

# LIPIDY

---

---

---

---

---

---

---

---

## IZOLACE CELKOVÝCH LIPIDŮ

- pro stanovení celkového množství lipidů
- pro další detailní rozборы charakteru lipidů

### Obecné požadavky na izolaci

- selektivita (*absence nelipidických složek*)
- zachování nativní struktury
  - *nutnost deaktivace lipolytických a oxidativních enzymů (ochrana polynenasycených mastných kyselin)*
  - *minimalizace autooxidace*

---

---

---

---

---

---

---

---

### Zajištění kvantitativních výsledků

– *nutnost užití směsi mísitelných rozpouštědel:*

**nepolární (nejčastěji uhlovodík)** –  
*rozrušení hydrofobních a van der Waalsových interakcí s matricí*

**polární (alkohol)** – *přerušování vodíkových a iontových vazeb na lipidy a polysacharidy*

---

---

---

---

---

---

---

---

**Přehled metod izolace a stanovení celkových lipidů**

<i>Postup podle</i>	<i>Štěpení vodíkových vazeb</i>	<i>Rozpouštědla</i>	<i>Použitelnost</i>
<b>Soxhleta</b>	ne	pentan, hexan, petrolether, chloroform, diethylether	vzorky s nízkým obsahem vody, hlavně neutrální lipidy
<b>Grossfelda</b>	ano (HCl)	diethylether	vzorky s vysokým obsahem sacharidů <b>(pečivo)</b>

---

---

---

---

---

---

---

---

<i>Postup podle</i>	<i>Štěpení vodíkových vazeb</i>	<i>Rozpouštědla</i>	<i>Použitelnost</i>
<b>FOLCHE</b>	ano	chloroform- methanol (2:1)	vzorky s vyšším obsahem vody a polárních lipidů jako fosfolipidy a komplexní lipidy <b>(maso a masné výrobky)</b>

---

---

---

---

---

---

---

---

<i>Postup podle</i>	<i>Štěpení vodíkových vazeb</i>	<i>Rozpouštědla</i>	<i>Použitelnost</i>
<b>ROSEHO, GOTTLIEBA (přesná rozhodčí metoda !)</b>	ano (NH <sub>4</sub> OH)	ethanol, diethylether, petrolether	vzorky s vyšším obsahem vody a lipoproteinů, bílkovin a sacharidů <b>(mléko a některé mléčné výrobky)</b>

---

---

---

---

---

---

---

---

Postup podle	Štěpení vodíkových vazeb	Rozpouštědla	Použitelnost
<b>Schmida, Bondzynskiho- Ratzlaffa</b>	ano (HCl)	ethanol, diethylether, petrolether	vzorky s vyšším obsahem vody a bílkovin <b>(sýry, maso a masné výrobky)</b>

**→ GRAVIMETRICKÁ KONCOVKA**

**odpaření rozpouštědla, zvážení rezidua**

---

---

---

---

---

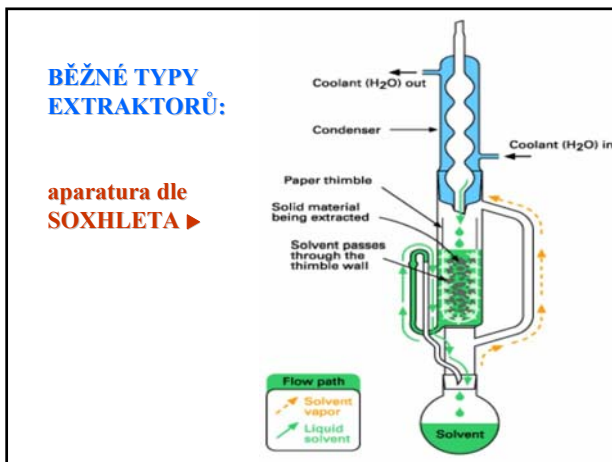
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**STANOVENÍ CELKOVÝCH LIPIDŮ  
RYCHLÝMI FYZIKÁLNÍMI  
METODAMI**

▶ **Metoda butyrometrická (Gerberova)**

- vzorek resp. tukové kuličky se hydrolyzují  $H_2SO_4$
- uvolněný tuk se po přidavku 1-pentanolu (amylalkoholu) odstředí
- objem tuku se odečte na stupnici butyrometru (% hm.)

- vhodné pro mléko, smetanu, sýry

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Butyrometr na mléko

A – kalibrovaná stupnice, B – tělo butyrometru  
C – hrdlo butyrometru, D – zátka



---

---

---

---

---

---

---

---

### ➤ Metoda denzimetrická

- extrakce 1,2-dichlorbenzenem
- stanovení hustoty extraktu
- odečet % tuku z kalibračního grafu (olejniný)

modifikace:

- stanovení dielektrické konst.,
- indexu lomu apod.

---

---

---

---

---

---

---

---

### ➤ Metoda nízkorozlišovací NMR spektrometrie

Měření signálu pohyblivějších protonů kapalného podílu vzorku – signál příslušející vodě se eliminuje kalibrací, vysušením, převedením do tuhé fáze ...

Použití:

- obsah oleje v semenech, extrakčních šrotech
- podíl tekutého podílu lipidů v emulzích, margarínech

---

---

---

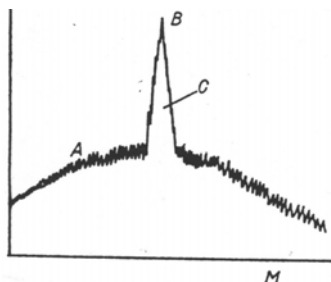
---

---

---

---

---



A – obalový pás  
vodíků tuhé fáze  
B – ostrý pás vodíků  
kapalné fáze  
C – plocha  
odpovídající podílu  
kapalné fáze  
M - frekvence

Nízkorozlišovací NMR-spektrum jedlého tuku

---

---

---

---

---

---

---

---

**STANOVENÍ FUNKČNÍCH SKUPIN LIPIDŮ**  
„Klasické“ postupy charakterizace lipidů

Tukové číslo	Míra obsahu	Vyjádření obsahu
kyselosti	volných mastných kyselin	mg KOH na 1 g tuku nebo ml KOH ( $c = 1 \text{ mol.l}^{-1}$ ) na 100 g tuku = stupeň kyselosti
zmýdelnění	veškerých mastných kyselin	mg KOH na 1 g
esterové	esterově vázaných mastných kyselin	mg KOH na 1 g

---

---

---

---

---

---

---

---

Tukové číslo	Míra obsahu	Vyjádření obsahu
hydroxylové	hydroxylových skupin (parciálních esterů glycerolu)	mg KOH na 1 g acetylovaného tuku
jodové	dvojných vazeb	% halogenu (jako jod) vázaného lipidy
rhodanové	polyenových mastných kyselin	% rhodanu (jako jod) vázaného lipidy

---

---

---

---

---

---

---

---

<i>Tukové číslo</i>	<i>Míra obsahu</i>	<i>Vyjádření obsahu</i>
dienové	konjugovaných mastných kyselin	% maleinanhydridu (jako jod) vázaného lipidy
Reichertovo – Weiselovo Polenského	těkavých mastných kyselin (ve vodě rozpuštěných dtto ve vodě nerozpuštěných)	mg KOH na 1 g tuku

---

---

---

---

---

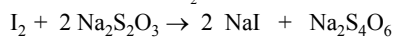
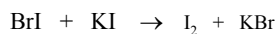
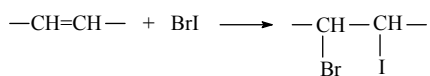
---

---

---

### ➤ Číslo jodové

Na dvojně vazby lipidů se váže (aduje) halogen, jeho nespotebované množství (vyjádřené jako jod) se stanoví titrací thiosíranem



*Hanušova metoda: BrI*

***Wijsova metoda: ICl***

---

---

---

---

---

---

---

---

☞ existuje řada modifikací ⇒ vždy je třeba specifikovat použitý postup

☞ metoda je nevhodná pro oxidované a polymerované lipidy

*Příklad hodnot jodového čísla:*

slunečnicový olej ~ 125

kokosový olej ~ 8

---

---

---

---

---

---

---

---

➤ **Číslo zmýdelnění**

zmýdelnění přebytkem KOH → neutralizace HCl s použitím fenolftaleinu jako indikátoru

stanovení K iontů vázaných v mýdlech pomocí titrace HCl na bromfenolovou modř

➤ **Číslo kyselosti**

lipidy rozpuštěné v polárním rozpouštědle se titrují alkoholickým roztokem KOH (fenolftalein nebo thymolftalein)

*- posouzení rozsahu hydrolytického žluknutí (lipázy, technologické operace jako smažení ...)*

---

---

---

---

---

---

---

---

➤ **Číslo hydroxylové**

rozpuštěné lipidy resp. volné hydroxylové skupiny se acetylují acetanhydridem (v prostředí pyridinu) → stanoví se přírůstek obsahu esterových vazeb

---

---

---

---

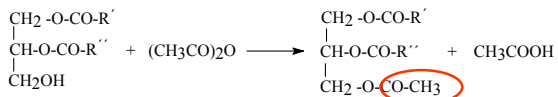
---

---

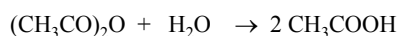
---

---

• **titrační metoda:**



Rozložení přebytku acetanhydridu, titrace uvolněné octové kyseliny:



---

---

---

---

---

---

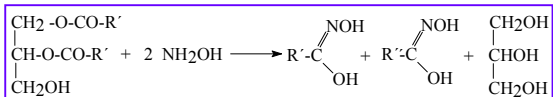
---

---

• **spektrofotometrická metoda:**

- výpočet z rozdílu esterových vazeb před a po acetylaci (po rozložení přebytku acetanhydridu se tuk izoluje do rozpouštědla nemísitelného s vodou)

a) vznik hydroxamových kyselin:




---

---

---

---

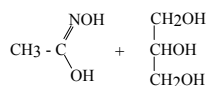
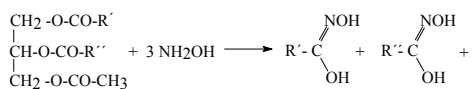
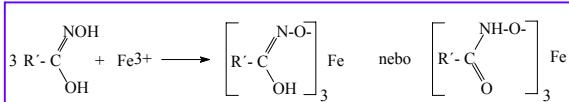
---

---

---

---

b) vznik barevného produktu s železitými solemi:



- charakterizace emulgátorů (parciálních esterů glycerolu); přítomnost ricinolejové kyseliny

---

---

---

---

---

---

---

---

**STANOVENÍ FRAKCI LIPIDŮ**

**METODY SEPARACE**

podle uspořádání

- chromatografie v plošném uspořádání (TLC)
- sloupcová chromatografie
- HPLC
- (GLC)

podle principu

- ▶ adsorpční chromatografie
- ▶ rozdělovací chromatografie
- ▶ ionexová chromatografie

---

---

---

---

---

---

---

---



*Sorbenty používané pro LC frakcionaci lipidů*

- deaktivovaný Florisil – magnesium silikát (7 % vody)
- silikagel (5 – 10 % vody)
- oxid hlinitý (5 %)

---

---

---

---

---

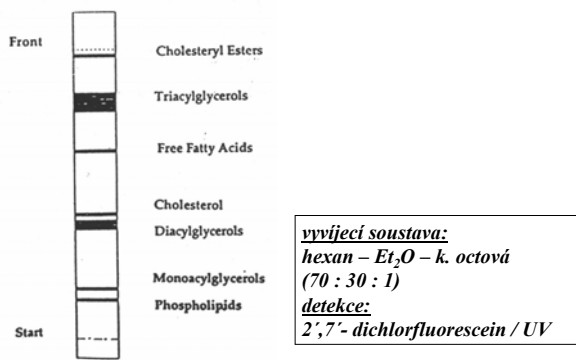
---

---

---

**TLC**

*Příklad 1. separace lipidů na silikagelu (Merck)*




---

---

---

---

---

---

---

---

**Sloupcová LC**

*Příklad 2. Separace lipidů na koloně Florisilu (35 x 170 mm, 30 g, 60 – 100 nm), eluce podle vzrůstající polarity*

ml elučního činidla			skupina eluovaných lipidů
hexan	diethylether	methanol	
100	-	-	uhlovodíky
95	5	-	estery cholesterolu
85	15	-	triacylglyceroly + volné mastné kyseliny
75	25	-	volný cholesterol
50	50	-	diacylglyceroly
-	90	10	monoacylglyceroly

---

---

---

---

---

---

---

---

**SEPARACE NEUTRÁLNÍCH LIPIDŮ  
- STRUKTURNÍ ANALÝZA TRIACYLGLYCEROLŮ**

- Dělení TGA podle zastoupení mastných kyselin – chromatografické metody (GC, HPLC)

**GC**

Požadavky na instrumentaci:

- možnost programování teploty až do 350 – 400 °C
- injektor „on-column“
- FID nebo „light scattering“ detektor

---

---

---

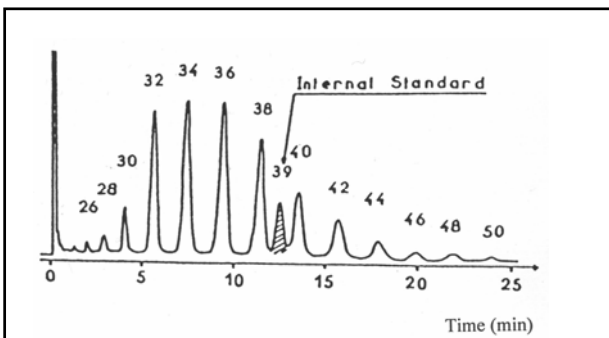
---

---

---

---

---



Příklad 1: Dělení triacylglycerolů kokosového oleje na náplňové koloně s 1% JXR na Gas-ChromQ, teplota 250 – 360 °C, 3 °C/min, nosný plyn: dusík 50 ml/min

---

---

---

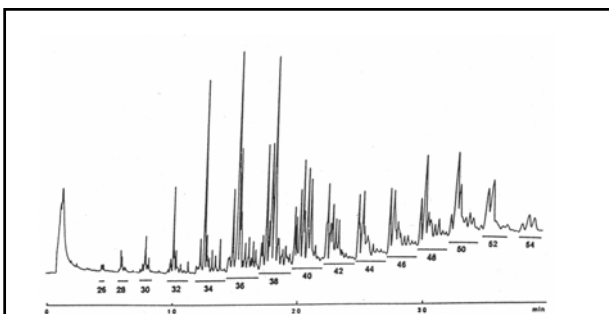
---

---

---

---

---



Příklad 2: separace máselného tuku na křemenné kapilární koloně (25 m x 0.25 mm) s relativně polární stacionární fází TAP (0.1 µm), teplota 260 – 360 °C, 3 °C/min, FID, vodík 2 ml/min

---

---

---

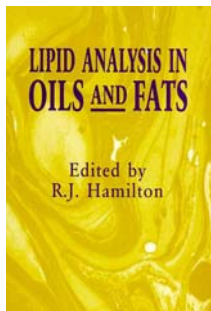
---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---

### STANOVENÍ NEZMÝDELNITELNÝCH LÁTEK

které látky patří do této skupiny?

⇒ *extrahovatelné organickými rozpouštědly spolu s lipidy*  
⇒ *nerozkládají se za podmínek zmýdelnění*  
(= účinkem hydroxidů alkalických kovů)

- ▶ pigmenty (např. karotenoidy)
- ▶ uhlovodíky
- ▶ vyšší alifatické alkoholy
- ▶ steroly (volné, esterifikované, glykosidy)
- ▶ tokoferoly
- ▶ (minerální či silikonové oleje)

---

---

---

---

---

---

---

---

### ■ STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU NEZMÝDELNITELNÝCH LÁTEK

- lipidy se zmýdelní (1 M KOH v ethanolu; 1 hod., 95 °C)
- nezmýdelnitelné látky se extrahují petroletherem nebo diethyletherem
- rozpouštědlo se odpaří a odparek se zváží (gravimetrie)

---

---

---

---

---

---

---

---

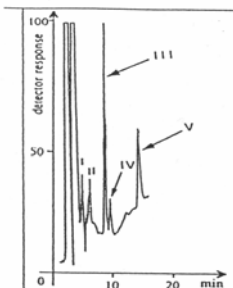
## STANOVENÍ FRAKČÍ NEZMÝDELNITELNÝCH LÁTEK

- Předběžná separace pomocí TLC, přednostně ale HPLC

*Příklad:*

**HPLC separace nezmýdelnitelného podílu slunečnicového oleje**  
(LiChrosorb Si-60, 250 x 4.6 mm; hexan – isopropanol, 99 : 1), RID

- I – neidentifikovaná frakce,
- II – 4-monomethylsteroly,
- III –  $\Delta^5$ -steroly, IV –  $\Delta^7$ -steroly,
- V – vnitřní standard (betulin)



---

---

---

---

---

---

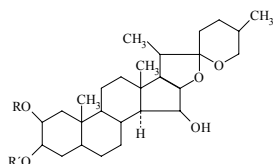
---

---

## STANOVENÍ STEROLŮ

### ■ Stanovení celkového obsahu sterolů

- lipidy se zmýdelní
- volné steroly se srazí digitoninem a stanoví vážkově



Digitonin  
R,R' : 2 D-glukosa  
2 D-galaktosa  
1 L-xylosa

---

---

---

---

---

---

---

---

### ■ Stanovení jednotlivých sterolů metodou GC

- lipidy se zmýdelní
- nezmýdelnitelný podíl se izoluje a rozdělí chromatografií na tenké vrstvě či pomocí HPLC

➔ vyšetření pomocí metody GC  
(často po derivatizaci na trimethylsilyl ethery)

*Detekce:*

- běžně pomocí FID - identifikace podle retenčních časů
- selektivně pomocí hmotnostně spektrometrického detektoru (MSD) – zohlednění struktury

---

---

---

---

---

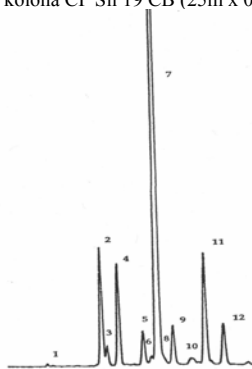
---

---

---

*Příklad:*

**Separace sterolů slunečnicového oleje pomocí kapilární GC/FID;**  
kolona CP Sil 19 CB (25m x 0.32 mm); isotermně 265 °C



- 1 – cholesterol,
- 2 – campesterol,
- 3 – campestanol,
- 4- stigmasterol,
- 5 – Δ7 campesterol,
- 6 – cholesterol,
- 7 – β-sitosterol,
- 8 – stigmasterol,
- 9 – Δ5-avenasterol,
- 10 – Δ5-24-stigmastadienol,
- 11 – 7Δ-stigmasterol,
- 12 – 7Δ-avenasterol

---

---

---

---

---

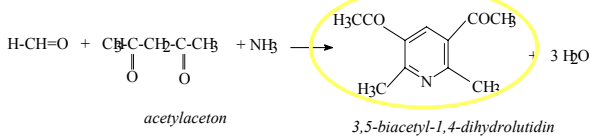
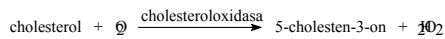
---

---

---

### ■ Enzymová metoda stanovení cholesterolu

**Komerční kity** – pro volný cholesterol, vázaný je třeba uvolnit



---

---

---

---

---

---

---

---

### STANOVENÍ FOSFOLIPIDŮ

#### • Izolace

**tuhé vzorky** – extrakce směsí chloroform – methanol, hexan – isopropanol, dichlormethan – methanol → potřeba rozrušení lipid-proteinových komplexů

→ oddělení od triacylglycerolů z roztoků v nepolárních rozpouštědél – precipitace acetonem

**tekuté vodné vzorky** – směs methanolu a chloroformu → vysolení – fosfolipidy v organické vrstvě

---

---

---

---

---

---

---

---

■ **STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU FOSFOLIPIDŮ**

- **Konverze organického fosforu na anorganický**
  - lipidy se mineralizují na mokré cestě
  - fosfor se stanoví **spektrofotometricky** jako molybdenová modř (viz stanovení fosforu)

---

---

---

---

---

---

---

---

**STANOVENÍ SLOŽENÍ FOSFOLIPIDŮ - FRAKCIONACE**

■ **TLC na silikagelu**

chromogenní činidla:

- ◆ směs octanu měďnatého, kyseliny fosforečné a sírové (barva závisí na stupni nenasycenosti)
- ◆ molybdenové činidlo (reaguje s fosforem)
- ◆ Dragendorffovo činidlo (pro deriváty cholinu)
- ◆ ninhydrin (pro deriváty obsahující aminoskupinu)

---

---

---

---

---

---

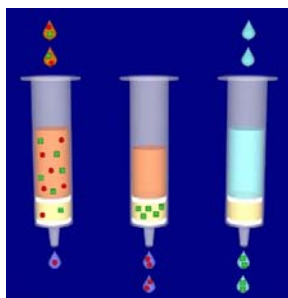
---

---

➤ **Extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction, SPE)**

*Oddělení fosfolipidů od neutrálních lipidů*

**Princip SPE**



---

---

---

---

---

---

---

---

<i>Stacionární fáze</i>	<i>Mobilní fáze</i>	<i>Frakce</i>
Sep-Pak silica	10 ml chloroform	
	10 ml petrolether/diethyl ether (7:93)	NL
	30 ml methanol	PL
Sep-Pak silica	40 ml hexan/diethylether (1:1)	NL
	20 ml methanol	
	20 ml CHCl <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O (3:5:2)	PL
Sep-Pak silica	20 ml chloroform	NPL
	30 ml methanol	PL

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

<i>Stacionární fáze</i>	<i>Mobilní fáze</i>	<i>Frakce</i>
Sep-Pak silica	chloroform	NL
	acetone/methanol (9:1)	
	chloroform/methanol (1:1)	PL
Bond-Elut aminopropyl	chloroform/2-propanol (2:1)	NL
	k. octová/diethylether (2:98)	FFA
	methanol	PL
Sep-Pak silica	10 ml petrolether/diethylether (95:5)	TG
	20 ml diethylether	
	10 ml methanol	PL
Bond-Elut silica	30 ml hexan/diethylether (20:80)	NPL
	30 ml methanol	PL

---

---

---

---

---

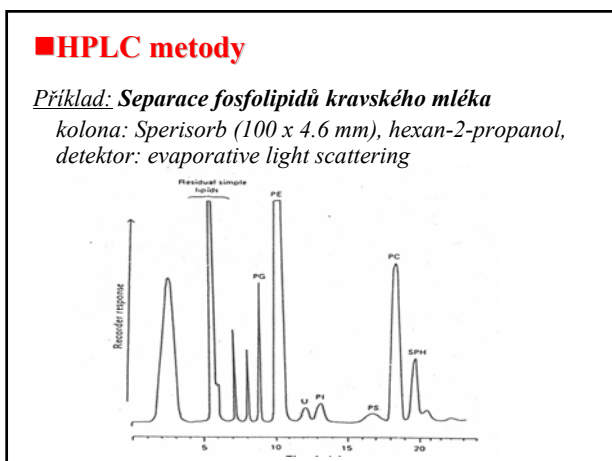
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

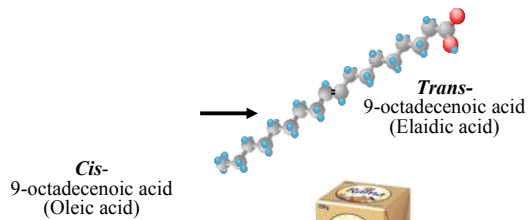
---

---

---

---

■ Stanovení trans mastných kyselin



ANTINUTRIČNÍ VLASTNOSTI

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

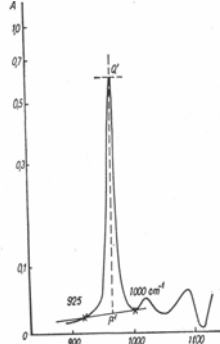
STANOVENÍ MASTNÝCH KYSELIN

■ Stanovení trans mastných kyselin

**INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE**

Absorbce při  $967\text{ cm}^{-1}$ , ( $10.34\text{ }\mu\text{m}$ ) - deformace přilehlých C-H vazeb

*Příklad:*  
Vyhodnocení *infračerveného spektra* při stanovení trans-vazeb;  
*A* – absorbance,  
*P', Q'* - korigovaná hodnota




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

■ Stanovení konjugovaných mastných kyselin

➤ *Mastné kyseliny a jejich estery s konjugovanými dvojnými vazbami (na rozdíl od polyenových kyselin) absorbují při:*

- 233 nm (konjugované dieny:  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ )
- 268 nm (konjugované trieny:  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ )

Stanovení **SPEKTROFOTOMETRICKÉ**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



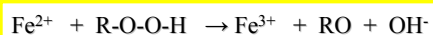
### ■ Stanovení esenciálních mastných kyselin

#### ■ ENZYMOVÉ

➤ Esenciální mastné kyseliny a jejich estery se oxidují **lipoxygenasou** (linoleát: O<sub>2</sub> oxidoreduktasa, EC 1.13.1.13) na příslušné hydroperoxydy

V rámci finálního kroku se stanoví:

- ▶ úbytek O<sub>2</sub> **manometricky**
- ▶ absorbance při 232 nm (absorbance konjugovaných hydroperoxidů) - **spektrofotometrie**
- ▶ Fe<sup>3+</sup> vzniklé oxidací Fe<sup>2+</sup> - **spektrofotometrie**



---

---

---

---

---

---

---

---

### ■ Stanovení jednotlivých mastných kyselin

#### ■ STANOVENÍ POMOCÍ GC

➤ nižší mastné kyseliny se stanoví jako volné nebo po převedení na butylestery – analýza mléčných výrobků

**Obecný postup: mastné kyseliny se převedou před GC analýzou na METHYLESTERY v rámci následujících kroků**

##### (i) Zmýdelnění

☞ *jsou-li mastné kyseliny vázány v triacylglycerolech, fosfolipidech, voscích apod., musí se uvolnit zmýdelněním*  
→ var s cca 1M metanolickým KOH v inertní atmosféře) a následně extrakce do organického rozpouštědla

---

---

---

---

---

---

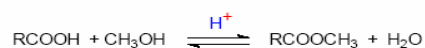
---

---

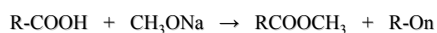
##### (ii) Příprava methylesterů

- Esterifikace methanolem v přítomnosti **kyselého katalyzátoru** – BF<sub>3</sub> (Lewisova kyselina)

- Kyselá katalýza (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)



- **basicky katalyzovaná reakce** – např. transesterifikace methoxidem sodným:



---

---

---

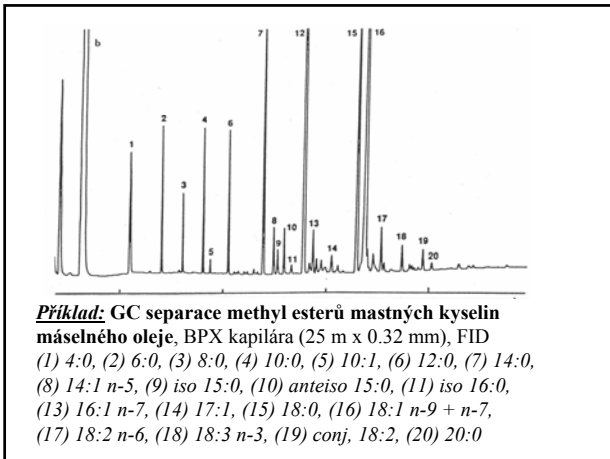
---

---

---

---

---




---

---

---

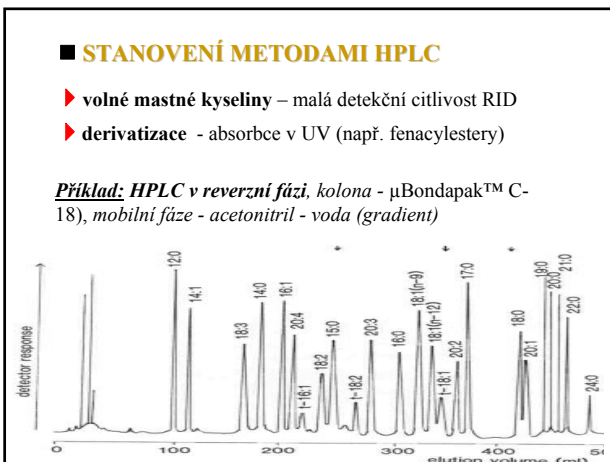
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

**STANOVENÍ STUPNĚ ŽLUKLOSTI**

---

---

---

---

---

---

---

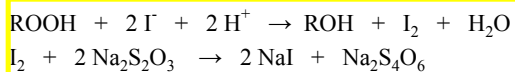
---

### STANOVENÍ STUPNĚ ŽLUKLOSTI

#### ■ Stanovení peroxidového čísla

- indikace rozsahu žluklosti v úvodních fázích

▶ *Hydroperoxydy mastných kyselin se stanoví JODOMETRICKY:*



Výsledky se vyjadřují jako peroxidové číslo (P.Č.)  
v mg aktivního kyslíku na 1 g tuku

---

---

---

---

---

---

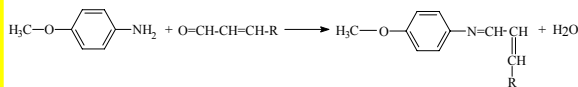
---

---

#### ■ Stanovení p-anisidinového čísla

- indikace fáze rozkladu hydroperoxidů (vznik off-flavour)

▶ *p-anisidin reaguje s 2-alkenaly a jinými aldehydy za vzniku barevného produktu (Schiffovy base), které se stanoví SPEKTROFOTOMETRICKY*



Výsledky se vyjadřují jako anisidinové číslo  
(absorbance při 400 nebo 430 nm, 1% roztoku tuku v 1 cm kyvetě)

---

---

---

---

---

---

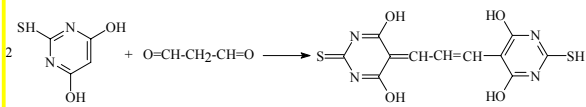
---

---

#### ■ Stanovení thiobarbiturového čísla

- indikace fáze rozkladu hydroperoxidů (vznik off-flavour)

▶ *2-thiobarbiturová kyselina reaguje s malondialdehydem a 2,4-alkadienaly za vzniku barevného produktu, stanovení SPEKTROFOTOMETRICKY*



Výsledky se vyjadřují jako thiobarbiturové číslo  
(absorbance při 530 nm, 1% roztok tuku v 1 cm kyvetě,  
nebo v mg malondialdehydu na 1 g tuku)

---

---

---

---

---

---

---

---

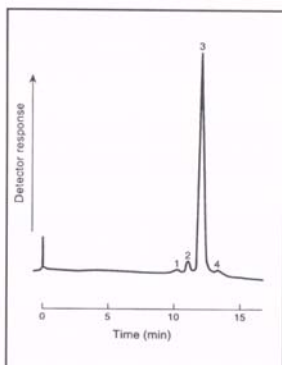
### ■ Stanovení obsahu polymerů

- indikace tepelného namáhání (smažení)

▶ Vzorek se frakcionuje pomocí  
**VYLUČOVACÍ  
(GELOVÉ PERMEACNÍ)  
CROMATOGRAFIE**

**Příklad: sójový olej po  
smažení - 1, 2 polymery, 2  
TGA, 3 – volné mastné k.**

SCE kolona (300 x 7.8  
mm; PL-GelTM (póry =  
100 Å) tetrahydrofuran, RI  
detektor



---

---

---

---

---

---

---

---

### STANOVENÍ STABILITY TUKŮ

- různé typy testů podle využití daného tuku

#### ■ Schaalův test

▶ Lipidy se skladují při zvýšené teplotě za  
přístupu vzduchu a stanoví se ve vhodných  
intervalech stupeň oxidace a určí se indukční  
perioda

**sledované změny: peroxidové číslo, přírůstek  
hmotnosti, anisidinové číslo, těkavé sloučeniny**

→ **jednoduchý test, vyžaduje však velké množství  
vzorků, zdlouhavý (4 až 8 dní)**

---

---

---

---

---

---

---

---

#### ■ Metoda aktivního kyslíku (AOM)

▶ Vzorek oleje se provzdušňuje při teplotě 100 °C

→ **oficiální metoda (AOAC)**

#### ■ Metoda „kyslíkové bomby“

pro stabilní tuky a oleje (např. fritovací, šorteningy, apod.)

▶ vzorek udržován při 135 °C, výchozí tlak kyslíku 110  
psig, sleduje se pokles tlaku

→ 2 – 10 x rychlejší než AOM

---

---

---

---

---

---

---

---

■ **Expozice světlu**

pro různé typy výrobků jako bramborové lupínky, mléko apod.

➤ vzorek se ozařuje fluorescenčním světlem o intenzitě 7535 lux, teplota 30 °C → sleduje se změna sensorické jakosti, příp. vznik těkavých sloučenin

---

---

---

---

---

---

---

---