Otrzymywanie i chromatografia lipidów złożonych

Streszczenie

Lipidy złożone to bardzo szeroka grupa związków. Jednak ich analiza nie musi być trudna. Jedną z metod do analizy jakościowej (rzadziej ilościowej) lipidów złożonych stosuje się chromatografię cienkowarstwową (TLC). Daje ona rzetelne wyniki a jej wykonanie jest proste i tanie, możliwe do przeprowadzenia w każdym laboratorium.

Słowa kluczowe: lipidy złożone, chromatografia cienkowarstwowa,

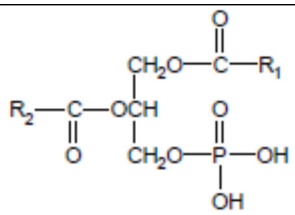
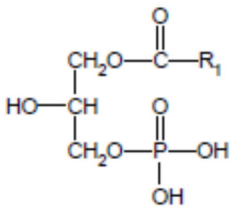
Wprowadzenie [1, 2, 3, 4]

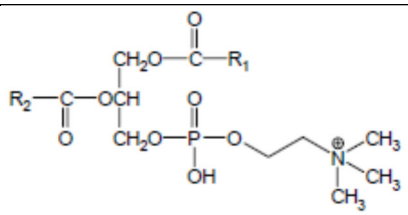
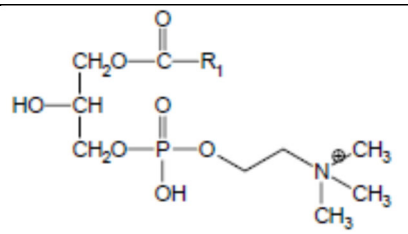
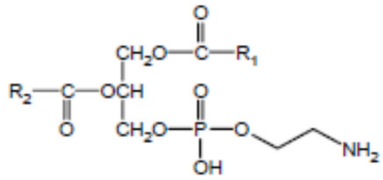
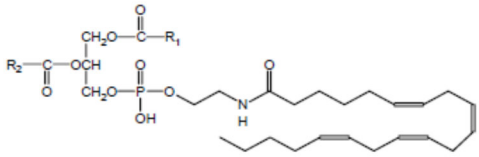
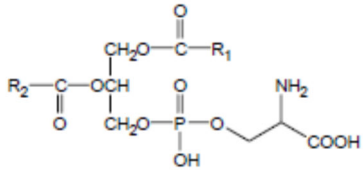
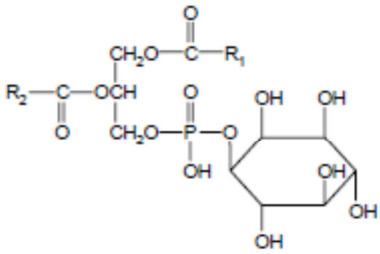
Tłuszczowce (lipidy) są to estry wyższych kwasów tłuszczowych i alkoholi. Alkohole wychodzące w skład lipidów mogą być jedno- lub wielowodorotlenowe. Lipidy dzielimy na:

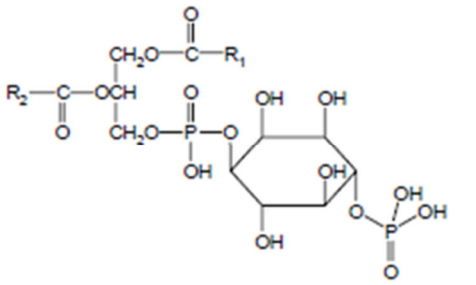
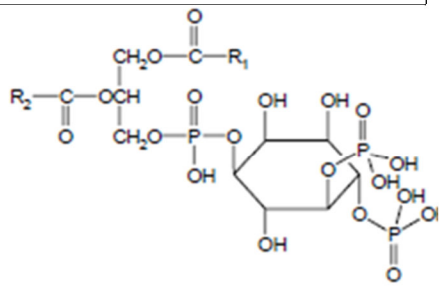
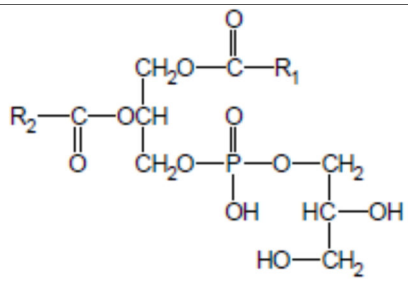
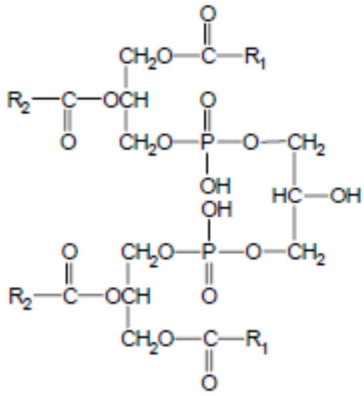
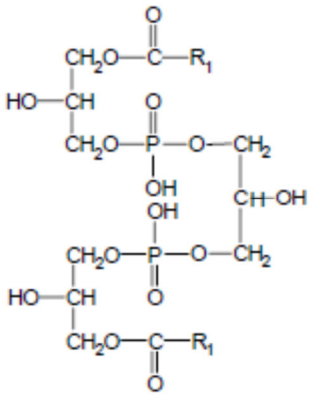
a. tłuszcze proste zwane również tłuszczami obojętnymi, składają się wyłącznie z kwasów tłuszczowych i alkoholi
b. złożone - składają się z kwasów tłuszczowych i alkoholi ale oprócz tych dwóch komponentów zawierają inne składniki, jak kwas fosforowy, zasady azotowe i inne.

Tłuszczowce złożone różnią się budową w zależności od nielipidowej części cząsteczki, stąd też wyróżnia się następujące trzy grupy lipidów złożonych:

1. **fosfolipidy** – lipidy posiadające w swojej strukturze resztę kwasu fosforowego, która jest przyłączona do organicznej części cząsteczki poprzez wiązanie estrowe (jest związana poprzez grupę –OH alkoholu); grupa różnorodna strukturalnie; związki tej grupy wchodzą w skład wszystkich błon komórkowych, ponieważ uczestniczą w aktywnym transporcie jonów oraz transport elektronów w mitochondriach. Podział tej grupy przedstawia Tabela 1.

Grupa	Właściwości/funkcje	Przykłady	Wzory strukturalne
kwasy fosfatydylowe	• pochodne mono- lub diglicerydów których cząsteczka zawiera fosforylowaną grupę hydroksylową • reszta fosforanowa przyłączona jest do grupy alkoholowej przy • węglu C3 • stymulują produkcję DNA i wzrost komórek, wpływają na gospodarkę jonami wapnia oraz na cytoszkielet i apoptozę	kwas fosfatydylowy	
		kwas lizofosfatydylowy	

fosfatydylocholina	• zawiera resztę aminy biogennej – choliny zamiast grupy –OH, • amina przyłączona jest wiązaniem estrowym do atomu fosforu. • Najpopularniejsze to lecytyna i lizolecytyna. • Zmniejszają napięcie powierzchniowe • Sprzyjają emulgacji tłuszczy	fosfatydylocholina	
		lizofosfatydylocholina	
Fosfatydyloetanoloamina (kefalina)	• zawiera zamiast choliny cząsteczkę etanoloaminy • jest głównym fosfolipidem bakteryjnym • tworzą je długołańcuchowe kwasy tłuszczowe np. stearynowy, palmitynowy	fosfatydyloetanoloamina	
		N-arachidonylofosfatydyloetanoloamina	
fosfatydyloseryna	• jest analogiem lecytyny • zawiera w miejscu reszty choliny cząsteczkę seryny • jest to jedyny fosfolipid zawierający aminokwas, izolowany z tkanek zwierzęcych • aktywuje kinazy proteinowe C, • uczestniczy ponadto w koagulacji komórek krwi	fosfatydyloseryna	
fosfatydyloinozytol	• jest fosfolipidem zawierającym w swojej budowie cząsteczkę *mezo*-inozytolu; przyłączoną do grupy fosforanowej poprzez hydroksyl związany z węglem C1 cyklitolu • związki te mogą posiadać dodatkowe grupy fosforanowe w pozycji 4 lub 4 i 5 inozytolu	fosfatydyloinozytol	

	• uczestniczą w przekazywaniu sygnałów	fosfatydylo-4-fosfoinozytol	
		fosfatydylo-4,5-difosfoinozytol	
fosfatydyloglicerol	• jest fosfolipidem zawierającym dwie reszty glicerolu przyłączone do jednej grupy fosforanowej; jedna z nich jest acylowana. • występują u bakterii, rzadziej w komórkach roślinnych i śladowych ilościach w komórkach zwierzęcych	fosfatydyloglicerol	
difosfatydyloglicerol (kardiolipiny)	• powstają na skutek przyłączenia dwóch fragmentów kwasu fosfatydylowego do glicerolu • istotny składnik błon mitochondrialnych oraz błon komórkowych bakterii	difosfatydyloglicerol	
		lizodifosfatydyloglicerol	

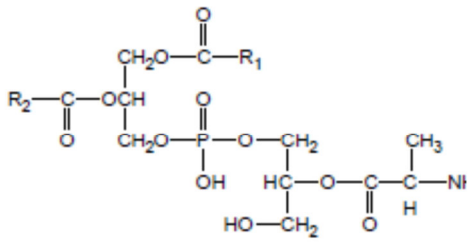
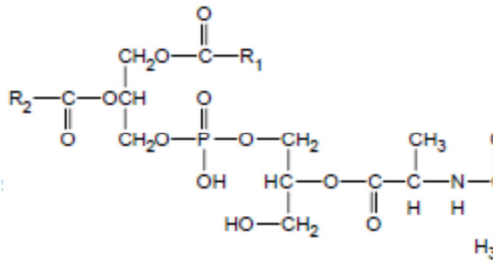
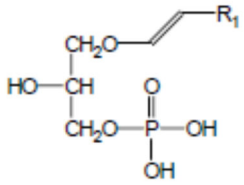
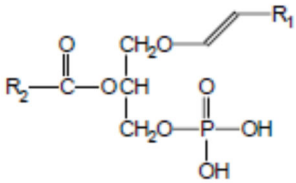
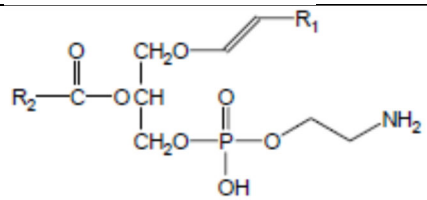
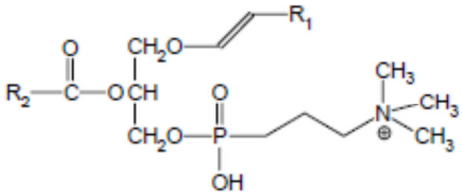
lipoaminokwasy	• zawierają resztę aminokwasową przyłączoną poprzez wiązanie estrowe do wolnych grup –OH w pozycji 2 lub 3 w difosfatydyloglicerol • mogą być uwikłane w strukturę peptydową	lipoaminokwas	
		lipopeptyd	
plazmalogeny	• grupy hydroksylowa przy węglu C1 gliceryny połączona wiązaniem eterowym z enolową formą aldehydu, utworzonego z któregoś z długołańcuchowych kwasów karboksylowych; powstały związek ulega fosforylacji w pozycji 3, tworząc kwas lizoplazmelinowy, który acylowany kwasem tłuszczowym w pozycji 2 daje w efekcie kwas plazmelinowy; • kwas ten tworzy estry z alkoholami • fosfolipidy mózgu i mięśni • znaczenie biologiczne tych związków nie jest do końca poznane	kwas lizoplazmelinowy	
		kwas plazmelinowy	
		plazmalogen etanoloaminowy	
		plazmalogen cholinowy	

Tabela 1. Podstawowe grupy fosfolipidów

2. **sfingozyny** – są pochodnymi 2-amino-1,3-dialkoholi, zwanych sfingozynami. Cząsteczki sfingozyny to wielowęglowych łańcuchy alifatycznych (C16-C20), które zawierają wiązania podwójne oraz rzadziej dodatkową grupę hydroksylową w pozycji 4. Występuje w komórkach zwierzęcych (sfingozyna d18:1 i dihydrosfingozyna d18:0), jak i roślinnych (fitosfingozyna t18:0). Sfingozyny w reakcji z kwasami tłuszczowymi tworzą amidy nazywane **ceramidami**. Grupy hydroksylowe umożliwiają dodatkową fosforylację. W organizmie ludzkim występują w tkance nerwowej i wątrobie, przy czym głównym

acylowym składnikiem sfingomielin wątroby jest kwas palmitynowy, mózgu – stearynowy i lignocerynowy. Związki te uczestniczą w przekazywaniu sygnałów przez błony komórkowe. Ostatnie badania wykazały obecność w organizmach owadów. Podstawowe grupy sfingomielin przedstawia Tabela 2.

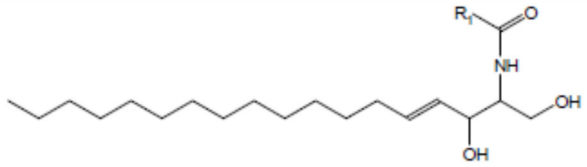
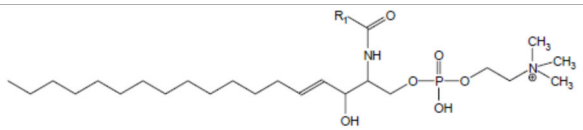
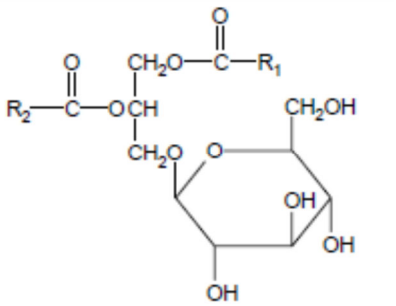
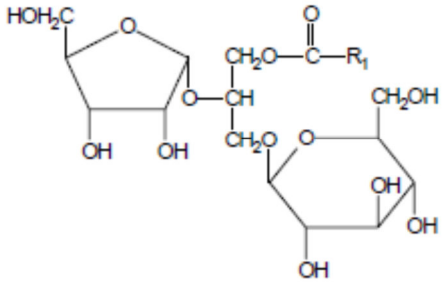
Grupa	Właściwości/funkcje	Przykłady	Wzory strukturalne
sfingozyny	• reagują z kwasami tłuszczowymi, tworząc amidy nazywane **ceramidami** • obecność wolnych grup hydroksylowych umożliwia z kolei fosforylację tych związków poprzez wytworzenie wiązań estrowych z resztą kwasu fosforowego • estry fosforanowe łączą się z kolei z cząsteczką choliny z wytworzeniem ważnych biologicznie **sfingomielin**	ceramidy	
		sfingomielina	

Tabela 2. Podstawowe grupy sfingozyn

3. **glikolipidy –** związki chemiczne zawierające wiązanie eterowe pomiędzy cząsteczką cukru a cząsteczką glicerolu (glikoglicerolipidach) bądź sfingozyny (glikosfingozydach). Podział glikoloipdów przedstawia tabela 3.

Grupa	Właściwości/funkcje	Przykłady	Wzory strukturalne
glikoglicerolipidy	• wiązanie eterowe tworzy grupa –OH przy anomerycznym atomie węgla sacharydu oraz grupa –OH w położeniu 3 glicerolu • fragmenty cukrowe mogą być zarówno mono- jak i oligosacharydami • grupy cukrowe mogą być sulfonowane lub aminocukrowe • części lipidowej cząsteczki zazwyczaj acylowane są wszystkie wolne grupy –OH. • występują one głównie u organizmów fotosyntetyzujących	glikoglicerolipid	
		diglikoglicerolipid	

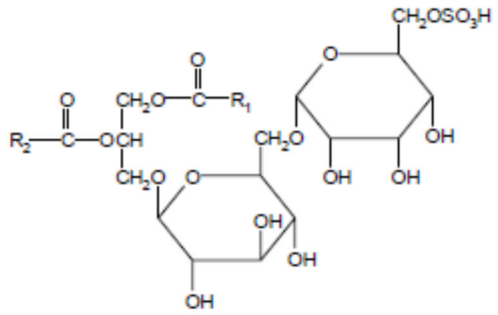
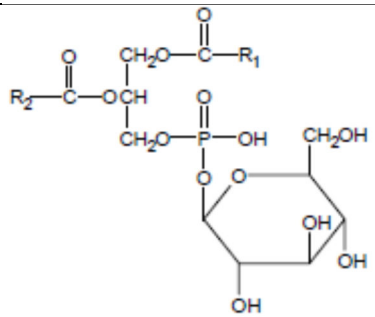
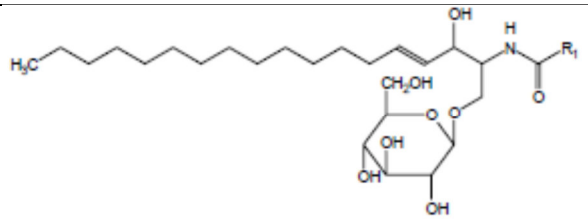
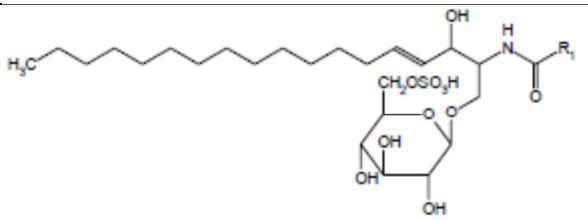
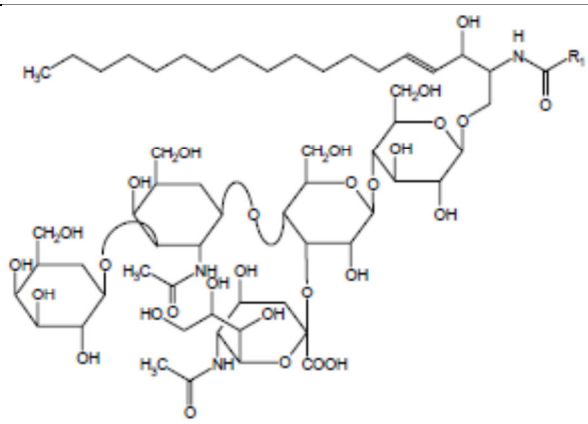
		sulfonowany glikoglicerolipid	
		fosfatydylosacharyd	
glikosfingozydy	• rozpowszechnione w tkankach żywych organizmów (tkanka nerwowa) • cerebrozydy (zawierające jedną resztę cukrową, przyłączoną do grupy hydroksylowej przy C-1 sfingozyny) • gangliozydy, zawierające w tej pozycji łańcuch oligosacharydowy.	cerebrozyd	
		sulfatyd	
		gangliozyd	

Tabela 3. Podstawowe grupy glikolipidów

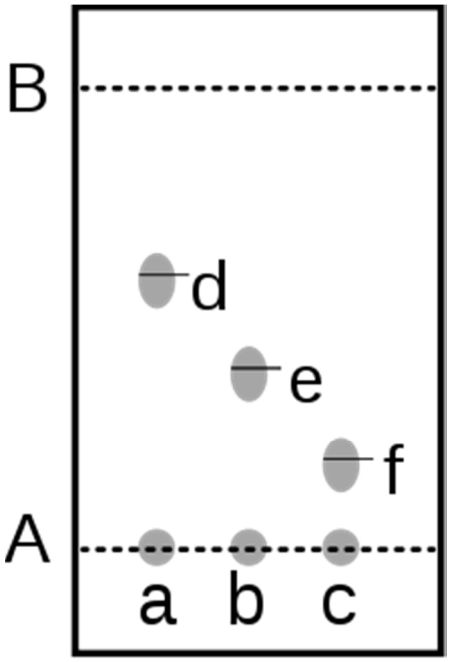
Wszystkie powyższe grupy lipidów złożonych można oznaczać metodą chromatografii cienkowarstwowej.

Wykonanie chromatografu cienkowarstwowego (TLC) [5]

Aby wykonać analizę lipidów złożonych należy rozpocząć wykonanie chromatogramu cienkowarstwowego od przygotowania komory chromatograficznej (zwykle stosuje się zlewkę laboratoryjną przykrytą szalką Petriego lub szkiełkiem zegarkowym). Następnie wlewamy do komory niewielką ilość (warstwę o wysokości ok. 0,5-1 cm) rozpuszczalnika lipidów złożonych. Tak przygotowaną komorę pozostawiamy na co najmniej 15 min. w celu wysycenia parami rozpuszczalnika. W tym czasie przygotowujemy płytki chromatograficzne. Szerokość płytki dostosowujemy do ilości nanoszonych substancji, przyjmując zasady podstawowe:

a. odstęp pomiędzy punktami startowymi powinny wynosić ok. 1 cm
b. zachowaniu min. 1 cm marginesów na brzegu
c. wysokość dobieramy tak aby pomiędzy linią startu a górną krawędzią płytki był odstęp 10,5-11 cm.

Płytkę o takich rozmiarach wycinamy ostrymi nożyczkami uważając aby nie zarysować jej powierzchni oraz nie dotknąć jej powierzchni palcami. Na dolnym brzegu zaznaczamy linię startu (około 1,5 cm od krawędzi, ołówkiem). Na linii tej zaznaczamy punktu startowe (zachowując 1 cm odstępy pomiędzy nimi oraz od boków płytki). Na punkty startowe nanosimy za pomocą kapilar rozcieńczone roztwory wzorców oraz próbki badane, starając się, aby średnica plamki nie przekraczała 5 mm. Płytkę umieszczamy w pozycji pionowej w komorze chromatograficznej. Należy pamiętać aby brzegi płytki nie stykały się ze ściankami naczynia (utrudnia ruch kapilarny). Gdy chromatogram zajmuje ok. 90% płytki, płytkę wyjmujemy z komory i suszymy.



Rysunek 1. Chromatografia cienkowarstwowej: a, b, c – punkty naniesienie przed rozwinięciem chromatografu; d, e, f – punkty a, b, c (odpowiednio) po rozwinięciu chromatografu [6].

Otrzymywanie lipidów złożonych [2]

Podstawowe etapy otrzymywania i chromatografii lipidów złożonych. Przykłady izolacji lipidów złożonych:

<u>a. Izolacja lipidów złożonych na przykładzie lecytyn</u>

Żółtko jaja należy potraktować mieszaniną eter-etanol (1:2) intensywnie mieszając przez 10 minut. Otrzymaną mieszaninę należy zwirować. Otrzymana mieszaninie heterogeniczną zdekantować a

nadmiar rozpuszczalnika odparować na wyparce rotacyjnej. Otrzymany osad ponownie rozpuść w eterze dietylowym (10 ml). Mieszając roztwór wkraplaj do niego aceton (50 ml). Powstały osad fosfolipidów odwiruj, przemyj acetonem (15 ml). Pobierz niewielką ilość osadu (ok. 10 mg) i pozostaw do analizy TLC. Resztę frakcji należy rozpuścić w 5 ml etanolu z dodatkiem chlorku kadmu. Po 10 minutowej inkubacji mieszaninie ponownie wirujemy w celu usunięcia przesączu. Pozostałość rozpuszcza się w chloroformie (15 ml) oraz dodaje 25 ml 30% etanolu i ponownie wirujemy. Warstwę etanolowo - wodną (górną) odrzucamy. Proces ekstrakcji chlorkiem kadmu należy powtórzyć kilka krotnie. Roztwór chloroformowy, po ostatniej ekstrakcji, należy odparować na wyparce, pozostałość rozpuść w eterze dietylowym (5 ml), i dodaj do niego acetonu (45 ml).Otrzymany osad to lecytyna. W celu oczyszczenia próbki można ja przemyć acetonem a następnie wysuszyć.

b. Izolacja lipidów mózgu lub wątroby

Mózg cielęcy lub wątroba musi zostać rozdrobniona (np. miksowanie). Rozdrobniona próbkę przenosimy do kolby stożkowej i zalewamy 250 ml acetonu. Mieszaninę wytrząsamy a osad dokładnie suszymy. Ok. 5 g sproszkowanego w moździerzu suchego mózgu (lub wątroby) zawieszonego w mieszaninie chloroform-metanol (2:1) umieść w zestawie do destylacji. Ogrzewaj do wrzenia przez 15 minut, mieszając okresowo zawartość kolby. Po ochłodzeniu osad odsączamy i suszymy.

c. Ekstrakcja lipidów z osocza

Do niewielkiej objętości surowicy krwi (0,5ml) wprowadź powoli 9,5 ml mieszaniny eteru etylowego z etanolem (3:1), wymieszaj i podgrzej umieszczając probówkę w gorącej wodzie na 2-3 minuty, mieszając ciągle zawartość. Osad należy odwirować a warstwę organiczną odparować. Otrzymany suchy osad przemywa się trzykrotnie w heksanie.

Chromatografia cienkowarstwowa lipidów [2, 5]

Do doświadczenia potrzebne są dwie komory chromatograficzne, na dno pierwszej wlewamy mieszaninę chloroform-metanol-woda (w stosunku molowym 65:25:4) - faza 1, do drugiej heksan-eter dietylowy-kwas octowy (w stosunku molowym 80:20:1) - faza 2. Komory pozostawia się pod przykryciem na 1 h w celu nasycenia parami rozpuszczalników. W tym czasie można przygotować płytki chromatograficzne najlepiej pokryte żelem krzemionkowym o dwóch różnych wymiarach, np. 2 o wymiarach 10x10 cm i 2 o wymiarach 5x10 cm. Na punkty startowe nanieś:

a. na płytkę do rozdziału lipidów polarnych (faza 1, większe płytki): nanosimy badane ekstrakty lipidów złożonych oraz ich wzorce: gangliozyd, L-fosfatydylocholinę, L-fosfatydyloetanolaminę, L-fosfatydylinozitol, L-fosfatidyloserynę, L-lizofosfatydylcholinę, sfingomielinę, galaktocerebrozyd, sulfatyd, kardiolipinę.

b. na płytkę do rozdziału lipidów niepolarnych (faza 2, mniejsze płytki) nanosimy badane ekstrakty lipidów złożonych oraz ich wzorce: 1-monooleilo-*rac*-glicerol, 1,3-dioleilo-*rac*-glicerol, trioleilo-*rac*-glicerol, cholesterol, oleśnian cholesterolu

Po rozwinięciu płytki wyjmij z komór, osusz a następnie zbadaj obecność lipidów pod lampą oraz wywołaj w parach jodu płytki oglądane wcześniej pod lampą UV. Otrzymane płytki spryskaj 50% kwasem siarkowym i ogrzej w suszarce do 1500˚C. Wyniki porównaj z wzorcami.

Podsumowanie

Artykuł ten pozwala zapoznać się z metodyką otrzymywania lipidów złożonych z frakcji organicznych oraz ich analizy metodą cienkowarstwowej chromatografii.

Literatura

[1] Jeremy M. Berg, Lubert Stryer, John L. Tymoczko. Biochemia. 2011. PWN
[2] Błażej Gierczyk, Grzegorz Schroeder. Fizykochemiczne podstawy życia. 2001. Uniwerystet im. Adama Mickiewicza. Poznań
[3] John McMurry: Chemia organiczna. Wyd. 4. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2000
[4] Robert T. Morrison, Robert N. Boyd. Chemia organiczna. 2012. PWN

[5] Zygfryd Witkiewicz. Podstawy Chromoatografii. 2000. PWN
[6] http://pl.wikipedia.org/wiki/Wsp%C3%B3%C5%82czynnik_op%C3%B3%C5%BAnienia