



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską

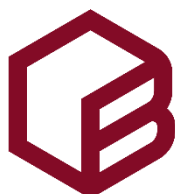


	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Projekt pt.: „STUDENCI HIPOKRATESA - kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej” w ramach programu Fundusze Europejskie dla Rozwoju Społecznego 2021-2027 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Plus, nr umowy: FERS.01.05-IP.08-0335/23-00

INSTRUKCJE DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z BIOCHEMII

*dla kierunku lekarskiego
Politechniki Bydgoskiej
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich*



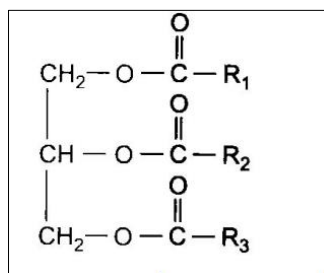
**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich



ĆWICZENIE 10

Tłuszcze

Tłuszcze (lipidy) są to związki pochodzenia naturalnego, nierozpuszczalne w wodzie, ale łatwo rozpuszczalne w organicznych rozpuszczalnikach niepolarnych i słabo polarnych. Pełnią one różne role biologiczne: modyfikujące białka, magazynujące dużą ilość energii, sygnalizacyjne, składniki błon biologicznych - fosfolipidy, glikolipidy i cholesterol. Tłuszcze to triestry kwasów tłuszczowych i glicerolu (gliceryny). Kwasy tłuszczowe są monokarboksyłowymi, alifatycznymi kwasami o parzystej liczbie atomów węgla w cząsteczce. Zawierają prosty (nasycony lub nienasycony) łańcuch węglowodorowy o parzystej liczbie atomów węgla.



Ogólny wzór tłuszczów

Mydła to sole sodowe lub potasowe wyższych kwasów karboksylowych, głównie stearynowego i palmitynowego. Powstają w wyniku reakcji odpowiednich kwasów z wodorotlenkiem sodu albo potasu oraz w rezultacie zasadowej hydrolizy tłuszczów.

Sterole są alkoholowymi pochodnymi steranu. Spośród steroli zwierzęcych najważniejsze to cholesterol i lanosterol. Cholesterol to organiczny związek chemiczny, który znajduje się we wszystkich komórkach ssaków. Wchodzi w skład błon komórkowych i wewnątrzkomórkowych, w znacznych ilościach występuje w mózgu i tkance nerwowej. Stanowi substrat do syntezy wszystkich steroidów występujących w organizmie, takich jak kortykosteroidy, hormony płciowe, kwasy żółciowe i witamina D.

Liczby określające przydatność spożywczą tłuszczów to: liczba kwasowa, liczba zmydlania, liczba jodowa, liczba Lea, liczba Reicherta – Meissla.

Liczba kwasowa (LK) jest to ilość mg KOH (NaOH), potrzebna do zobojętnienia wolnych kwasów organicznych zawartych w 1 g tłuszczu. Oznaczanie liczby kwasowej posiada znaczenie przy ocenie świeżości tłuszczów jadalnych. Świeże tłuszcze charakteryzują się niskimi liczbami kwasowymi. Wysokie liczby kwasowe



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



mają natomiast tłuszcze nieświeże, zjełczałe, częściowo zhydrolizowane, cechujące się wysoką zawartością wolnych kwasów organicznych.

1. Rozdział lipidów techniką chromatografii cienkowarstwowej

Na płytkę nanieść po 6 kropli chloroformowego roztworu glicerolu, kwasu oleinowego, kwasu stearynowego i cholesterolu oraz roztworu badanego na linię startu (około 3-4 cm od krawędzi płytki). Roztwory nanosić po kropli odparowując każdorazowo rozpuszczalnik, aby osiągnąć maksymalne stężenie substancji na małej powierzchni. Do komory chromatograficznej wlać mieszaninę rozpuszczalników stanowiącą fazę rozwijającą. Dno komory powinno być pokryte warstwą 0,5-1 cm fazy rozwijającej. Płytkę umieścić w komorze chromatograficznej i rozwijać techniką wstępującą. Po dotarciu fazy ruchomej na wysokość 2-3 cm poniżej górnej krawędzi płytki, płytkę wyjąć z komory i suszyć w strumieniu powietrza przez około 15 minut. Następnie spryskać powierzchnię płytki roztworem 50% H₂SO₄ i ogrzewać w suszarce w temperaturze 200°C do ukazania się plam. Wywołany chromatogram opracować rysując obraz oraz obliczyć dla każdego naniesionego roztworu współczynnik R_f według wzoru:

$$R_f = \frac{\text{droga, którą przebyła badana substancja [cm]}}{\text{droga, którą przebył układ rozwijający [cm]}}$$

2. Skład chemiczny tłuszczów prostych

a) Wykrywanie glicerolu (reakcja Wagenaara)

Umieścić w 2 probówkach po kropli glicerolu i oleju roślinnego. Do każdej dodać 1,5 ml 5% etanolowego roztworu NaOH i 0,29 ml roztworu siarczanu (VI) miedzi (II).

b) Wykazywanie kwasów tłuszczowych reakcją zmydlania

Nalać do probówki 1 ml oliwy (oleju) i 3 ml 20%NaOH. Wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 30 minut. Wytrąca się osad mydła. Część tego mydła przenieść bagietką



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



do czystej probówki i rozpuścić w wodzie destylowanej. Powinien powstać roztwór koloidalny, który opalizuje, a po wstrząśnięciu pieni się. Napisz reakcję zmydlania.

a) Wysalanie mydła

Wykonanie

Do 2 ml roztworu mydła z ćwiczenia 2 dodać NaCl do całkowitego nasycenia roztworu. Wypada osad wysolonego mydła. Odląć wodę z nad osadu i rozpuścić w wodzie.

b) Otrzymywanie mydła nierozpuszczalnego

Wykonanie

Do 2 ml roztworu mydła z ćwiczenia 2 dodać kroplami 1 N chlorku baru. Wytrąci się osad. Sprawdź jego rozpuszczalność w wodzie.

e) Wykazanie kwasów tłuszczowych nienasyconych

Do 3 ml chloroformowego roztworu oliwy (oleju), smalcu i margaryny dodać kroplami z zakraplacza roztworu Hübla do trwałego żółtego zabarwienia. Porównać liczbę kropeł zużytych przez te tłuszcze i wyciągnąć wnioski co do ich składu.

3. Oznaczanie liczby kwasowej (LK)

Wykonanie:

Do kolbki stożkowej o pojemności 250 ml odważyć 2 g tłuszczu, dodać 20 ml rozpuszczalnika i delikatnie ogrzewać mieszając do rozpuszczenia tłuszczu. Z ostudzonej zawartości kolbki pobrać do trzech kolbek po 5 ml roztworu. Do każdej kolbki dodać 3 krople wskaźnika. Następnie miareczkować 0,1 M etanolemowym roztworem NaOH do utrzymującej około minuty różowej barwy wskaźnika.

Równoległe należy wykonać próbę kontrolną: miareczkować 5 ml rozpuszczalnika z 3 kroplami wskaźnika.



Obliczenia dokonać wg wzoru:

$$LK = \frac{5,611 \times (a - b)}{0,75 \times c}$$

a- liczba ml 0,1 N KOH zużyta na miareczkowanie próby badanej,

b - liczba ml 0,1 N KOH zużyta na miareczkowanie rozpuszczalnika

c – ilość g tłuszczu

0,75 – ilość mg tłuszczu w 10 ml roztworu

5,611 – milirównoważnik KOH

4. Badania rozpuszczalności cholesterolu

Sprawdzić rozpuszczalność cholesterolu w wodzie zimnej i ciepłej, eterze, alkoholu, acetonie i chloroformie.

5. Reakcje charakterystyczne na cholesterol

- *Reakcja Liebermana – Burcharda*

Do 1 ml chloroformowego roztworu tłuszczu dodać 10 kropli bezwodnika kwasu octowego, po czym ostrożnie po ściankach probówki wprowadzić 2 krople stężonego kw. Siarkowego (VI).

Do drugiej suchej probówki odmierzyć 1 ml chloroformowego roztworu cholesterolu i dodać 10 kropli bezwodnika kwasu octowego oraz kroplę stężonego kwasu siarkowego (VI).

- **Reakcja Salkowskiego**

Do 1 ml chloroformowego roztworu tłuszczu dodać ok. 2 ml stężonego kwasu siarkowego (VI).

Do 1 ml chloroformowego roztworu cholesterolu nalać ostrożnie po ściankach probówki 1 ml stężonego kwasu siarkowego (VI) tak, aby oba płyny nie mieszały się.



Fosfolipidy

Fosfolipidy są lipidami złożonymi, które oprócz kwasów tłuszczowych i alkoholu zawierają resztę kwasu ortofosforowego (V). Główną rolą fosfolipidów jest budowa błon komórkowych. Lecytyny zaliczane są do fosfolipidów, w których reszta kwasu ortofosforowego (V) zestryfikowana jest choliną. Lecytyna jest najobficiej występującym fosfolipidem w komórkach eukariotycznych, występuje także w żółtku jaja kurzego.

1. Lecytyna

a) Rozpuszczalność lecytyny

Do dwóch probówek przenieść po szczypcie lecytyny.

Do jednej z nich dodać 2 ml H₂O i ogrzać przez kilka sekund we wrzącej łaźni wodnej. Zaobserwować mętną zawiesinę.

Do drugiej probówki dodać 1 ml chloroformu i podobnie ogrzać w łaźni wodnej.

Lecytyna rozpuszcza się w chloroformie. Dodać 2 ml acetonu - wytrąca się osad lecytyny.

2. Oznaczanie cholesterolu

Celem ćwiczenia jest oznaczenie stężenia cholesterolu całkowitego w próbkach żywności.

Cholesterol w obecności kwasu p-toluenosulfonowego, bezwodnika kwasu octowego i kwasu siarkowego daje zielone zabarwienie.

Przygotowanie badanej próbki: do 0,5 g badanej próbki żywności dodać 5 ml etanolu. Roztwór przesączyć przez bibułę filtracyjną.

Przygotowanie roztworów do analizy

Przygotować cztery probówki i oznaczyć je jako: 1) ślepa próba, 2) wzorzec, 3) i 4) próbka badana (oznaczenie wykonujemy w dwóch powtórzeniach).

Do probówek (1-ślepa, 2-wzorzec) odmierzyć:

- 0,2 ml wody destylowanej oraz 0,2 ml kwasu octowego.

Do próbówki (2-wzorzec)

- odmierzyć 0,2 ml wzorca cholesterolu.



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



Do próbek (3 i 4-próbka badana) odmierzyć 0,2 ml uprzednio przygotowanego ekstraktu cholesterolu oraz 0,2 ml kwasu octowego (dygestorium).

UWAGA! Kolejne odczynniki dodawać pod dygestorium !

Do wszystkich próbek dodać po 1 ml kwasu p-toluenosulfonowego i po 3 ml bezwodnika kwasu octowego (**UWAGA na reakcję egzotermiczną**).

Zawartość próbek delikatnie zamieszać, pozostawić do ochłodzenia do temperatury pokojowej.

Następnie do wszystkich próbek dodać (ostrożnie) 0,5 ml stężonego kwasu siarkowego (VI) (pod digestorium). Zawartości próbek delikatnie zamieszać i odstawić na około 20 min.

Wykonanie oznaczeń spektrofotometrycznych

Zmierzyć absorbancję roztworów przy długości 550 nm względem ślepej próby.

Wykorzystując metodę porównania z pojedynczym wzorcem obliczyć zawartość cholesterolu w analizowanej próbce. W obliczeniach przyjąć addytywność objętości. Wynik proszę podać w $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ produktu.