

10. ANALIZA SKŁADU TŁUSZCZOWCÓW

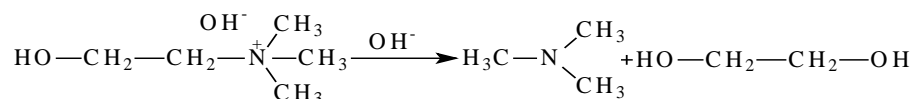
1. Identyfikacja lecytyny

Fosfatydylocholinę można zidentyfikować i odróżnić od innych glicerofosfolipidów poprzez wskazanie jej charakterystycznych składników, czyli choliny i fosforanu. Dzięki tym składnikom, tj.: fosfocholinie o charakterze hydrofilnym, lecytyna tworzy w wodzie dość trwałe emulsje. Lecytyna zawiera również kwasy tłuszczowe, ich obecność jest charakterystyczna dla wszystkich tłuszczowców, zawiera też glicerol, który jest składnikiem wszystkich glicerolipidów.

1.1. Wykrywanie choliny

Zasada:

W środowisku silnie zasadowym lecytyna ulega hydrolizie, uwolnioną cholinę można zidentyfikować. Cholina jest czwartorzędowym kationem amoniowym, który w tych warunkach rozpada się do trimetyloaminy i glikolu etylenowego.



Trimetyloamina ma charakterystyczny zapach solanki śledziowej, który pozwala zidentyfikować obecność choliny w fosfolipidach.

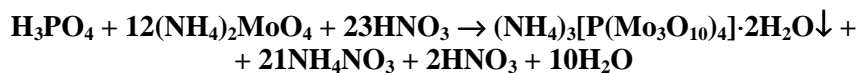
Wykonanie:

- Przygotować dwie probówki, do których wprowadzić:
 - do pierwszej probówki 5 kropli etanolowego roztworu lecytyny,
 - do drugiej probówki 5 kropli etanolu (próba ślepa).
- Do obu probówek dodać po 5 ml 20% roztworu NaOH.
- Ogrzewać około 5 minut we wrzącej łaźni wodnej. Wydzieli się lotna trimetyloamina o charakterystycznym zapachu solanki śledziowej, co wskazuje na obecność choliny w analizowanej próbce.

1.2. Wykrywanie fosforanów

Zasada:

Wykrywanie ortofosforanów w związkach organicznych, w tym również w fosfolipidach, jest skuteczne po zmineralizowaniu związku. W wyniku spalania prób fosforanów organicznych w osadzie pozostają tlenki różnych pierwiastków, także P_2O_5 . Wyługowany z osadu bezwodnik kwasu fosforowego, po zakwaszeniu stężonym kwasem azotowym (V) reaguje z molibdenianem amonowym, tworząc fosfomolibdenian amonowy $(NH_4)_3P(Mo_3O_{10})_4 \cdot 2H_2O$, czyli $(NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3$ o barwie żółtej.



Wykonanie:

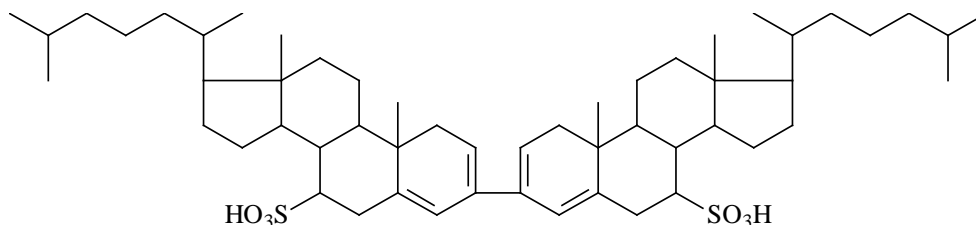
- Do suchego tygla porcelanowego wprowadzić 1 ml alkoholowego roztworu lecytyny, pod dygestorium odparować etanol, podgrzewając tygiel na płytce elektrycznej, po czym dodać 3-krotną ilość mieszaniny spalającej KNO_3/Na_2CO_3 (w stosunku 2:3) i próbę stopić.
- Uzyskany stop rozpuścić w 2–3 ml gorącej wody i przesączyć. Do przesącza dodać w nadmiarze stężonego HNO_3 i 2 ml 10% roztworu molibdenianu amonu. Zawartość probówki ogrzać do wrzenia w łaźni wodnej.
W trakcie ogrzewania pojawia się żółto zabarwiony fosfomolibdenian amonowy, który przy większych stężeniach wytrąca się w postaci krystalicznego żółtego osadu.

2. Wykrywanie sterydów i karotenów

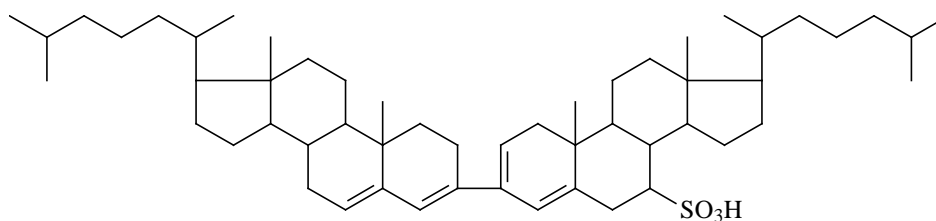
2.1. Wykrywanie cholesterolu

Zasada:

Cholesterol (zawierający wiązanie podwójne) pod wpływem stężonego kwasu siarkowego ulega odwodnieniu, odłączana jest cząsteczka wody i pojawiają się sprzężone wiązania podwójne odpowiedzialne za pojawienie się barwy. **W odczynie Salkowskiego** powstaje kwas disulfonowy bicholestadienu o barwie czerwonej.



W odczynie **Liebermanna-Burcharda** w obecności kwasu siarkowego i bezwodnika kwasu octowego powstaje zielono zabarwiony kwas monosulfonowy bicholestadienu. Reakcja ta jest wykorzystywana do ilościowego oznaczania cholesterolu w płynach biologicznych.



W obu reakcjach zachodzi odwodnienie cząsteczek cholesterolu. Obecność śladów wody uniemożliwia przebieg reakcji. Analizy te należy przeprowadzać, używając suchych probówek i pipet.

Wykonanie odczynu Salkowskiego:

- Przygotować cztery suche probówki zawierające po 1 ml chloroformu. Dodać do nich:
 - 5 kropli 2% chloroformowego roztworu cholesterolu – do pierwszej,
 - 5 kropli rozpuszczonego masła – do drugiej,
 - 5 kropli lecytyny – do trzeciej,
 - 5 kropli oleju – do czwartej.
- Wszystkie probówki dokładnie wymieszać przez wytrząsanie.
- Następnie do każdej próby podwarstwić (przez swobodne spłynięcie po ściance pochylonej probówki) 0,5 ml stężonego kwasu siarkowego.
- Warstwa chloroformowa barwi się na kolor malinowy, natomiast dolna warstwa wykazuje zieloną fluorescencję.
- Porównaj barwy poszczególnych prób, zinterpretuj uzyskane wyniki.

Wykonanie odczynu Liebermanna-Burcharda:

- Do suchej probówki zawierającej 1 ml 2% chloroformowego roztworu cholesterolu dodać 10 kropli bezwodnika kwasu octowego i 1 kroplę stężonego kwasu siarkowego. Wymieszać. Pojawiająca się barwa czerwona przechodzi w barwę niebieską, a następnie w zieloną.

2.2. Wykrywanie hormonów steroidowych

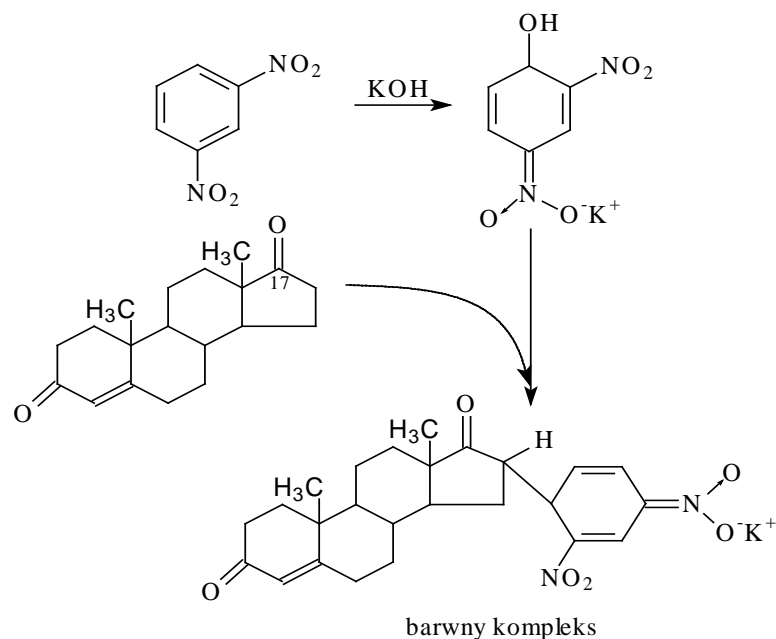
Zasada:

Chemiczne odróżnienie nieznacznych różnic w strukturze hormonów steroidowych jest ograniczone, szczególnie w płynach biologicznych, które zwykle są mieszaniną wielu steroidów. Hormony steroidowe C21, które zawierają ugrupowania $17\alpha,21$ -dihydroksy-20-okso, czyli: 11-deoksykortyzol, kortyzol i kortyzon, w środowisku kwaśnym reakcji Portera i Silbera z fenylhydrazyną tworzą 3,20- lub 3,21-fenylhydrazony o barwie żółtobrunatnej. Grupa 17-oksosteroidów (do której należą metabolity męskich hormonów płciowych oraz niektóre nadnerczowe steroidy C19) charakteryzuje się obecnością grupy ketonowej przy C17, która w środowisku zasadowym reakcji Zimmermanna daje czerwono zabarwiony produkt kondensacji z m-dinitrobenzenem. Wszystkie estrogeny, czyli steroidy C18: estradiol, estron, estriol, mają w swej strukturze aromatyczny pierścień A oraz grupę hydroksylową o charakterze fenolowym w tym pierścieniu, które w obecności stężonego kwasu siarkowego i hydrochinonu tworzą barwne produkty w reakcji Kobera.

Wykonanie próby Portera i Silbera:

- Przygotować dwie probówki zawierające po:
 - 0,5 ml 0,005% etanolowego roztworu kortyzolu – w pierwszej,
 - 0,5 ml etanolu (ślepa) – w drugiej.
- Do obu prób dodać po 1,5 ml 0,065% roztworu fenylhydrazyny w kwasie siarkowym (62%).
- Próby ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 30 minut. Dodatni odczyn jest wówczas, gdy pojawia się żółtobrunatne zabarwienie próby.

Reakcja Zimmermanna:



Wykonanie próby Zimmermanna:

- Przygotować dwie probówki zawierające po:
 - 0,5 ml etanolowego roztworu androsteronu ($6 \times 10^{-4}\%$) – w pierwszej,
 - 0,5 ml etanolu (ślepa) – w drugiej probówce.
- Do obu prób dodać po 0,5 ml 1% etanolowego roztworu m-dinitrobenzenu, wymieszać, po czym do obu dodać po: 0,5 ml 8 M roztworu NaOH w celu zakwaszenia.
- Dodatni odczyn jest wówczas, gdy pojawia się czerwone zabarwienie próby, które pogłębia się w czasie przetrzymywania (do 20 min) prób w ciemności w temperaturze pokojowej.

Wykonanie próby Kobera:

- Przygotować dwie probówki zawierające po:
 - 0,5 ml 0,005% etanolowego roztworu estradiolu – w pierwszej,
 - 0,5 ml etanolu (ślepa) – w drugiej probówce.
- Do obu prób dodać po 2 ml 4% roztworu hydrochinonu w stężonym kwasie siarkowym, wymieszać i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 10 minut.

- Dodatni odczyn jest wówczas, gdy pojawia się różowoczerwone zabarwienie próby.

2.3. Wykrywanie witamin D i A

Zasada:

Karotenowce i witamina A wchodzą w reakcję barwną z nasyconym chloroformowym roztworem chlorku antymonowego (SbCl_3), dając zabarwienie niebieskie, które w obecności cholekalcyferolu (witaminy D) szybko przechodzi w fioletowoczerwone. Podczas wykonywania analiz używać wyłącznie suchej pipety, ponieważ woda powoduje hydrolizę SbCl_3 , co przyczynia się do zatykania pipet.

Wykonanie:

- Przygotować pięć suchych próbek zawierających po 0,5 ml nasyconego roztworu SbCl_3 w chloroformie. Następnie dodać:
 - 1 kroplę chloroformowego roztworu witamin A+D – do pierwszej,
 - 1 kroplę chloroformowego roztworu witaminy A – do drugiej,
 - 5 kropli chloroformowego roztworu witaminy D – do trzeciej,
 - 5 kropli rozpuszczonego masła – do czwartej,
 - 1 kroplę chloroformu (ślepa) – do piątej.
- Porównać barwy próby ślepej z próbkami zawierającymi witaminy oraz tłuszcz, zinterpretować uzyskane wyniki.

ODCZYNNIKI

Etanolewy roztwór lecytyny; 10% roztwór masła (lub smalcu) w etanolu; 10% roztwór oleju w etanolu; etanol; 20% roztwór NaOH; mieszanina spalająca $\text{KNO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (w stosunku 2:3); stężone HNO_3 ; 10% roztwór $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$; chloroformowy roztwór 2% cholesterolu; stężony H_2SO_4 ; bezwodnik kwasu octowego; etanolewy roztwór 0,005% kortyzolu; 0,065% roztwór fenylohydrazyny w kwasie siarkowym (62%); etanolewy roztwór androsteronu ($6 \times 10^{-4}\%$); etanolewy roztwór 1% m-dinitrobenzenu; 8 M roztwór NaOH; etanolewy roztwór 0,005% estradiolu; 4% roztwór hydrochinonu w stężonym kwasie siarkowym; nasycony roztwór SbCl_3 w chloroformie; chloroformowe roztwory witamin: A, D i A+D.