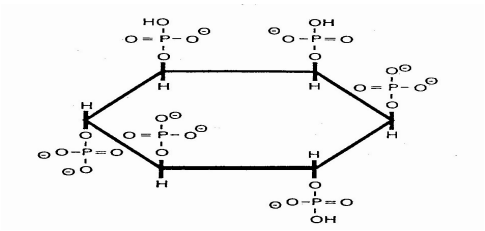
Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie.
Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

Oczyszczanie kwasu fitynowego techniką chromatografii jonowymiennej. Oznaczanie zawartości kwasu fitynowego oraz fosforu nieorganicznego w ziarniakach zbóż.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się metodyką rozdzielania mieszanin związków techniką chromatografii jonowymiennej oraz z metodami oznaczania fosforanu nieorganicznego i kwasu fitynowego

WPROWADZENIE

Kwas fitynowy (sześciofosforan inozytolu, 1,2,3,4,5,6-heksafosforan mioinozytolu, IP6) jest związkiem naturalnym, szeroko rozpowszechnionym w tkankach roślinnych i zwierzęcych.

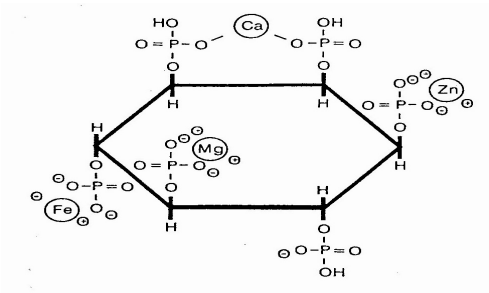


Rys. 1 wzór strukturalny sześciofosforanu inozytolu

Związek ten wraz z niższymi fosforanami inozytolu zaliczany jest do molekuł sygnałowych, spełniających szereg niezwykle istotnych i różnorodnych funkcji w metabolizmie podstawowym komórki. IP6 bierze udział m. in. w procesach naprawy i rekombinacji DNA, w eksporcie mRNA do cytoplazmy, w regulacji struktury chromatyny, w apoptozie oraz w utrzymaniu odporności komórki przeciw patogenom (Rabey, 2003). Przypuszcza się także , ze kwas fitynowy może być także wykorzystywany jako donor reszty fosforanowej do syntezy ATP. Związek ten wykazuje także właściwości antyoksydacyjne, co wiąże się ze zdolnością do chelatowania jonów żelaza Fe^{3+}. W przypadku organizmu człowieka potwierdzono funkcję tego związku w następujących procesach: w zapobieganiu agregacji płytek krwi, w regulacji rytmu serca, pobudzaniu neuronów związanym z chelatowaniem jonów wapnia oraz zapobieganiu kamicy nerkowej ze względu na przeciwdziałanie krystalizacji w płynach ustrojowych soli wapnia. W ostatnich latach duże zainteresowanie budzi postulowana aktywność protekcyjna i terapeutyczna fitynianu w chorobie nowotworowej jelita grubego (Węglarz i inni, 2003; Gonzales i inni, 2010). W przypadku roślin związek ten stanowi, obok niewielkich ilości niższych fosforanów inozytolu, główną formę zapasową fosforu w dojrzałych ziarniakach zbóż i nasionach roślin

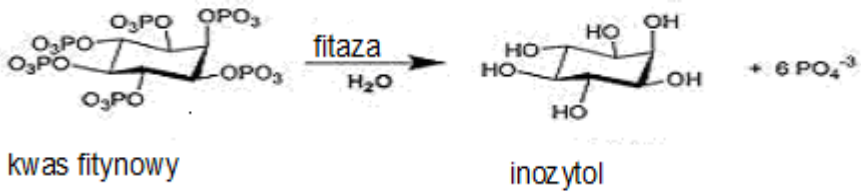
Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie.
Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

strączkowych. Nieznaczne ilości fitynianu występują również u innych roślin m.in. w bulwach ziemniaka, korzeniach marchwi oraz w częściach nadziemnych niektórych traw. Związek ten jest syntetyzowany i gromadzony w rosnących ziarniakach zbóż, głównie w ostatnim stadium dojrzewania. Jego zawartość jest zależna od gatunku i odmiany oraz warunków wzrostu i nawożenia rośliny. W całych ziarniakach jego zawartość może stanowić 0,3 do 1% s. m , natomiast w okrywie nasiennej i zarodku kilkakrotnie więcej. Ze względu na obecność sześciu zjonizowanych reszt fosforowych, kwas fitynowy wykazuje zdolność tworzenia nierozpuszczalnych soli z kationami metali głównie Mg^{2+}, Zn^{2+} i Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+} oraz Fe^{2+} i Fe^{3+}.



Rys. 2 kompleks kwasu fitynowego z jonami metali

Ta właściwość powoduje, ze kwas fitynowy uważany jest za związek wspomagający magazynowanie kationów metali w nasionach, niezbędnych dla rosnącej siewki. Badania wykazały, ze podczas kiełkowania ziarniaków zmniejsza się zawartość fitynianu a gwałtownie wzrasta aktywność fitazy (fosfohydrolazy heksafosforanu *mio*-inozytolu), enzymu odpowiedzialnego za hydrolizę kwasu fitynowego do niższych fosforanów *mio*-inozytolu



Rys. 3 całkowita defosforylacja kwasu fitynowego pod wpływem fitazy

W znaczących ilościach (0,5 - 10 mg/g) kwas fitynowy występuje w mąkach żytnich, pszennych oraz innych przetworzonych produktach zbożowych. Związek ten uważany za czynnik antyodżywczy, nie podlega trawieniu w przewodzie pokarmowym zwierząt

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie.
Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

monogastrycznych oraz człowieka. Przy wartościach pH występujących w jelitach kwas fitynowy tworzy trudno rozpuszczalne kompleksy z wcześniej wymienionymi jonami metali, co wpływa niekorzystnie na poziom dostępnych w pożywieniu soli mineralnych. Spożywanie pokarmów bogatych w kwas fitynowy może doprowadzić m.in. do niedoboru w organizmie żelaza lub krzywicy. Ponadto związek ten może zmniejszać rozpuszczalność niektórych białek powodując obniżenie ich funkcji fizjologicznej. Niekorzystny wpływ na zdrowie człowieka można złagodzić przez częściową defosforylację tego związku do niższych estrów fosforanowych inozytolu. Enzymatyczna defosforylacja fitynianu może zachodzić w dużym stopniu podczas technologicznego procesu przygotowania ciasta (fermentacji) na wskutek hydrolitycznego działania fitaz.. Obecnie bada się wpływ .dodawanych na etapie wypieku, komercyjnych preparatów mikrobiologicznych fitaz na zawartość fitynianu w ciastach i w pieczywie.

Ekstrakcja i oznaczanie kwasu fitynowego oraz niższych estrów fosforanowych inozytolu

Ekstrakcję kwasu fitynowego z otrąb zbożowych prowadzi się w rozcieńczonych roztworach kwasów, najczęsciej trichlooctowym, solnym lub siarkowym. Efektywność tego procesu zwykle zależy od czasu i intensywności wytrząsania prób podczas ekstrakcji.
Metody oznaczania zawartości fitynianu w ekstraktach można podzielić na bezpośrednie i pośrednie. W sposób pośredni oznaczano fitynian, obecnie rzadko stosowaną, metodą żelazową. W tej metodzie fitynan wytrącano chlorkiem żelaza (II) , utworzony kompleks Fe^{2+} -fitynian izolowano i powodowano jego rozkład w kwasie azotowym a następnie oznaczano ilość fosforu lub żelaza. Ze względu na pracochłonność tej metody obecnie kwas fitynowy oczyszcza się z ekstraktów metodami chromatografii cieczowej, nisko-lub wysokociśnieniowej.

Mieszaninę związków różniących się ładunkiem możemy rozdzielić technika chromatografii jonowymiennej. Ten typ chromatografii polega na odwracalnym wiązaniu obdarzonych ładunkiem makromolekuł na złożu jonowymiennym. Złoża stosowane w chromatografii jonowymiennej mogą być obdarzone ładunkiem ujemnym (kationity) ,matrycę stanowią wówczas polianiony, lub dodatnim (anionity), z matrycą polikationową. Kationity mają zdolność wymiany i wiązania kationów , anionity – anionów, wiec składniki rozdzielanej mieszaniny o ładunku ujemnym będą wiązały się do anionitu, o ujemnym do kationitu. Podstawowym parametrem określającym zdolność rozdzielczą jonowymieniaczy jest pojemność (capacity) określająca ilość grup czynnych, dostępnych dla rozdzielanych substancji znajdujących się w 1 gramie nośnika.

Na ćwiczeniach oczyszczanie ekstraktu ze śruty zbożowej będzie prowadzone techniką chromatografii cieczowej, jonowymiennej na złożu DEAE –Sephacel, zawierającym

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie.
Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

jako grupę funkcyjną resztę dietyloaminoetylową -OCH2CH2 NH+ (CH2CH3)2. Atom azotu tej grupy wykazuje jonizację w pH 2-9 i w tym zakresie ma właśnie zdolność jonowymienną. W opisanej metodzie wykorzystuje sie znaczne różnice w sile wiązania jonów fosforanowych i fitynianowych z zastosowanym złożem anionitowym. Po naniesieniu na złoże w formie chlorkowej ekstraktu śruty zbożowej związany ze złożem jon Cl- będzie wymieniany na fitynian i na niższe estry fosforanowe inozytolu, a tylko w nieznacznym stopniu na ortofosforan. Przemywanie kolumny wodą prowadzi do usunięcia większości fosforanu nieorganicznego. Pozostałości tej formy fosforu wymywa się ze złoża 0,1 M NaCl. Związany z anionitem kwas fitynowy i mniej ufosforylowane pochodne inozytolu można eluować ze złoża 0,75 M NaCl.

Oznaczanie ilościowe kwasu fitynowego w wycieku z kolumny będzie prowadzone metodą z odczynnikiem Wade (Latte i Eskin, 1980). Odczynnik Wade ma barwę różową wskutek reakcji jonów żelaza Fe^{3+} z kwasem sulfosalicylowym o maksimum absorbancji przy 500 nm. W obecności fitynianu jony żelazowe łączą się z nim powodując rozpad kompleksu Fe^{3+}–sulfosalicylan i tym samym następuje spadek intensywności różowej barwy. Różnica absorbancji pomiędzy próbą materiałową (woda z odczynnikiem Wade) a pełną jest miara ilości fitynianu. Jest to metoda prosta, jednak nie należy jej stosować w przypadku oznaczeń ekstraktu z niedojrzałych ziarniaków w względu na obecność w takim materiale innych związków powodujących rozpad kompleksu odczynnika Wade.

Fosforan nieorganiczny bedzie oznaczony metodą molibdenianowi wg. Pipera i Lovela, pozwalającą na wykonywanie oznaczeń również na preparatach nieodbiałczanych. Wolny jon fosforanowy reaguje z odczynnikiem molibdenianowym tworzy wypadający z roztworu kompleks heteropolikwasu tetratri molibdeniano-fosforowy. Wytrącaniu osadu zapobiega obecność albuminy i chlorowodorku guanidyny. Żółta barwa roztworu zwiększająca absorbancję jest wynikiem oddziaływania pomiedzy wiązaniami peptydowymi albuminy a kompleksem fosforomolibdenianowym .

WYKONANIE ĆWICZENIA :

Ekstrakcja związków fosforu z śruty zbożowej (2 osoby)

1 gram drobno zmielonej śruty pszenżyta przenieść do suchej kolby stożkowej, dodać 20 ml 3% TCA, po wymieszaniu przykryć korkiem. Ekstrakcję należy prowadzić na wytrząsarce przy 150 rpm przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Ekstrakt odwirować 10 min. 15 000 obr./min, supernatant ostrożnie zlać znad osadu i wykorzystać do dalszych badań. W razie konieczności uzyskany ekstrakt dodatkowo przesączyć przez sączek z bibuły.

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie.
Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

Przygotowanie kolumny do rozdziału chromatograficznego

Plastikową kolumnę chromatograficzną umieścić pionowo w statywie, zacisnąć zacisk przy jej wylocie i nanieść pipetą 3ml złoża DEAE –Sephacel, uprzednio przemytego wodą destylowaną. Po opadnięciu anionitu zwolnic zacisk u wylotu kolumny i odsączać wodę znad złoża, przemyć ścianki kolumny w celu zmycia ewentualnych jego pozostałości, nad powierzchnią złoża pozostawić kilkumilimetrową warstwę wody. Tak przygotowany anionit należy przepłukać 3 razy po 5 ml 1,5 M NaCl a następnie wodą (3 objętości kolumny) aż do zaniku soli w eluacie.

Oczyszczanie ekstraktu

Do zlewki odmierzyć 1 ml odwirowanego ekstraktu, 10 ml wody i doprowadzic pH do ok. 3,5 za pomocą 0,1 M NaOH (ok. 1,6 ml). Tak przygotowany roztwór w całości nanieść na kolumnę, odsączyć płyn znad złoża , 3-krotnie przemyć 5 ml wody w celu usunięcia fosforanów nieorganicznych a następnie dodać porcjami 3 razy po 5 ml 0,1 M NaCl, co umożliwi usunięcie ze złoża pozostałości ortofosforanów. Po podstawieniu pod wylot kolumny cylindra na 20 ml należy przemywać złoże 3 porcjami po 5 ml 0,75 M w celu elucji związanego ze złożem kwasu fitynowego i niższych estrów fosforanowych inozytolu. W razie potrzeby objętość eluatu uzupełnić do 20 ml.

Oznaczanie kwasu fitynowego

Do dwóch probówek Eppendorfa -próby pełne-odmierzyć po 1 ml wycieku z kolumny oraz 0,35 ml odczynnika Wade. Do kolejnych dwóch probówek –próby kontrolne-dodać po 1,0 ml wody oraz 0,35 ml odczynnika Wade. Wszystkie próby worteksować przez 5 sekund i wirować 5 minut przy 4000 obr/min. Dokonać pomiaru absorbancji przy długości fali 520 nm w fotometrze wyzerowanym na wodę.

Oznaczanie fosforanu nieorganicznego

Do dwóch probówek Eppendorfa odmierzyć po 0,3 ml ekstraktu i 0,9 ml odczynnika molibdenowego. Do równolegle wykonywanej próby kontrolnej należy odmierzyć 0,3 ml wody oraz 0,9 ml odczynnika molibdenowego. Próby natychmiast dokładnie wymieszać i po 10 minutach mierzyć absorbancję prób pełnych przy długości fali 420 nm w fotometrze wyzerowanym na próbę kontrolną.

OPRACOWANIE WYNIKÓW :

Oznaczanie fitynianu: od odczytu średniej wartości absorbancji prób kontrolnych odjąć średnią wartość absorbancji prób pełnych, dla uzyskanej różnicy odczytać z krzywej wzorcowej ilość mikrogramów fitynianu, po uwzględnieniu rozcieńczeń obliczyć zawartość kwasu fitynowego w mg/gram śruty pszenżyta.

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie.
Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

Oznaczenie fosforanu nieorganicznego: z krzywej wzorcowej odczytać ilość mikrogramów fosforu, po uwzględnieniu rozcieńczeń obliczyć zawartość w mg fosforu/gram śruty pszenżyta.

Literatura:

Gonzalez B, Banos-Sanza, JI, Villatea, M, Brearley, CA and Sanz-Aparicio, J: Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase is a distant IPK member with a singular inositide binding site for axial 2-OH recognition. PNAS 107, 21, 9608-9613.

Latta M., Eskin M.: A Simple and rapid colorimetric method for phytate determination. J. Agric. Food Chem., 1980, 28, 1313-1315.

Raboy V.: myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. Phytochemistry 64 (2003) 1033–1043.

Węglarz L., Parfiniewicz B, Dzierżewicz Z, Wilczok T. Kwas fitynowy jako potencjalny czynnik przeciwnowotworowy jelita grubego. Gastroenterologia Polska 2003, 10 (5): 441-448.