

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Stanovení profilu mastných kyselin v komerčních
margarínech**

Bakalářská práce

Autor práce: Nina Sedláčková

Vedoucí práce: Ing. Jan Táborský, Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Stanovení profilu mastných kyselin v komerčních margarínech" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17.4.2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Janu Táborskému, PhD. za pomoc, cenné rady a připomínky, za vlídný přístup a trpělivost při vypracovávání této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mne po celou dobu studia podporovali.

Stanovení profilu mastných kyselin v komerčních margarínech

Souhrn

Cílem bakalářské práce bylo stanovit zastoupení mastných kyselin v margarínech běžně dostupných v obchodní síti České republiky, zhodnotit kvalitu těchto margarínů a naměřené výsledky analýz porovnat s údaji dostupnými v literatuře. Byly vybrány vzorky Flora, Flora Gold, Flora Light, Rama Classic a jeden roztíratelný tuk určený na pečení Hera. Extrahovaný tuk ze vzorku byl derivatizován methanolátem sodným, čímž se mastné kyseliny ve vzorku převedly na methylestery, které byly následně analyzovány metodou plynové chromatografie s plameno-ionizačním detektorem (GC-FID).

Nasyčených mastných kyselin (SFA) bylo nejvíce obsaženo v margarínu Hera (44,3 % z celkového množství mastných kyselin), z nich byla nejvíce zastoupena kyselina palmitová (27,3 %), laurová (8,9 %) a myristová (3,5 %). Nejvyšší zastoupení monoenoových mastných kyselin (MUFA) bylo detekováno v margarínu Rama Classic (45,3 %), nejvyšší podíl tvořila kyselina olejová (44,3 %). Margaríny značky Flora obsahovaly nejvíce polyenoových mastných kyselin (PUFA). Jediná omega-3 nenasycená mastná kyselina alfa-linolenová byla v zastoupení od 10,6 % u Flory Light do 12,4 % u Flory (Flora Gold obsahovala 11,5 %). Omega-6 mastných kyselin bylo nejvíce ve Floře Light (41,6 %), ve Floře bylo 38,2 % a ve Floře Gold 35,8 %. Nejvyšší zastoupení měla kyselina linolová, méně potom bylo kyseliny gama-linolenové a arachidonové. Obsah jediné identifikované trans nenasycené mastné kyseliny se u všech vzorků pohyboval ve velmi malém množství (0,03 % až 0,05 %). Výsledkem bakalářské práce mj. bylo, že margaríny obsahují malé množství trans nenasycených mastných kyselin a některé mohou být dobrým zdrojem esenciálních mastných kyselin.

Klíčová slova: mastné kyseliny, margarín, plynová chromatografie, lipidy, methylestery

Determination of fatty acids profile in commercial margarines

Summary

The aim of this thesis is to identify the fatty acids in margarine commonly available in stores across the Czech Republic, to assess the quality of these margarines and to determine the results of the analyses compared with the available data. The selected samples were Flora Gold, Flora, Flora Light, Rama Classic and one spreadable fat intended for baking, Hera. The samples were dissolved with sodium methoxide and the fatty acids converted into methyl esters, which were subsequently analyzed by gas chromatography with flame-ionization detection (GC-FID).

The most of saturated fatty acids (SFA) were found in the Hera sample (44,3 % from the total amount of fatty acids), from which were the highest concentrations of palmitic acid (27,3 %), lauric acid (8,9 %) and myristic acid (3,5 %). The highest representation of monounsaturated fatty acids (MUFA) was detected in Rama Classic (45,3 %), with the highest proportion being oleic acid (44,3 %). Flora contained the highest amount of polyenoic fatty acids (PUFA). Flora Light contained 10.6% of the only one omega-3 unsaturated fatty acid alpha-linolenic acid contained, Flora contained 12,4 %, Flora Gold contained 11,5 %. Omega-6 fatty acids were concentrations were highest in Flora Light (41,6 %), Flora contained 38,2 % and Flora Gold 35,8 %. Most prevalent was linoleic acid, next gamma-linolenic acid and arachidonic acid. Content of the only one identified trans unsaturated fatty acid across all the acids was in very small quantities ranging from 0,03 % to 0,05 %. The conclusion drawn from the analysis was that margarines contain small amount of trans unsaturated fatty acids and some could be a good source of essential fatty acids.

Keywords: fatty acids, margarine, gas chromatography, lipids, methyl esters

Obsah

1 ÚVOD	8
2 CÍL PRÁCE	9
3 LITERÁRNÍ REŠERŠE	10
3.1 Lipidy	10
3.1.1 Klasifikace lipidů	10
3.1.2 Osud lipidů v organismu	13
3.2 Mastné kyseliny	14
3.2.1 Nasycené mastné kyseliny (SFA)	15
3.2.2 Nenasycené mastné kyseliny	16
3.2.3 Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (MUFA).....	17
3.2.4 Trans mastné kyseliny	18
3.2.5 Kyseliny omega-3 a omega-6	19
3.2.6 Správný výběr tuků	20
3.3 Margaríny	21
3.3.1 Historie.....	21
3.3.2 Snaha o snížení obsahu nasycených mastných kyselin	22
3.3.3 Technologie výroby margarínu.....	23
3.3.4 Složení margarínu	24
3.4 Chromatografie	25
3.4.1 Princip chromatografie	26
3.4.2 Dělení chromatografických metod:	26
3.4.3 Plynová chromatografie.....	26
3.4.4 Plynový chromatograf.....	27

4	MATERIÁL A METODY	29
4.1	Příprava methylesterů.....	30
4.1.1	Chemikálie	31
4.2	Analýza vzorků plynovou chromatografií	31
5	VÝSLEDKY	33
6	DISKUSE	39
7	ZÁVĚR.....	41
8	SEZNAM LITERATURY	42

1 Úvod

Lipidy jsou díky svým vlastnostem nezastupitelnou součástí všech organismů. Jsou velmi významným zdrojem energie, mají ochrannou funkci a jsou zdrojem esenciálních mastných kyselin. Podle jejich původu rozlišujeme lipidy na živočišné a rostlinné. Živočišné lipidy se vyznačují vyšším podílem nasycených mastných kyselin, což se projevuje jejich typickou tuhostí. S vyšším podílem nenasycených mastných kyselin (mono- a polynenasycených) v rostlinných lipidech je naopak spojena jejich tekutost.

Tato bakalářská práce byla inspirována polským výzkumem, který byl mimo jiné založen na analýze mastných kyselin v margarínech dostupných na polském trhu (Zbikowska et al, 2012). Margarín vznikl ve Francii ve druhé polovině 19. století jako náhrada másla. Ze začátku se vyráběl z živočišných tuků a složením mastných kyselin se podobal máslu. Kvůli vysokému obsahu nasycených mastných kyselin, které jsou spojovány s vyšším příjmem cholesterolu a z nutričního pohledu jsou proto nežádoucí, bylo tedy snahou zvyšovat obsah poly-nenasycených mastných kyselin. Z tohoto důvodu se živočišné tuky začaly nahrazovat rostlinnými. Ztužování rostlinných tuků se provádělo hydrogenací, při které však docházelo ke vzniku velkého množství trans nenasycených mastných kyselin, které jsou mj. spojovány s rizikem vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Dodnes se můžeme setkat s názvem hydrogenovaný tuk. V dnešní době však hydrogenaci nahradila tzv. přeesterifikace, při které se trans kyseliny téměř netvoří.

Teoretická část práce pojednává o obecných vlastnostech lipidů a mastných kyselin, jejich významu, složení, zdrojích a metabolismu. Dále je popsána historie margarínu, snaha o zlepšení profilu mastných kyselin a jejich výroba. Nakonec je popsána metoda chromatografie a to zejména plynová, kterou se mastné kyseliny stanovují nejčastěji.

Praktická část obsahuje výsledky analýz pěti vzorků margarínů běžně dostupných na našem trhu. Analýza byla provedena metodou plynové chromatografie na katedře chemie České zemědělské univerzity. U každého vzorku byly stanoveny mastné kyseliny a jejich procentuální obsah byl porovnán jak mezi jednotlivými vzorky, tak s literaturou.

2 Cíl práce

Cílem práce je na základě literární rešerše sestavit aktuální poznatky o složení a zastoupení mastných kyselin v komerčních, běžně dostupných margarínech. U vybraných vzorků stanovit zastoupení jednotlivých mastných kyselin metodou plynové chromatografie a porovnat jejich obsah a složení v analyzovaných vzorcích. Výsledky analýzy porovnat s údaji v literatuře a zhodnotit kvalitu analyzovaných vzorků margarínu z hlediska obsahu mastných kyselin.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Lipidy

Lipidy mají v organismech mnoho významných úloh, ať již se jedná o jednoduché lipidy (tuky, vosky a ceramidy), nebo o složené lipidy (fosfolipidy a glykolipidy). Zejména tuky jsou energeticky velmi bohatou složkou potravy. V této formě jsou jediným zdrojem esenciálních mastných kyselin a vehikulem, umožňujícím příjem a resorpci v tučných rozpustných vitamínů a dalších potřebných hydrofobních organických látek. Jako energetická rezerva jsou tuky uloženy v tukové tkáni nejen živočichů, ale i v plodech olejnatých rostlin. Lipidové dvojvrstvy membrán v buňkách jsou tvořeny strukturálními lipidy (fosfolipidy a glykolipidy). Neopomenutelná je ochranná funkce lipidů, která spočívá například v tepelné izolaci živočichů tukovou podkožní tkání a v ochraně neuronů myelinovými pochvami, které obsahují až 75 % fosfolipidů. U některých rostlin slouží k ochraně listů, kde jsou přítomné ve formě vosku chránícího před odpařováním vody (Odstrčil, 2005).

Lipidy jsou vedle proteinů a sacharidů jednou z hlavních složek ve výživě člověka. Na rozdíl od těchto skupin organických sloučenin, které jsou definovány na základě struktury, jsou lipidy definovány na základě fyzikální vlastnosti – rozpustnosti. Jsou omezeně rozpustné ve vodě a jejich extrakce je možná nepolárními organickými rozpouštědly. Obvykle se definují jako přírodní sloučeniny, složené z triesterů glycerolu s vyššími mastnými kyselinami (triacylglyceroly). Mezi lipidy se řadí tuky, oleje, vosky, mnohé vitamíny, hormony a většina nebílkovinných složek buněčných membrán. Jako tzv. doprovodné látky lipidů označujeme netěkavé lipofilní sloučeniny, které doprovázejí vlastní lipidy. Patří sem např. lipofilní vitamíny, různé terpenoidy jako steroly a karotenoidy, přírodní antioxidanty a další (Velíšek, 1999; McMurry, 2007).

3.1.1 Klasifikace lipidů

Velíšek (1999) uvádí, že lipidy řadíme do tří základních skupin podle chemického složení na homolipidy, heterolipidy a komplexní lipidy.

Homolipidy jsou sloučeniny mastných kyselin a alkoholů. Dále se dělí podle struktury vázaného alkoholu.

Heterolipidy obsahují kromě kyselin a alkoholu ještě další kovalentně vázané sloučeniny (např. kyselina fosforečná nebo D-galaktosa).

Komplexní lipidy obsahují homolipidy, heterolipidy a navíc nejen kovalentně vázané složky, ale také složky vázané různými fyzikálními vazbami (např. vodíkovými nebo hydrofobními interakcemi) (Velíšek, 1999).

Lipidy se dále dělí podle hydrolyzovatelnosti (tzn. štěpitelnosti) do dvou základních skupin na hydrolyzovatelné a nehydrolyzovatelné. Hydrolyzovatelné jsou charakteristické přítomností esterové vazby, kterou lze hydrolyticky štěpit (např. v tucích a voscích). Nehydrolyzovatelné lipidy jako je např. cholesterol, se naopak vyznačují nepřítomností esterové vazby (McMurry, 2004).

Vosky

Jeden z nejnámějších vosků je vosk včelí, jsou však také obsaženy v ochranných povlacích na různých bobulích, ovocných plodech, listech nebo na srsti zvířat (McMurry, 2007). Z chemického hlediska jsou to estery vyšších mastných kyselin a vyšších alkoholů. Počet uhlíků v kyselinách se pohybuje v rozmezí 24 – 36, uhlíků u alkoholu je 16 – 36 (Odstrčil, 2005).

Fosfolipidy

Podle Odstrčila, (2005) se fosfolipidy vyskytují především v membránách buněk, nejvíce potom v nervových pochvách, v játrech, ledvinách, ve žloutku a plodech sóji.

Obecně jsou fosfolipidy diestery kyseliny fosforečné. Do dvou nejvýznamnějších skupin fosfolipidů patří fosfoacylglyceroly a sfingomyeliny (McMurry, 2007).

Molekula glycerolu, ke které jsou esterově vázané dvě molekuly mastných kyselin a jedna molekula kyseliny fosforečné, tvoří základ fosfoacylglycerolů a řadí tyto látky k úzce příbuzným olejům a tukům. Bohatě jsou zastoupené v rostlinných a živočišných tkáních. Buněčné

membrány jsou z velké části složeny z lipidových dvojvrstev, jejichž lipofilní konce směřují dovnitř dvojvrstev a slouží jako účinná bariéra při průchodu vody, iontů a jiných částic do buňky a ven (McMurry, 2007).

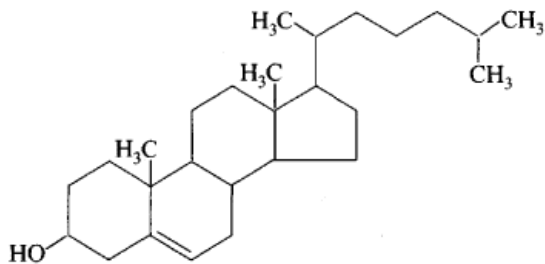
Sfingomyeliny jsou složité lipidy, jejichž základem je sfingosin, nebo příbuzný aminodiol. Stejně jako fosfoacylglyceroly jsou součástí buněčných membrán. Nejvíce sfingomyelinů je v mozku a nervových tkáních, kde tvoří hlavní složku ochranné vrstvy nervových vláken (McMurry, 2007).

Cholesterol

Cholesterol je uváděn jako základní sterol. Obecně jsou steroidy v organismech syntetizovány z acetyl-CoA složitými mechanismy v mnoha stupních. Člověk si většinu potřebného cholesterolu sám syntetizuje, protože příjem sterolů potravou je podstatně nižší, než jeho potřeba. V závislosti na tomto faktu klesá syntéza cholesterolu v těle s jeho vyšším příjmem ve stravě. Denně dospělý člověk přijme cca 0,3g cholesterolu potravou a přibližně 1g syntetizuje (Velíšek, 2009; Havlík a Marounek, 2013).

Orgán syntetizující nejvíce cholesterolu jsou játra. Na jaterní syntéze cholesterolu se podílejí také hormony. Zvýšená hladina glukagonu a kortisolu je typická při hladovění, kdy jaterní syntézu inhibují. Naopak hormony štítné žlázy a insulin jaterní syntézu zvyšují (Engelking, 2014).

Jako výchozí sloučenina cholesterol slouží k syntéze steroidních hormonů, žlučových kyselin a vitamínu D3. V krevním řečišti je transportován LDL lipoproteiny a odstraňován HDL lipoproteiny a z těla je následně vylučován po přeměně na žlučové kyseliny nebo přímo. Vyšší koncentrace cholesterolu ve frakci LDL frakci je příčinou vzniku aterosklerozy, jejímž klinickým projevem je kardiovaskulární onemocnění (Havlík a Marounek, 2013).



Obrázek č. 1: Cholesterol

(Zdroj: <http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/Cholesterol>)

3.1.2 Osud lipidů v organismu

K prvnímu trávení lipidů v organismu dochází v žaludku pomocí lipas. V kyselém žaludečním prostředí je však velmi nedokonalé (dochází zde jen k částečnému štěpení lipidů mléka). K hlavnímu štěpení dochází až v duodenu působením pankreatických lipas. Významnou roli při odbourávání tuků mají hormony adrenalin a glukagon, díky nimž jsou aktivovány enzymové systémy – nejvýznamnější je aktivace proteinkinasy, která katalyzuje aktivaci triacylglycerollipasy na aktivní fosforylovanou formu. Při trávení se uplatňuje také emulgační efekt žlučových kyselin.

Rozklad tuků probíhá postupně:

1. Účinkem triacylglycerollipasy se odštěpí jedna molekula MK z polohy 1 nebo 3 v glycerolu a následným působením diacylglycerollipasy se odštěpí další molekula MK. Výsledkem tohoto rozkladu je molekula 2 - monoacylglycerol, která je vstřebávána z 50 – 60 %.
2. Zbytek 2 – monoacylglycerolu štěpí 2 – monoacylglycerollipasa až na glycerol a mastné kyseliny.
3. Ze štěpných produktů se ve střevní sliznici znovu vytváří triacylglyceroly, které jsou ve formě chylomikronů (1 μ m) transportovány hlavním mízovodem do krve.
4. V krvi se následně váží na krevní proteiny a vznikají lipoproteiny. Malé množství volných, neesterifikovaných AMK se váže na sérový albumin. Volné

tuky se v krvi za normálních okolností nevyskytují. Pouze při hyperlipemii jsou volné tuku ve formě chylomikronů v krvi přítomné (Odstrčil, 2005).

V absorpční fázi jsou částice lipoproteinů rychle hydrolyzovány lipoproteinovou lipasou. Tukovou tkání jsou potom vychytávány uvolněné mastné kyseliny a z nichž jsou znovu tvořeny triglyceridy zásobního tuku. Mastné kyseliny zachytává i řada dalších buněk, ty je však využívají převážně jako zdroj energie. Zbylé lipoproteiny jsou zachyceny a odbourány v játrech (Langmeier, 2009).

3.2 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny se vyznačují sudým počtem uhlíků, což vyplývá ze skutečnosti, že jejich syntéza vychází z 2-uhlíkaté molekuly acetyl-CoA a pokračuje připojováním dalších dvouuhlíkatých jednotek. Podle počtu uhlíků v řetězci označujeme mastné kyseliny na těkavé (< 6 C), mastné kyseliny o střední délce (8 - 14 C) a vyšší mastné kyseliny (> 16 C) (McMurry, 2004; Havlík a Marounek, 2013).

Z hlediska výživy jsou mastné kyseliny nejdůležitější složkou lipidů. Havlík a Marounek, (2013) uvádějí, že nutričně nejvýznamnější je kyselina palmitová (C16:0), stearová (C18:0), olejová (C18:1), linolová (C18:2), linolenová (C18:3), arachidonová (C20:4) a dodekahexaenová (C22:6).

Mezi mastnými kyselinami se nacházejí také esenciální mastné kyseliny. Jako esenciální látky obecně označujeme ty, které organismus není schopen sám syntetizovat, a tudíž je musíme přijímat potravou. Z mastných kyselin sem patří kyselina linolová a linolenová. Organismus je schopen svými enzymy prodlužovat řetězec mastných kyselin – elongace. Pomocí enzymů tak dokáže vytvořit například z kyseliny palmitové (C16:0) kyselinu stearovou (C18:0). Další schopností organismu je také za pomoci enzymů vytvořit nové dvojně vazby v mastných kyselinách (např. dokáže přeměnit kyselinu stearovou na olejovou (C18:1n9)), není však schopen zavést novou dvojnou vazbu mezi již existující dvojnou vazbu a methylový konec (Calder, 1998; Havlík a Marounek, 2013).

3.2.1 Nasycené mastné kyseliny (SFA)

Nasycené mastné kyseliny z angličtiny někdy označované jako satureované (SFA - saturated fatty acids) jsou běžnou složkou přírodních lipidů (Velíšek, 1999).

Nejběžnější nasycenou kyselinou vyskytující se téměř ve všech živočišných a rostlinných lipidech, ale i v triacylglycerolech a fosfolipidech, je kyselina palmitová. Vysoký obsah nasycených mastných kyselin je také v tuku užitkových zvířat (hlavně u vepřů a přežvýkavců), kde se vyskytuje převážně kyselina palmitová a stearová. V mléčném tuku se naopak vyskytují mastné kyseliny s krátkými řetězci do deseti uhlíků např. kyselina máselná (Velíšek, 1999).

Řetězec nasycených mastných kyselin nejčastěji obsahuje 4 až cca 30 atomů uhlíků, bez dvojných vazeb. Nasycené kyseliny s vyšším počtem uhlíků existují, jejich výskyt je však spíše výjimečný. Jejich struktura je zpravidla rovná a nerozvětvená (Velíšek, 1999). Živočišné tuky mají vyšší poměr nasycených mastných kyselin vůči nenasyceným. Molekuly triacylglycerolu v nasycených mastných kyselinách zaujímají jednotný tvar, umožňující jim výhodné uložení a upořádání v krystalické mřížce. Protože poměr nasycených mastných kyselin u tuků je vyšší, jsou také teploty tání tuků vyšší, což se projevuje jejich typickou tuhostí (McMurry, 2007).

Vedle klasických systematických názvů převládá v běžné praxi jejich triviální označení. V potravinách jsou hlavní mastné kyseliny většinou kyselina palmitová a stearová. Mastné kyseliny se sudým počtem uhlíků v malém množství doprovázeny kyselinami s lichým počtem uhlíků, nejčastěji kyselinou pentadekanovou a heptadekanovou (margarovou) (Velíšek, 1999).

Tabulka č. 1: Přehled hlavních nasycených mastných kyselin vyskytujících se v lipidech (Velíšek, 1999).

Mastná kyselina	Počet atomů uhlíku	Triviální název
butanová	4	máselná
hexanová	6	kapronová
oktanová	8	kaprylová
dekanová	10	kaprinová
dodekanová	12	laurová
tetradekanová	14	myristová
hexadekanová	16	palmitová
oktadekanová	18	stearová
eikosanová	20	arachová
dokosanová	22	behenová
tetrakosanová	24	lignocerová

3.2.2 Nenasycené mastné kyseliny

Nenasycené mastné kyseliny se obecně vyznačují přítomností dvojných vazby v molekule. Podle počtu dvojných vazeb rozlišujeme mastné kyseliny na monoenuové označované MUFA (mono unsaturated fatty acids), které obsahují jen jednu dvojnou vazbu a polyenuové mastné kyseliny PUFA (poly unsaturated fatty acids), které obsahují dvě a více dvojných vazeb.

Velíšek (1999) uvádí, že v přírodních lipidových materiálech se obsah nenasycených mastných kyselin pohybuje v širokém rozmezí, od 90 % všech mastných kyselin (např. v řepkovém oleji) po méně než 10 % (např. v kokosovém tuku). NMK v tucích živočichů se pohybuje v daleko menším rozmezí, obvykle mezi 50 – 70 %.

Složení NMK v rostlinách je ve srovnání s živočichy mnohem pestřejší a z hlediska složení dělíme rostlinné tuky a oleje na skupiny o příbuzném složení MK. Rozeznávají se:

- Tuky ze semen palem – malé množství kyseliny olejové a jen stopy kyselin s vyšším počtem dvojných vazeb (kokosový tuk, palmojadrový tuk).
- Rostlinná másla - obsah NMK je podobný jako v tucích živočišných, tvořených především kyselinou olejovou (typické je kakaové máslo).

- Oleje s převažující kyselinou olejovou a jen malým množstvím vícenásobných MK (olivový olej).
- Oleje se středním obsahem kyseliny linolové (podzemnicový olej).
- Oleje s vysokým obsahem kyseliny linolové (slunečnicový, sezamový olej).
- Oleje obsahující kyselinu linoleovou (sójový, bezerukový řepkový nebo lněný) byly kultivary olejnin s podstatně nižším obsahem kyseliny linolenové přešlechtěny a dnes se u nás téměř výhradně pěstuje řepka a řepice s minimálním obsahem této MK.
- Oleje s obsahem některé specifické MK (Velíšek, 1999).

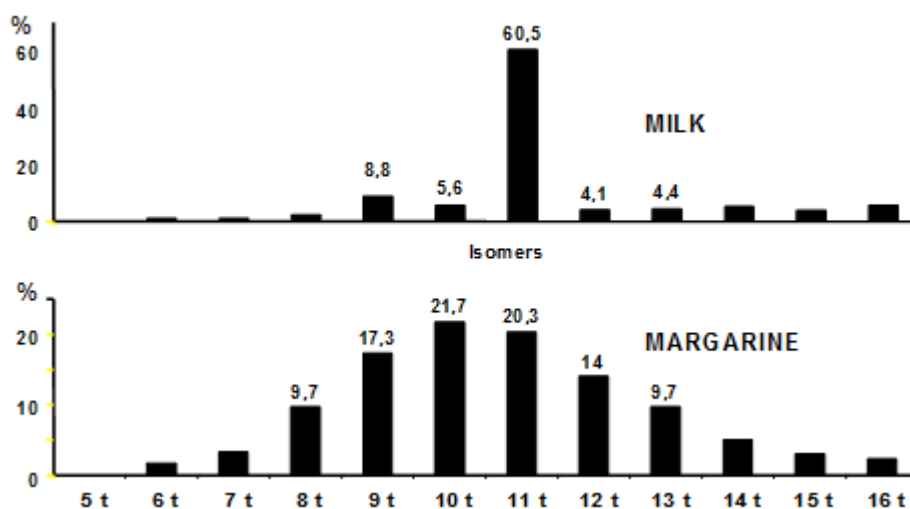
V profilu rostlinných olejů převažují nenasycené mastné kyseliny. Jak již vyplynulo z textu o živočišných tucích, převaha nenasycených mastných kyselin v tucích rostlinných je spojena s jejich tekutostí. Dvojně vazby v nenasycených kyselinách vnášejí do uhlíkatých řetězců zlomy a nepravidelnosti, tím obtížněji se molekuly skládají do krystalové mřížky a tím je nižší teplota tání. Dvojně vazby v mastných kyselinách se mohou katalyticky hydrogenovat, čehož využíváme při výrobě margarínů a jiných pokrmových tuků. Při hydrogenaci totiž vznikají nasycené tuhé nebo polotuhé tuky (McMurry, 2007).

3.2.3 Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (MUFA)

Monoenové kyseliny se od sebe navzájem liší počtem atomů uhlíku, polohou dvojně vazby a její prostorovou konfigurací. Stejně tak, jako nasycené mastné kyseliny, mají i monoenové své systematické názvy, které jsou používány většinou u nově objevených kyselin, tak i své triviální označení (Velíšek, 1999). Z pohledu konfigurace se rozlišují na cis a trans nenasycené mastné kyseliny. Přírodní obsah nenasycených kyselin v konfiguraci cis je mnohem vyšší než v konfiguraci trans. Jejich stopy byly zaznamenány pouze v za studena lisovaných jedlých olejích (0,04 - 0,05 %) (Hui et Sherkat, 2005). Reaktivita trans kyselin je nižší, proto mají tendenci samovolně se tvořit z cis kyselin při různých chemických procesech. Také se hůře oxidují, hydrogenují a obtížně mohou probíhat i některé stereospecifické reakce, na kterých se podílí dvojná vazba. To jsou důvody, proč se trans kyseliny v reakčních produktech spíše hromadí na úkor cis kyselin (Pokorný, J. 2004). Nejčastější nenasycenou kyselinou je kyselina olejová (C18:1n9), která je v malém množství přítomna téměř ve všech lipidech (Hui et Sherkat, 2005).

3.2.4 Trans mastné kyseliny

Trans MK jsou dvojího původu. Činností bakterií přirozeně vznikají v zažívacím traktu přežvýkavců, a následně se proto stávají složkou jejich masa a mléka. V tomto případě mluvíme o přírodním původu. Hlavním izomerem vzniklým tímto biohydrogenačním procesem je 11*t*-18:1, kterého je ve výsledné směsi izomerů více než 60 %. Technologicky se tvoří záhřevem tuků nad teplotu 240 °C obsahujících polynenasycené mastné kyseliny a při ztužování (hydrogenaci – sycení vodíkem) tuků. Příkladem může být parciální katalytická hydrogenace, kde distribuce a obsah trans izomerů závisí na hydrogenačních parametrech (teplota, typ katalyzátoru, míchání a tlak vodíku). V tomto případě je dvojných delokalizovaných vazeb na uhlíkatém řetězci více. Mezi hlavní patří 8*t*-, 9*t*-, 10*t*-, 11*t*- a 12*t*-18:1 (Sébédio et Christie, 2009b).



Obrázek č. 2: Typické trans 18:1 izomery obsažené v mléčných lipidech a margarinech. (Zdroj: <http://lipidlibrary.aocs.org/frying/n-tmono/index.htm>)

Parciální hydrogenací vznikají trans nenasycené mastné kyseliny obsahující alespoň jednu dvojnou vazbu v konfiguraci trans. Z rostlinných olejů tak vznikají polotuhé tuky, které se využívají pro výrobu margarínů nebo například při výrobních procesech některých potravin. Jejich oblíbenost v potravinářském průmyslu spočívá v jejich dlouhodobé trvanlivosti, stabilitě a schopnosti zvýšit chutnost některých potravin jako jsou pekařské výrobky nebo sladkosti (Mozaffarian, 2006). Dříve se při přípravě ztužených tuků používala pouze metoda hydrogenace, to je důvod, proč se i dnes můžeme setkat s názvem

hydrogenovaný tuk v souvislosti se ztuženými tuky. V dnešní době proces hydrogenace ve většině případů nahradila tzv. přeesterifikace (Dostálová a kol., 2014). Při přeesterifikaci na rozdíl od hydrogenace trans kyseliny nevznikají.

Parciálně hydrogenované oleje obsahují směs izomerů, kde se trans dvojná vazba může nacházet kdekoli mezi čtvrtým a desátým uhlíkem, avšak malé množství izomerů se dvěma dvojnými vazbami může být také přítomno (Mozaffarian, 2006).

Hlavní zdroje trans kyselin jsou fritované potraviny z fast foodů, margariny i pokrmové tuky, pekařské výrobky, čokoládové tyčinky, cukrářské výrobky a další (Mozaffarian, 2006).

Důvodem, proč jsou trans MK rizikové při vzniku ischemické choroby srdeční je to, že když se chylomikrony dostanou do jater, část MK se přeskupí do triacylglycerolu a fosfatidylcholinu a následně do lipoproteinů o nízké a velmi nízké hustotě a mohou tak ovlivnit koncentraci cholesterolu (Sébédio et Christie, 2009a). Při nadměrném hromadění triacylglycerolů v játrech dochází ke ztučňování jater, inzulínové rezistenci a diabetu typu 2 (Christie, 2014).

3.2.5 Kyseliny omega-3 a omega-6

Biologicky se jedná o nejvýznamnější polyenové mastné kyseliny. Poloha první dvojná vazby se počítá od CH_3 -konce, z čehož vychází jejich označení omega-3 a omega-6. Můžeme se také setkat s označením ω -3 a ω -6, nebo n-3 a n-6 kyseliny.

Z celkového množství doporučeného příjmu tuků (30 - 35 %), by měl příjem nasycených mastných kyselin představovat maximálně jednu třetinu. V celkovém součtu pak toto množství tvoří do 10 % celkového denního příjmu energie. K tomuto množství by měl být přívod polynenasycených mastných kyselin cca 7 %. Je-li však překročen příjem nasycených kyselin nad 10 %, polynenasycených kyselin by mělo být přijímáno 10 % a to především kyseliny alfa-linolenové (omega-3). Mezi kyselinou alfa-linolenové (omega-3) a kyselinou linolovou (omega-6) se takto docílí žádoucího poměru zhruba na 1 : 5.

Alfa-linolenová kyselina má schopnost přeměny na biologicky účinné mastné kyseliny s dlouhým řetězcem – kyselinu eikosapentaenovou (EPA) a dokosahexaenovou (DHA). Pokud jsou tyto dvě kyseliny v optimální koncentraci v krevní plazmě, bylo prokázáno snížené riziko kardiovaskulárních chorob. Alfa-linolenová a linolová kyselina patří mezi esenciální mastné kyseliny a za normálních okolností příjmu se mění na účinné deriváty EPA a DHA, nejvýše však do 10 % (Kasper, 2015).

3.2.6 Správný výběr tuků

Kvalitní margariny a máslo jsou vhodné k přímé spotřebě za studena. Z výživových doporučení, která udávají, že denní příjem tuků by měl být do 30 %, z čehož 1/3 by měla být tvořena živočišnými a 2/3 rostlinnými tuky vyplývá, že spotřeba másla by měla být nižší, než je tomu u margarinu. Důvodem je vyšší obsah nasycených mastných kyselin a s ním spojená přítomnost cholesterolu. Margariny a máslo z důvodu různého obsahu vody nejsou vhodné na smažení. Máslo navíc obsahuje bílkoviny, které se po tepelném záhřevu mění zdravotně rizikové látky.

Speciální 100% rostlinné tuky a oleje jsou vhodné k tepelným úpravám potravin, které ani při vysokých teplotách smažení (cca 200 °C) nepodléhají tak snadno oxidaci. Ačkoliv údaje o vhodnosti oleje na smažení jsou uvedené na obalu, ne všechny takto označené oleje jsou na další smažení vhodné.

- Slunečnicový olej – obsah kyseliny linolové, která obsahuje dvě konjugované dvojně vazby, může být až 70 %, proto slunečnicový olej snadno podléhá oxidaci.
- Rafinovaný olivový olej – k tepelným úpravám je vhodnější díky obsahu monoenoové kyseliny olejové (cca 70 %).
- Řepkový olej – s obsahem 50 – 66 % kyseliny olejové, je také vhodný pro použití v teplé kuchyni (Vránová, 2012).

3.3 Margaríny

3.3.1 Historie

Od doby vynálezu margarínu uplynulo již 150 let. Za tuto dobu prošel velkou řadou změn. Značný hospodářský a ekonomický růst Francie ve druhé polovině 19. století způsobil stěhování lidí z vesnic do měst, což mělo za následek vyšší poptávku po másle, kterou ale s úbytkem farmářů nebylo možno uspokojit. Také cena másla neustále rostla, a proto snaha vytvořit jeho náhradu byla více než na místě. Napoleon III. nabídl cenu pro každého, kdo by objevil proces výroby náhrady másla. Margarín poprvé vyrobil francouzský chemik Hippolyte Mége-Mouriés, který v roce 1869 (rok, kdy cena byla nabídnuta) dokončil svou práci, a proto se také snadno stal vítězem. Téhož roku mu byl francouzským ministerstvem zemědělství a obchodu udělen patent na zpracování určitých tuků živočišného původu, který byl registrován i v Anglii (List, 2006).

Hippolyte Mége-Mouriés se do roku 1867 zabýval výzkumem mléka na farmě Vincennes u Paříže. Zjistil, že i mléko dojníc, které nemají dostatek potravy a ztrácí na váze, stále obsahuje mléčný tuk. Pokusil se tedy vyrobit máslo uměle. V anglickém patentu byl Mégeho proces popsán takto: tuk stejného chemického složení s máslem se získává drcením čerstvého loje mezi dvěma válci pod proudem vody, následuje mytí a štěpení, pomocí žaludeční šťávy. Tuk se extrahuje, taví, protlačí sítem a nalije do krabic (kvůli tvaru). Poté se řeže na kousky, které se zabalí do látky a lisují se mezi dvěma varnými deskami. Tento čištěný tuk se při tělesné teplotě 40 °C smísí s vodou obsahující malé množství jedlé sody, kaseinu studeného mléka a prsní tkáň spolu se žlutým barvivem. Následně se štěpí, nechá usadit, dekantuje se, ochladí se a získá se směs. Výše uvedená směs se míchá, dokud se nevytvoří krém, který se poté zpracovává jako obvyklé máslo (List, 2006).

Výrobek měl podobnou konzistenci jako máslo a perleťový vzhled, podle kterého dostal margarín svůj název. Slovo margarín je řeckého původu, je odvozen od slova *margaritari* znamenající perla. Z jiného pramene vychází odvození slova margarín ze skutečnosti, že první výrobek tohoto typu byl směsí kyselin s průměrným počtem uhlíků 17. Mastná kyselina se sedmnácti uhlíky je kyselina margarová (Brát a Jiroušek, 2008).

Zatímco máslo produkovaly převážně menší mlékárny a farmy, z výroby margarínu se stal velký byznys. V Dánsku vedla rivalita mezi mlékárnami a producenty margarínu až k rozpadu parlamentu v roce 1885. Z tohoto důvodu se musely ustanovit předpisy, které jasně určovaly rozdíl mezi máslem a margarínem. Margaríny se odlišovaly barvami, vyráběl se růžový, hnědý i modrý margarín. V USA byly s margarínem prodávány barevné kapsle, aby si hospodyňky mohly namíchat svůj vlastní. Odlišovaly se od sebe ale také odlišným umístěním v regálech, barevnými páskami nebo jinými způsoby (Robinson, 2005a). Díky novým technologiím se dnešní margaríny s těmi původními vůbec nedají srovnávat. Jejich složení, vzhled, roztíratelnost, udržitelnost a další vlastnosti se od původních diametrálně liší. V sedmdesátých letech 20. století margarín dokonce v prodeji předčil máslo (Robinson, 2005b).

3.3.2 Snaha o snížení obsahu nasycených mastných kyselin

Nasycené mastné kyseliny jsou spojované s rozvojem kardiovaskulárních onemocnění a snaha o jejich snížení je známa již několik desetiletí. Původní margaríny měly obdobné složení jako máslo, kde nasycené mastné kyseliny převažují, což je z nutričního pohledu nežádoucí. Vhodnou kombinací pevného tukového podílu s kapalnou olejovou bází lze obsah nasycených mastných kyselin výrazně snížit. V padesátých letech 20. století byly vyráběny margaríny s nižším obsahem nasycených mastných kyselin a lepší roztíratelností. Tehdy začalo období balení margarínu do plastových kelímků. Na samém počátku byl margarín balen do soudků, později se přešlo k ručnímu balení margarínu do folie a od dvacátých let minulého století se začal balit strojově do folií. Zpočátku byl margarín prodáván v lékárnách pod označením „Becel“, což bylo odvozeno z „Blood cholesterol lowering“. Tento výrobek vznikl v šedesátých letech jako první se zvýšeným obsahem vícenenasycených mastných kyselin. Jejich obsah se tehdy pohyboval v rozmezí 50 - 60 %. Od konce sedmdesátých let 20. století v souvislosti s modernizací technologií se nabídka výrobků se sníženým obsahem tuku začala rozšiřovat. Tehdy se začaly vyrábět margaríny s obsahem tuku nižším o 60 a 40 % a směsné tuky. V devadesátých letech nové technologie umožnily vyrobit i produkty s obsahem tuku kolem 20 %. V zahraničí se můžeme setkat dokonce s výrobky, jejichž obsah tuku je téměř nulový (Brát a Jiroušek, 2008).

3.3.3 Technologie výroby margarínu

Při výrobě margarínu se míchají dvě složky – tuková násada a vodná fáze.

- Tuková násada se připravuje při teplotách 45 – 50 °C, kdy se mísí strukturální tuk s rafinovaným rostlinným olejem. Poměr, v jakém se mísí, závisí na požadované konzistenci produktu. K tukové násadě se přidávají složky rozpustné v tucích (lecitin a/nebo emulgátor monoacylglycerolového typu, barvivo, vitamíny, aroma).
- Vodná fáze se skládá z mikrobiologicky nezávadné vody a obnovené syrovátky. Do vodné fáze se před výrobou přidávají ve vodě rozpustné složky (sůl 0,1 – 0,2 %, kyselina mléčná a citrónová a aroma) (Kadlec, 2002).

Proces výroby:

V emulzní nádobě se mísí odvážené množství obou fází a vzniká jedna šarže tzv. hrubá emulze (velikost částic cca 10 µm, teplota 40 – 45 °C). Vysokotlaké čerpadlo čerpá směs do kontinuální části linky (2 – 3 votátory), kde dochází k ukončení emulgace a postupnému chlazení-podchlazení a je započata nukleace (40 → 28 → 18 °C). Následuje kuličkový krystalizátor, zvyšuje se teplota na 25 °C, nukleace pokračuje a začíná fáze růstu krystalů (Kadlec, 2002). Krystalizace je jedním z nejdůležitějších kroků při výrobě margarínu. Jemné a stabilní krystaly zajišťují lepší roztíratelnost, texturu, pocit v ústech atd. (Nosho at al., 2002). V tzv. uzravači se emulze temperuje na 12 – 15 °C (krystalizace pokračuje). Následuje balení a skladování. Po 2 – 3 dnech při teplotě 15 °C je dokončena krystalizace za vzniku prostorové mřížky, čímž se ustalují jeho rheologické vlastnosti (Kadlec, 2002). Skladováním při vyšších teplotách se urychluje oxidace (Zhang at al., 2006).

3.3.4 Složení margarínu

Databáze složení potravin České republiky uvádí hodnoty nutrietů obsažených v margarínech takto:

Základní nutrienty	Hodnota (ve 100 g)
Lipidy celkové (tuky)	80,3 g
Bílkoviny celkové	0 g
Sacharidy celkové	0 g
Voda celková	19,6 g
Popel	0,2 g

Mastné kyseliny					
Nasycené MK	27,96 g	MUFA	35,95 g	PUFA	12,62 g
C 4:0	0	C 14:1	0	n-6 MK	9,75
C 6:0	0	C 16:1	0,13 g	C 18:2, n-6	9,75
C 8:0	0	C 17:1	0	C 18:3, n-6	0
C 10:0	0	C 18:1, n-9	35,08 g	C 20:4, n-6	0
C 12:0	0	C 20:1, n-11	0,57 g	n-3 MK	2,87 g
C 13:0	0 g	C 22:1, n-9	0,11 g	C 18:3, n-3	2,84 g
C 14:0	0,48 g			C 20:5, n-3 (EPA)	0
C 15:0	0			C 22:5, n-3 (DPA)	0
C 16:0	24,1 g			C 22:6, n-3 (DHA)	0
C 17:0	0,07 g			Trans- MK	0,29 g
C 18:0	2,79 g			C 18:1, n-9 trans	0
C 20:0	0,37 g			C 18:2, n-6 trans	0,18 g
C 22:0	0,15 g				
Cholesterol	0 mg				

(Centrum pro databázi složení potravin, 2013)

Rozdělení roztíratelných a směsných tuků (Dostálová a kol., 2014):

Skupina	Charakteristika výrobku dle obsahu tuku v % hm.
Margarin Směsné tuky	Výrobek získaný z rostlinných a/nebo živočišných tuků s obsahem tuku nejméně 80 %, avšak méně než 90 %.
Tříčtvrtětučný margarin Tříčtvrtětučné směsné tuky	Výrobek získaný z rostlinných a/nebo živočišných tuků s obsahem tuku nejméně 60 %, avšak nejvýše 62 %.
Polotučný margarin Polotučné směsné tuky	Výrobek získaný z rostlinných a/nebo živočišných tuků s obsahem tuku nejméně 39 %, avšak nejvýše 41 %.
Roztíratelný tuk X % Roztíratelné směsné tuky X %	Výrobek získaný z rostlinných a/nebo živočišných tuků s tímto obsahem tuku: <ul style="list-style-type: none"> - méně než 39 % - více než 41 %, avšak méně než 60 % - více než 62 %, avšak méně než 80 %

3.4 Chromatografie

Chromatografie se řadí mezi separační analytické metody. Umožňuje dělení, identifikaci a stanovení velkého počtu organických i anorganických látek. Do chromatografických metod zahrnujeme operace založené na fyzikálně chemických principech, při nichž dochází k postupnému, mnohonásobnému opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma, popř. i více fázemi (Holzbecher a kol., 1987).

Fáze stacionární (nepohyblivá) je umístěna v koloně (popřípadě ve vrstvě) a může mít několik forem. Za prvé to mohou být částičky tuhé látky o průměru jednotek až stovek mikrometrů a za druhé to může být kapalina, která je umístěna na povrchu interního nosiče, jehož vlastnosti jsou velmi podstatné (velikost, druh a tvar pórů, poróznost). Fáze mobilní (pohyblivá) unáší separované látky ložem stacionární fáze (Holzbecher a kol., 1987).

3.4.1 Princip chromatografie

Princip metody je založen na rozdílné rychlosti pohybu látek v soustavě. Vzorek se umístí na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární je vzorek soustavou unášen ke konci kolony. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Složky zdržující se více jsou stacionární fází poutány silněji. Takto se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dříve dostávají složky méně zadržované (Klouda, 2003).

3.4.2 Dělení chromatografických metod:

Podle skupenství mobilní fáze:

- Kapalina - kapalinová chromatografie (LC)
- Plyn - plynová chromatografie (GC)

Podle uspořádání stacionární fáze:

- Kolonová chromatografie - stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně)
- Plošné techniky:
 - Papirová chromatografie (PC) - stacionární fáze je součástí chromatografického papíru
 - Tenkovrstvá chromatografie (TLC) - stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu (např. hliníková fólie nebo skleněná deska) (Klouda, 2003)

3.4.3 Plynová chromatografie

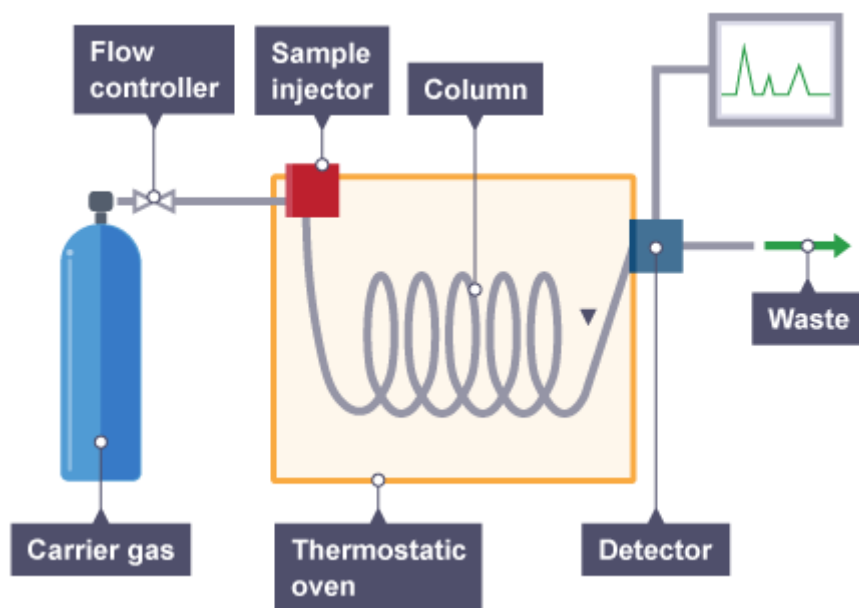
Metoda je určena k dělení a stanovení látek s bodem varu do cca 400 °C (Zachář a Sýkora, 2008). Mobilní fází v plynové chromatografii je plyn (tzv. nosný plyn) a také separované složky jsou v plynné fázi. U kapalných vzorků je proto třeba zvolit takovou

teplotu, aby molekuly dělených složek byly ve formě par. Je-li stacionární fází tuhá látka, mluvíme o plynové adsorpční chromatografii (GSC), kde k separaci dochází většinou na principu adsorpce nebo síťového efektu. Stacionární fází může být i kapalina, v tomto případě se jedná o plynovou rozdělovací chromatografii (GLC). U kapilárních kolon stacionární fáze smáčí stěny kolony, u kolon náplňových je nanosena na povrch nosiče. Složka se zde rozděluje mezi kapalnou stacionární a plynnou mobilní fází. V obou případech stacionární fáze působí selektivně na jednotlivé separované látky a na základě vzájemných interakcí dochází k rozdělení (retenci, zadržování) jednotlivých složek v koloně, a tudíž i k jejich rozdílné eluci. Nosný plyn separované složky unáší z kolony a jejich množství je zaznamenáváno detektorem jako funkce času nebo objemu proteklého nosného plynu (Holzbecher a kol., 1987).

3.4.4 Plynový chromatograf

Tlakovou láhví je přes redukční ventil odebírán nosný plyn, který po průchodu regulátory tlaku a průtoku přichází do nástřikové komory – injektoru. Vzorek se speciální stříkačkou dávkuje do injektoru, přes který se dostává do proudu nosného plynu. Vyhříváním injektoru na určitou teplotu dochází k okamžitému zplynění vzorku. Páry jsou unášeny na kolonu, která je umístěna za termostatem, kde dochází k separaci jednotlivých složek vzorku. Z kolony nosný plyn vstupuje do detektoru, jehož signál je veden na zesilovač a je registrován zapisovačem a zpracován integrátorem (Zachař a Sýkora, 2008).

Okamžitou koncentraci separovaných látek v nosném plynu indikuje detektor. Jeho signál se plynule registruje. Jeho výsledný grafický záznam se nazývá chromatogram. Na ose y se zaznamenává odezva detektoru a na ose x délkové jednotky nebo čas. Chromatogram obsahuje jednotlivé eluční křivky separovaných látek, tzv. píky. Píků je vždy tolik, kolik bylo detekováno složek. Podle jejich polohy lze vyslovit předpoklad o identitě látky a z jejich plochy vypočítat množství látky ve vzorku (Zachař a Sýkora, 2008).



regulátor průtoku, injektor, kolona, nosný plyn, termostat, detektor

Obrázek č. 3: Schéma plynového chromatografu

(Zdroj: http://getrevising.co.uk/revision-notes/gas_chromatography)

4 MATERIÁL A METODY

Analýza mastných kyselin byla provedena ze vzorků margarínů, které jsou na českém trhu běžně dostupné. Z počátku bylo vybráno sedm vzorků margarínů – Flora Gold, Flora, Flora Light, Rama Classic, Rama s máslem, Perla s příchutí farmářského másla a jeden margarín určený na pečení – Hera. Analýza byla provedena na jaře a na podzim roku 2014, kdy pro objektivnost byly zakoupeny vždy stejné, čerstvé vzorky.

Zakoupeny byly vzorky značky Flora s rozdílným obsahem tuku. Flora Light obsahovala 30 %, Flora 45 % a Flora Gold 70 %. U těchto výrobků byl deklarován vyšší obsah polynenasycených mastných kyselin. Margarín Rama Classic obsahoval 60 % tuku, z toho nejvíce monoenových mastných kyselin. U výrobku Rama s máslem byl uveden obsah tuku 70 %, u Perly s příchutí farmářského másla 39 %. Hera, jako jediný margarín určený na pečení obsahoval 72 % tuku.

V první sérii na jaře 2014 byly z každého ze sedmi vzorků vytvořeny dva deriváty, které byly analyzovány pomocí plynového chromatografu. Ve druhé sérii na podzim byly vyřazeny margaríny Perla s příchutí farmářského másla a Rama s máslem. U těchto margarínů pravděpodobně kvůli vysokému obsahu emulgátorů nebylo možno připravit dostatečně kvalitní deriváty pro následnou analýzu na plynovém chromatografu. Chromatograf byl navíc nastaven na detekci mastných kyselin obsahujících 10 a více uhlíků, které jsou typické pro rostlinné tuky. Mléčný tuk, který byl pravděpodobně obsažen v těchto dvou margarínech, obsahuje však větší množství krátkých, především nasycených kyselin. Na jaře bylo připraveno ze sedmi vzorků 14 derivátů, na podzim pak po vyřazení dvou margarínů s máslem pouze 10 derivátů.

Pro stanovení byla použita níže popsaná metoda přípravy methylesterů mastných kyselin. Vlastní stanovení pak bylo provedeno analytickou metodou kapilární plynové chromatografie s plameno-ionizačním detektorem (CG-FID) na plynovém chromatografu patřícím Výzkumnému ústavu mlékárenskému v Praze (VÚM). Chromatografické záznamy byly vyhodnoceny pomocí programu firmy Agilent Technologies – ChemStation a softwaru Microsoft Office Excel 2007.

Porovnáním retenčních časů standardů a retenčních časů analyzovaných vzorků byly identifikovány mastné kyseliny. Procentuální obsah jednotlivých mastných kyselin byl stanoven na základě plochy píků jednotlivých kyselin k celkové ploše všech píků.

4.1 Příprava methylesterů

Do silnostěnné centrifugační zkumavky bylo pomocí automatické váhy odváženo cca 300 mg margarínu (300 ± 5 mg). K margarínu bylo přidáno 5 ml hexanu p. a., zkumavka byla zazátkována a vložena do ultrazvukové lázně, dokud nebyla vytvořena homogenní emulze. Po vytvoření emulze byla zkumavka vložena do odstředivky, kde se obsah nechal po dobu 5 minut a otáčkách 5000 za minutu odstředit. Pipetou bylo odebráno 4 ml horní hexanové vrstvy do kulaté zábrusové baňky o objemu 50 ml. Rozpouštědlo ve vzorku se nechalo důkladně odpařit na rotační vakuové odparce při teplotě 40 °C. Vzorek oleje byl ihned odebrán k další analýze.

Do centrifugační zkumavky bylo automatickou pipetou odebráno 40 µl vzorku oleje. Ke vzorku ve zkumavce bylo skleněnou pipetou přidáno 0,5 ml methanolu HPLC grade a jinou pipetou 0,5 ml methanolické báze, která byla před přidáním vytemperována na pokojovou teplotu. Zkumavka byla pevně zazátkována a obsah na dně zkumavky byl lehce protřepán. Následně byla zkumavka umístěna na dobu 1 minuty do vodní lázně o teplotě 75 – 80 °C. Po 1 minutě byla zkumavka vyndána z lázně, obsah byl protřepán a zkumavka byla opět umístěna do vodní lázně na 3 minuty. Zkumavka byla občas lehce promíchána kroužením svorky nebo stojanu. Pokud po uplynutí této doby nebyl roztok ještě čirý, nebo byly vidět kapičky oleje, byla přidána ještě jedna minuta záhřevu na vodní lázni. Po vyjmutí z lázně byla zkumavka ihned ochlazená pod tekoucí vodou.

Po ochlazení bylo ke směsi ve zkumavce přidáno 1,5 ml hexanu. Zkumavka byla pevně zazátkována a celý objem byl důkladně protřepán. Následně bylo přidáno 5 ml nasyceného roztoku NaCl a obsah byl opět důkladně protřepán. Zkumavka byla na 5 minut vložena do centrifugy nastavené na 5000 otáček za minutu. Po centrifugaci bylo co nejdříve automatickou pipetou odebráno 800 µl (2 x 400 µl) horní hexanové vrstvy do tmavé vialky o

objemu 1,5 ml. Jestliže analýza methylesterů nebyla provedena ještě téhož dne, byla vialka uložena do chladicího zařízení a analýza byla provedena nejpozději druhý den.

4.1.1 Chemikálie

- Hexan GC grade (Lach-Ner, Neratovice)
- Hexan p. a. (Lach-Ner, Neratovice)
- Methanol HPLC grade
- Methanolát sodný 0,5M (Supelco Analytical, Bellefonte, USA)
- Nasycený roztok NaCl

4.2 Analýza vzorků plynovou chromatografií

Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A, který byl použit pro analýzu mastných kyselin, byl vybaven kapilární křemennou kolonou SPB-2560, 100 m x 25 μm s tloušťkou filmu 0,2 μm s plameno-ionizačním detektorem (FID), autosamplerem G4513A.

Použité plyny pro analýzu:

- nosný plyn \rightarrow He (čistota 5.6)
- průtok plynů detektorem \rightarrow make-up N_2 25 ml/min (čistota 6.0)
 \rightarrow H_2 30 ml/min (čistota 6.0)
 \rightarrow vzduch syntetický 400 ml/min (čistota 5.0)

Podmínky analýzy:

- vstupní tlak nosného plynu \rightarrow 50 psi (= 310,264 kPa)
- splňovací poměr \rightarrow 1 : 100
- objem nastříkovaného vzorku \rightarrow 1 μl
- teplota nástřiku \rightarrow 280 $^\circ\text{C}$
- teplota detektoru \rightarrow 280 $^\circ\text{C}$
- teplotní program \rightarrow 140 $^\circ\text{C}$ (5 min), nárůst 4 $^\circ\text{C}/\text{min}$, 245 $^\circ\text{C}$ (20 min)

Chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí chromatografického softwaru ChemStation firmy Agilent Technologies. Jednotlivé mastné kyseliny byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů analyzovaných látek a standardů methylesterů mastných kyselin (Sulpeco 37 Component FAME Mix). Plochy všech detekovaných píků na chromatogramu byly sečteny, dohromady se rovnaly 100 %. Z plochy každého píku pak bylo vypočteno procentuální zastoupení příslušné složky ve vzorku. Takto provedená kvantitativní analýza se nazývá metoda vnitřní normalizace.

5 VÝSLEDKY

Ze všech vzorků margarínů bylo vždy vybráno 18 mastných kyselin, které byly vybrány na základě jejich majoritního obsahu ve vzorku. Jednalo se vždy o stejné látky, které se u margarínů opakovaly. Z osmnácti látek bylo identifikováno 16 mastných kyselin a 2 neidentifikované látky (v tabulce jsou označené jako ni-). Součet vybraných látek se pohyboval v rozmezí od 99,08 % do 99,14 % z celkového množství mastných kyselin.

V každé sérii (na jaře a na podzim) byly připraveny vždy dva deriváty od každého vzorku. Protože se hodnoty derivátů jednotlivých margarínů z jara i podzimu mezi sebou lišily minimálně, v konečné tabulce byly zprůměrovány. Jednotlivé vzorky byly mezi sebou porovnány.

Tabulka č. 2: Přehled margarínů – procentuální obsah základních skupin mastných kyselin (SFA – nasycené MK, MUFA – monoenové MK, PUFA – polyenové MK, omega-3 a omega-6 MK, neidentifikované MK, trans-mastné kyseliny)

	FLORA LIGHT	FLORA 45 %	FLORA GOLD 70 %	RAMA CLASSIC	HERA
SFA	19,89	22,39	23,82	28,39	44,25
MUFA	26,07	25,29	27,12	45,28	37,32
PUFA:					
ω - 3 MK	10,57	12,44	11,48	5,65	3,54
ω - 6 MK	41,60	38,15	35,80	17,21	12,12
neidentifikované	0,98	0,80	0,87	2,51	1,83
trans MK	0,03	0,04	0,03	0,05	0,03
SUMA	99,14	99,11	99,13	99,08	99,11

Nasycených mastných kyselin bylo obsaženo nejvíce v margarínu Hera, a to v průměru 44,25 %. Mezi vybrané nasycené kyseliny u všech margarínů patřily kyselina dekanová (C10:0), kyselina laurová (C12:0), kyselina myristová (C14:0), kyselina palmitová (C15:0), kyselina stearová (C18:0), kyselina arachová (C20:0), kyselina behenová (C22:0) a kyselina lignocerová (C24:0). Ve srovnání s ostatními margaríny byl v margarínu Hera vyšší

obsah kyseliny laurové, myristové a kyseliny palmitové, tedy nejkratších z detekovaných nasycených kyselin, což je uvedeno v tabulce (č. 4a a 4b).

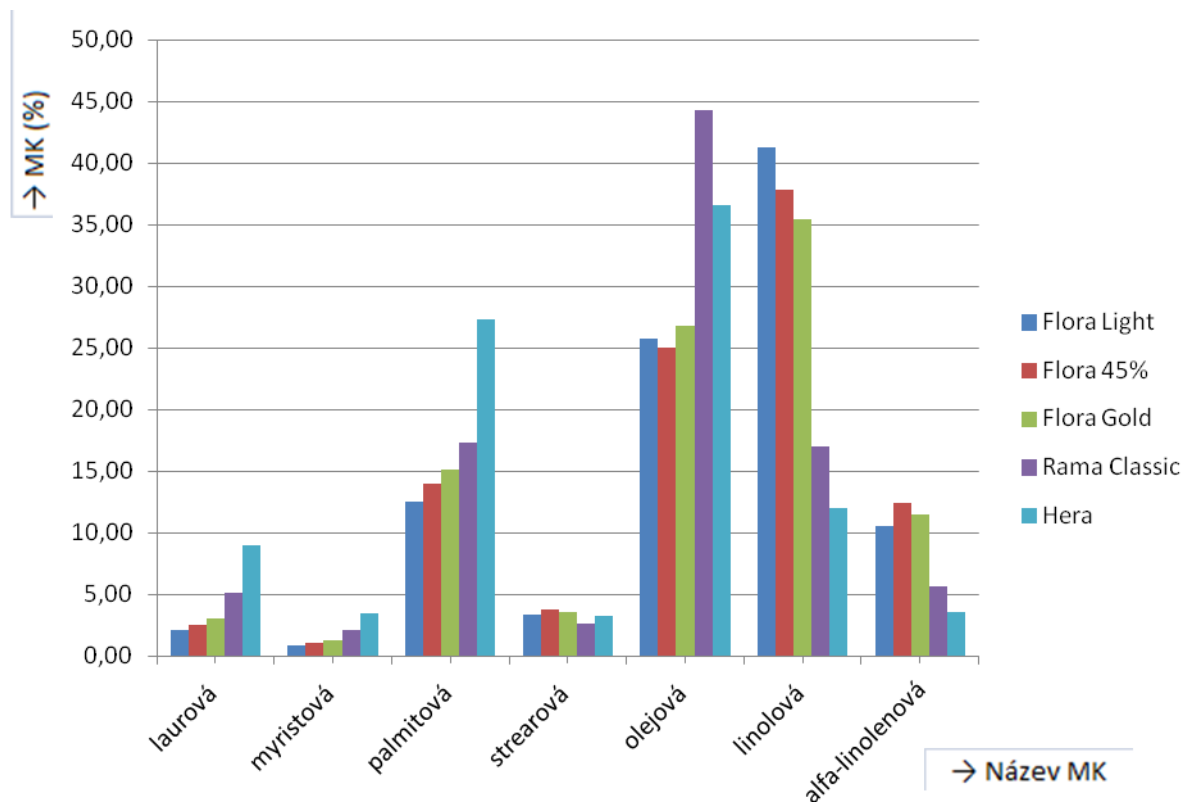
Mezi detekovanými monoenoovými mastnými kyselinami byly kyselina palmitolejová (C16:1n7), kyselina olejová (C18:1n9) a kyselina cis-11-ikosenová (C20:1n9). Kyselina olejová zde byla u všech margarínů přítomna téměř v absolutním majoritním množství. Kyseliny olejové bylo ze všech margarínů nejvíce v Ramě Classic. Z celkového množství všech monoenových mastných kyselin v Rama Classic, což bylo 45,28 %, tvořila kyselina olejová 44,29 %.

Z omega-3 nenasycených mastných kyselin byla identifikována pouze kyselina alfa-linolenová (C18:3n3), která ovšem na druhou stranu byla u všech margarínů v poměrně značném množství. U Flory 45 % bylo množství této kyseliny 12,44 %, nejméně pak byla přítomna v Heře, kde její obsah dosahoval v průměru jen 3,54 %.

Jako polynenasycené mastné kyseliny řady omega-6 byly v margarínech stanoveny kyselina linolová (C18:2n6), kyselina gama-linolenová (C18:3n6) a kyselina arachidonová (C20:4n6). Jednoznačně nejvyšší podíl měla kyselina linolová, která u margarínu Flora Light dosahovala průměrné hodnoty 41,29 %. Kyselina arachidonová ve srovnání byla u všech vzorků detekována v hodnotách pouze několika setin %.

Neidentifikované látky byly stanoveny dvě. Zatímco o původu druhé neidentifikované látky označené jako ni-2, by se dalo spekulovat, první ni-1 látka se vyskytovala v průměru od 0,76 % do 2,32 % a vždy následovala kyselinu olejovou, její původ však doposud jasný není.

Z trans nenasycených mastných kyselin byla zaznamenána pouze kyselina elaidová (C18:1n9), která se dle očekávání pohybovala ve velmi malém množství. Všechny výrobky obsahovaly 0,03 % kyseliny elaidové pouze Rama Classic 0,05 %.



Graf č. 1: Procentuální zastoupení mastných kyselin vyskytujících se v margarínech v nejvyšším množství.

Do grafu byly vybrány mastné kyseliny, které se u všech margarínů nacházely v majoritním množství. Jasně z něj vyplývá převaha kyseliny olejové a linolové. Jak již bylo řečeno, v margarínu Rama Classic byl obsah kyseliny olejové nejvyšší a to ze všech mastných kyselin. Margarín Flora Light, Flora 45% i Flora Gold měly nejvyšší podíl kyseliny linolové (omega-6 mastné kyseliny). Vyšší obsah byl patrný také u kyseliny alfa-linolenové patřící mezi omega-3 mastné kyseliny. Ve srovnání s ostatními margaríny měly margaríny značky Flora nejnižší podíl nasycených mastných kyselin – kyselina laurová, myristová, palmitová.

Tabulka č. 3: Přepočítané množství jednotlivých skupin mastných kyselin z celkového množství ve 100g průměrného margarínu na procentuální zastoupení v lipidech. (SFA – nasycené MK, MUFA – monoenoové MK, PUFA – polyenoové MK, omega-3 a omega-6 MK, neidentifikované MK, trans-mastné kyseliny)

MARGARÍN		% MK v lipidech
SFA	27,92 g ve 100g	36,36
MUFA	35,95 g ve 100g	46,82
PUFA:		
ω - 3 MK	2,87 g ve 100g	3,74
ω - 6 MK	9,75 g ve 100g	12,70
neidentifikované		
trans MK	0,29 g ve 100g	0,38

Černě zvýrazněné řádky v tabulce 4a a 4b značí kyseliny, které jsou v margarínech v majoritním množství. U všech margarínů se vždy jednalo o stejné mastné kyseliny – kyselina laurová (C12:0), myristová (C14:0), palmitová (C15:0), stearová (C18:0), olejová (C18:1n9), linolová (C18:2n6) a alfa-linolenová (C18:3n3).

Červeně zvýrazněné jsou hodnoty, které ukazují na margarín, který obsahuje dané majoritní kyseliny nejvíce.

Kyseliny, které v tabulkách nejsou zaznamenány jako například kyseliny EPA (C20:5) nebo DHA (C22:6), které jsou významné ve vztahu ke zdraví, byly detekovány, jejich obsah ve vzorcích margarínů byl však naprosto zanedbatelný.

Tabulka č. 4a: Pro procentuální zastoupení mastných kyselin v jednotlivých margarínech.

	MASTNÁ KYSELINA	RETENČNÍ ČAS (min.)		FLORA LIGHT 30%		∅	FLORA 45%		∅	FLORA GOLD 70%		∅
		podzim	jaro	podzim	jaro		podzim	jaro		podzim	jaro	
1	dekanová (10:0)	12,68	13,83	0,16	0,15	0,16	0,20	0,18	0,19	0,22	0,23	0,22
2	laurová (12:0)	15,57	16,82	2,23	2,03	2,13	2,59	2,37	2,48	2,93	3,05	2,99
3	myristová (14:0)	19,09	20,42	0,90	0,83	0,86	1,06	1,01	1,04	1,22	1,26	1,24
4	palmitová (15:0)	22,77	24,21	12,61	12,41	12,51	13,77	14,26	14,01	14,74	15,51	15,13
5	palmitolejová (16:1n7)	24,13	25,57	0,10	0,09	0,09	0,08	0,10	0,09	0,09	0,10	0,09
6	stearová (18:0)	26,29	27,76	3,36	3,36	3,36	3,89	3,73	3,81	3,72	3,40	3,56
7	elaidová (18:1n9, trans)	27,09	28,64	0,03	0,03	0,03	0,03	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03
8	olejová (18:1n9)	27,45	29,02	25,29	26,20	25,74	24,27	25,72	25,00	25,70	27,95	26,82
9	ni-1	27,66	29,12	0,87	1,00	0,93	0,71	0,80	0,76	0,71	0,95	0,83
10	linolová (18:2n6)	29,11	30,74	41,18	41,40	41,29	38,36	37,36	37,86	36,23	34,69	35,46
11	arachová (20:0)	29,56	31,06	0,26	0,26	0,26	0,26	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
12	gama-linolenová (18:3n6)	30,33	31,96	0,27	0,28	0,27	0,29	0,21	0,25	0,28	0,35	0,31
13	cis-11-ikosenová (20:1n9)	30,64	32,21	0,23	0,24	0,24	0,20	0,19	0,20	0,20	0,21	0,21
14	alfa-linolenová (18:3n3)	30,97	32,62	10,87	10,28	10,57	12,83	12,06	12,44	12,22	10,74	11,48
15	behenová (22:0)	32,61	34,22	0,50	0,47	0,48	0,46	0,45	0,45	0,44	0,34	0,39
16	ni-2	33,69	35,38	0,04	0,06	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04
17	arachidonová (20:4n6)	34,12	35,79	0,04	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,04	0,02	0,03
18	lignocerová (24:0)	35,66	37,38	0,10	0,16	0,13	0,17	0,16	0,17	0,01	0,08	0,05

Tabulka č. 4b: Procentuální zastoupení mastných kyselin v jednotlivých margarínech

	MASTNÁ KYSELINA	RAMA CLASSIC		∅	HERA		∅
		podzim	Jaro		podzim	jaro	
1	dekanová (10:0)	0,37	0,37	0,37	0,59	0,69	0,64
2	laurová (12:0)	5,15	5,18	5,16	8,17	9,67	8,92
3	myristová (14:0)	2,07	2,06	2,06	3,17	3,74	3,46
4	palmitová (15:0)	17,30	17,40	17,35	27,53	27,05	27,29
5	palmitolejová (16:1n7)	0,19	0,15	0,17	0,13	0,13	0,13
6	stearová (18:0)	2,64	2,65	2,65	3,39	3,18	3,29
7	elaidová (18:1n9, trans)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,00	0,03
8	olejová (18:1n9)	45,24	43,33	44,29	36,45	36,79	36,62
9	ni-1	2,52	2,13	2,32	1,58	1,81	1,69
10	linolová (18:2n6)	15,02	18,95	16,99	12,66	11,25	11,96
11	arachová (20:0)	0,48	0,44	0,46	0,40	0,40	0,40
12	gama-linolenová (18:3n6)	0,24	0,17	0,20	0,16	0,12	0,14
13	cis-11-ikosenová (20:1n9)	0,90	0,75	0,82	0,55	0,58	0,57
14	alfa-linolenová (18:3n3)	6,21	5,08	5,65	3,72	3,35	3,54
15	behenová (22:0)	0,25	0,22	0,23	0,18	0,16	0,17
16	ni-2	0,21	0,15	0,18	0,13	0,16	0,14
17	arachidonová (20:4n6)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
18	lignocerová (24:0)	0,10	0,10	0,10	0,09	0,09	0,09

6 DISKUSE

Nejvíce nasycených kyselin bylo obsaženo v margarínu Hera. Zatímco v běžném, průměrném margarínu, jak je uvedeno v Databázi složení potravin České republiky, se uvádí hodnota nasycených mastných kyselin 36,36 %, Hera obsahovala 44,25 %. Nejběžnější nasycená kyselina, která je obsažena téměř ve všech živočišných i rostlinných tucích, je kyselina palmitová. V Heře bylo této kyseliny stanoveno mnohem více než v ostatních margarínech, stejně tak jako kyseliny laurové. Myristové kyseliny bylo také stanoveno více než u ostatních vzorků, avšak rozdíl nebyl nijak markantní. Vzhledem k tomu, že Hera je margarínem určeným především na pečení, lze předpokládat trochu jiné složení mastných kyselin. Z nasycených kyselin byla kyselina stearová, jedna z nejběžnějších nasycených mastných kyselin, u všech vzorků téměř ve stejném množství. O trochu méně jí bylo jen v Rama Classic, rozdíl byl však minimální.

Monoenových kyselin bylo v průměrném margarínu deklarováno 46,82 %. Z analyzovaných vzorků se tomuto množství nejvíce blížila Rama Classic, která obsahovala 45,28 % těchto kyselin. Z tohoto celkového množství 45,28 % mastných kyselin s jednou dvojnou vazbou představovala jen kyselina olejová 44,29 %. Zbylé procento bylo zastoupeno kyselinou palmitolejovou (0,17 %) a cis-11-ikosenovou (0,82 %), které byly samostatně v majoritním množství i nad ostatními vzorky. Jak uvádí Vránová (2012), vysoký obsah kyseliny olejové se nachází především v řepkovém oleji, proto je velmi pravděpodobné, že pro výrobu Rama Classic byl řepkový olej výchozí látkou.

Jediná z identifikovaných trans kyselin byla kyselina elaidová. Podle Sábido et Christie (2009), přítomnost dvojně vazby na devátém uhlíku ukazuje na to, že tato kyselina nevznikla biohydrogenačním procesem, což znamená, že na výrobu žádného vzorku nebylo použito mléko, pro které by byla typická přítomnost trans nenasycené mastné kyseliny s dvojnou vazbou na jedenáctém uhlíku.

Ve výrobcích Flora Light, Flora Gold a Hera byl obsah trans kyselin jen 0,03 %. Flora 45% 0,04 % a Rama Classic obsahovala 0,05 % kyseliny elaidové. V měření na podzim byl obsah kyseliny elaidové u margarínu Hera dokonce nulový. Ve srovnání s průměrným margarínem, kde byl uveden obsah 0,38 %, jsou tyto hodnoty velmi nízké, což hraje ve prospěch všech vybraných vzorků.

Z takto nízkých hodnot trans kyselin lze také konstatovat, že dřívější výroba margarínu hydrogenací, pro kterou je typický vznik velkého množství trans nenasycených mastných kyselin, byl v současnosti nahrazen již zmíněnou přeesterifikací.

Obsah omega-3 a omega-6 mastných kyselin byl v Heře téměř identický, jako je uvedený u průměrného margarínu. Hera obsahovala 3,54 % omega-3 a 12,12 % omega-6 mastných kyselin. U průměrného margarínu byl obsah 3,74 % omega-3 a 12,70 % omega-6 kyselin.

Z pohledu optimálního poměru omega-3 a omega-6 mastných kyselin, který je zhruba 1 : 5, lze porovnat poměr těchto kyselin v analyzovaných vzorcích. Nejvíce se optimálnímu poměru přibližovala Flora Light s poměrem 1 : 3,94. Hera, která se hodnotami těchto kyselin téměř nelišila, měla poměr 1 : 3,42, Flora Gold 1 : 3,12, Flora 45% 1 : 3,07 a Rama Classic 1 : 3,04.

Ve všech margarínech značky Flora byl obsah kyseliny linolové (omega-6) a alfa-linolenové (omega-3) podstatně vyšší než u Rama Classic a Hera. Například lze uvést výrobek Flora Light, kde byl obsah omega-6 mastných kyselin 41,60 %, zatímco u Hery pouhých 12,12 %. Z výsledků by se obecně dalo říci, že margaríny, kde byl vyšší obsah nasyčených a monoenových mastných kyselin, byl obsah omega-3 a omega-6 nižší a naopak. Z výše uvedeného tedy vyplývá, že margaríny značky Flora jsou, z pohledu vysokého obsahu esenciálních mastných kyselin, pro naše zdraví prospěšnější než ostatní analyzované výrobky. Zároveň neobsahují velké množství nasyčených mastných kyselin.

Kyselina linolová je obsažená hlavně ve slunečnicovém oleji (Velíšek, 1999) a kyselina alfa-linolenová v oleji řepkovém. To je důvod pro předpoklad toho, že margaríny značky Flora vzhledem ke svému majoritnímu postavení těchto kyselin ve svém profilu, jsou vyrobeny převážně z těchto rostlinných olejů.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo analyzovat profil mastných kyselin ve vzorcích margarínů dostupných na našem trhu, což bylo provedeno u margarínů Flora, Flora Light, Flora Gold, Rama Classic a Hera.

Obsah jednotlivých druhů mastných kyselin byl u vzorků značně proměnlivý. U margarínů určených k použití za studena byl potvrzen, jak deklaroval výrobce, vyšší obsah polynenasycených mastných kyselin (margaríny Flora), popřípadě monoenoových (Rama Classic), což je žádoucí z výživového hlediska, protože tyto mastné kyseliny ve srovnání s nasycenými mastnými kyselinami představují menší riziko vzniku například kardiovaskulárních onemocnění. U margarínu určeného na pečení výrazně převažoval obsah nasycených mastných kyselin. Poměr polynenasycených mastných kyselin, bez ohledu na celkové procentuální zastoupení mastných kyselin ve vzorcích, byl u všech margarínů téměř stejný.

Pozitivní bylo množství jediné z identifikovaných trans nenasycených mastných kyselin, kyseliny elaidové, které bylo u všech vzorků velmi malé. Z tohoto výsledku lze říci, že margaríny, v minulosti často označované jako hydrogenované tuky, které byly spojovány s vysokým obsahem trans nenasycených mastných kyselin a jejich aterogenními účinky, v dnešní době z tohoto pohledu nepředstavují riziko.

8 SEZNAM LITERATURY

- Brát, J., Jiroušek, A. 2008. Margariny včera, dnes a zítra. *Výživa a potraviny*. (5). 124-126.
- Calder, P. C. 1998. Dietary fatty acids and the immune system. *Nutrition Reviews*. 56 (1). 70-83.
- Centrum pro databázi složení potravin (2013): On-line databáze složení potravin ČR, verze 4.13. Centrum pro databázi složení potravin. Ústav zemědělské ekonomiky a informací a Výzkumný ústav potravinářský Praha. Dostupné z <<http://www.nutridatabaze.cz/potraviny/?id=470>>.
- Christie, W. W. Metabolism and Physiological Effects of Trans Monounsaturated Fatty Acides from Partially Hydrogenated Vegetable Oils [online]. The AOCS Lipid Library. 17. ledna 2014 [cit. 2015-2-15]. Dostupné z <http://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=cs&prev=search&rurl=translate.google.cz&sl=en&u=http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/tag2/index.htm&usg=ALkJrhgwopVuKIIa3gp0XzT0aZ2juoAbBA>.
- Engelkin, L. R. 2014. Textbook of Veterinary Physiological Chemistry. 3rd ed. Academic press. p 786. ISBN: 9780123919090.
- Havlík, J., Marounek, M. 2013. Živiny a živinové potřeby člověka. ČZU. Praha. 131 s. ISBN: 9788021323742.
- Holzbecher, Z., Churáček, J. a kol. 1987. Analytická chemie. SNTL / ALFA. Praha. 664 s.
- Hui, Y. H., Sherkat, F. 2005. Handbook of Food Science, Technology and Engineering. Taylor and Francis. p. 3632. ISBN: 9780849398476.
- Kadlec, P. a kol. 2002. Technologie potravin II. VŠCHT Praha. 236 s. ISBN: 9788070805107.

- Karger, B. L. Separation and purification [online]. Encyklopedie Britannica. 15. května [cit. 02.3.2015]. Dostupné z <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/108875/separation-and-purification/80490/Chromatography>.
- Kasper, H. 2015. Výživa v medicíně a dietetika. Vyd. 11. Grada. Praha. 592. ISBN: 9788024745336.
- Klouda, P. 2003. Moderní analytické metody. Pavel Klouda. Ostrava. 132 s. ISBN: 8086369072.
- Langmeier, M. a kol. 2009. Základy lékařské fyziologie. Grada. Praha. 320 s. ISBN: 9788024725260.
- List, G. R. 2006. Giants of the past: Hippolyte Mége (1817 – 1880). Inform. 17 (4). 264.
- McMurry, J. 2007. Organická chemie. Vyd. 1. VUTIUM. Brno. 1260 s. ISBN: 9788021432918.
- Mozaffarian, D., Katan, M. D., Ascherio, A., Stamper, M. J., Willett, W. C. 2006. Trans fatty acids and cardiovascular disease. The New England Journal of Medicine. 354 (15). 1601-1613.
- Nosho, Y., Hashimoto, S., Kato, M., Suzuki, K. 2003. A novel high pressure technology for the production of margarine. In: Winter, R. (ed.). Proceedings of 2nd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology II: 16.9-19.9. 2002, Dortmund, Germany. p. 447-451. ISBN: 3540009779.
- Odstrčil, J. 2005. Biochemie. NCO NZO. Brno. 161 s. ISBN: 8070134259.
- Pokorný, J. 2004. Co jsou a jak vznikají trans izomery mastných kyselin. Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa. 7 (3). 134-135.
- Robinson, D. 2005a. Margarine's modern history. Inform. 16 (4). 206.
- Robinson, D. 2005b. The history of margarine. Inform. 16 (3). 135.
- Sébédio, J. L., Christie, W. W. Metabolism and Physiological Effects of Trans Monounsaturated Fatty Acides from Partially Hydrogenated Vegetable Oils [online]. The

AOCS Lipid Library. 12. května 2009a [cit. 2015-2-15]. Dostupné z <http://lipidlibrary.aocs.org/frying/n-tmono/index.htm>.

Sébédio, J. L., Christie, W. W. Metabolism of Trans Polyunsaturated Fatty Acides Formed during Frying [online]. The AOCS Lipid Library. 12. května 2009b [cit. 2015-3-3]. Dostupné z <http://lipidlibrary.aocs.org/frying/n-tpufa/index.htm>.

Velíšek, J. 1999. Chemie potravin 1. vydání. OSSIS. Tábor. 352 s. ISBN: 8090239137.

Vránová, D. Tuky v naší výživě [online]. Chempoint. 24. června 2012 [cit. 11. 3. 2015]. Dostupné z <http://www.chempoint.cz/tuky-v-nasi-vyzive>.

Zachař, P., Sýkora, D. Plynová chromatografie. VŠCHT Praha [online]. 2008 [cit. 11. 3. 2015]. Dostupné z <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>.

Zbikowska, A., Kowalska, M., Rutkowska, J. 2012. The quality of Polish spreadable fats especially with emphasis of trans isomers content. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*. 89 (1). 62-69.

Zhang, H., Jacobsen, C., Pedersen, L. S., Christensen, M. W., Adler-Nissen, J. 2006. Storage stability of margarines produced from enzymatically interesterified fats compared to those prepared by conventional methods chemical properties. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 108 (3). 227-238.