm
- zestaw do chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

8.4.3. Ekstrakcja lipidów z materiału roślinnego

8.4.3.1. Ekstrakcja lipidów z liści rzodkiewki

Fisher W. Handbook of chromatography (Mangold H.K., red.) CRC Press, Boca Raton 1984, Vol. I, 555–587.

Postępowanie

1. 5 g podsuszonych, poszatkowanych liści rzodkiewki umieścić w rozdzielaczu, dodać 50 ml metanolu i wytrząsać kilka minut.
2. Dodać 40 ml chloroformu i wymieszać przez obracanie.
3. Dodać 20 ml metanolu i mieszać przez chwilę.
4. Do całości dodać ok. 50 ml 0,9% NaCl i delikatnie wymieszać, następnie pozostawić do rozdzielania faz.
5. Zebrać fazę dolną do kolby.
6. Do fazy górnej dodać 40 ml chloroformu i mieszać całość przez kilka minut, pozostawić do rozdzielania faz.
7. Zebrać fazę dolną i połączyć z zebraną poprzednio.
8. Zagęścić otrzymany ekstrakt poprzez częściowe odparowanie rozpuszczalników.
9. W komorach chromatograficznych umieścić układy rozwijające A oraz B.
10. Przykryć komory płytką szklaną i pozostawić na ok. 30 minut. Równocześnie przygotować płytkę do chromatografii: 1 cm od brzegu zaznaczyć ołówkiem linię startową.
11. Badane próby nanieść kapilarką na linię startową w postaci plamek o średnicy do 3–4 mm w odległości ok. 1,5–2 cm od siebie.
12. Plamki wysuszyć strumieniem powietrza (suszarka do włosów).
13. Włożyć płytkę z naniesionymi próbkami do komory i rozwijać.
14. Gdy front rozpuszczalnika dojdzie 1–1,5 cm od górnej krawędzi płytki, płytkę wyjąć i wysuszyć strumieniem powietrza pod dygestorium.
15. Wywołać chromatogram przez umieszczenie go w pojemniku z jodem.
16. Bezpośrednio po wyjęciu płytek plamy lipidów obrysować ołówkiem (w miarę upływu czasu plamki będą tracić intensywność zabarwienia).
17. Do rozwijania chromatogramów stosować dwa układy rozwijające:
 - A – chloroform : metanol : kwas octowy : woda w stosunku 60:50:1:4 (układ rozwijający fosfolipidy)
 - B – chloroform : aceton : metanol : kwas octowy : woda w stosunku 50:20:10:10:5 (układ rozwijający fosfo- i glikolipidy roślinne).

Materiały i odczynniki

- liście rzodkiewki
- chloroform
- aceton
- kwas octowy
- metanol
- 0,9% NaCl
- rozdzielacz na 250 ml
- zestaw do chromatografii cienkowarstwowej (TLC)
- suszarka do włosów, pojemnik z jodem

8.4.3.2. Przygotowanie ekstraktu z wysuszonych i sproszkowanych korzeni marchwi

Fisher W. Handbook of chromatography (Mangold H.K., red.) CRC Press, Boca Raton 1984, Vol.I, 555–587.

Postępowanie

1. Do 4 probówek wsypać po około 200 mg suszu i zalać na wysokość jaką zajmuje susz: 1. wodą, 2. metanolem, 3. acetonem, 4. heksanem.
2. Ekstrahować około 1 godziny przygodnie mieszając. Po godzinie przesączyć na małych sączkach z bibuły nałożonych bezpośrednio na suche próbówki.
3. Przygotować cztery płytki pokryte żelem krzemionkowym, na każdą z nich nanieść uzyskane wcześniej ekstrakty oraz roztwór cholesterolu, triacyloglicerolu i lecytyny.
4. Ekstrakty nanosić w formie 0,5 cm pasków, na linię startu znajdującą się około 1,5 cm od dolnego brzegu płytki.
5. Po wysuszeniu naniesionych ekstraktów, płytki włożyć do komory chromatograficznej do której wcześniej nalano odpowiedni układ rozwijający. Powierzchnia układu rozwijającego powinna znajdować się przynajmniej o 0,5 cm poniżej linii startu.
6. Chromatogramy rozwijać w czterech różnych układach:
 - metanol
 - chloroform : aceton : metanol : kwas octowy : woda (50:20:10:10:5)
 - chloroform : aceton (95:5)
 - heksan.
7. Gdy front rozpuszczalnika dojdzie 1–1,5 cm od górnej krawędzi płytki, płytkę wyjąć i wysuszyć strumieniem powietrza pod dygestorium.
8. Wywołać chromatogram przez jego umieszczenie w pojemniku z jodem.
9. Bezpośrednio po wyjęciu płytek plamy lipidów obrysować ołówkiem (w miarę upływu czasu plamki będą tracić intensywność zabarwienia).

Materiały i odczynniki

- wysuszony i sproszkowany korzeń marchwi
- chloroform
- metanol
- aceton
- heksan
- kwas octowy
- bibuła filtracyjna
- zestaw do chromatografii cienkowarstwowej (TLC)
- pojemnik z jodem

8.5. METODY IDENTYFIKACJI LIPIDÓW W CHROMATOGRAMACH

8.5.1. Detekcja nieswoista lipidów w chromatogramach po TLC

Postępowanie

1. Suche płytki do TLC, na których dokonano uprzednio rozdziałów ekstraktów lipidowych spryskać ostrożnie, posługując się odpowiednim rozpylaczem (pod dygestorium) jednym z następujących roztworów:
 - 30–40% wodny lub 5% etanolowy roztwór kwasu siarkowego lub
 - 55% wodny roztwór kwasu siarkowego z 0,6% K_2CrO_3 lub
 - 20% wodny roztwór siarczanu (VI) amonu.
2. Spryskane płytki umieścić na 15–30 min w temp. 180°C (**Uwaga!** Płytki z plastikowym podłożem nie nadają się do tej metody). Podczas ogrzewania wszystkie lipidy ulegają zwęgleniu i są widoczne w postaci ciemnych plam.
3. Alternatywną metodą często stosowaną jest umieszczenie wywoływanej płytki TLC w oparach jodu: Pary jodu w komorze jodowej (szczelnie przykryty pojemnik szklany zawierający na dnie cienką warstewkę kryształków jodu). W zależności od ilości substancji naniesionych na płytkę wywoływanie następuje w ciągu kilku–kilkunastu minut. Jeśli nastąpił rozdział substancji poszczególne związki są uwidaczniane jako brązowe plamy na żółtawym tle.

8.5.2. Detekcja swoista lipidów w chromatogramach po TLC

8.5.2.1. Detekcja fosforu fosfolipidów

Vascovsky V.E., Svetashev V.I. (1972) J.Chromatogr. 65, 451.

Zasada metody

Fosfor występujący w cząsteczkach fosfolipidów redukuje molibdenian amonu w obecności chlorku hydrazyny do mieszaniny tlenków molibdenu o barwie granatowej.

Postępowanie

1. 10 g molibdenianu amonowego rozpuścić w 100 ml 4 M HCl.
2. 1 g chlorku hydrazyny rozpuścić w 100 ml wody.
3. Połączyć całość roztworów uzyskanych w punkcie 1 i 2, zmieszać i ogrzewać przez 5 minut we wrzącej łaźni wodnej. Po ochłodzeniu uzupełnić wodą do 1 litra.
4. Roztworem uzyskanym w powyższy sposób spryskać suchy chromatogram.
5. Fosfolipidy dają od razu, bez ogrzewania, niebieskie plamy.

8.5.2.2. Detekcja grup aminowych w lipidach

Wagner H., Horhammer L., Wolff P. (1961) Biochem. Z. 334, 175.

Zasada metody

Ninhydryna reaguje z wolnymi grupami aminowymi występującymi w aminolipidach i niektórych fosfolipidach, tworząc kompleks o barwie różowo-purpurowej.

Postępowanie

1. Spryskać suche płytki roztworem wywołującym.
2. Różowo-purpurowe plamy występują po 1–2 godz. w temp pokojowej lub po 15 minutach ogrzewania w około 100°C.

Materiały i odczynniki

- roztwór wywołujący: 0,25% ninhydryna w acetonie lub butanolu

8.5.2.3. Detekcja grup cholinowych lipidów

Beiss U.J. (1964) Chromatogr. 13, 104.

Postępowanie

1. Suche chromatogramy spryskać wywoływaczem.
2. Po kilku minutach lipidy zawierające cholinę zabarwią się na pomarańczowo.

Materiały i odczynniki

- roztwór **A**: 1,7 g zasadowego azotanu bizmutu (odczynnik Dragendorffa) rozpuścić w 100 ml 20% kwasu octowego
- roztwór **B**: 10 g jodku potasowego rozpuścić w 25 ml wody
- wywoływacz: zmieszać 20 ml roztworu **A** z 5 ml roztworu **B** i dodać 70 ml wody

8.5.2.4. Detekcja reszt cukrowych glikolipidów

Siakotos A.N., Rouser G. (1965) J. Am. Oil Chem. Soc. 42, 913–916.

Zasada metody

α -Naftol daje barwne pochodne z produktami odwodnienia i częściowej hydrolizy cukrów i niektórych lipidów w stężonych kwasach mineralnych.

Postępowanie

1. Suchy chromatogram spryskać 0,5% roztworem α -naftolu w 50% alkoholu etylowym, wysuszyć w temp. pokojowej, a następnie spryskać (**Uwaga!** Stężony kwas) roztworem kwasu siarkowego. Tak potraktowaną płytkę ogrzewać w 120°C (podłoże płytek nie może być plastikowe) do chwili zakończenia reakcji.
2. Glikolipidy (cerebrozydy, sulfatydy, gangliozydy, diglicerydy glikozydowe itp.) dają plamy niebiesko-purpurowe, inne lipidy polarne dają plamy żółte, a cholesterol w tych warunkach plamy szaro-czerwone.

Materiały i odczynniki

- 0,5% roztwór α -naftolu (rekrytalizowanego z heksanu z chloroformem) w 50% alkoholu etylowym
- stężony kwas siarkowy (VI) : woda (95:5)

8.5.2.5. Detekcja reszt kwasu sjałowego gangliozydów

Miettinen T., Takki-Luukainen I.T. (1959) Acta Chem. Scand. 13, 856

Postępowanie

1. Na 4–6 godzin przed użyciem 10 ml roztworu **A** dodać do roztworu **C**.
2. Suchy chromatogram spryskać przygotowanym roztworem, przykryć płytką szklaną i ogrzewać w 120°C.
3. Gangliozydy i pochodne kwasu sjałowego dają niebiesko-fioletowe plamy.

Materiały i odczynniki

- roztwór **A**: 2% wodny roztwór rezorcynolu
- roztwór **B**: 2,5% wodny roztwór pięciowodnego siarczanu (VI) miedzi (II)
- roztwór **C**: 0,5 ml roztworu **B** dodać do 80 ml stężonego HCl

8.5.2.6. Detekcja sterydów i ich estrów

Jatzkievitz H., Mehl E. (1960) Z. Physiol. Chem. 320, 251.

Lowry R.R. (1968) J. Lipid Res. 9, 397.

Zasada metody

Produkty reakcji cholesterolu z silnymi kwasami dają barwne kompleksy z solami żelazowymi.

Postępowanie

1. Suche chromatogramy spryskać roztworem wywołującym **A**, a następnie ogrzewać w 90°C przez 15 min. Cholesterol, jego estry oraz inne sterydy zostaną wywołane jako czerwone plamy na białym tle.
2. Suchy chromatogram spryskać roztworem wywołującym **B** i ogrzewać w 100°C. Czerwono-fioletowa plama estrów cholesterolu pojawia się nieco później. Dalsze ogrzewanie powoduje zwęglanie i inne lipidy stają się widoczne.

Materiały i odczynniki

- roztwór wywołujący **A**: mieszanina stężonych kwasów siarkowego i octowego w stosunku 1:1
- roztwór wywołujący **B**: rozpuścić 50 mg $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ w 90 ml wody, dodać 5 ml stężonego kwasu octowego i 5 ml stężonego kwasu siarkowego; odczynnik jest trwały 3 miesiące w temp. pokojowej

8.5.2.7. Detekcja lipidów i związków fenolowych

Kritchevsky D., Kirk M.C. (1952) Arch. Biochem. Biophys. 35, 346.

Postępowanie

1. Suchy chromatogram spryskać roztworem wywołującym.
2. Ogrzać do 120°C i umieścić w pojemniku nasyconym parami amoniaku. Większość lipidów, związki fenolowe, antyoksydanty i związki redukujące dają niebieskie plamy na białym tle.

Materiały i odczynniki

- roztwór wywołujący: 10% kwas fosfomolibdenowy w etanolu
- pojemnik z parami amoniaku

8.5.2.8. Detekcja lipidów rezorcynolowych

Mejbaum-Katzenellenbogen W., Tłuszcz F., Kozubek A., Sikorski A., Maresz Z. (1975) Acta Soc. Bot. Polon. 44, 479–489.

Kozubek A., Tłuszcz F., Mejbaum-Katzenellenbogen W. (1981) Acta Soc. Bot. Polon. 50, 637–643.

Zasada metody

Związki fenolowe reagują z solami diazowymi (Fast Blue B) dając barwniki azowe.

Postępowanie

1. Suchy chromatogram spryskać roztworem wywołującym **A** i ogrzewać w 110°C. Lipidy rezorcynolowe barwią się po kilku minutach na różowo-czerwono.
2. Suchy chromatogram spryskać roztworem wywołującym **B**. Lipidy rezorcynolowe barwią się od razu na kolor fioletowo-czerwony.

Materiały i odczynniki

- roztwór wywołujący **A**: 1% wanilina w 50% kwasie o-fosforowym
- roztwór wywołujący **B**: 0,5% Fast Blue B w 5% kwasie octowym (trwały w lodówce przez kilka dni)

8.6. KOLORYMETRYCZNE METODY OZNACZANIA LIPIDÓW

8.6.1. Oznaczanie cholesterolu całkowitego

Courchaine A.J., Miller W.H., Stein D.B., Jr. (1959) Clin. Chem. 5,609–613.

Zasada metody

Produkty reakcji cholesterolu z silnymi kwasami dają barwne kompleksy z solami żelazowymi.

Postępowanie

1. Próbkę lipidów zawierającą do 100 µg cholesterolu umieścić w suchej probówce i odparować z niej rozpuszczalnik.
2. Do pozostałości dodać 1,5 ml stężonego kwasu octowego i 1 ml odczynnika żelazowego.
3. Po dokładnym wymieszaniu odczekać 10 min i odczytać absorbancję próby przy 550 nm wobec ślepej odczynnikowej.
4. Ilość cholesterolu w próbce określić z krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla 20 -100 µg cholesterolu.

Materiały i odczynniki

- stężony kwas octowy
- odczynnik żelazowy: 4 ml FeCl₃ (2,5 g FeCl₃ × H₂O rozpuścić w 100 ml 85% kwasu ortofosforowego) uzupełnić ostrożnie do 50 ml stężonym kwasem siarkowym (VI); odczynnik jest trwały do utraty klarowności

- wzorzec: 10 mg cholesterolu rozpuścić w 100 ml kwasu octowego

8.6.2. Oznaczanie fosforu w fosfolipidach

Zasada metody

Fosfolipidy ogrzewane z kwasem chlorowym (VII) (nadchlorowy) ulegają degradacji do CO_2 , H_2O oraz PO_4^{3-} . W środowisku kwaśnym ortofosforan tworzy z molibdenianem (VI) amonu fosfomolibdenian (VI) amonu. Związek ten pod wpływem czynników redukujących ulega redukcji do mieszaniny tlenków molibdenu, tzw. błękitu molibdenowego ($\text{MO}_2 \times \text{MO}_3$), którego ilość jest określana kolorymetrycznie.

Metoda I (Barletta)

Bartlett G.R. (1959) J. Biol. Chem. 234, 466–469.

Postępowanie

1. Próbkę lipidów uwolnić od rozpuszczalników przez ogrzanie kilka minut w 120°C .
2. Dodać 300 μl kwasu nadchlorowego, wymieszać, probówkę przykryć kulką szklaną i umieścić na 30 min w bloku grzejmym ($180\text{--}200^\circ\text{C}$).
3. Ochłodzić i dodać 3 ml roztworu molibdenianu, zamieszać.
4. Dodać 120 μl odczynnika Fiske-Subbarowa i zamieszać.
5. Ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 15 min.
6. Ochłodzić i odczytać absorbancję próby przy 830 nm (barwa stabilna przez 24 godz.). 90 nmoli P_i daje absorbancję ok. 0,7.
7. Oznaczyć ilość fosforu w próbce posługując się wykonaną krzywą kalibracyjną (10–90 nmoli P_i). Etap spalania w przypadku standardu może być pominięty.

Materiały i odczynniki

- molibdenian amonu: rozpuścić 2,2 g molibdenianu amonu w 20 ml 98% kwasu siarkowego stosując ciągłe mieszanie przez 10 min i uzupełnić wodą destylowaną do 1 litra
- stężony kwas siarkowy (VI)
- disiarczan (IV) sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)
- siarczan (IV) sodu (Na_2SO_3)
- kwas 1-amino-2-naftaleno-4-sulfonowy
- 68–75% kwas chlorowy (VII) (nadchlorowy)
- roztwór standardowy: 275,7 mg KH_2PO_4 rozpuścić w 250 ml wody i 10 ml tego roztworu uzupełnić do 250 ml wodą; 1 ml zawiera 10 μg P_i
- odczynnik Fiske-Subbarowa: 27,36 g disiarczanu (IV) sodu oraz 1 g siarczanu (IV) sodu rozpuścić w 200 ml wody destylowanej; dodać 0,5 g kwasu aminonaftalenosulfonowego i mieszać przez 15 min w temp. ok. 40°C ; odstawić na noc w ciemne miejsce, a następnie przesaczyć do ciemnej butelki; odczynnik jest trwały przez ok. 8 tygodni w 4°C

Metoda II (Rouser , Siakotosa)

Rouser G., Siakotos A.N. (1966) *Lipids* 1, 85–86.

Postępowanie

1. Próbkę lipidów umieścić w suchej probówce, odparować rozpuszczalnik i dodać 0,9 ml kwasu nadchlorowego.
2. Probówkę przykryć kulką szklaną i mineralizować 30 min w 180°C.
3. Ochłodzić i dodać 5 ml wody splukując przy okazji ścianki próbki.
4. Dodać 1 ml roztworu molibdenianu, 1 ml roztworu kwasu askorbinowego oraz 2 ml wody, dokładnie wymieszać.
5. Ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 5 min.
6. Ochłodzić w strumieniu zimnej wody.
7. Odczytać absorbancję klarownego supernatantu przy 825 lub 797 nm wobec ślepej odczynnikowej.
8. Odczytać ilość fosforu w próbie posługując się krzywą kalibracyjną.

Materiały i odczynniki

- 70% kwas chlorowy (VII) (nadchlorowy)
- 2,5% wodny roztwór molibdenianu amonowego
- 10% wodny roztwór kwasu askorbinowego
- standardowy roztwór fosforanu (rozdział 8.6.2, Metoda I); krzywa kalibracyjna jest liniowa do 10 µg P_i

8.6.3. Oznaczanie stężenia fosfolipidów w roztworach zawierających fosforany nieorganiczne

Steward J.C M. (1959) *J. Biol. Chem.* 104, 10–15.

Zasada metody

W metodzie Stewarda wykorzystuje się zdolność tworzenia rozpuszczalnego w chloroformie kompleksu pomiędzy fosfolipidami i tiocyjanianem żelaza (III) (rodankiem żelazowym). Oznaczenie stężenia fosfolipidów jest niezależne od obecności fosforanów nieorganicznych w roztworze, a więc w metodzie tej możliwe jest oznaczanie stężenia fosfolipidów zawieszonych w buforach zawierających fosforany takich jak np. PBS.

Jedynym ograniczeniem metody jest różna zdolność poszczególnych fosfolipidów do tworzenia tego kompleksu, co wymaga przygotowania krzywej kalibracyjnej zawierającej dokładnie te same fosfolipidy bądź ich mieszaniny. Należy jednak pamiętać, że fosfatydyloglicerol wybarwia się wyjątkowo słabo odczynnikiem Stewarda.

Postępowanie

1. Przygotować krzywą kalibracyjną fosfolipidu poprzez umieszczenie w probówkach szklanych wzrastających ilości chloroformowego roztworu fosfolipidu (0 ml; 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml aż do 1 ml) i uzupełnić chloroformem do 2 ml.
2. Do wszystkich probówek dodać 2 ml roztworu tiocyjanianu żelaza (III) (rodanku żelazowego).
3. Procedurę przeprowadzić analogicznie używając chloroformowych roztworów prób badanych.
4. Zawartość probówek intensywnie wytrząsać (mikrowytrząsarka) przez 15 sekund.

5. Dolna faza chloroformowa przybiera barwę krwistoczerwoną, której intensywność zależy od stężenia obecnego w niej fosfolipidu.
6. Próby odwirować w tych samych probówkach (5 min, 300×g) i zebrać dolną warstwę pipetą Pasteura.
7. Odczytać absorbancję wobec ślepej odczynnikowej przy 485 nm, używając do pomiaru kuwet szklanych (chloroform!).
8. Stężenie prób badanych odczytać z przygotowanej krzywej kalibracyjnej.

Materiały i odczynniki

- tiocyjanian amonu (rodanek amonu)
- chlorek żelaza (III) sześciowodny
- chloroform
- chloroformowy roztwór fosfolipidu – 1mg/ml
- 0,1 M roztwór tiocyjanianu żelaza (III) (rodanku żelazowego): rozpuścić 27,03 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ oraz 30,4 g NH_4CNS w wodzie destylowanej tak by końcowa objętość wynosiła 1litr; krwistoczerwony roztwór jest stabilny wiele miesięcy w temp. pokojowej

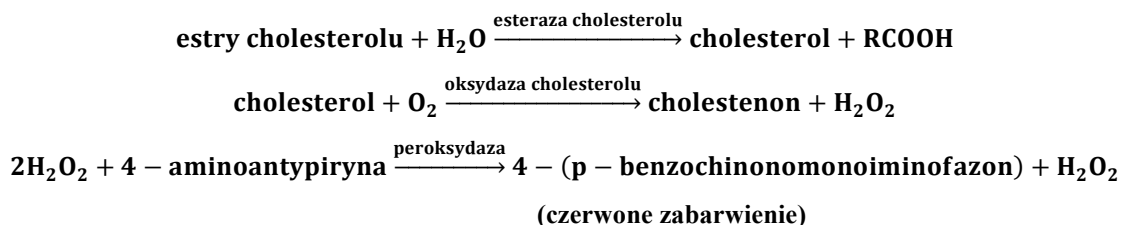
8.6.4. Oznaczanie cholesterolu całkowitego zestawem diagnostycznym stosowanym w laboratoriach medycznych

Znajdujący się w organizmie cholesterol pochodzi z pokarmu oraz z syntezy własnej (syntetyzowany jest głównie w wątrobie). W surowicy występuje jako cholesterol wolny oraz zestryfikowany (estry z kwasami tłuszczowymi). Cholesterol zestryfikowany stanowi ok. 70% cholesterolu całkowitego. Jest też związany z frakcjami lipoproteinowymi surowicy oraz wchodzi w skład chylomikronów. Oznaczanie jego poziomu ma znaczenie diagnostyczne ponieważ zwiększenie lub zmniejszenie zawartości cholesterolu występuje w wielu schorzeniach. Test oznacza cholesterol całkowity jako cholesterol wolny i zestryfikowany oraz cholesterol w lipoproteinach.

Tak np. oznaczanie cholesterolu w HDL (ang. *High Density Lipoprotein*) ma znaczenie w profilaktyce antymiażdżycowej. Frakcja ciężka lipoprotein (HDL) jest uważana za czynnik antymiażdżycowy. Większe stężenie cholesterolu HDL, świadczy o większej zawartości tej frakcji w surowicy, a więc o mniejszym zagrożeniu miażdżycą.

Zasada metody

Opisana poniżej metoda enzymatycznego oznaczania cholesterolu jest prosta w wykonaniu i jest dobrym przykładem pewnej strategii stosowanej w oznaczaniu wielu związków. Dysponując specyficzną oksydazą jakiegoś związku, doprowadzamy do jego utlenienia z wytworzeniem H_2O_2 , który w obecności peroksydazy i 4-aminoantypiryny daje odpowiedni chromogen.



Szczegółowa procedura wykonania oznaczenia nie jest podana w niniejszym skrypcie, gdyż w zależności od producenta zestawu mogą zachodzić niewielkie różnice. W celu wykonania oznaczenia – patrz instrukcja dołączona do danego zestawu.

8.6.5. Oznaczanie lipidów całkowitych metodą wanilinową

Zasada metody

Fosfowanilina reaguje z wiązaniem nienasyconym. Reakcję dodatnią dają również ketony, wyższe alkohole, związki z aktywną grupą metylenową, hydrazyny i niektóre leki.

Cholesterol ma jedno wiązanie nienasycone i w tej metodzie jest stosowany jako standard. Warunkiem stosowania jakiegoś związku jako standardu jest jego zdefiniowana formuła chemiczna, dostępność w wysokooczyszczonej postaci w handlu, trwałość oraz cena. Kwasy tłuszczowe nienasycone nie nadają się w tej metodzie jako standard ponieważ są nietrwałe, trudne do uzyskania w postaci wysokooczyszczonej a ponadto są drogie.

Uwagi

Istnieje wiele metod oznaczania lipidów i każda z nich obarczona jest licznymi wadami. Jak się wydaje metoda wanilinowa jest aktualnie najlepszą. Co prawda w metodzie tej oznaczają się tylko te lipidy, które mają wiązania nienasycone (kwasy tłuszczowe nienasycone), ale za to pomiar jest wiarygodny i szybki. Metoda wanilinowa jest zdecydowanie metodą współczynnikową, czyli wyliczona zawartość w ogóle nie musi być równa faktycznej zawartości lipidów.

Jeśli ekstrahujemy lipidy z określonego materiału w określonych warunkach, to biorąc pod uwagę dużą stabilność składu takiego ekstraktu i oznaczając zawartość lipidów w takim materiale np. metodą wagową, a następnie metodą wanilinową można sobie wyznaczyć współczynnik, o który należy pomnożyć uzyskaną wartość aby uzyskać rzeczywistą zawartość lipidów w próbce.

Postępowanie

1. W suchej probówce umieścić próbę badaną (50 μ l) i dodać 2 ml stężonego kwasu siarkowego; ostrożnie, ale dobrze wymieszać i ogrzewać przez 20 min na wrzącej łaźni wodnej, ochłodzić. Podobnie postąpić z próbą wzorcową używając 50 μ l wzorcowego roztworu cholesterolu.
2. Pobrać do próbek po 0,1 ml powyższych hydrolizatów (próby badanej i wzorca), dodać 4 ml odczynnika waniliowego wymieszać i odstawić na 20 min.
3. Odczytać absorbancję próby badanej oraz wzorcowej przy 525 nm wobec próby ślepej odczynnikowej zawierającej zamiast hydrolizatu 0,1 ml stężonego kwasu siarkowego. Odczyty należy dokonać w ciągu 30 minut od zakończenia reakcji.
4. Ilość μ g lipidu w próbce obliczyć korzystając ze wzoru:

$$\mu\text{g lipidu w próbce (50}\mu\text{l)} = (A_{\text{pr. badanej}}) \times 350 / A_{\text{wzorca}}$$

Materiały i odczynniki

- 95–98% kwas siarkowy (VI)
- 0,01 M wanilina w 11,5 M kwasie ortofosforowym (V): do 115 ml 85% kwasu ortofosforowego (V) dodać 20 ml wody; odczynnik jest trwały przez rok
- wzorzec: 700 mg cholesterolu rozpuścić w 100 ml metanolu.