

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. Sprzęt do sączenia pod normalnym ciśnieniem (na gorąco)
7. Wyparka rotacyjna próżniowa
8. Łażnia wodna
9. Szkło laboratoryjne: zlewki, kolby okrągłodenne i płaskodenne, cylindry miarowe, probówki

Wykonanie doświadczenia:

Do 20 g mózgu dodać 100 mL acetonu i dokładnie zhomogenizować. Zawiesinę odsączyć na lejku Büchnera. Stałą pozostałość ponownie zawiesić w 50 mL acetonu i odsączyć jak poprzednio. Z połączonych roztworów acetonowych usunąć rozpuszczalnik pod obniżonym ciśnieniem. Zagęszczony roztwór przesączyć. Surowy cholesterol rozpuścić w minimalnej objętości gorącego etanolu i jeśli zawiera jakieś nierozpuszczalne zanieczyszczenia, odsączyć na gorąco. Otrzymany roztwór cholesterolu w etanolu pozostawić do krystalizacji. Wykrystalizowany cholesterol odsączyć pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostawić w temperaturze pokojowej do wyschnięcia. 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:

a) Odczyn Salkowskiego

W suchej probówce umieścić 1 mL chloroformowego roztworu cholesterolu i podwarstwić stężonym kwasem siarkowym. Warstwa chloroformowa barwi się na kolor malinowy, natomiast dolna warstwa 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, budowa błon komórkowych, transport aktywny i bierny przez błonę komórkową, rola nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych w budowie błon biologicznych.