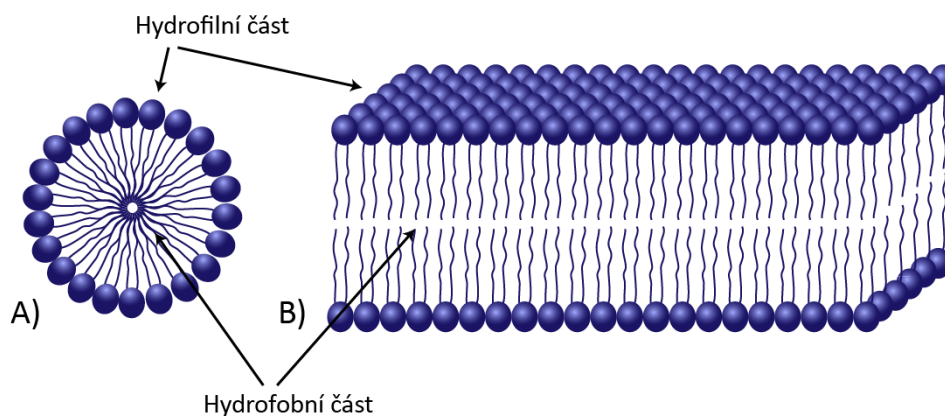


1 Teoretický úvod

Lipidy (z řeckého *lipos* = tuk) představují velmi rozmanitou skupinu látek, které jsou nerozpustné ve vodě (hydrofobní), ale dobře se rozpouští v nepolárních organických rozpouštědlech (lipofilní). Tím se zásadně odlišují od ostatních přírodních látek, které jsou hydrofilní a lipofobní. Tato definice se plně uplatňuje u jednoduchých lipidů. Složené lipidy obsahují vedle základních složek v molekule ještě další polární složku, která jim dodává amfifilní charakter: část molekuly je hydrofobní a část hydrofilní. Molekuly tohoto typu vytvářejí ve vodném prostředí útvary, v nichž styčná plocha nepolárních částí a polárního rozpouštědla je minimální (Obr. 1). Tyto útvary jsou základem struktury biologických membrán. Zvláštní, strukturně odlišnou skupinu tvoří isoprenoidní lipidy (isoprenoidy). Mají hydrofobní vlastnosti, účastní se transportu klasických lipidů v organismu a jsou spolu s nimi součástí biologických struktur. Z chemického hlediska jsou lipidy estery vyšších karboxylových (mastných) kyselin. Podle složení je dělíme na jednoduché a složité. V jednoduchých i složitých lipidech jsou karboxylové kyseliny se sudým počtem uhlíků, s přímým (nerozvětveným) řetězcem. Mohou být nasycené i nenasycené (Tab. 1). Rozdělení lipidů do jednotlivých skupin shrnuje tabulka (Tab. 2). Lipidy jsou potřebné pro stavbu buněčných struktur a tkání, jsou zdrojem energie, chrání organismus před tepelnými ztrátami a mechanickým poškozením, účastní se stavby nervových buněk a obalují nervová vlákna, vytváří prostředí, ve kterém se rozpouštějí biologicky významné nepolární látky (vitamíny, hormony, léčiva, barviva).

Jednoduché lipidy jsou estery vyšších mastných kyselin a alkoholu. Podle alkoholové části se dělí na acylglyceroly a vosky.



Obr. 1 A) micela, B) lipidová dvojvrstva v polárním prostředí.

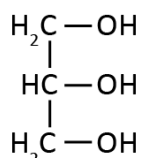
Tab. 1 Přehled běžně se vyskytujících mastných kyselin.

Počet C	Název kyseliny	Struktura kyseliny	Poznámky
C ₁₂	laurová	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	nasyčená
C ₁₄	myristová	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	nasyčená
C ₁₆	palmitová	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	nasyčená
	palmitolejová	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	nenasyčená, 1 <i>cis</i> -dvojná vazba (9)
C ₁₈	stearová	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	nasyčená
	olejová	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	nenasyčená, 1 <i>cis</i> -dvojná vazba (9)
	ricinolejová	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH(OH)CH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Obsahuje OH + 1 <i>cis</i> -dvojnou vazbu (9)
	linolová*	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	nenasyčená, 2 <i>cis</i> -dvojně vazby (9, 12)
	linoleová*	CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	nenasyčená, 3 <i>cis</i> -dvojně vazby (9, 12, 15)
	oleostearová	CH ₃ (CH ₂) ₃ CH=CHCH=CHCH=CH(CH ₂) ₇ COOH	nenasyčená, 1 <i>cis</i> a 2 <i>trans</i> dvojně vazby (9, 11, 13)
C ₂₀	arachidonová*	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₄ CH ₂ CH ₂ COOH	Nenasycená, 4 <i>cis</i> -dvojně vazby (5, 8, 11, 14)
* esenciální pro člověka, čísla v závorkách udávají pozice dvojných vazeb			

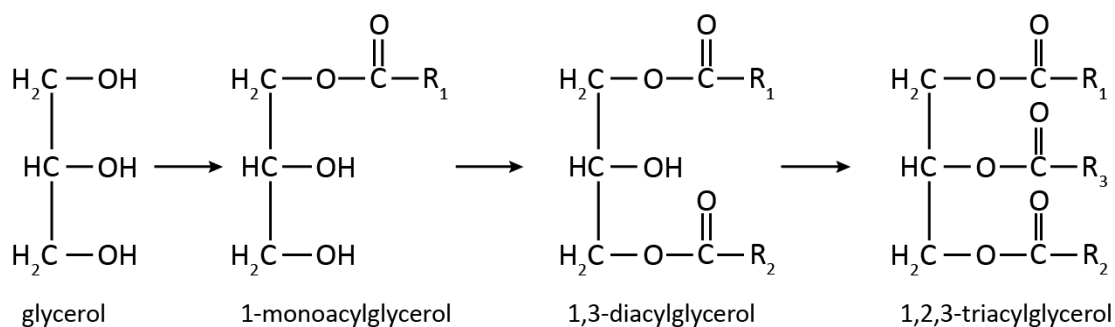
Tab. 2 Rozdělení lipidů.

→ jednoduché	→ triacylglyceroly		
	→ vosky		
	→ acylsteroly		
→ složené	→ fosfolipidy	→ glycerofosfolipidy	→ fosfatidylcholin
			→ fosfatidylethanolaminy
			→ fosfatidylseriny
			→ fosfatidylinositoly
			→ plasmalogeny
	→ sfingofosfolipidy	→ sfingomyeliny	
→ glykolipidy	→ sfingoglykolipidy	→ cerebrosidy	
		→ gangliosidy	
		→ sulfatidy	
→ isoprenoidní	→ steroly		
	→ žlučové kyseliny		

Acylglyceroly (tuky, oleje) jsou estery vyšších karboxylových kyselin, které mají ve své molekule trojsytný alkohol glycerol (Obr. 2), který může mít esterifikovanou jednu, dvě nebo tři hydroxylové skupiny. Podle toho vznikají mono-, di- nebo triacylglyceroly (Obr. 3). Pokud jsou všechny zbytky karboxylových kyselin (–R) stejné, jde o jednoduché acylglyceroly. V případě, že zbytky karboxylových skupin (–R) stejné nejsou, hovoříme o smíšených acylglycerolech. Jednoduché lipidy, které obsahují převážně nasycené karboxylové kyseliny, jsou za běžných podmínek tuhé – tuky. Obsahují-li větší podíl nenasycených karboxylových kyselin, jsou tekuté – oleje.

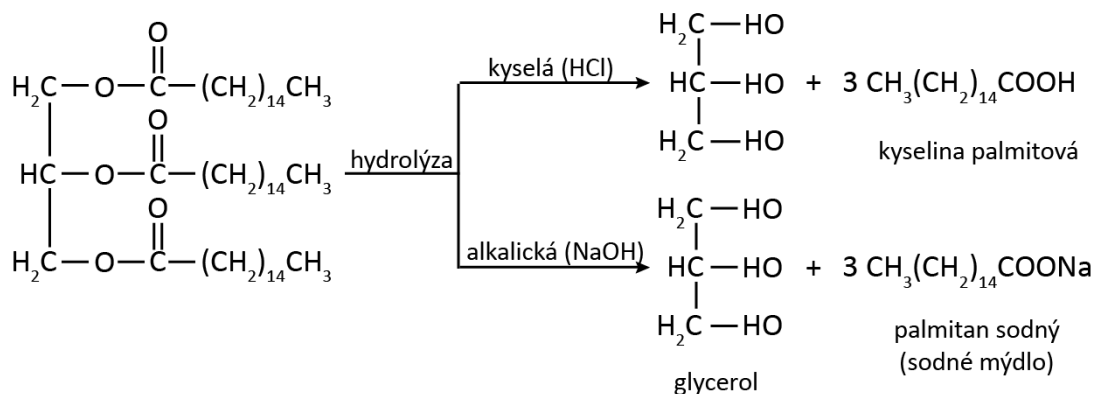


Obr. 2 Glycerol.



Obr. 3 Vznik mono-, di- nebo triacylglycerolu.

Čisté tuky jsou bezbarvé látky bez chuti a zápachu. Negativní vlastností tuků a olejů je jejich žluknutí způsobované baktérií zejména ve vlhkém a teplém prostředí. Při žluknutí dochází k oxidaci na dvojných vazbách nenasycených karboxylových kyselin a štěpení jejich dlouhého uhlíkatého řetězce. Vznikají různé aldehydy, ketony a nižší karboxylové kyseliny, které nepříjemně páchnou. Účinnou ochranou před zkažením je ztužování tuků. Nasycením dvojných vazeb vodíkem (katalytická hydrogenace) se z olejů stávají tuhé látky – tuky, přičemž se ale ztrácí jejich původní biologická hodnota pro náš organismus. Při hydrolýze acylglycerolu se štěpí esterová vazba za vzniku karboxylových kyselin a glycerolu. Hydrolýzu je možné provést působením silných minerálních kyselin nebo alkalických hydroxidů (Obr. 4).



Obr. 4 Hydrolýza acylglycerolu.

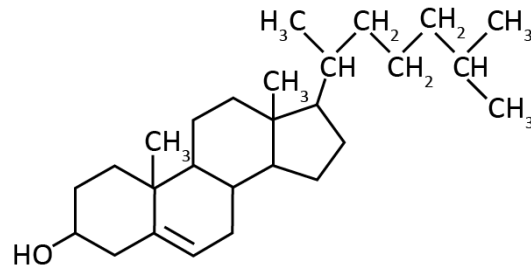
Působením hydroxidu sodného nebo draselného vznikají sodné nebo draselné soli vyšších karboxylových kyselin, tedy mýdla. Tato alkalická hydrolýza se nazývá zmýdelnění. Hydrolýzou s hydroxidem sodným získáme tzv. suché sodné mýdlo, vhodné na výrobu čistících a pracích prostředků. Draselná mýdla jsou mazlavá, používají se k přípravě dezinfekčních prostředků.

Druhou skupinou jednoduchých lipidů jsou vosky. Jsou to estery vyšších karboxylových kyselin a vyšších jednosytných alkoholů, nejčastěji těchto: cetylalkohol (C₁₆), stearylalkohol (C₁₈), myricylalkohol (C₃₁). Uplatňují se jako ochranné a izolační povrchové vrstvy listů, plodů i některých živočichů. V živočišných voscích převládají alkoholy se 14 až 18 uhlíkovými atomy, v rostlinných alkoholy s delším řetězcem, s 26 až 30 atomy uhlíku.

Acylsteroly obsahují jako alkoholovou složku cholesterol (Obr. 5) nebo jiný sterol. Jsou součástí lipidní složky biologických membrán a lipoproteinů, které umožňují regulovatelný

transport lipidů v organismu. Hydrolytickým odštěpením mastné kyseliny vzniká amfifilní steroidní alkohol. Tato přeměna lipofilní-amfifilní má význam v regulaci transportu lipidů.

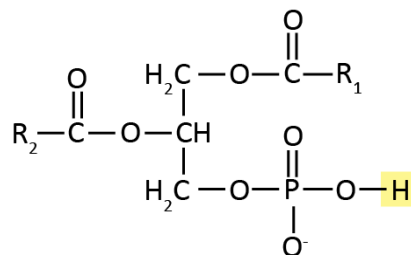
Složené lipidy obsahují ve své molekule kromě mastné kyseliny a alkoholu ještě další složku: fosfolipidy – obsahují esterově vázanou kyselinu fosforečnou, glykolipidy – obsahují sacharidovou složku, lipoproteiny – obsahují bílkovinnou část.



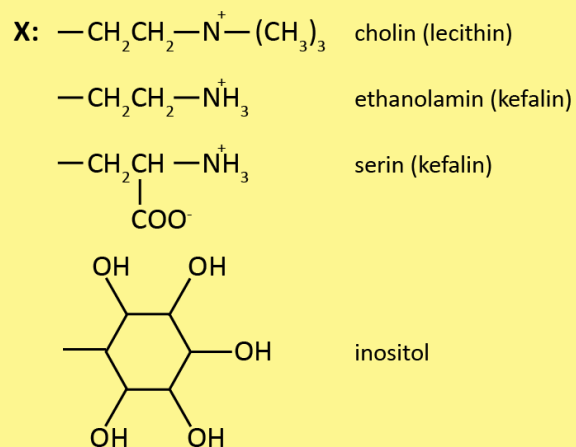
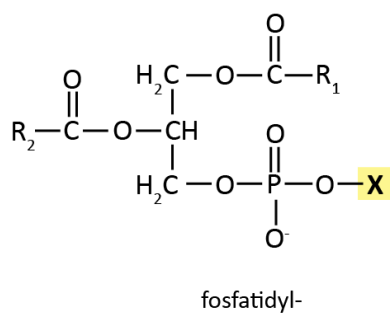
Obr. 5 Cholesterol.

Glycerofosfolipidy (fosfatidy) jsou estery 1,2-diacylglycerol-3-fosforečné (fosfatidové) kyseliny (Obr. 6).

Fosfátový zbytek tvoří diestery s aminoalkoholy ethanolaminem (kolaminem) a cholinem (lecithin), s hydroxyaminokyselinou serinem s glycerolem a s cyklickým alkoholem inositolem (Obr. 7). Glycerofosfolipidy se uplatňují především jako stavební základ biologických membrán. Charakteristický je pro ně obsah jednoho nenasyceného acylového zbytku.

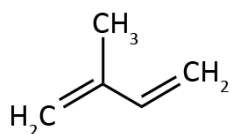


Obr. 6 Kyselina fosfatidová.

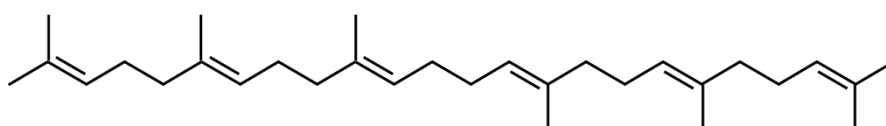


Obr. 7 Glycerofosfolipidy.

Isoprenoidy jsou největší a nejpestřejší skupinou látek, strukturně odvozených od molekuly isoprenu, 2-methyl-1,3-butadienu (Obr. 8). Řadíme sem terpeny a steroidy. Podle počtu isoprenoidních jednotek rozlišujeme (1) hemi-, (2) mono-, (3) seskvi-, (4) di-, (6) tri-, (8) tetra- a polyterpeny. Mezi triterpeny řadíme skvalen (Obr. 9), což je prekurzor při syntéze steroidů. Konečným produktem cyklizace skvalenu je cholesterol, který je nejdůležitějším živočišným steroidem.

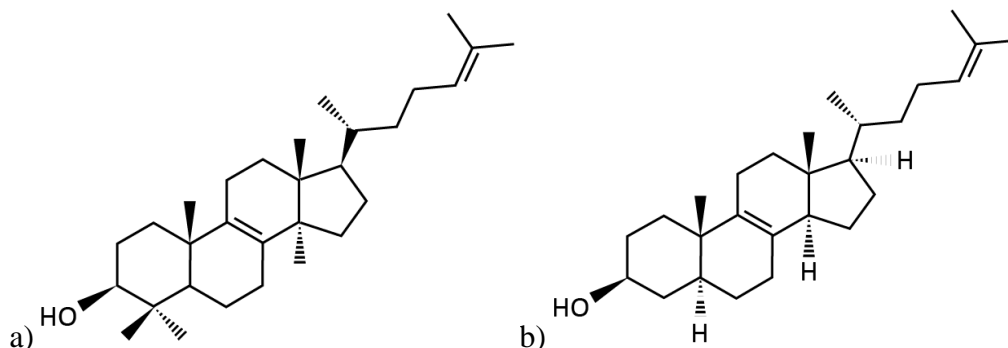


Obr. 8 Struktura isoprenu.

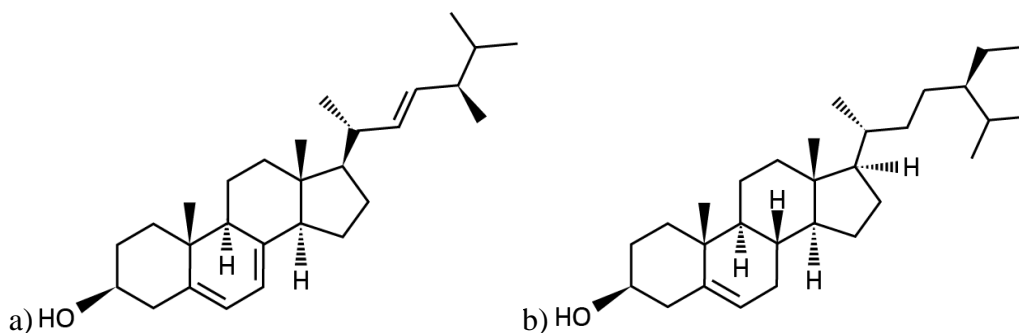


Obr. 9 Skvalen.

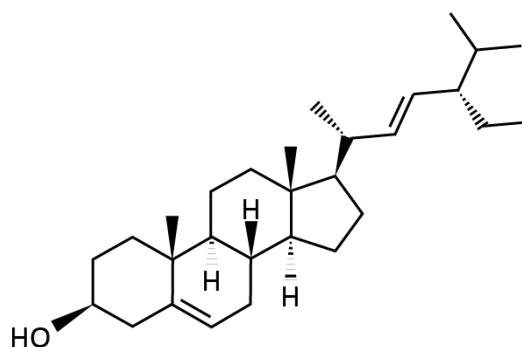
Dalšími steroly jsou např. lanosterol (Obr. 10a) z ovčí vlny, zymosterol (Obr. 10b) a ergosterol (Obr. 11a) z kvasnic, sitosterol (Obr. 11b) a stigmasterol (Obr. 12) rostlinného původu. Známými tetraterpeny jsou karoteny, xanthofyly a některá jiná lipofilní rostlinná barviva.



Obr. 10 a) Lanosterol, b) zymosterol.

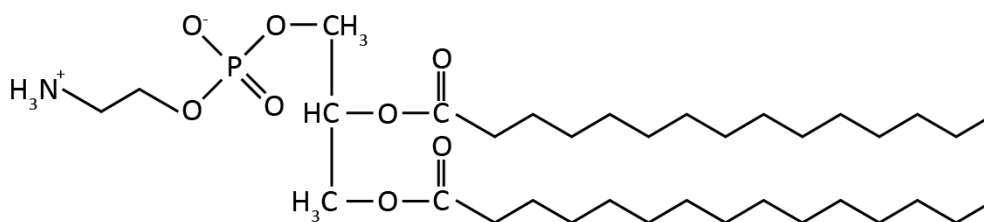


Obr. 11 a) Ergosterol, b) sitosterol.



Obr. 12 Stigmasterol.

Zdrojem lecithinu (Obr. 13) – nejznámějšího fosfolipidu, který se dnes běžně používá v potravinářském průmyslu, je vaječný žloutek. Obsahuje značné množství tuků (asi 23 %), dále jsou v něm obsaženy fosfatidy (lecithiny, kefaliny, plasmalogeny), sfingolipidy (sfingomyeliny, cerebrosidy), látky terpenoidního charakteru (steroidy a karotenoidy), ale i bílkoviny. Lecithin (asi 11 %) je ve žloutku přítomen ve formě aduktu s bílkovinou vitelinem jako tzv. lecithalbumin. Některé z uvedených látek se dají ze směsi snadno oddělit na základě rozdílných vlastností. Fosfatidy jsou nerozpustné ve studeném acetonu, ve kterém se naopak snadno rozpouštějí neutrální tuky a steroidy. S výjimkou neesterifikovaných sterolů se lipidy hydrolyzují alkáliemi za vzniku solí mastných kyselin (mýdel), jež jsou nerozpustné v etheru. Neutrální tuky a vodu odstraníme ze žloutku extrakcí acetonem a z nerozpustného zbytku představujícího denaturované bílkoviny a fosfolipidy extrahujeme druhé jmenované 95% ethanolem. Obsah jednotlivých složek v extraktu záleží na použitém rozpouštědle. Ethanolový extrakt obsahuje převážně lecithin, kefalín a další minoritní složky. Lecithiny lze ze směsi fosfolipidů vysrážet alkoholickým roztokem chloridu kadmenného. Vaječný lecithin je směsí obsahující různé estericky vázané kyseliny (palmitovou, olejovou, linolovou, atd.).



Obr. 13 Lecithin.

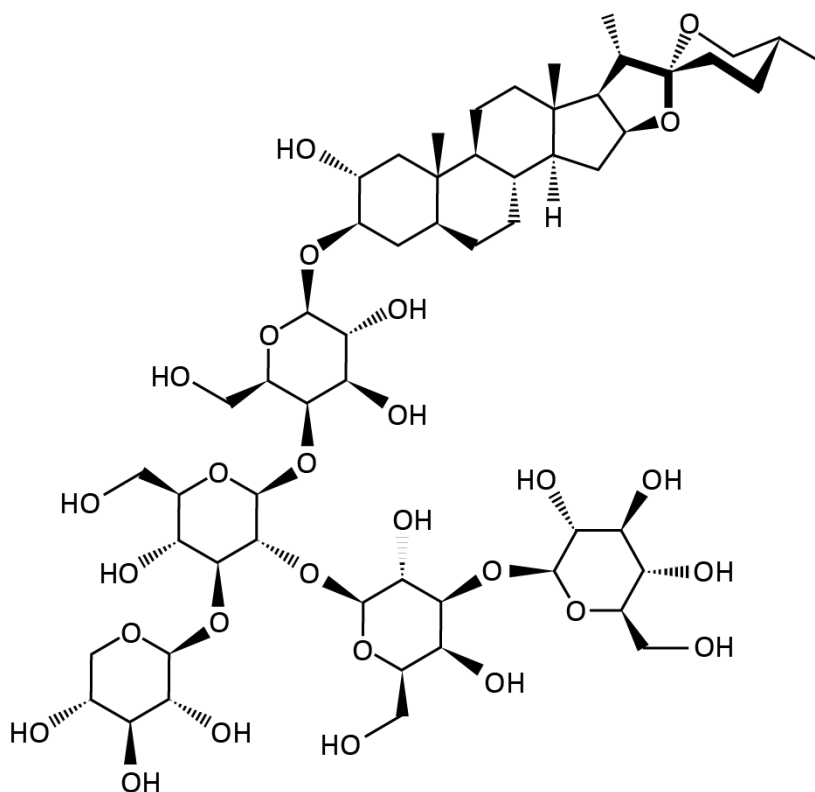
Molekula lecithinu složená z objemné hydrofobní části řetězců mastných kyselin a malé hydrofilní části fosfátu a amoniové skupiny tvoří snadno ve vodě micely – krystalické shluky koloidních rozměrů. Tyto amfifilní látky přidané k soustavě dvou vzájemně nemísitelných kapalin snižují povrchové napětí mezi polární a nepolární kapalinou a pomáhají vytvořit emulze. Hydrofilní část emulgátoru se přitom orientuje do vodné fáze, hydrofobní část do nepolární olejové fáze. V praxi nejčastěji užívanými emulgátory jsou mýdla a saponáty, v potravinářství je to lecithin.

Lecithin lze rozštěpit hydrolyzou na vyšší mastné kyseliny, glycerol, kyselinu fosforečnou a dusíkatou organickou bázi. Tyto složky lze v hydrolyzátu dokázat. Mastné kyseliny jako mýdla, glycerol reakcí nitrochromovou a kyselinu fosforečnou jako žlutý fosfomolybdenan

amonný, který po redukcí poskytne modré zbarvení fosfomolybdenové modře (princip kvantitativního stanovení fosfátů podle Fiske-Subbarowa). Cholin dává s přebytkem jódu málo rozpustnou adiční sloučeninu (Florenceovy krystalky). Je to enneajodid cholinu ($C_5H_{14}NOI_8$). Této sloučeniny se užívalo pro kvantitativní jodometrické stanovení cholinu. Také s roztokem komplexní soli reineckátu amonného (jedná se o sloučeninu tetrahydrodanidoammochromitan – $NH_4[Cr(SCN)_4(NH_3)_2].H_2O$) dává cholin málo rozpustnou sůl.

Cholesterol (Obr. 5) se nedá zmýdelnit, protože není ester. Podobně jako další β -hydroxysteroidy tvoří s digitoninem (Obr. 14) málo rozpustnou sloučeninu, které se užívalo při gravimetrickém stanovení cholesterolu. V chloroformovém prostředí dává cholesterol barevnou reakci s acetanhydridem, které se používá ke kolorimetrickému stanovení.

Hydrolyzou tuků v alkalickém prostředí vznikají soli vyšších mastných kyselin (mýdla) a glycerol. Draselná, sodná a amonná mýdla jsou rozpustná ve vodě, dají se však přidáním vhodného elektrolytu vysolit. Mýdla vápenatá a hořečnatá jsou nerozpustná. Nenasycené mastné kyseliny lze dokázat adicí bromu na dvojně vazby.



Obr. 14 Digitonin.

2 Praktická část

2.1 Preparace lipidových frakcí z vaječného žloutku a identifikace lipidů

2.1.1 Vybavení

2.1.1.1 Materiál

- Vejce, rostlinný olej, nastrouhané mýdlo, komerční cholesterol.

2.1.1.2 Přístroje

- Vařič, mikroskop, vodní lázeň pro odpařování.

2.1.1.3 Chemikálie

- Hydroxid sodný, chlorid sodný, jodid draselný, ethanol, kyselina sírová, brom, kyselina octová, aceton, diethylether, chloroform, molybdenan amonný tetrahydrát, chlorid cínatý, chlorid vápenatý dihydrát, reineckát amonný, acetanhydrid, cholesterol.

2.1.1.4 Roztoky

- **Lugolův roztok**

10 g jodidu draselného a 5 g jódu se rozpustí ve vodě a doplní na objem 100 ml.

- **10% hydroxid sodný**

10 g hydroxidu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na objem 100 ml.

- **10% alkoholický roztok NaOH**

10 g hydroxidu sodného se rozpustí v ethanolu a doplní do objemu 100 ml.

- **2,5% molybdenan amonný**

Do 80 ml vody se přidá 14 ml kyseliny sírové, v roztoku se rozpustí 2,5 g molybdenanu amonného a poté se objem doplní vodou do 100 ml.

- **2% reineckát amonný**

200 mg reineckátu amonného se rozpustí v 10 ml vody.

- **10% chlorid vápenatý**

10 g chloridu vápenatého se rozpustí ve vodě a doplní na objem 100 ml.

- **Bromová voda**

Do 100 ml vody se přidá asi 5 kapek bromu.

- **Chloroformový roztok cholesterolu**

V 25 ml chloroformu se rozpustí špetka cholesterolu.

2.1.2 Postup

Extrakce neutrálních lipidů

- Žloutek slepičího vejce oddělte pečlivě od bílku.
- Žloutek důkladně promíchejte v kádince s 15 ml bezvodého acetonu.
- Za občasného míchání nechejte směs asi 10 min stát.

- Poté extrakt zfiltrujte přes filtr navlhčený acetonem do odpařovací misky.
- Zbytek na filtru (denaturované bílkoviny a fosfolipidy) vpravte zpět do kádinky a opět cca 5 min míchejte s 15 ml acetonu.
- Směs znovu zfiltrujte do stejné odpařovací misky a filtrát obsahující převážně neutrální tuky a cholesterol odpařte na vodní lázni do sucha.

Izolace fosfolipidů

- Zbytek na filtru po dvojnásobné extrakci acetonem dejte zpět do kádinky a míchejte cca 5 min s 15 ml 95% ethanolu ze stříčky.
- Směs zfiltrujte přes filtr navlhčený ethanolem.
- Zbytek na filtru dejte zpět do kádinky (denaturované bílkoviny) a ještě jednou promyjte 15 ml 95% ethanolu.
- Filtrát obsahující fosfolipidy odpařte do sucha na vodní lázni.
- Získáte mazlavou sraženinu fosfatidů, která se sestává převážně z lecithinu.

Odstranění tuku ve formě mýdla

- Připravte si 100 ml 10% alkoholického roztoku NaOH ze zásobního roztoku 40% NaOH a 95% ethanolu.
- Acetonový filtrát po zahuštění (viz Extrakce neutrálních lipidů) rozetřete tloučkem přímo v odpařovací misce s 15 ml alkoholického roztoku NaOH a zahřívajte na vroucí lázni do sucha, nejdéle však 30 min, čímž se zmýdelní tuky.
- Zbytek ochlaďte na stole a dobře rozetřete tloučkem s 25 ml diethyletheru přímo v odpařovací misce.
- Sraženinu sodného mýdla odfiltrujte a uschovejte pro další práci.

Izolace cholesterolu

- Etherický filtrát (viz Odstranění tuku ve formě mýdla) obsahující cholesterol odpařte do sucha na vodní lázni a ze zbytku vyextrahujte cholesterol 2 ml chloroformu.
- Proved'te důkaz cholesterolu, viz další kapitola.

Vlastnosti mýdla

- Získané mýdlo a nejemno nastrohané komerční mýdlo (špetka) rozpust'te asi v 50 ml teplé vody z kohoutku a je-li potřeba, roztok zfiltrujte.
- Do čtyř zkumavek odměřte asi po 5 ml roztoku získaného mýdla a do dalších čtyř zkumavek odměřte asi 5 ml roztoku komerčního mýdla. Proved'te tyto reakce:
- V první zkumavce pozorujte, že třepáním se tvoří pěna (snížení povrchového napětí vody).
- Do druhé zkumavky přikapejte 10% roztok chloridu vápenatého do vzniku sraženiny.
- Do třetí zkumavky přidejte několik kapek kyseliny octové, až se objeví bílý zákal, který se po delším stání přemění v olejovou vrstvu.

- Ve čtvrté zkumavce rozpustíte tolik pevného NaCl, až se objeví sraženina vysoleného mýdla.

Lecithin jako přirozený emulgátor

- Do dvou zkumavek přidejte po 2 ml vody a 1 ml rostlinného oleje.
- Do jedné ze zkumavek pak přidejte tyčinkou malé množství lecithinu.
- Za mírného míchání zahřejte na vodní lázni, zazátkujte a intenzivně třepejte asi 2 minuty.
- Po 10 minutách stání srovnajte stabilitu bez emulgátoru a s emulgátorem.

Hydrolyza lecithinu

- Připravte si 100 ml 10% vodného roztoku NaOH ze zásobního roztoku 40% NaOH a destilované vody.
- Polovinu připraveného surového lecithinu vpravte na dno zkumavky a zahřívejte nejméně 15 minut na vroucí vodní lázni s 5 ml 10% vodného roztoku NaOH.
- Hydrolyzát ochlaďte, okyselte kyselinou octovou na pH 6 a odfiltrujte vyloučené mastné kyseliny.

Důkaz kyseliny fosforečné

- K 1 ml odfiltrovaného hydrolyzátu lecithinu přidejte několik kapek roztoku molybdenanu amonného.
- Vytvoří se žlutý fosfomolybdenan amonný, který po přidání chloridu cínatého zmodrá (fosfomolybdenová modř).
- Chlorid cínatý v množství na špičku špachtle se přidává opatrně na stěnu nakloněné zkumavky.

Důkaz cholinu

- Tři kapky odfiltrovaného hydrolyzátu smíchejte v mikrozkušavce s 3 kapkami Lugolova roztoku. Následně přeneste kapku na podložní sklíčko a překryjte ji krycím sklíčkem.
- Pod mikroskopem pozorujte růst hnědých krystalků, které zakreslete do protokolu.
- Ke 3 kapkám filtrátu v mikrozkušavce přidejte 3 kapky 2% reineckátu amonného.
- Vytvoří se růžově zbarvené krystalky reineckátu cholinu, které si rovněž prohlédnete pod mikroskopem.

Důkaz cholesterolu

Reakci pro srovnání provedte s chloroformovým roztokem komerčního cholesterolu.

Liebermann-Buchardova reakce

- Asi 1 ml roztoků cholesterolu dejte do suché zkumavky, přidejte 10 kapek acetanhydridu a 2 kapky kyseliny sírové.

- Protřepete a nechte několik minut stát.
- Pozorujte zbarvení směsi.

2.1.3 Vyhodnocení

- Do protokolu zapište schéma izolace.
- Zjistěte výtěžek lecithinu.
- Napište rovnici hydrolýzy lecithinu v alkalickém prostředí.
- Zaznamenejte výsledky provedených kvalitativních reakcí.
- Pozorujte zbarvení směsi cholesterolu při Liebermann-Buchardově reakci.