

Lipidy

Analytické úkoly

- izolace lipidů
- stanovení celkových lipidů (stanovení tuku)
- charakterizace tuku (stanovení tukových čísel, stanovení složení mastných kyselin)
- frakcionace a stanovení frakcí lipidů
 - fosfolipidy
 - frakce triacylglycerolů
- stanovení stupně žluklosti tuku
- stanovení oxidační stability tuku
- stanovení doprovodných látek lipidů

Izolace a stanovení tuku

Obvyklý postup izolace a vážkového stanovení tuku

- příprava vzorku k extrakci tuku (uvolnění tuku z vazby na bílkoviny a sacharidy – hydrolýza a dále vysušení vzorku)
- extrakce tuku nepolárním až středně polárním rozpouštědlem
- odpaření rozpouštědla z extraktu a zvažení odparku

Tuk = všechny nepolární netěkavé látky extrahované ze vzorku nepolárním rozpouštědlem (petrolether, hexan, diethylether...) nebo směsí rozpouštědel.

Alternativy provedení extrakce

- extrakce tuhého vzorku v extrakční patroně kondenzátem par rozpouštědla (SOXHLETŮV nebo TWISSELMANNŮV extraktor)
- extrakce varem v rozpouštědle s následným promýváním kondenzátem rozpouštědla (zařízení Soxtec)
- extrakce tuhého vzorku v uzavřené nádobě velkým přebytkem rozpouštědla (např. při metodě podle FOLCHE)
- extrakce kapalina – kapalina v uzavřené nádobě (např. v přístroji pro extrakci podle RÖSEHO a GOTTLIEBA)



Soxhletův extraktor



Twisselmannův extraktor



přístroj dle Röseho a Gottlieba

Některé extrakční metody stanovení tuku

Metoda podle SOXHLETA

spočívá v extrakci (rozemletého a vysušeného) vzorku (příp. roztřeného s mořským pískem) hexanem, petroletherem nebo diethyletherem v SOXHLETOVĚ nebo TWISSELMANNOVĚ extraktoru po dobu 4-6 hod. Z extraktu ve varné baňce se odpaří rozpouštědlo (vakuová odparka, sušárna 103°C) a odparek se zvaží.

Použití: materiály s vysokým obsahem tuku, malým obsahem vody a sacharidů (olejninny).

Metoda podle GROSSFELDA (použití: cereální materiály, vzorky stravy)

- částečná hydrolýza vzorku kys. chlorovodíkovou
- filtrace, promytí vodou, vysušení
- extrakce vysušeného vzorku ethyletherem v SOXHLETOVĚ přístroji

Extrakční stanovení tuku

Metoda podle FOLCHE

Použití: vzorky s vysokým obsahem bílkovin a vody (maso...)

- extrakce směsí $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ (2:1) homogenizací za studena
- filtrace
- reextrakce filtrátu vodou
- odpaření rozpouštědla z organické fáze, zvážení odparku

Metoda podle RÖSEHO a GOTTLIEBA

Použití: mléko, syrovátka, podmásli... (**rozhodčí metoda**)

- hydrolýza bílkovin amoniakem, přídavek ethanolu
- opakovaná extrakce směsí petrolether – diethylether
- odpaření rozpouštědla, zvážení odparku

Rychlé fyzikální metody stanovení tuku

Butyrometrická metoda (GERBEROVA)

Použití: mléko, mléčné výrobky

- přidavkem H_2SO_4 ke vzorku v butyrometru se rozpustí bílkoviny v obalu tukových kuliček
- uvolněný tuk se odstředí (přidavkem amylalkoholu se dosáhne ostrého rozhraní) a v kalibrované části butyrometru se odečte objem tuku (% tuku ve vzorku)



butyrometr

Denzitometrická metoda

Použití: semena olejnin

- homogenizace vzorku s 1,2-dichlorbenzenem
- filtrace
- stanovení hustoty filtrátu \Rightarrow odečtení obsahu tuku z tabulky (nutná kalibrace pro každý druh materiálu)

Rychlé fyzikální metody stanovení tuku

Refraktometrická LEITHOVA metoda

Použití: olejniny, různé šroty, pekařské a cukrářské výrobky, kakaové boby, ryby...

- rozetření vzorku s rozpouštědlem (1-bromnaftalenem) a mořským pískem v třecí misce
- filtrace směsi
- měření indexu lomu filtrátu (extraktu tuku)
- výpočet obsahu tuku z rozdílu indexů lomu rozpouštědla a extraktu

Spektrometrické metody stanovení tuku

Hlavní výhoda: rychlá a nedestruktivní analýza

NIR spektrometrie

Použití: vzorky s obsahem tuku nad 0,2 %

- měření spektra vzorku reflexní metodou v intervalu 0,8-2,5 μm
- záznam $\log(1/R)$ vs. λ
- signály $-\text{CH}_2$ – skupin mastných kyselin při 1200, 1734, 1765, 2310, 2345 nm
- individuální kalibrace pro každý typ vzorku

^1H -NMR spektrometrie s nízkým rozlišením

- měří se signál protonů lipidů v kapalně fázi
- vzorek je třeba vysušit nebo vodu převést do tuhé fáze

Stanovení tukových čísel

- tuková čísla sloužila a zčásti dosud slouží k charakterizaci vlastností a jakosti tuku nebo oleje
- vlastnosti vyjádřené hodnotou určitého čísla lze dnes určit objektivněji a konkrétněji modernějšími metodami (GC, HPLC)

Ukazatel	Vlastnost tuku, kterou ukazatel vyjadřuje
číslo kyselosti	obsah volných mastných kyselin
číslo zmýdelnění	obsah veškerých mastných kyselin
esterové číslo	obsah esterově vázaných mastných kyselin
hydroxylové číslo	obsah hydroxylových skupin
jodové číslo	obsah dvojných vazeb
rhodanové číslo	obsah polyenových kyselin
dienové číslo	obsah konjugovaných dienových kyselin

Další čísla (**peroxidové**, *p*-anisidinové, thiobarbiturové) souvisejí se stupněm žluklosti tuku.

Číslo kyselosti

Č. k. je ukazatelem obsahu volných mastných kyselin v tuku. Vyjadřuje se jako hmotnost KOH (v mg), který je potřebný k neutralizaci kyselin obsažených v 1 g tuku.

Stanovení čísla kyselosti

- rozpuštění tuku ve směsi ethanol-diethylether (1+1)
- titrace ethanolovým roztokem KOH (0,1 mol/l) na fenolftalein nebo thymolftalein

$$\text{číslo kyselosti} = 56,11 \cdot c_{\text{KOH}} \cdot V_{\text{KOH}} / m \quad [\text{mg/g}]$$

Přípustné hodnoty čísla kyselosti

sádlo	max. 1,3
olivový olej panenský	max. 6,6
rostlinné oleje rafinované	max. 0,6

Číslo zmýdelnění

= hmotnost KOH (v mg), který je potřebný k neutralizaci mastných kyselin a k hydrolýze (zmýdelnění) jejich esterů v 1 g tuku.

Stanovení čísla zmýdelnění

- vzorek tuku se neutralizuje a hydrolyzuje varem (pod zpětným chladičem) s nadbytkem 0,5 M ethanolového KOH
- titrace nadbytku KOH odměrným roztokem HCl

$$\text{číslo zmýdelnění} = 56,11 \cdot c_{\text{HCl}} \cdot (V_1 - V_2) / m \quad [\text{mg/g}]$$

V_1 – spotřeba při titraci slepého pokusu [ml], V_2 – při titraci vzorku

Typické hodnoty čísla zmýdelnění

sádlo	192-203	podzemnicový olej	187-196
olivový olej	184-196	sójový olej	189-195
slunečnicový olej	188-194	řepkový olej	168-193

Esterové číslo

vyjadřuje obsah esterově vázaných mastných kyselin;
udává se jako hmotnost KOH (v mg), který je potřebný k hydrolýze esterů mastných kyselin v 1 g tuku.

$$\text{esterové číslo} = \text{číslo zmýdelnění} - \text{číslo kyselosti}$$

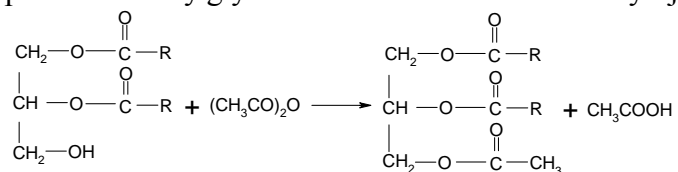
$$\text{Obsah vázaného glycerolu} = 0,547 \cdot \text{esterové číslo} \quad [\text{mg/g tuku}]$$

Hydroxylové číslo

se používá k vyjádření obsahu parciálních esterů glycerolu v tuku; vyjadřuje se jako hmotnost KOH (v mg), který je ekvivalentní obsahu hydroxylových skupin.

Titrační stanovení hydroxylového čísla

parciální estery glycerolu obsažené v tuku se acetylují acetanhydridem

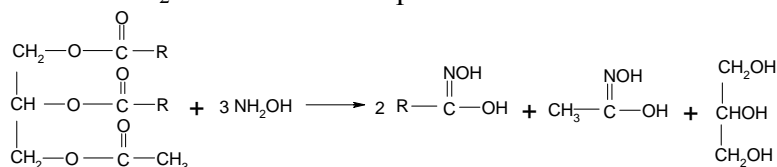


acetylovaný tuk se oddělí od acetanhydridu a octové kyseliny extrakcí hexanem a promytím organické fáze vodou. V acetylovaném vzorku se stanoví číslo zmydlnění. Hydroxylové číslo se vypočte jako rozdíl čísel zmydlnění acetylovaného a původního tuku.

Spektrofotometrické stanovení hydroxylového čísla

zvýšení obsahu esterových skupin po acetylaci parciálních esterů glycerolu v tuku se stanoví ve dvou krocích:

1. konverze esterů glycerolu na hydroxamové kyseliny reakcí s NH_2OH v alkalickém prostředí:



2. stanovení hydroxamových kyselin po komplexotvorné reakci s Fe^{3+} spektrofotometrickým měřením červenofialového komplexu ($\lambda=530 \text{ nm}$)

Jodové číslo

Jodové číslo je měřítkem nenasycenosti tuku (oleje), tj. obsahu dvojných vazeb.

Udává se jako množství halogenu vyjádřené hmotností jodu v gramech, které se může adovat na 100 g tuku.

Stanovení jodového čísla

spočívá v adici interhalogenové sloučeniny (HANUŠOVA metoda – IBr, WIJISOVA metoda – ICl) na vzorek tuku (reakční doba je 1-2 hod) a titračním stanovení nadbytku činidla.

Chemismus HANUŠOVY metody

1. adice bromidu jedného: $-\text{CH}=\text{CH}- + \text{IBr} \rightarrow -\text{CHBr}-\text{CHI}-$
2. reakce nadbytku činidla s jodidem: $\text{IBr} + \text{KI} \rightarrow \text{I}_2 + \text{KBr}$
3. titrace jodu thiosíranem: $\text{I}_2 + 2 \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow 2 \text{I}^- + \text{S}_4\text{O}_6^{2-}$

Výpočet

$$\text{Jodové číslo} = 100 \cdot c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot (V_1 - V_2) \cdot 0,1269 / m$$

V_1 je spotřeba při titraci slepého pokusu [ml]

V_2 je spotřeba při titraci vzorku [ml]

m je navážka tuku [g]

Hodnoty jodového čísla

sádlo	45-70	řepkový olej	94-126	TAG (SLS) nebo (SOO)	57,2
olivový olej	75-94	olejová kys.	89,9	TAG (SLO)	86,0
slunečnicový o.	110-143	linolová kys.	181,0	TAG (OLO)	114,9
podzemnicový o.	80-106	linolenová kys.	273,5	TAG (LLO) nebo (OLnO)	144,0
sójový olej	120-143	TAG (SOS)	28,5	TAG (LLnO)	173,2

Složení mastných kyselin lipidů

Důvody pro stanovení složení MK

- nutriční a biologická hodnota tuku (esenciální MK)
- identifikace druhu oleje nebo tuku
- posouzení oxidační stability (nasycené vs. polyenové MK)
- sledování technologických procesů

Analytické metody

- chromatografické (GC, HPLC)
- spektrometrické: doplňkové ukazatele
 - UV: obsah konjugovaných dienů, trienů
 - MIR: obsah *trans*-nenasycených MK
- enzymové: esenciální MK

Stanovení mastných kyselin v tucích plynovou chromatografií

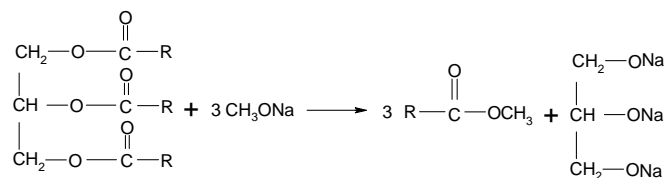
vyžaduje derivatizaci; mastné kyseliny (volné i vázané v lipidech) se převádějí nejčastěji na:

- methylestery
- butylestery (při analýze tuku, který obsahuje také nižší mastné kyseliny C₄-C₁₀ – např. mléčný tuk)

Příprava methylesterů MK

- 1) hydrolýza (zmýdelnění) tuku záhřevem s 0,5M KOH v CH₃OH v inertní atmosféře (tento krok se vynechává při stanovení volných MK)
- 2) esterifikace methanolem za přítomnosti kyselého katalyzátoru (nejčastěji BF₃), vzniklé methylestery se extrahují do hexanu nebo isooktanu

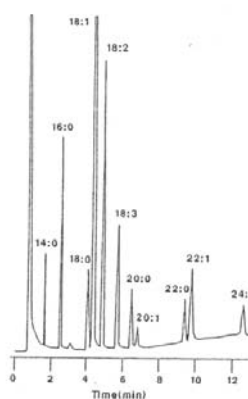
Alternativní postup: transesterifikace triacylglycerolů methoxidem sodným v methanolu



(volné MK nereagují)

Podmínky GC stanovení mastných kyselin

- náplňové nebo kapilární kolony s polární až středně polární stacionární fází
- teplota kolony > 175 °C
- detektor FID
- kvantifikace: vnitřní normalizace, vnitřní standard (např. methylpentadekanoát)



GC analýza methylesterů MK řepkového oleje
kolona 30 m × 0,75 mm i.d.,
film 1 μm;
stac. fáze Supelcowax 10; teplota kolony 180 °C

Stanovení konjugovaných dienových a trienových mastných kyselin UV spektrometrií

- systém konjugovaných dvojných vazeb se v přírodních lipidech nevyskytuje
- konjugovaný systém však vzniká při oxidaci polyenových MK (při vzniku hydroperoxidů dochází k posunu dvojných vazeb v řetězci) a během technologického zpracování olejů (bělení)
- konjugované dieny mají absorpční maximum při 233 nm, konjugované trieny mají maxima při 268 a 278 nm a minima při 262 a 274 nm

Postup: navážka m mg tuku se rozpustí v hexanu (výsledný objem V [ml]), měří se absorbance resp. absorpční spektrum proti hexanu, absorbance se přepočtou na absorptivity $a = A \cdot V / (b \cdot m)$

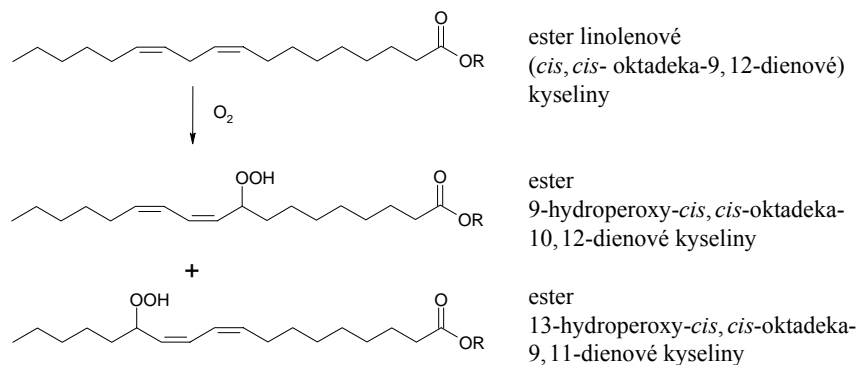
Obsah konjug. dienů = $0,91 \cdot (a_{233} - 0,07)$ [%]

Obsah konjug. trienů = $1,316 \cdot (a_{268} - 0,5 \cdot (a_{262} + a_{274}))$ [%]

Stanovení esenciálních mastných kyselin

Podstatou stanovení je selektivní oxidace esenciálních MK kyslíkem za katalýzy **lipoxygenasou** (linoleát: O₂-oxidoreduktasou).

Do molekuly se zavádí hydroperoxidová skupina a vzniká konjugovaný systém dvojných vazeb:



Stanovení esenciálních mastných kyselin

Měřeným ukazatelem obsahu esenciálních MK může být:

- změna koncentrace kyslíku
- nárůst A_{233}
- nárůst obsahu hydroperoxidů
 - lze měřit spektrofotometricky např. na základě detekce Fe^{3+} vzniklých oxidací železnatých iontů hydroperoxidem:
$$\text{Fe}^{2+} + \text{R-O-O-H} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{R-O-H} + \text{H}_2\text{O}$$

$$\text{Fe}^{3+} + n \text{SCN}^- \rightarrow [\text{Fe}(\text{SCN})_n]^{3-n}$$

Stanovení *trans*-nenasycených mastných kyselin infračervenou spektrometrií

Triacylglyceroly se konvertují na methylestery, které se rozpustí v CS_2 , a změní se infračervené spektrum vzorku v intervalu $1100\text{-}910 \text{ cm}^{-1}$ ($9\text{-}11 \mu\text{m}$).

Výška absorbačního píku při 970 cm^{-1} je úměrná obsahu dvojných vazeb v konfiguraci *trans* (deformační vibrace vazby C-H na atomech uhlíku vázaných dvojnou vazbou *trans*).

Ke kvantifikaci se použijí kalibrační roztoky methylesteru elaidové (*trans* 9-oktadecenové) kyseliny.

Stanovení frakcí lipidů

Hrubá frakcionace lipidového podílu vzorku

Lipidový podíl lze dělit na frakce jednotlivých tříd sloučenin sloupcovou chromatografií na silikagelu. Nepolární lipidy a jejich doprovodné látky se ze sloupce eluují směsí hexanu a diethyletheru:

Poměr hexan:DE v eluční směsi	Eluované látky
99:1	alkany, skvalen, karoteny, vosky, estery sterolů
96:4	triacylglyceroly, mastné kyseliny
92:8	steroly
75:25	diacylglyceroly, mastné alkoholy
0:100	monoacylglyceroly

Pro dělení fosfolipidů se používá eluce směsí chloroform-methanol.

Frakcionace a stanovení triacylglycerolů

Možnosti dělení TAG

dělení podle počtu atomů C a počtu dvojných vazeb

- TLC na silikagelu, na Si-gelu impregnovaném AgNO_3
- RP-HPLC
- Ag^+ -HPLC
- GC

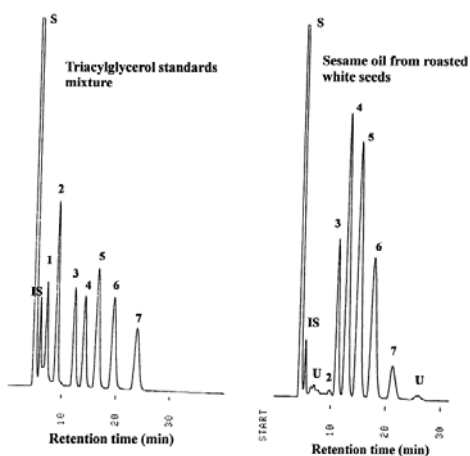
HPLC triacylglycerolů

při separaci v systému obrácených fází (RP-HPLC) se TAG eluují zhruba v pořadí podle ECN (*effective carbon number*)

ECN = počet atomů C v acylových řetězcích – 2 · počet dvojných vazeb

Detekce TAG

- refraktometr
- ELSD
- MS
- (UV – jen TAG s nenasycenými MK)



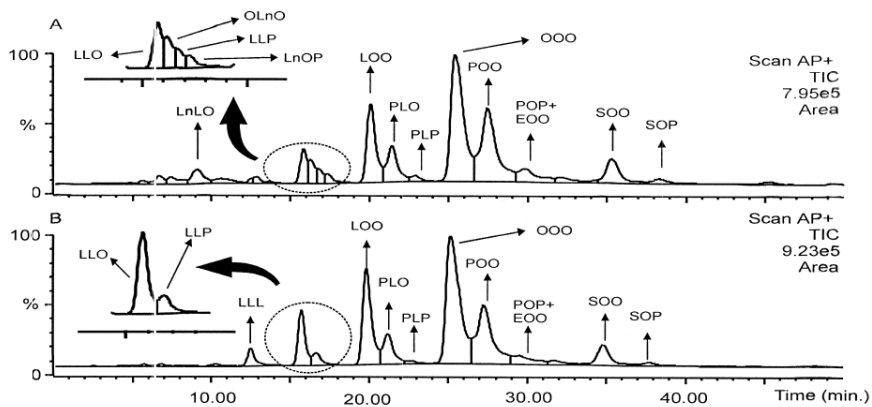
HPLC triacylglycerolů – dělení podle ECN

kolona μ -Bondapak C18
(150×3,9 mm, 10 μ m)
mobilní fáze: aceton-acetonitril (1+1)

- 1 – CCC (trikaproylglycerol),
ECN = 18
- 2 – LnLnLn, ECN = 36
- 3 – LLL, ECN = 42
- 4 – LLO, ECN = 44
- 5 – OOL, ECN = 46
- 6 – OOO, ECN = 48
- 7 – OOS, ECN = 50

IS – vnitřní standard (n-oktan)

U – neznámá látka



HPLC triacylglycerolů olivového oleje (A) a lískového oleje (B)
 kolona Spherisorb ODS 2 (250×4,4 mm, 5 μm)
 mobilní fáze: aceton-acetonitril (64:36), průtok 1 ml/min

Fosfolipidy

Obsah celkových fosfolipidů v některých potravinách (g/100 g sušiny)

sádlo	< 0,1	vaječný žloutek	20
rostlinné oleje surové	0,5-3	játra	3-4
rostlinné oleje rafinované	< 0,01	mozek	5-6
máslo	0,5-1,5	ovoce, zelenina, obiloviny	0,5-1,5

Stanovení celkových fosfolipidů

- izolace lipidového podílu (extrakce podle FOLCHE)
- mineralizace tuku (nejčastěji rozklad směsí $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$)
- stanovení fosforu v mineralizátu (spektrofotometricky po převedení kys. fosforečné na molybdenovou modř)
- přepočet obsahu P na obsah fosfolipidů

Přepočítávací faktory fosfolipid/fosfor:

palmitoyl linoloyl fosfatidylcholin	24,51
oleoyl linoloyl fosfatidylcholin	25,35
palmitoyl linoloyl fosfatidylethanolamin	23,12
palmitoyl linoloyl fosfatidylinositol	26,96
palmitoyl linoloyl fosfatidylserin	24,54

Stanovení stupně žluklosti tuku

Žluknutí – souhrn chemických změn, které vedou ke zhoršení organoleptických vlastností. Zahrnuje především oxidační hydrolytické reakce.

Fáze oxidačního žluknutí a analytické ukazatele:

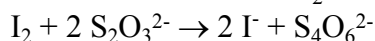
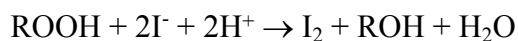
Fáze	Ukazatel
1) tvorba hydroperoxidů	peroxidové číslo, obsah „polárních látek“
2) vznik aldehydů, epoxidů, cyklických peroxidů, derivátů furanu...	<i>p</i> -anisidinové číslo thiobarbiturové číslo obsah „polárních látek“
3) vznik oligomerních lipidů	obsah oligomerů

Peroxidové číslo

Peroxidové číslo je ukazatelem obsahu primárních produktů oxidace. Vyjadřuje se v μval na 1 gram tuku (tj. v μmol ($1/2 \text{ ROOH}$) nebo μmol ($1/2 \text{ O}_2$) na gram tuku) nebo v μg aktivního kyslíku ($1/2 \text{ O}_2$) na 1 gram tuku.

Jodometrické stanovení peroxidového čísla

probíhá na základě reakcí:



Vzorek tuku rozpuštěný v chloroformu se po přidavku octové kyseliny a nadbytku KI titruje odměrným roztokem $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Peroxidové číslo

Výpočet:

$$\text{PČ} = 1000 \cdot c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot (V_1 - V_2) / m \quad [\mu\text{mol} (1/2 \text{ ROOH}) \cdot \text{g}^{-1}]$$

$$\text{PČ} = 1000 \cdot 16 \cdot c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot (V_1 - V_2) / m \quad [\mu\text{g} (1/2 \text{ O}_2) \cdot \text{g}^{-1}]$$

V_1 a V_2 jsou spotřeby při titraci vzorku a slepého pokusu [ml]
 m je navážka tuku [g]

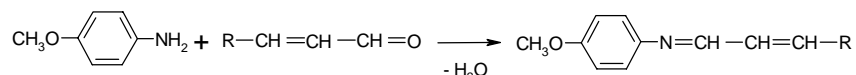
Zhodnocení výsledku:

max. přípustná hodnota PČ	10 $\mu\text{mol} (1/2 \text{ ROOH}) \text{ g}^{-1}$
tuk vysoké jakosti	< 2
zcela čerstvý tuk	< 0,5

***p*-Anisidinové číslo**

je měřítkem obsahu aldehydů (zejména 2-alkenalů), které vznikají jako sekundární produkty oxidace lipidů.

Stanovuje se spektrofotometricky na základě reakce



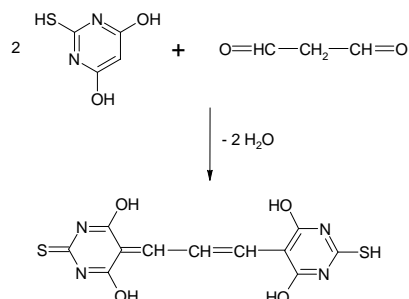
Reakce probíhá v roztoku tuku v isooktanu (nebo hexanu); rozpouštědlo a činidlo nesmí obsahovat zbytky vody; absorbance produktu se měří při 350 nm.

p-Anisidinové číslo se vyjadřuje jako 100 násobek absorbance (změřené v 1 cm kyvetě) vzorku obsahujícího ve 100 ml spolu s činidlem 1 g tuku.

Normální hodnota *p*-anisidinového čísla je $2 \pm 0,5$.

Thiobarbiturové číslo

se také používá k vyjádření obsahu aldehydů, zejména malondialdehydu a 2-alkenalů, s nimiž 2-thiobarbiturová kyselina poskytuje červeně zbarvené produkty (absorbance se měří při 530 nm). Alkanaly dávají s činidlem žluté produkty.



Thiobarbiturové číslo je vhodné pro sledování střední fáze žluknutí pokud tuk obsahuje polyenové mastné kyseliny.

Vyjadřuje se jako zvýšení A_{530} (v 1cm kyvetě) vyvolané reakcí vzorku s činidlem v roztoku 1 mg tuku v 1 ml.

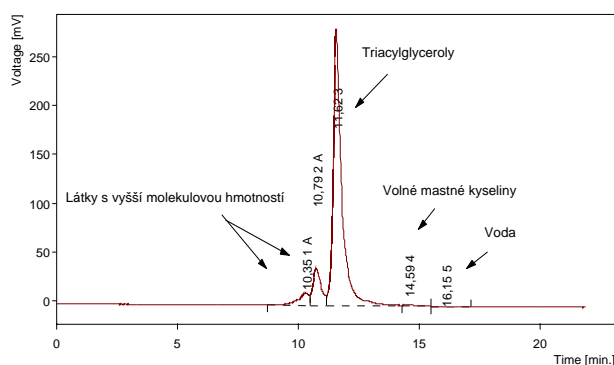
Hodnoty thiobarbiturového čísla: čerstvý olej 0,005-0,2; žluklý > 0,1

Obsah oligomerních lipidů

se používá jako kritérium jakosti tuků ve smažicích lázních.

Obsah oligomerů nesmí být vyšší, než 12 %.

Stanovuje gelovou permeační chromatografií s refraktometrickou detekcí. Výsledný obsah se určí metodou vnitřní normalizace.



Kolona: PL gel Mixed E
300 mm × 7,5 mm × 3 μm
Mobilní fáze: tetrahydrofuran
průtok 0,6 ml/min
Příprava vzorku:
100 μl oleje vysušeno
bezvodým Na₂SO₄
a rozpuštěno v 1,5 ml THF
Nástrik: 5 μl
Detekce: RID, teplota 30 °C

Stanovení oxidační stability tuků

Oxidační stabilita tuku závisí na:

- přítomnosti nenasycených (zvláště polyenových) MK
- fyzikálních a chemických podmínkách
 - přístup kyslíku, koncentrace kovů (Cu, Fe)
 - teplota, osvětlení
- obsahu antioxidačních látek

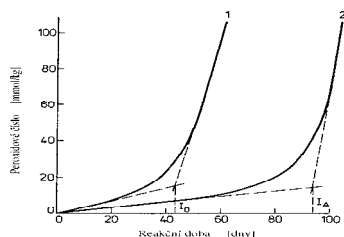
Důvody pro stanovení oxidační stability

- odhad doby skladovatelnosti tuku (oleje)
- posouzení účinnosti antioxidačtů

Nejběžnější metoda – tzv. SCHAALŮV test

SCHAALŮV test

25 g oleje (tuku) se ve 150 ml kádince zahřívá na 60°C za přístupu vzduchu; průběžně (po 24 hodinách, později po několika dnech) se stanovuje peroxidové číslo (nebo se sleduje změna hmotnosti); z křivky $P\check{C}=f(t)$ se odečte *indukční perioda* (doba potřebná k nastartování rychlé tvorby peroxidů)



protekční faktor antioxidantu:
relativní prodloužení indukční
periody

$$PF = (I_A - I_0) / I_0 \text{ nebo}$$

$$PF(\%) = 100 \cdot (I_A - I_0) / I_0$$

Metoda aktivního kyslíku (100°C, probublávání oleje vzduchem)

Oxipres (100°C, tlak O₂: 0,5 MPa, měření tlaku)

Stanovení doprovodných látek lipidů

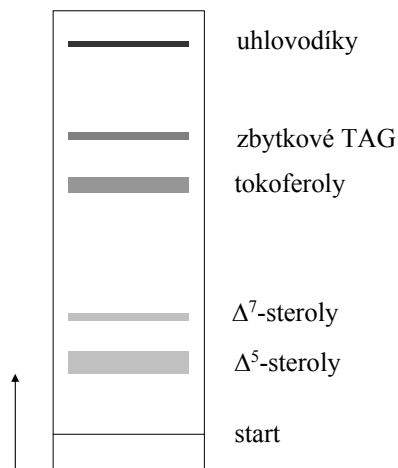
- uhlovodíky (alkany, skvalen)
- karotenoidy
- lipofilní vitaminy
- steroly, methylsteroly a dimethylsteroly

Izolace doprovodných látek lipidů z nezmýdelnitelného podílu a stanovení jejich celkového obsahu

1. zmýdelnění tuku varem s 1M KOH v ethanolu (1 hod)
2. extrakce nezmýdelnitelných lipofilních látek hexanem nebo diethyletherem
3. odpaření rozpouštědla a zvážení odparku

Frakcionace látek nezmýdelnitelného podílu

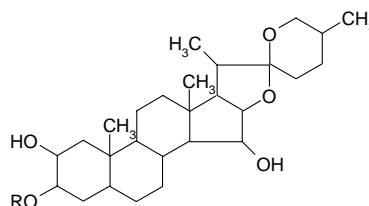
- TLC
silikagel/: hexan-
diethylether-kys. octová
(90:10:1)
- sloupcová chromatografie



Stanovení sterolů

Vázkové stanovení celkových sterolů digitoninem

- zmýdelnění tuku
- srážení sterolů
ethanolovým roztokem
digitoninu z vodně-
alkoholického prostředí
(12 hod)
- filtrace, promývání,
sušení a vážení
krytalických digitonidů
(1g je ekv. 0,25 g sterolů)



digitonin

R je zbytek nelineárního pentasacharidu složeného ze dvou glukosových, dvou galaktosových a jedné xylosové jednotky

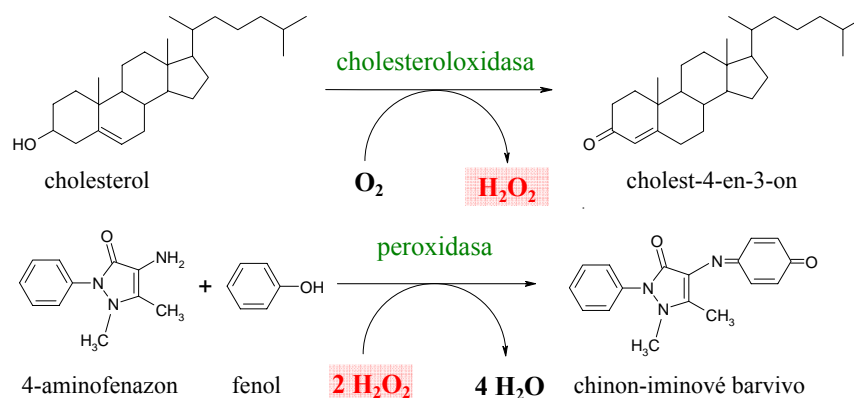
Další metody stanovení sterolů

- cholesterol
 - spektrofotometrická metoda
 - enzymová spektrofotometrická metoda
 - GC
- fytosteroly: GC, RP-HPLC

Spektrofotometrické stanovení cholesterolu (LIEBERMANNOVA-BURCHARDOVA reakce)

reakcí cholesterolu s H_2SO_4 a acetanhydridem v ethylacetátovém roztoku vzniká modrozeleně zbarvený produkt; měří se A_{620} .
Reakce není specifická. Metoda se používá pro stanovení cholesterolu ve vejcích a těstovinách.

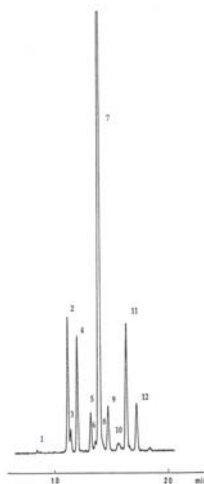
Enzymové spektrofotometrické stanovení cholesterolu



Vzorky, které nebyly předem zmýdelněny, obsahují estery cholesterolu. Z nich je třeba nejprve uvolnit cholesterol účinkem **cholesterolesterasy**. Reakce probíhá v pufovaném prostředí (pH 6,5-8) za přítomnosti cholátu sodného. Měří se A_{500} . K vyvolání zbarvení ($\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$) lze využít také reakce H_2O_2 s triarylderiváty imidazolu.

Stanovení sterolů plynovou chromatografií

- zmýdelnění tuku
- extrakce hexanem
- frakcionace TLC, seškrábání zóny sterolů, rozpuštění v etheru, odpaření v proudu N₂
- derivatizace silylace (BSTFA+TMCS v pyridinu) nebo acetylace (acetanhydrid v pyridinu), extrakce hexanem
- nástřik



GC separace
trimethylsilyletherů sterolů
slunečnicového oleje
kapilára 25 m × 0,32 mm,
stacionární fáze 0,44 μm
CP Sil 19 CB,
t kolony 265 °C,
detekce FID
1 – cholesterol,
2 – kampesterol,
3 – kampestanol,
4 – stigmasterol,
5 - Δ⁷-kampesterol,
6 – chlosterol,
7 - β-sitosterol,
8 – stigmastanol,
9 – Δ⁵-avenasterol,
10 – Δ^{5,24}-stigmastadienol,
11 – Δ⁷-stigmasterol,
12 – Δ⁷-avenasterol

Význam stanovení jednotlivých sterolů

- identifikace původu oleje nebo tuku
poměr sitosterol / (kampesterol+stigmasterol) – marker falšování olivového oleje
vyšší podíl brasikasterolu indikuje přítomost řepkového oleje
vyšší podíl cholesterolu indikuje přídavek živočišného tuku
- fytosteroly přijímané stravou působí příznivě na krevní hladinu cholesterolu – využití pro funkční potraviny.