

POLITECHNIKA ŚLĄSKA

WYDZIAŁ CHEMICZNY

**KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ, BIOORGANICZNEJ
I BIOTECHNOLOGII**

Laboratorium z Chemii Związków

Naturalnych

Semestr VI

ĆWICZENIE 5

Wydzielanie lecytyny z żółtek jaj kurzych

Prowadzący: dr inż. Gabriela PASTUCH-GAWOŁEK
mgr inż. Roman KOMOR

Miejsce ćwiczenia: sala 7

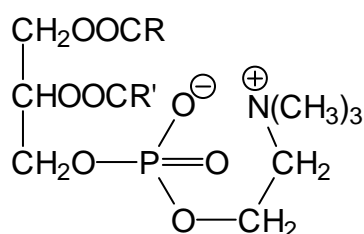
CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest wydzielenie fosfatydylocholina (lecytyny) z żółtek jaj kurzych, a następnie jej oczyszczenie metodą chromatografii kolumnowej.

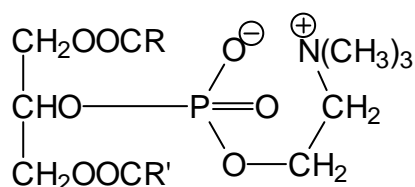
PODSTAWY TEORETYCZNE

Nazwa chemiczna lecytyny to fosfatydylocholina. Związek ten należy do grupy fosfolipidów, a otrzymuje się go zwykle z żółtek jajek kurzych lub z ziaren soi.

Lecytyny stanowią mieszaniny estrów kwasów α - i β -glicerynofosforowego (głównie tego ostatniego, β -lecytyny) i nienasyconych kwasów tłuszczowych. Ponadto zawierają resztę choliny, czyli wodorotlenku trimetylohydroksyetyloamoniowego, zestryfikowaną kwasem fosforowym. Ich budowę można przedstawić ogólnym wzorem:



α -lecytyny



β -lecytyny

Są to substancje maziste, barwy żółtobrunatnej, higroskopijne i rozpuszczalne w etanolu.

Lecytyna to substancja w pewnym sensie wyjątkowa, nie ma podobnego naturalnego produktu tak doskonale łączącego fizjologiczne, dietetyczne, farmaceutyczne i technologiczne funkcje w jednym kompleksie.

W organizmie człowieka lecytyna jest obecna w każdej komórce ciała, zwłaszcza jako składnik błon komórkowych. Bierze udział w rozmaitych procesach przemiany materii, jest bardzo ważnym elementem składowym mózgu i tkanki nerwowej, stanowi barierę ochronną ścian żołądka, ma poważny udział w gospodarce cholesterolem. Ponadto opóźnia procesy starzenia, pełni funkcje ochronne wobec wątroby, wspomaga wykorzystanie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, podnosi sprawność krążenia krwi.

Najważniejszym obszarem działania lecytyny jest funkcjonowanie układu nerwowego. Cholina zawarta w lecytynie pobudza układ nerwowy wzmacniając zdolność koncentracji i zapamiętywania. Niedobory choliny mają związek między innymi z chorobą Alzheimera, istnieją również doniesienia o efektywnym stosowaniu lecytyny w zwiększeniu koncentracji i pamięci u dzieci schizofrenicznych i autystycznych.

Lecytyna bierze udział w metabolizmie tłuszczu i cholesterolu. Jest to związane z obecnością w jej cząsteczce wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które wiążą się z cholesterolem ułatwiając jego transport i usuwanie z ustroju. Działanie lecytyny wpływa korzystnie na zmniejszenie ryzyka wystąpienia miażdżycy i związanych z nią schorzeń sercowo-naczyniowych.

Pozytywny wpływ lecytyny dostarczanej w pożywieniu tłumaczony jest także jej właściwościami emulgującymi co pozwala na rozbicie spożywanych tłuszczów i cholesterolu na małe cząstki i zapobieganie przyczepianiu się ich do płytek krwi lub do ścian naczyń krwionośnych. W przeciwnym wypadku wzrasta niebezpieczeństwo blokady naczyń krwionośnych (miażdżycy naczyń) lub powstają stany zakrzepowe (zakrzepy naczyń wieńcowych). Lecytyna jest nazywana pogromcą tłuszczu. Nie tylko wspomaga metabolizm tłuszczów, ale także zapobiega jego gromadzeniu w niechcianych miejscach. Ponadto ma pozytywny wpływ na układ mięśniowy, między innymi podnosi wytrzymałość mięśni.

Lecytyna jest odpowiedzialna za rozpuszczalność cholesterolu w żółci i chroni przed tworzeniem się kamieni żółciowych. Lecytyna oddziałuje również na funkcje wątroby. Niedobór choliny w pożywieniu sprzyja akumulacji lipidów w wątrobie. Zaobserwowano pozytywny wpływ lecytyny na wątrobę u alkoholików.

Lecytyna i cholina pełnią ważną funkcję w reprodukcji, udowodniono znaczenie zwiększonej ilości choliny w podtrzymaniu wzrostu płodu. Pewna forma lecytyny ma także istotne znaczenie w procesie implantacji zapłodnionego jaja w ścianie macicy. Dostarczanie lecytyny okazało się skuteczne w znoszeniu zaburzeń w sprawności seksualnej u mężczyzn.

Opisana poniżej metoda wydzielenia lecytyny z jaj kurzych polega na szybkim odwodnieniu żółtek bezwodnym acetonem, przy czym równocześnie następuje usunięcie karotenoidów, glicerydów i innych lipidów obojętnych. Z odwodnionego materiału ekstrahuje się fosfolipidy mieszaniną chloroformu i metanolu. Otrzymaną surową frakcję fosfolipidów oczyszcza się przez rozpuszczenie w eterze dietylowym i ponowne wytrącenie acetonem. Tak otrzymany preparat zawiera, obok fosfatydylocholiny, mniejsze ilości innych fosfolipidów (fosfatydyloserynę i fosfatydyloetanolaminę) oraz sfingolipidów. Dalsze oczyszczanie preparatu można uzyskać w wyniku chromatografii kolumnowej na tlenku glinu. Czystość otrzymanych preparatów można określić za pomocą chromatografii cienkowarstwowej.

WYKONANIE ĆWICZENIA

Zadanie 1. Otrzymanie preparatu lecytyny.

Sprzęt i akcesoria:

- ♦ mieszadła magnetyczne
- ♦ kolbki stożkowe z korkami
- ♦ lejki
- ♦ kolbki ssawkowe
- ♦ sączki
- ♦ wyparka próżniowa
- ♦ wirówka

Materiał i odczynniki:

- ♦ jaja kurze –2 sztuki
- ♦ aceton
- ♦ metanol
- ♦ chloroform
- ♦ eter dietylowy

Wykonanie ćwiczenia:

Żółtka z 2 jaj przenieść do dwóch kolbek stożkowych na 250 ml (po jednym żółtku do kolbki), dodać po 30 ml acetonu ochłodzonego do 6°C i mieszać na mieszadle magnetycznym przez minutę. Mieszaninę z każdej kolbki odsączyć na osobnym lejku Büchnera, a osady przenieść do kolbek i ponownie zadać po 30 ml zimnego acetonu. Mieszać minutę i odsączyć. Operację powtórzyć w sumie pięć razy. W rezultacie otrzymuje się sumarycznie około 20 g białego osadu.

Osad przenieść ponownie do 2 kolbek stożkowych i do każdej dodać 60 ml mieszaniny złożonej z 250 ml metanolu i 50 ml chloroformu (metanol:chloroform 5:1). Kolbki zatkać korkami, uszczelnić parafilmem, umieścić na mieszadle i mieszać przez 1h. Po tym czasie podzielić pomiędzy dwie sekcje, odsączyć osady z kolbek, a przesącze przenieść odpowiednio do dwóch zważonych kolbek okrągłodennych i oddestylować do sucha na wyparce próżniowej w temperaturze nie wyższej niż 40°C. Każdą z otrzymanych pozostałości rozpuścić w 5 ml bezwodnego zimnego eteru, przenieść do probówki Falcona na 50 ml a następnie dodać 45 ml zimnego acetonu. Całość odwirować przy prędkości 6000 (temperatura podczas wirowania 4°C). Uzyskane po odwirowaniu osady (sumarycznie około 2g) to surowy preparat lecytyny.

Zadanie 2. Oczyszczanie lecytyny metodą chromatografii kolumnowej.

Sprzęt:

- ♦ kolumny chromatograficzne
- ♦ komora i płytki do chromatografii cienkowarstwowej
- ♦ spryskiwacze do chromatogramów
- ♦ odbieralniki
- ♦ lampa UV

Materiał i odczynniki:

- ♦ surowy preparat lecytyny
- ♦ metanol
- ♦ chloroform
- ♦ tlenek glinu
- ♦ płytki TLC
- ♦ odczynnik Dragendorffa: Roztwór A- 1.7 g zasadowego azotanu bizmutu rozpuścić w 100 ml 20% kwasu octowego. Roztwór B- 10 g jodku potasu rozpuścić w 25 ml wody. Bezpośrednio przed użyciem zmieszać 20 ml roztworu A z 5 ml roztworu B i dodać 70 ml wody.
- ♦ 10% kwas siarkowy w etanolu

Wykonanie ćwiczenia:

Przygotowanie kolumn: tlenek glinu (2 oddzielne naważki po 10g), zawiesić w 30 ml mieszaniny chloroform:metanol (1:1) i dokładnie odpowietrzyć poprzez mieszanie. Na spiek w kolumnie nasypać cienką warstwę piasku, a następnie otrzymane zawiesiny wlewać porcjami po bagietce do kolumny chromatograficznej. Usunąć nadmiar rozpuszczalnika odpuszczając go kranikiem u dołu kolumny (pozostawić nad powierzchnią słupa adsorbentu kilkumilimetrową jego warstwę).

Każdy z preparatów lecytyny rozpuścić w 2 ml mieszaniny chloroform:metanol (1:1) i wprowadzić roztwór na kolumnę.

Kolumnę rozwijać eluując kolejno:

- ♦ 40 ml mieszaniny chloroform:metanol (1:1)
- ♦ 20 ml mieszniny chloroform:metanol:woda (2:5:2)

Szybkość elucji nie powinna być większa niż 4 ml/min. Zbierać 8 frakcji po 8 ml, zanalizować je metodą chromatografii cienkowarstwowej porównując z preparatem surowej lecytyny, a następnie zateżyć wyciek zawierający czyste frakcje lecytyny w zważonych kolbkach. Obliczyć wydajność etapu oczyszczania lecytyny uwzględniając

przy tym masę surowego preparatu przed oczyszczaniem oraz masę czystej frakcji lecytyny.

Chromatografia cienkowarstwowa:

Na 2 płytki (7×4 cm) pokryte żelem krzemionkowym nanieść punktowo roztwory: surowego preparatu lecytyny, supernatantu po odwirowaniu lecytyny oraz frakcji otrzymanych z kolumny (na pierwszą płytkę nanieść surową lecytynę, supernatant i trzy pierwsze frakcje z kolumny, na drugą płytkę nanieść pozostałych pięć frakcji z kolumny). Oba chromatogramy rozwinąć w układzie chloroform:metanol:woda (65:25:4). Po wyschnięciu obejrzeć je pod lampą UV i ołówkiem zaznaczyć widoczne plamki związku, a następnie wywołać przez umieszczenie w komorze z jodem, oraz poprzez spryskanie 10% etanolem kwasu siarkowego i ogrzanie na kuchence elektrycznej. Płytki można również wywołać przez spryskanie odczynnikami Dragendorffa.

Warunki zaliczenia ćwiczenia:

Aby uzyskać zaliczenie ćwiczenia należy zaliczyć sprawdzian teoretyczny (w formie pisemnej w pierwszym dniu wykonywania ćwiczenia) oraz oddać sprawozdanie (jedno na całą grupę) zawierające opis przebiegu ćwiczenia oraz wydajności lecytyny na poszczególnych etapach jej wydzielenia i oczyszczania.

Sprawozdanie należy oddać najpóźniej w dwa tygodnie po zakończeniu ćwiczenia. Każdy tydzień zwłoki spowoduje obniżenie oceny końcowej za to ćwiczenie.