



Pracownia studencka
Katedry Analizy Środowiska

Ćwiczenia laboratoryjne - teoria

Analiza lipidów

ANALIZA PRODUKTÓW POCHODZENIA NATURALNEGO

Gdańsk, 2009

1. Lipidy

Lipidy, inaczej tłuszcze, to naturalne związki chemiczne o różnorodnej budowie chemicznej. *Lipidy są definiowane jako grupa związków dobrze rozpuszczalnych w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych takich jak chloroform, węglowodory, alkohole, etery i estry i w bardzo niewielkim stopniu rozpuszczalnych w wodzie* [1]. Powyższa definicja jest bardzo ogólna, gdyż w skład lipidów wchodzi związków o różnej budowie chemicznej. Można je podzielić na dwie kategorie:

- lipidy o strukturach opartych na długołańcuchowych kwasach karboksylowych a także ich bezpośrednich pochodnych, czyli: kwasy tłuszczowe, alkanany, niektóre alkeny, aldehydy i alkohole długołańcuchowe oraz ich pochodne (estry),
- lipidy terpenowe o strukturach opartych na jednostce izoprenowej C₅.

Inna definicja została zaproponowana przez W. Christie [2], który proponuje, aby *terminem lipidy określać kwasy tłuszczowe, ich pochodne oraz substancje związane z nimi bądź biochemicznie bądź poprzez funkcje w organizmie*.

Kwasy tłuszczowe występują w naturze zazwyczaj w postaci związanej. Tworzą estry z glicerolem jako monoacyloglicerole, diacyloglicerole, triacyloglicerole, fosfolipidy i inne. Istnieją również ich estry ze sterolami oraz alkoholami długołańcuchowymi.

Obecnie znanych jest powyżej 1000 kwasów tłuszczowych zidentyfikowanych w naturalnych produktach pochodzenia zwierzęcego, roślinnego a także z grzybów i bakterii. Najczęściej występuje i jest analizowanych około 50 kwasów. Ze względu na określoną, niewielką liczbę dróg biosyntezy z ograniczonej liczby substratów, kwasy tłuszczowe mają podobną budowę.

Kwasy tłuszczowe (FA) charakteryzują się następującymi cechami:

1. większość kwasów tłuszczowych ma prostołańcuchowe cząsteczki zawierające parzystą liczbę atomów węgla w zakresie od 12 do 22,
2. kwasy jednonienasycone zawierają 1 wiązanie podwójne najczęściej o konfiguracji Z (*cis*),
3. kwasy wielonienasycone zawierają dwa lub więcej wiązań podwójnych najczęściej o konfiguracji Z (*cis*) oddzielonych grupą metylenową.

Kwasy tłuszczowe nazywane są od nazw węglowodorów o tej samej liczbie atomów węgla w cząsteczkach przy jednoczesnej zamianie końcówki z -an na -owy (tabela 1). Na przykład:

- węglowodór: *n*-heksadekan,
- kwas tłuszczowy: kwas *n*-heksadekanowy, CH₃(CH₂)₁₄COOH,

- w skrócie możemy zapisać: **16:0**, gdzie 16 oznacza ilość atomów węgla w łańcuchu kwasu tłuszczowego zaś liczba po dwukropku oznacza ilość wiązań podwójnych.

Skróty używane zwyczajowo do określania nienasyconych kwasów tłuszczowych tworzy się w sposób podany poniżej na przykładzie kwasu oleinowego:

$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$			skrót
$\omega 1$	$\omega 9$	$\omega 18$	18:1($\omega 9$)
n1	n9	n18	18:1(n9)
n-1	n-9	n-18	18:1(n-9)

W podanych skrótach położenie wiązania podwójnego liczy się od końca ω cząsteczki kwasu tłuszczowego. Te zwyczajowe skróty są często używane, gdyż pokazują wspólną drogę biosyntezy kwasów z tym samym miejscem położenia wiązania podwójnego. Na przykład: elongacja kwasu oktadecenowego 18:1(n-9) prowadzi do powstania kwasu ejkozenowego 20:1(n-9) a następnie kwasu dokozenowego 22:1(n-9):

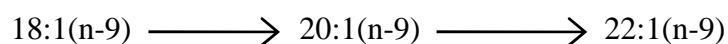
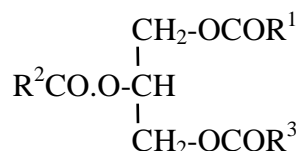


Tabela 1. Typowe kwasy tłuszczowe występujące w naturze.

Nazwa systematyczna	Nazwa zwyczajowa	Skrót
<i>kwasy nasycone:</i>		
<i>n</i> -dodekanowy	laurynowy	12:0
<i>n</i> -tetradekanowy	mirystynowy	14:0
<i>n</i> -heksadekanowy	palmitynowy	16:0
<i>n</i> -oktadekanowy	stearynowy	18:0
<i>n</i> -ejkozanowy	arachidowy	20:0
<i>n</i> -dokozanowy	behenowy	22:0
<i>kwasy jednonienasycone:</i>		
<i>cis</i> -9-heksadecenowy	palmitoleinowy	16:1(n-7)
<i>cis</i> -6-oktadecenowy	petroselinowy	18:1(n-12)
<i>cis</i> -9-oktadecenowy	oleinowy	18:1(n-9)
<i>cis</i> -11-oktadecenowy	wakcenowy	18:1(n-7)
<i>kwasy wielonienasycone:</i>		
9,12-oktadekadienowy	linolowy*	18:2(n-6)
9,12,15-oktadekatrienowy	linolenowy*	18:3(n-3)
6,9,12-oktadekatrienowy	γ -linolenowy*	18:3(n-6)
5,8,11,14-ejkozatetraenowy	arachidonowy*	20:4(n-6)

* - ważniejsze niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT)

Triacyloglicerole (TAG) są to estry kwasów tłuszczowych oraz glicerolu (gliceryny). Ich strukturę można przedstawić w postaci ogólnego wzoru (rys. 1). W naturalnych tłuszczach TAG tworzą zwykle skomplikowane mieszaniny estrów różnych kwasów tłuszczowych. Na przykład, z dwóch kwasów tłuszczowych: palmitynowego i stearynowego, może powstać 9 różnych triacylogliceroli. Natomiast z 10 różnych kwasów tłuszczowych może powstać 1000 izomerów triacylogliceroli (wliczając w to izomery optyczne).



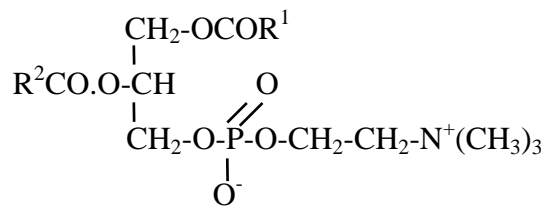
Rys. 1. Struktura triacyloglicerolu, gdzie $\text{R}^1\text{CO-}$, $\text{R}^2\text{CO-}$ oraz $\text{R}^3\text{CO-}$ odpowiadają resztom kwasowym.

Fosfolipidy to liczna grupa polarnych lipidów zawierających estrowo związaną resztę kwasu fosforowego. Zalicza się do niej kilka klas związków znacznie różniących się budową. Fosfolipidy występują we wszystkich organizmach żywych, zwierzęcych i roślinnych, w większych ilościach w organach o szczególnym znaczeniu takich jak mózg lub nasiona u roślin. Do fosfolipidów zaliczamy m.in. fosfatydylocholinę (PC), fosfatydyloetanolaminę (PE), fosfatydyloserynę (PS) i fosfatydyloinozytolę (PI) (rys. 2).

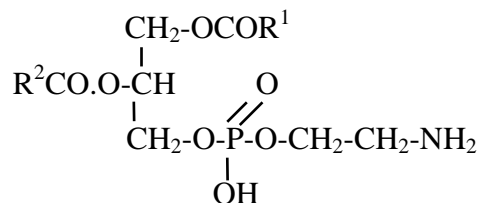
Fosfatydylocholinę, zwane inaczej lecytyną, zawierają w swej cząsteczce glicerol związany estrowo z dwiema resztami kwasów tłuszczowych, trzecia grupa hydroksylowa jest zestryfikowana kwasem fosforowym, który z kolei jest związany z choliną.

Fosfolipidy odkryto najpierw w mózgu a następnie w żółtku jaj. Od jego greckiej nazwy wywodzi się zwyczajowa nazwa lecytyny. Lecytyna jest najczęściej występującym lipidem w membranach komórkowych w tkankach zwierzęcych i często jest także znaczącym lipidem w tkankach roślinnych.

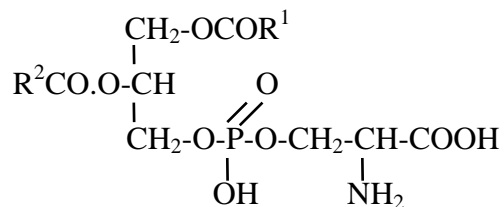
Lizofosfolipidy mają tylko jedną resztę acylową w cząsteczce, generalnie w pozycji *sn*-1. Na przykład lizofosfatydylocholina (rys. 2).



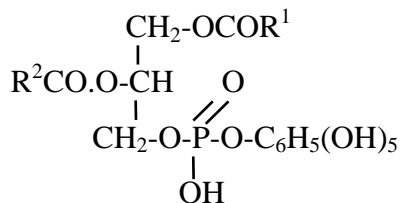
1,2-diacylo-*sn*-glicerolo-3-fosforylocholina czyli fosfatylocholina



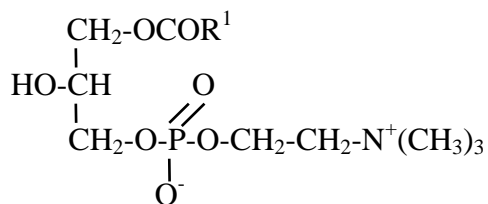
fosfatydyloetanoloamina



fosfatydyloseryna



fosfatydyloinozytol



lizofosfatydylocholina

Rys. 2. Struktury fosfolipidów, gdzie R¹CO– oraz R²CO– odpowiadają resztom kwasowym.

Różnorodność struktur związków lipidowych odzwierciedla różnorodność ich funkcji w żywych organizmach. Lipidy polarne są głównymi składnikami błon komórkowych. Funkcjonowanie wszystkich komórek eukariotycznych związane jest z selektywną i zmienną przepuszczalnością błon, które regulują poziom metabolitów w komórce i jej organellach. Każda komórka otoczona jest błoną oddzielającą cytoplazmę od środowiska. Podobne błony oddzielają również organelle komórkowe od cytoplazmy. Błony cytoplazmatyczne zbudowane są głównie z fosfolipidów i białek. Ponadto lipidy są głównym materiałem zapasowym w komórkach zwierzęcych, roślinnych i bakteryjnych. Materiałem zapasowym w komórkach eukariotycznych są lipidy niepolarne - triacyloglicerole.

2. Skład lipidów żółtek jaj kurzych

Żółtka jaj kurzych są znanym źródłem lipidów m.in. fosfatydylocholiny i triacylogliceroli [3]. Około 1/3 masy żółtka jaj stanowią lipidy. Głównymi kwasami tłuszczowymi w żółtku są kwasy oleinowy i palmitynowy, ale ich skład procentowy we frakcji TAG i frakcji fosfolipidów jest różny. Triacyloglicerole zawierają około 53% kwasu oleinowego, 25% palmitynowego, 9% linolowego i 8% stearynowego, natomiast fosfolipidy zawierają 43% oleinowego, 32% palmitynowego, 8% linolowego i 4% stearynowego. Należy pamiętać, że kompozycja kwasów tłuszczowych zależy od pokarmu, który jedzą kury, natomiast zawartość cholesterolu jest stała i wynosi około 5% masy lipidów.

Tabela 2. Główne klasy lipidów żółtek kurzych [3].

Klasa lipidów	Zawartość (%)
lipidy niepolarne	61,7
cholesterol	4,8
fosfatydylocholina	24,5
lizofosfatydylocholina	0,8
fosfatydyloetanolamina	5,0
lizofosfatydyloetanolamina	0,7
sfigomiolina	0,1

3. Analiza lipidów

Metody analiz składników lipidowych złożonych próbek naturalnych mogą być bardzo różnorodne tak jak występujące w nich związki. Celem analizy jest uzyskanie informacji o składzie próbki, czyli identyfikacja poszczególnych składników a także oznaczenie ich ilości.

Analiza składa się z kilku równie istotnych etapów. Pierwszym z nich jest ekstrakcja lipidów a następnie, w większości przypadków, rozdział na poszczególne klasy związków o podobnej budowie i polarności. Składniki każdej z wyizolowanych grup identyfikuje się w oparciu o nowoczesne metody analityczne między innymi chromatografię gazową i cieczową, spektrometrię mas, spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego, spektroskopię w podczerwieni. W niektórych przypadkach analizuje się ekstrakt bez wcześniejszego podziału na klasy związków.

Zanim zaczniemy analizę próbki lipidów, najpierw musimy wyekstrahować ją z tkanki. Lipidy wyodrębnia się z tkanek poprzez ekstrakcję rozpuszczalnikami najczęściej w układzie ciec-ciecz. Istnieje wiele różnych metod ekstrakcji lipidów z tkanek. Wybór rozpuszczalnika i procedura ekstrakcji zależą od tego, którą frakcję lipidów chcemy uzyskać oraz z jakiej tkanki ją ekstrahujemy. Lipidy niepolarne, takie jak na przykład triacyloglicerole, występują zazwyczaj w tkance tłuszczowej, skąd mogą być z łatwością wyekstrahowane. Lipidy polarne tworzą strukturę błon komórkowych wraz z polisacharydami i białkami, z którymi są związane i dlatego ich ekstrakcja jest trudniejsza niż lipidów niepolarnych. Aby wyekstrahować lipidy z tkanek należy znaleźć taki rozpuszczalnik, który nie tylko rozpuszcza lipidy, ale również przełamie oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami lipidów a innymi składnikami komórek. Do wyekstrahowania jednocześnie lipidów niepolarnych i polarnych stosuje się mieszaninę chloroformu i metanolu.

Rozpuszczalniki do ekstrakcji lipidów powinny być świeżo destylowane w szklanej aparaturze bez jakichkolwiek smarów (np. używanych do szlifów). W trakcie ekstrakcji lipidów należy zachować środki ostrożności i unikać kontaktu skóry rąk i twarzy z rozpuszczalnikami. Mieszanina chloroformu z metanolem używana do ekstrakcji lipidów powoduje natychmiastowe usunięcie bariery lipidowej ze skóry i bolesne podrażnienie.

Próbki lipidów należy przechowywać w szklanych naczyniach. Lipidy przechowywane w plastikowych pojemnikach absorbują plastyfikatory ze ścianek pojemnika, które przeszkadzają w dalszych analizach próbki lipidów.

4. Metoda Folcha

Ekstrakty lipidów z tkanek zawierają duże ilości nie-lipidowych związków rozpuszczalnych w wodzie takich jak cukry, aminokwasy i inne. Substancje te muszą być usunięte z próbki przed rozpoczęciem analiz. Stosuje się do tego celu prostą metodę przemywania nazywaną od nazwiska jej twórcy metodą Folcha [4]. Procedura ekstrakcji i przemywania próbki jest następująca [5]:

- próbka tkanki jest homogenizowana z roztworem chloroform-metanol (2:1) w proporcji 1 g tkanki na 20 ml roztworu rozpuszczalników,
- homogenizat jest filtrowany albo odwirowywany,
- uzyskany ekstrakt (20 ml) jest przemywany albo wodą albo 0,9% wodnym roztworem NaCl (4 ml), objętość roztworu soli wynosi 1/5 objętości ekstraktu lipidów,
- po rozdzieleniu faz usuwa się górną fazę zawierającą większość nie-lipidowych zanieczyszczeń, dolna warstwa zawiera lipidy.

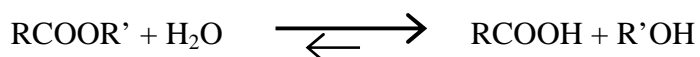
Efektywność przemywania zależy od obecności soli mineralnych w surowym ekstrakcie [4]. Obecność soli zmienia podział lipidów pomiędzy dwie fazy i praktycznie eliminuje lipidy z górnej warstwy. Niewielką stratę lipidów można zredukować poprzez zastosowanie roztworu soli zamiast wody do przemywania ekstraktu.

Dokładne procedury metody Folcha oraz jej modyfikacji zamieszczone są w wielu publikacjach dotyczących ekstrakcji i analiz lipidów.

5. Profil kwasów tłuszczowych

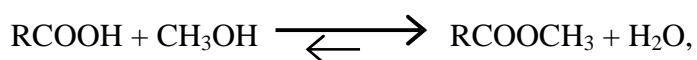
W lipidach kwasy tłuszczowe występują w postaci estrów. Najprostszy sposób analizy mieszaniny lipidów polega na uwolnieniu kwasów tłuszczowych poprzez kwaśną lub alkaliczną hydrolizę i następnie na analizie składu kwasów tłuszczowych. Jakościowa i ilościowa kompozycja kwasów tłuszczowych z lipidów nosi nazwę profilu kwasów tłuszczowych. Przed analizą należy wykonać albo hydrolizę lipidów a następnie uwolnione kwasy tłuszczowe zestryfikować albo należy wykonać transestryfikację. Jeżeli transestryfikację lipidów przeprowadzimy w bezwodnym środowisku w metanolu to uzyskamy estry metylowe kwasów tłuszczowych. Jest to tzw. metanoliza. Jej produkty, estry metylowe kwasów tłuszczowych, możemy łatwo analizować metodą chromatografii gazowej. Profil kwasów tłuszczowych z żółtka jaj jest podany na rys. 1.

Estry ulegają hydrolizie, czyli przemianie w kwasy [1]. Reakcja może być katalizowana przez kwas:

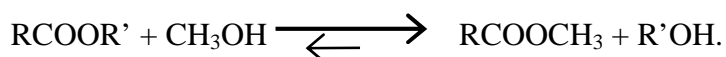


lub przez zasadę. Hydroliza kwasowa jest reakcją odwracalną. W warunkach hydrolizy zasadowej kwas karboksylowy otrzymujemy w postaci jego soli. Hydrolizę lipidów wykonuje się zazwyczaj poprzez ogrzewanie próbki lipidów z 1 M roztworem wodorotlenku potasowego w 95% etanolu.

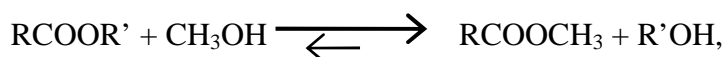
W trakcie ogrzewanie próbki lipidów rozpuszczonej w nadmiarze bezwodnego metanolu w obecności kwaśnego katalizatora wolne kwasy tłuszczowe ulegają estryfikacji:



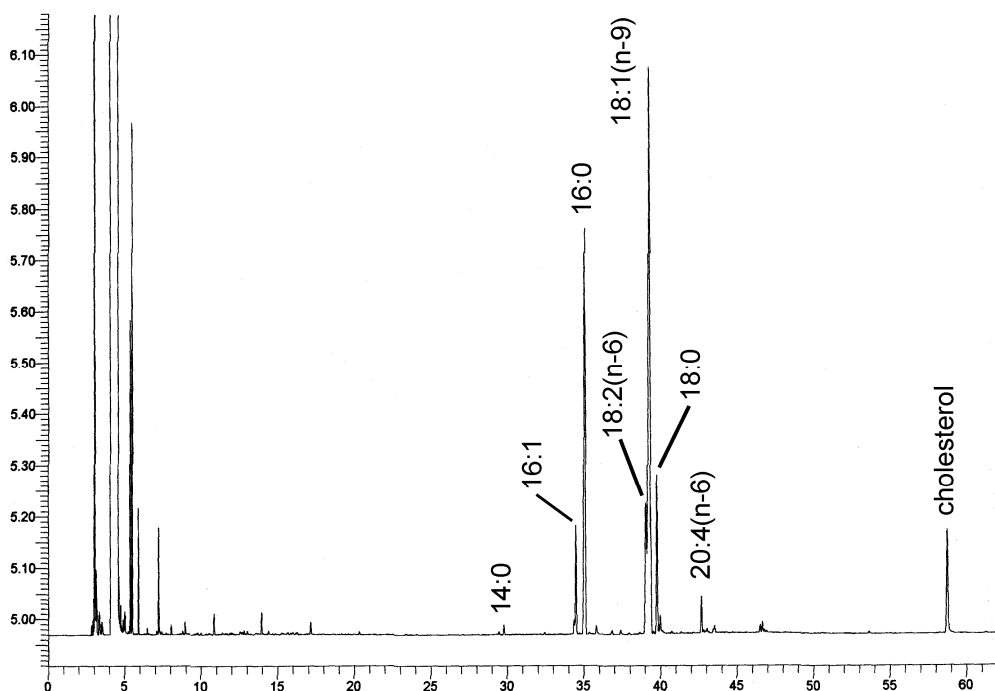
zaś estry transestryfikacji:



W trakcie ogrzewanie próbki lipidów rozpuszczonej w nadmiarze bezwodnego metanolu w obecności zasadowego katalizatora (na przykład metanolanu sodu) estry ulegają transestryfikacji:



natomiast wolne kwasy tłuszczowe nie są w tych warunkach estryfikowane.



Rys. 1. Chromatogram GC-FID estrów metylowych kwasów tłuszczowych wyizolowanych z żółtka jaja kurzego. Kolumna kapilarna RTX-5 (faza stacjonarna niepolarna), 30 m × 0,25 mm; 0,25 μm grubość filmu fazy stacjonarnej. Analiza w warunkach programowanej temp. od 70 °C do 300 °C, narost 4°C/min.

6. Analiza kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej

Kwasy tłuszczowe są najczęściej analizowaną, metodą chromatografii gazowej (GC), klasą lipidów. Aby poprawić kształt pików i rozdzielczość, kwasy tłuszczowe analizuje się w postaci estrów metylowych. Większość tych związków można analizować na kolumnach kapilarnych z niepolarną fazą stacjonarną. Kolejność elucji niepolarnych związków z kolumny o niepolarnej fazie stacjonarnej jest zgodna z kolejnością rosnących temperatur wrzenia a tym samym mas cząsteczkowych. Obecność wiązań podwójnych lub rozgałęzień łańcucha skraca czas elucji (rys. 1). Kolejność elucji estrów metylowych kwasów tłuszczowych będzie następująca: 16:1, 16:0, 18:3, 18:2, 18:1, 18:0.

W przypadku występowania problemów z rozdziałem estrów metylowych kwasów wielonienasyconych polecane jest użycie kolumn o polarnej fazie stacjonarnej. Kolejność elucji estrów metylowych kwasów tłuszczowych na polarnej fazie stacjonarnej jest w zasadzie zgodna z kolejnością rosnących mas cząsteczkowych estrów. Jednak obecność wiązań podwójnych w łańcuchach kwasów powoduje niewielki wzrost polarności tych estrów, czego

efektem jest zwiększenie czasu retencji zgodnie z regułą, że polarne związki eluują z dłuższymi czasami retencji z polarnych kolumn. Związki zawierające wiązanie podwójne w łańcuchu są dłużej zatrzymywane w polarnej fazie stacjonarnej ze względu na oddziaływania dipol-dipol pomiędzy wiązaniem podwójnym a polarną fazą stacjonarną. Kolejność elucji estrów metylowych kwasów tłuszczowych będzie następująca: 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3.

Analizy ilościowe metodą chromatografii gazowej wykonuje się metodą wzorca wewnętrznego. Metoda wzorca wewnętrznego polega na dodaniu do próbki określonej, dokładnie znanej ilości substancji wzorcowej, która nie występuje w badanej próbce natomiast jej właściwości fizykochemiczne są zbliżone do właściwości analitu. W przypadku analiz kwasów tłuszczowych, do próbki lipidów dodaje się najczęściej rzadko występujące w naturze nasycone kwasy tłuszczowe o nieparzystej liczbie atomów węgla w łańcuchach (kwasy heptadekanowy, nonadekanowy lub trikozanowy). Wzorzec wewnętrzny powinien przejść tę samą procedurę wyodrębniania i spochadniania próbki, co analit i dlatego dodaje się go do próbki przed wykonaniem ekstrakcji. Stosując do spochadniania lipidów transestryfikację katalizowaną zasadowo wybierzemy jako wzorzec wewnętrzny węglowodór, ponieważ wolne kwasy tłuszczowe nie są estryfikowane w tych warunkach.

W analizach chromatograficznych substancje identyfikuje się za pomocą detektorów jakościowych takich jak spektrometr mas bądź identyfikuje się związki na podstawie ich parametrów retencji. Najczęściej porównuje się czas retencji analizowanej substancji z czasem retencji substancji o znanej strukturze.

Literatura

1. Morrison R.T, Boyd R.N. *Chemia Organiczna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1996.
2. <http://www.lipidlibrary.co.uk/index.html> (aktualizacja 17.09.2009)
3. Padley F.B., Gunstone F.D., Harwood J.L. Occurrence and characteristics of oils and fats. W: *The Lipid Handbook*, red. Gunstone F.D., Harwood J.L., Padley F.B., Chapman & Hall, Cambridge, drugie wydanie, 1995, str. 193-194.
http://books.google.pl/books?id=m9J9pTDZEGEC&printsec=frontcover&source=gbv_v2_summary_r&cad=0#v=onepage&q=&f=false
4. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. *J. Biol. Chem.* 1957, 226: 497-509.
<http://www.jbc.org/cgi/reprint/226/1/497>
5. <http://www.cyberlipid.org/extract/extr0005.htm#1> (aktualizacja 09.09.2009)