

# 9. IZOLACJA I CHARAKTERYSTYKA TŁUSZCZOWCÓW

## EKSTRAKCJA LIPIDÓW Z MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

### Zasada:

Lipidy nie rozpuszczają się w wodzie, lecz w rozpuszczalnikach organicznych, np. benzynie, chloroformie, eterze, alkoholu, acetonie i innych, choć w różnym stopniu, zależnie od warunków. Właściwości te stanowią podstawę metod ekstrakcji i frakcjonowania lipidów z każdego materiału biologicznego, zarówno o strukturze komórkowej, tkankowej, jak i z macierzy pozakomórkowej, w tym z surowicy krwi. Rozdzielanie tłuszczów prostych od tłuszczów złożonych opiera się na ich odmiennej rozpuszczalności w zimnym acetonie. Tłuszcze proste oraz pochodne lipidowe (estry steroli i kwasów tłuszczowych) rozpuszczają się w zimnym acetonie, natomiast tłuszcze złożone (lecytyny, kefaliny, sfingomieliny i glikolipidy) są nierozpuszczalne. Lipidy obecne w surowicy krwi są składnikami lipoprotein, które są rozpuszczalnymi w wodzie kompleksami białkowo-lipidowymi. W ekstrakcie lipidowym surowicy stwierdza się obecność triacylogliceroli, fosfolipidów, cholesterolu wolnego i zestryfikowanego oraz wolnych kwasów tłuszczowych. Dogodnym źródłem otrzymywania lecytyny są komórki jajowe bogatożółtkowe, ponieważ obecne w nich złożone deutoplazmatyczne zawierają wiele tłuszczowców, wśród których lecytyna stanowi znaczącą część. Ekstrakcję lecytyny przeprowadza się przy użyciu rozpuszczalników organicznych.

### 1. Ekstrakcja lipidów z surowicy krwi

#### Wykonanie:

- Do probówki wirówkowej odmierzyć 0,5 ml surowicy, dodać 10 ml mieszaniny chloroform – metanol (w stosunku 2:1), probówkę zamknąć korkiem i wstawić na 30 minut do wytrząsarki.
- Następnie dodać 2 ml 0,1 M roztworu NaCl i dalej wytrząsać przez 10 minut. Po tym czasie próby wirować przy 3000 obr./min przez 10 minut.

- Po odwirowaniu warstwę górną, wodno-alkoholową, odpipetować i odrzucić, natomiast warstwę dolną, chloroformową, zachować, ponieważ jest lipidowym ekstraktem surowicy.
- Ekstrakt lipidów surowicy przeznaczony jest do rozdziału metodą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym na poszczególne frakcje lipidów lub do analiz jakościowych.

## 2. Ekstrakcja lecytyny z żółtka jaja kurzego

### Wykonanie:

- W moździerzu porcelanowym umieścić 3 g suchego, sproszkowanego żółtka (lub świeżego), zalać 10 ml mieszaniny chloroform – metanol (w stosunku 2:1) i rozcierać przez 5 minut.
- Następnie ekstrakt przesączyć przez sączek zwilżony mieszaniną ekstrakcyjną. Przesącz odparować do sucha we wrzącej łaźni wodnej, pod dygestorium.
- Pozostała oleista, pomarańczowobrunatna masa po ostudzeniu przyjmuje konsystencję wazeliny i stanowi surowy ekstrakt lecytyny. Otrzymany surowy ekstrakt lecytyny jest zanieczyszczony różnymi związkami, w tym barwnikami należącymi do karotenów. Ekstrakt przeznaczyć do dalszych analiz jakościowych.

## CHARAKTERYSTYKA JAKOŚCIOWA LIPIDÓW

W zależności od rodzaju, świeżości i stopnia zanieczyszczenia tłuszcze mają różne wartości liczb tłuszczowych, czyli: liczby kwasowej, liczby zmydlenia i liczby jodowej.

**Liczba kwasowa** jest to ilość KOH potrzebna do zobojętnienia wolnych kwasów tłuszczowych zawartych w 1 g tłuszczu. Jej wartość jest miarą zawartości w tłuszczu wolnych kwasów tłuszczowych, powstałych wskutek rozerwania części wiązań estrowych, których ilość zależy od warunków i czasu przechowywania tłuszczu oraz obecnych zanieczyszczeń. Tłuszcze nieświeże lub zafałszowane wolnymi kwasami tłuszczowymi posiadają wysokie liczby kwasowe.

**Liczba zmydlenia** jest to ilość miligramów KOH, potrzebna do zmydlenia (zhydrolizowania) 1 g tłuszczu i zobojętnienia zawartych w nim wolnych kwasów tłuszczowych. Jej wartość jest odwrotnie proporcjonalna do średniej masy cząsteczkowej (a tym samym do długości łańcucha węglowodorowego) kwasów tłuszczowych wchodzących w skład danego tłuszczu. Wysoką wartość liczby zmydlenia posiadają tłuszcze zawierające stosunkowo dużą ilość kwasów o krótkich łańcuchach, takich jak np. kwas masłowy, kapronowy i kaprylowy.

Niską wartość liczby zmydlania mają tłuszcze charakteryzujące się dużą zawartością kwasów tłuszczowych o długich łańcuchach węglowodorowych.

**Liczba jodowa** jest to ilość gramów jodu, którą mogą przyłączyć nienasycone kwasy tłuszczowe zawarte w 100 g danego tłuszczu. Jej wartość jest miarą zawartości w tłuszczu nienasyconych kwasów tłuszczowych. Wysoką liczbą jodową charakteryzują się tłuszcze bogate w nienasycone kwasy tłuszczowe, np. oleje roślinne lub tran, natomiast niską charakteryzują się tłuszcze ubogie w nienasycone kwasy tłuszczowe, np. triacyloglicerole zwierzęce. Liczba jodowa służy do charakterystyki różnego pochodzenia tłuszczów (roślinnych, wątroby niektórych ryb, zwierzęcych).

### 3. Oznaczanie liczby kwasowej tłuszczów

#### Zasada:

Rozpuszczony tłuszcz miareczkuje się 0,1 M roztworem KOH w obecności fenoloftaleiny do trwałego różowego zabarwienia. Tak samo postępuje się z próbą ślepa, którą jest sam rozpuszczalnik. Liczba moli zużytego roztworu wodorotlenku potasu zużyta do miareczkowania równa jest liczbie moli wolnych kwasów tłuszczowych w analizowanej próbce.

#### OBLICZANIE WYNIKÓW:

$$\text{liczba kwasowa} = 5,611 \cdot (x-y)/c$$

gdzie:

x – ilość ml 0,1 M KOH zużyta na miareczkowanie próby badanego tłuszczu

y – ilość ml 0,1 M KOH zużyta na miareczkowanie próby ślepej

c – ilość gramów tłuszczu

#### Wykonanie:

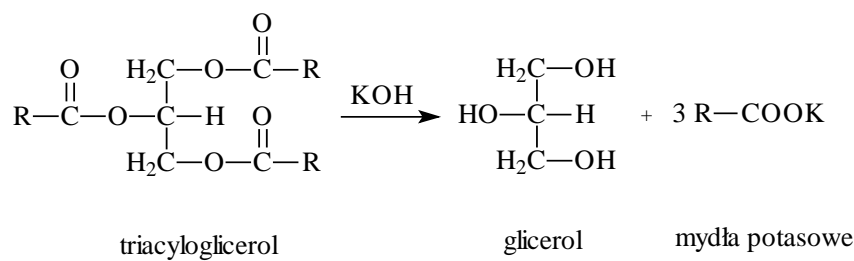
- Przygotować trzy kolby stożkowe o pojemności 100 ml, do których należy wprowadzić:
  - 5 g tłuszczu I i 30 ml alkoholu etylowego – do pierwszej kolby,
  - 5 g tłuszczu II i 30 ml alkoholu etylowego – do drugiej kolby,
  - 30 ml alkoholu etylowego (próba ślepa) – do trzeciej kolby.
- Wszystkie kolby lekko podgrzać, do rozpuszczenia tłuszczu.
- Po schłodzeniu, każdą próbę:

miareczkować 0,1 M roztworem KOH w obecności fenoloftaleiny. Obliczyć wartości liczb kwasowych dla obu prób tłuszczów, porównać i zinterpretować uzyskane wyniki, wskazując, który z oznaczanych tłuszczów jest nieświeży.

#### 4. Zmydlanie tłuszczów, odczyn na obecność kwasów tłuszczowych

##### Zasada:

Reakcja zmydlania, czyli hydrolizy tłuszczów – zarówno prostych, jak i fosfolipidów – zachodzi łatwo w środowisku zasadowym. Produktami reakcji, poza alkoholem, są mydła, czyli sole wyższych kwasów tłuszczowych.



Mydła potasowe i sodowe są rozpuszczalne w wodzie. Jako sole słabych kwasów oraz mocnych zasad wykazują odczyn zasadowy. Mydła rozpuszczalne w wodzie są substancjami powierzchniowo czynnymi, czyli detergentami. Natomiast mydła wapniowe lub magnezowe są nierozpuszczalne w wodzie i wytrącają się z roztworu.

##### Wykonanie:

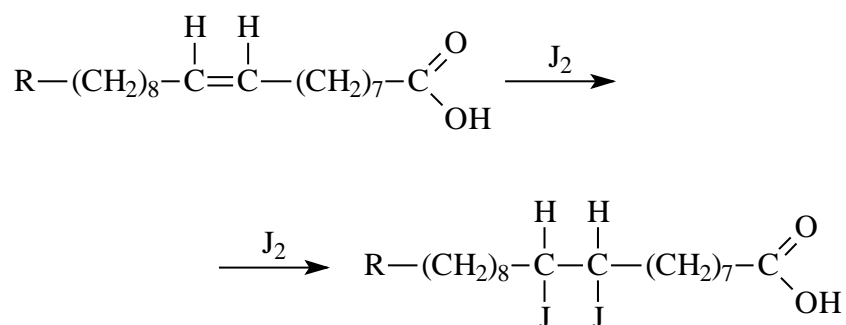
- Przygotować suchą próbkę, do której wprowadzić:
  - 5 kropli oliwy lub innego tłuszczu wskazanego przez asystenta,
  - 5 ml 10% alkoholowego roztworu KOH.
- Ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej do otrzymania około 2 ml opalizującego roztworu, po odparowaniu alkoholu (po 10–15 min). Wstrząsnąć probówką, pienie się roztworu świadczy o obecności w nim mydeł.
- Następnie otrzymany roztwór mydeł rozdzielić równo do dwóch probówek.
- Do jednej probówki dodać parę kropli 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, aż do uzyskania odczynu kwaśnego (sprawdzić wobec papierka wskaźnikowego). W tych warunkach wytrącają się nierozpuszczalne w wodzie kwasy tłuszczowe.

- Do drugiej probówki dodawać kroplami 1 M roztwór CaCl<sub>2</sub>, aż do pojawienia się osadu nierozpuszczalnych w wodzie mydeł wapniowych.

## 5. Wykrywanie nienasyconych kwasów tłuszczowych

### Zasada:

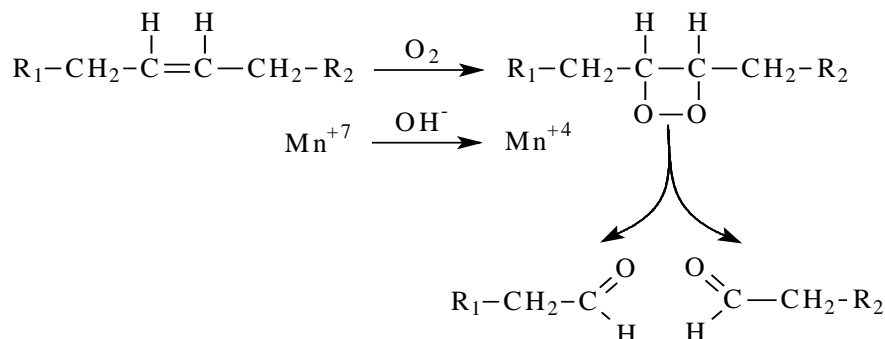
Reakcja addycji chlorowców do atomów węgla wiązania podwójnego stosowana jest jako próba chemiczna na obecność wiązań nienasyconych w związkach organicznych. Nienasycone kwasy tłuszczowe reagują z chlorowcami (J<sub>2</sub>, Br<sub>2</sub>, Cl<sub>2</sub>), które przyłączają się do wiązań podwójnych. Reakcje te są podstawą ilościowego oznaczania nienasyconych wiązań (oznaczanie liczby jodowej) oraz podstawą metod rozróżniania między nasyconymi i nienasyconymi kwasami tłuszczowymi. Wykrywanie wiązań podwójnych metodą Hübla opiera się na tym, że roztwór jodu ma brunatne zabarwienie, natomiast po addycji jodu do wiązań podwójnych (w obecności katalizatora reakcji HgCl<sub>2</sub>) następuje odbarwienie roztworu, gdyż jod cząsteczkowy przechodzi w bezbarwny jon jodkowy, związany organicznie. W reakcji Hübla dochodzi do przyłączenia dwóch atomów jodu do każdego podwójnego wiązania w łańcuchu kwasu tłuszczowego.



gdzie:

R – reszta łańcucha węglowodorowego kwasu tłuszczowego.

Podobna sytuacja zachodzi, gdy zamiast jodu wykorzystuje się wodę bromową o żółtej barwie. Po addycji bromu pierwiastkowego do wiązań podwójnych następuje odbarwienie roztworu. Addycja tlenu do wiązań podwójnych nienasyconych kwasów tłuszczowych sprawia, że fioletowo zabarwiony roztwór nadmanganianu potasu odbarwia się, przechodząc w roztwór brązowy z powodu pojawienia się jonów Mn<sup>+4</sup>.



gdzie:

$\text{R}_1, \text{R}_2$  – reszta łańcucha węglowodorowego kwasu tłuszczowego.

Utlenianie wiązania podwójnego kwasu tłuszczowego nadmanganianem ( $\text{KMnO}_4$ ) ulega rozbięciu tylko w podwyższonej temperaturze i produktami są dwie cząsteczki niższych aldehydów, a  $\text{Mn}^{+7}$  w środowisku zasadowym redukuje się do  $\text{Mn}^{+4}$  (brunatny osad  $\text{MnO}_2$ ). Natomiast ta sama reakcja przeprowadzona na zimno dostarcza diolu, np. kwasu 9,10-dihydroksystearynowego.

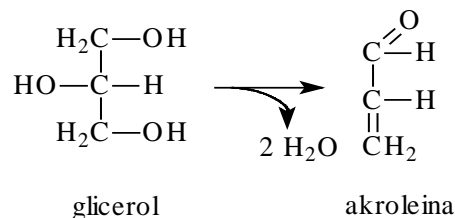
### Wykonanie:

- Do trzech probówek zawierających po 3 krople roztworu Hübla I (2,6% roztwór jodu w alkoholu) dodać:
  - 1 ml 10% (v/v) roztworu oleju w etanolu, do pierwszej probówki,
  - 1 ml 10% (v/v) roztworu masła (lub smalcu) w etanolu, do drugiej,
  - 1 ml etanolu (próba ślepa), do trzeciej probówki.
- Wszystkie próby dokładnie wymieszać.
- Do wszystkich probówek dodawać kroplami, jednocześnie mieszając, roztwór Hübla II (3% roztwór  $\text{HgCl}_2$  w etanolu), aż do odbarwienia prób badanych.
- Do próby ślepej dodać tę samą liczbę kropeł roztworu Hübla II, którą dodano do próby pierwszej. Porównać barwy próby ślepej z próbami zawierającymi różne rodzaje tłuszczów, zinterpretować uzyskane wyniki.

## 6. Wykrywanie glicerolu

### Zasada:

Glicerol, główny składnik glicerolipidów, ogrzewany w obecności czynników wiążących wodę (np.  $\text{KHSO}_4$ ), ulega odwodnieniu, przekształcając się w nienasycony aldehyd, zwany akroleiną.



Akroleina jako aldehyd wykazuje własności redukujące, dlatego można ją wykryć reakcją „lustro srebrnego”. Po dodaniu odczynnika Tollensa (amoniakalny roztwór azotanu srebra) wytrąca się srebro metaliczne, które tworzy lustrzaną warstwę na ścianach probówki. Pary akroleiny również redukują jony  $\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$ , obecne w bibule nasączonej odczynnikiem Tollensa, dlatego bibuła przybiera kolor brunatny, aż do czarnego, zależnie od stężenia akroleiny.

### Wykonanie:

- Przygotować trzy suche probówki, zawierające po około 0,2 g krystalicznego  $\text{KHSO}_4$ , następnie dodać:
  - 5 kropli glicerolu do pierwszej probówki,
  - 5 kropli 10% (v/v) etanolowego roztworu lecytyny, do drugiej,
  - 5 kropli etanolu (próba ślepa) do trzeciej probówki.
- U wylotu każdej probówki zawiesić pasek bibuły, uprzednio zwilżony w amoniakalnym roztworze  $\text{AgNO}_3$ .
- Probówki ogrzewać powoli w gorącej łaźni wodnej.
- Zaobserwować zmianę barwy bibuły w poszczególnych probówkach, zinterpretować uzyskane wyniki.

### ODCZYNNIKI

Surowica bydłęca; chloroform; metanol; mieszanina chloroform: metanol (w stosunku 2:1); 0,1 M roztwór  $\text{NaCl}$ ; sproszkowane żółtko; 0,1 M roztwór  $\text{KOH}$ ; tłuszcz I; tłuszcz II; alkohol etylowy; roztwór fenoloftaleiny; oliwa; 10% alkoholowy roztwór  $\text{KOH}$ ; 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 1 M roztwór  $\text{CaCl}_2$ ; roztwór Hübla I (2,6% roztwór jodu w etanolu); roztwór Hübla II (3% roztwór  $\text{HgCl}_2$  w etanolu); 10% roztwór oleju w etanolu; 10% roztwór masła (lub smalcu) w etanolu; etanolowy roztwór lecytyny; etanol; krystaliczny  $\text{KHSO}_4$  *in subst.*; glicerol; 10% amoniakalny roztwór  $\text{AgNO}_3$ .