

2. Wyodrębnianie i analiza jakościowa cholesterolu

A. Wyodrębnianie cholesterolu z mózgu

Metoda wyodrębniania cholesterolu z tkanek biologicznych wykorzystuje różnice w rozpuszczalności cholesterolu i pozostałych lipidów w acetonie.

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

1. Mózg cielęcy lub wieprzowy
2. Aceton
3. Etanol
4. Homogenizator
5. Sprzęt do sączenia pod obniżonym ciśnieniem (kolba ssawkowa + lejek Büchnera)
6. Wyparka rotacyjna próżniowa
7. Łażnia wodna
8. Szkło laboratoryjne: zlewki, kolby okrągłodenne i płaskodenne, cylindry miarowe, probówki

Wykonanie doświadczenia:

Do 10 g mózgu dodać 50 mL acetonu i dokładnie zhomogenizować. Zawiesinę odsączyć na lejku Büchnera. Stałą pozostałość ponownie zawiesić w 25 mL acetonu i odsączyć jak poprzednio. Z połączonych roztworów acetonowych usunąć rozpuszczalnik pod obniżonym ciśnieniem. Surowy cholesterol rozpuścić w minimalnej objętości gorącego etanolu (3-5 mL). Otrzymany roztwór cholesterolu w etanolu zebrać pipetą do suchego, zważonego naczynka wagowego i pozostawić do krystalizacji w temperaturze pokojowej. Osad zważyć i obliczyć zawartość cholesterolu w tkance.

B. Analiza jakościowa cholesterolu

Pod wpływem stężonego H_2SO_4 następuje odłączenie od cholesterolu cząsteczki wody i powstaje kwas disulfonowy bicholestadienu (odczyn Salkowskiego), natomiast w obecności kwasu siarkowego i bezwodnika kwasu octowego tworzy się kwas monosulfonowy bicholestadienu (odczyn Liebermana-Burcharda).

Odczynniki:

1. Stężony H_2SO_4
2. Bezwodnik kwasu octowego
3. Chloroformowy roztwór cholesterolu

Wykonanie doświadczenia:

Wykonać pokazowe doświadczenie dla komercyjnego cholesterolu (przygotować ok. 3-5ml cholesterolu w chloroformie – 10mg/ml) oraz dla cholesterolu wyodrębnionego w pierwszej części ćwiczenia.

a) Odczyn Salkowskiego

W suchej probówce umieścić 1 ml chloroformowego roztworu cholesterolu i podwarstwić stężonym kwasem siarkowym. Na granicy faz pojawia się czerwone zabarwienie, a roztwór wykazuje zieloną fluorescencję.

b) Odczyn Liebermana-Burcharda

W suchej probówce umieścić 1-2 mL chloroformowego roztworu cholesterolu, dodać 5-6 kropli bezwodnika kwasu octowego i 2 krople stężonego kwasu siarkowego. Pojawia się czerwone zabarwienie, które szybko przechodzi w barwę zieloną.

Zakres materiału:

Budowa steroidów, funkcje cholesterolu, pojęcie „dobry” i „zły” cholesterol (HDL, LDL); budowa fosfolipidów; budowa błon komórkowych, transport aktywny i bierny przez błonę komórkową, rola nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych w budowie błon biologicznych, kwasy tłuszczowe: palmitynowy, stearynowy, oleinowy, arachidowy, arachidonowy, linolowy, linolenowy; amfifilowość (amfipatyczność); liposom, mydło, micela.