



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# MOŽNOSTI ANALYTICKÉHO STANOVENÍ VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN

THE POSSIBILITIES OF ASSESSMENT OF FREE FATTY ACIDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MIROSLAVA HORNÁKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. EVA VÍTOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0902/2014</b>	Akademický rok: <b>2014/2015</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Miroslava Hornáková</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Eva Vítová, Ph.D.</b>	
Konzultanti:		

### Název diplomové práce:

Možnosti analytického stanovení volných mastných kyselin

### Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:

- složení mastných kyselin (MK) v sýrech

- přehled metod vhodných pro stanovení MK v potravinách (izolace z matrice vzorku, derivatizace, stanovení)

- přehled metod vhodných pro stanovení volných MK

2. Vyberte metodu vhodnou pro stanovení volných MK v sýrech

3. Optimalizujte podmínky a ověřte validační parametry vybrané metody

### Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Miroslava Hornáková  
Student(ka)

-----  
Ing. Eva Vítová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá stanovením volných mastných kyselin v přírodních a tavených sýrech. V teoretické části jsou popsány možnosti extrakce, frakcionace a stanovení frakcí lipidů, charakterizovány mastné kyseliny, různé způsoby jejich stanovení včetně stanovení volných mastných kyselin.

V experimentální části byla optimalizována a částečně validována vybraná metoda na stanovení volných mastných kyselin, která byla následně aplikována na vzorky tavených sýrových analogů a přírodních sýrů typu Gouda. Pro extrakci lipidů ze vzorku byla zvolena metoda dle ČSN 0107, pro oddělení volných mastných kyselin metoda extrakce na pevné fázi (SPE). Pro esterifikaci byla vybrána metoda podle ČSN EN ISO 5509 s použitím metanolového roztoku hydroxidu draselného. Na stanovení methylesterů mastných kyselin byla použita plynová chromatografie s FID detekcí.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

sýry, GC, MK, VMK, TLC, SPE

## **ABSTRACT**

This thesis deals with the determination of free fatty acids in natural and processed cheese. In the theoretical part the possibilities of extraction, fractionation and determination of lipid fractions, characterization of fatty acids and various methods of their determination are described, including the determination of free fatty acids.

In the experimental part the selected method for determination of free fatty acids was optimized and partly validated; this method was then applied to samples of processed cheese analogues and natural Gouda type cheese.

For extraction of lipids from the sample the method according to ČSN 0107 was selected, solid phase extraction (SPE) was used for separation of free fatty acids. The method according to ČSN EN ISO 5509, using methanol solution of potassium hydroxide, was applied for esterification, fatty acids methyl esters were determined by gas chromatography with FID detection.

## **KEYWORDS**

cheese, GC, FA, FFA, TLC, SPE



HORNÁKOVÁ, M. Možnosti stanovení volných mastných kyselin. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 54 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D..

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### *Poděkování:*

*Na tomto místě bych chtěla poděkovat Ing. Evě Vítové, Ph.D a konzultantce Ing. Martině Mahdalové za odborné vedení bakalářské práce, za cenné rady a připomínky a všem přátelům za podporu během psaní této práce.*

## OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Mastné kyseliny.....	9
2.1.1	Nasyčené mastné kyseliny .....	10
2.1.2	Nenasycené mastné kyseliny.....	10
2.2	Metody vhodné pro extrakci, esterifikaci a stanovení mastných kyselin.....	10
2.2.1	Extrakce podle Soxhleta.....	11
2.2.2	Extrakce podle Folche .....	12
2.3	Předběžné rozdělení extraktu .....	12
2.3.1	Extrakce na pevné fázi .....	12
2.3.1.1	Provedení SPE.....	13
2.3.1.2	Instrumentace SPE .....	13
2.3.1.3	Výhody a nevýhody SPE.....	14
2.3.2	Chromatografie na tenké vrstvě .....	14
2.4	Derivatizace (esterifikace) mastných kyselin.....	15
2.4.1	Bazicky katalyzovaná esterifikace .....	15
2.4.2	Kyselou katalyzovaná esterifikace .....	15
2.5	Plynová chromatografie .....	15
2.6	Možnosti stanovení volných mastných kyselin v potravinových matricích .....	16
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	18
3.1	Laboratorní vybavení a chemikálie .....	18
3.1.1	Plyny.....	18
3.1.2	Přístroje .....	18
3.1.3	Pracovní pomůcky.....	18
3.1.4	Chemikálie .....	18
3.2	Analyzované vzorky.....	19
3.3	Použité metody.....	19
3.3.1	Extrakce lipidů ze vzorku dle normy ČSN 57 0107.....	19
3.3.2	Frakcionace lipidů metodou SPE .....	20
3.3.3	Frakcionace lipidů metodou TLC .....	21
3.3.4	Esterifikace mastných kyselin.....	21
3.4	Podmínky metody pro stanovení methylesterů mastných kyselin .....	22
3.5	Identifikace a kvantifikace mastných kyselin ve vzorcích.....	23
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	24
4.1	Standards mastných kyselin.....	24
4.2	Stanovení celkového obsahu mastných kyselin ve vzorcích.....	25
4.3	Frakcionace lipidů metodou tenkovrstvé chromatografie .....	29
4.4	Frakcionace lipidů metodou extrakce na pevné fázi .....	30
4.5	Srovnání metod TLC a SPE .....	30
4.6	Optimalizace metody SPE.....	31
4.6.1	Experiment č. 1 .....	31
4.6.2	Experiment č.2 .....	32
4.6.3	Experiment č.3 .....	33
4.6.4	Experiment č.4 .....	34
4.6.5	Experiment č.5 .....	35
4.7	Stanovení opakovatelnosti metody.....	37
4.8	Aplikace na vybrané vzorky.....	38
5	ZÁVĚR.....	43

6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	44
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	46
8	PŘÍLOHY .....	47

# 1 ÚVOD

Tuky tvoří významnou část námi přijímaných potravin, tedy i mléčných výrobků, jako jsou sýry a analogy tavených sýrů a mnohé další výrobky. Udělují potravinám sensorické vlastnosti, mezi které patří jemná chuť, příjemná vůně, výborné texturní vlastnosti a jiné vlastnosti. Tuky jsou také nejbohatší složky potravin z pohledu zisku energie, dodávají pocit sytosti. Jsou i důležité pro lidský organismus, v tucích jsou například rozpustné i některé důležité vitamíny, ale i jiné doprovodné látky. Jednou z významných součástí tuku jsou mastné kyseliny. Mastných kyselin se v lipidech vyskytuje více druhů a liší se například fyzikálními vlastnostmi. I mastné kyseliny se podílejí na konečných vlastnostech potraviny jako jsou konzistence, nutriční hodnota a jiné.

Cílem této práce bylo vybrat a optimalizovat metodu stanovení volných mastných kyselin v různých sýrových maticích. Pro frakcionaci vyextrahovaných lipidů a zisk frakce volných mastných kyselin byly vyzkoušeny a porovnány dvě metody: chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a extrakce na pevné fázi (SPE). Pro stanovení mastných kyselin byla použita plynová chromatografie s FID detekcí.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou nejdůležitější a z hlediska výživy nejdůležitější složkou lipidů. Podle názvosloví používaného v organické chemii se za mastné kyseliny označují karboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem. Tato definice nepokrývá celou škálu mastných kyselin přítomných v lipidech. Některé mastné kyseliny dle definice organických chemiků (např. kyselina octová) nejsou přítomny v přírodních lipidech, i když se mohou vyskytovat v průmyslových výrobcích obsahující tuk. Naopak některé mastné kyseliny vázané v lipidech jsou alicyklické nebo dokonce aromatické sloučeniny.

V potravinách obsahující lipidy se vyskytují tyto skupiny mastných kyselin:

- nasycené mastné kyseliny
- nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (monoenoové)
- nenasycené mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami (polyenoové)
- mastné kyseliny s trojnými vazbami a s různými substituenty (rozvětvené, cyklické, s kyslíkatými, sirnými nebo dusíkatými funkčními skupinami)

Pro mléčné tuky jsou typické nasycené mastné kyseliny s kratším řetězcem, např. máselná kyselina a skupina kyselin s 6-10 uhlíky v molekule. Pro srovnání v tabulce č. 1. je obsah mastných kyselin vybraných sýrů a syrového mléka [1].

Tabulka č. 1a. Obsah tuku a mastných kyselin ve 100 g jedlého podílu vybraných sýrů (pozn.: T. v S. = tuk v sušině)[2]

	Sýr Eidam 30 % T. v S.	Sýr Hermelín 50 % T. v S.	Sýr tavený nízkoenergetický Lipno, 30 % T. v S.	Syrové mléko
<b>Lipidy celkové</b>	<b>16,00 g</b>	<b>22,30 g</b>	<b>11,40 g</b>	<b>4,10g</b>
<b>Nasycené MK</b>	<b>10,35 g</b>	<b>14,40 g</b>	<b>7,38 g</b>	<b>2,65 g</b>
Máselná	0,54 g	0,76 g	0,39 g	0,14 g
Kapronová	0,35 g	0,49 g	0,25 g	0,09 g
Kaprylová	0,22 g	0,31 g	0,16 g	0,13 g
Kaprinová	0,50 g	0,69 g	0,35 g	0,06 g
Laurová	0,62 g	0,87 g	0,44 g	0,16 g
Myristová	1,76 g	2,45 g	1,25 g	0,45 g
Palmitová	4,74 g	6,59 g	3,37 g	1,21 g
Stearová	1,62 g	2,25 g	1,15 g	0,41 g
<b>Mononenasycené MK</b>	<b>4,32 g</b>	<b>6,01 g</b>	<b>3,08 g</b>	<b>1,11</b>
Myristolejová	0,22 g	0,31 g	0,16 g	0,06 g
Palmitolejová	0,35 g	0,49 g	0,25 g	0,09 g
Olejová	3,55 g	4,94 g	2,53 g	0,91 g
Cis-11- eicosenová	0,19 g	0,27 g	0,14 g	0,05 g

Tabulka č. 1b. Obsah tuku a mastných kyselin ve 100 g jedlého podílu vybraných sýrů (pozn.: T. v S. = tuk v sušině)[2]

	Sýr Eidam 30 % T. v S.	Sýr Hermelín 50 % T. v S.	Sýr tavený nízkoenergetický Lipno, 30 % T. v S.	Syrové mléko
<b>Polynenasycené MK</b>	<b>0,46 g</b>	<b>0,65 g</b>	<b>0,33 g</b>	<b>0,12</b>
linolová	0,34 g	0,47 g	0,24 g	0,09 g
linolenová	0,13 g	0,18 g	0,09 g	0,03 g

### 2.1.1 Nasycené mastné kyseliny

Nasycené mastné kyseliny neobsahují žádné dvojné vazby. Všeobecně je nejběžnější palmitová a stearová kyselina, které se vyskytují skoro ve všech živočišných a rostlinných lipidech, a to v triacylglycerolech i fosfolipidech. Nasycené mastné kyseliny s lichým počtem uhlíkových atomů jsou poměrně vzácné a vyskytují se jen jako stopové složky. Ve větším množství (hlavně kyselina pentadekanová a heptadekanová, ale jen do 1 %) jsou přítomny jen v lipidech některých mikroorganismů, v kožních lipidech a v depotním i mléčném tuku přežvýkavců. [1]

### 2.1.2 Nenasycené mastné kyseliny

Obsah nenasycených mastných kyselin v přírodních lipidových materiálech, např. v tucích a olejích, se pohybuje v širokém rozmezí, od více než 90 % všech mastných kyselin (např. v řepkovém oleji) po méně než 10 % (např. v kokosovém tuku). Obsah nenasycených mastných kyselin v tucích živočichů se pohybuje v daleko menším rozmezí, obvykle mezi 50-70 %. V rostlinách je ve srovnání se živočichy daleko větší pestrost ve složení nenasycených mastných kyselin. [1]

Nejběžnější nenasycenou mastnou kyselinou je kyselina olejová, která se alespoň v malém množství vyskytuje prakticky ve všech živočišných i rostlinných lipidech. Z polyenových mastných kyselin je nejběžnější linolová kyselina, která je rovněž přítomná alespoň ve stopových množstvích ve všech tucích.

V mléčném tuku se vyskytují další nenasycené mastné kyseliny, např. palmitolejová (asi 4 %) a vakcenová (1-5 %). [1]

Přírodní nenasycené mastné kyseliny mají většinou konfiguraci *cis*. Kyseliny s konfigurací *trans* se vyskytují hlavně v depotním tuku přežvýkavců, kam se dostávají z potravy přeměněné mikroorganismy v bachoru, kde vznikají při hydrogenaci linoleové. Podobně mají zvýšený obsah *trans*-nenasycených mastných kyselin také jiní savci, v jejichž trávicím systému je listí a tráva předtráveno mikroorganismy (např. klokani). Tyto *trans*-nenasycené mastné kyseliny přecházejí částečně také do mléka. S potravou jsou přijímány člověkem, a proto se vyskytují i v lidském depotním tuku. [1]

Kyseliny s konfigurací *trans* vznikají také průmyslovou katalytickou hydrogenací nenasycených mastných kyselin, proto se vyskytují ve značném množství ve ztužených tucích a v tukových výrobcích připravených. Tvoří se také při záhřevu tuků obsahujících polyenové mastné kyseliny na teploty přes 240 °C, např. při jejich deodoraci. Celkový obsah *trans*-nenasycených mastných kyselin u mléka a másla je 2-4 % z veškerých mastných kyselin. [1]

## 2.2 Metody vhodné pro extrakci, esterifikaci a stanovení mastných kyselin

Nedílnou součástí analýzy je odběr a příprava vzorku. Odebraný vzorek by měl obsahovat všechny součásti ve stejném hmotnostním nebo objemovém poměru jako jsou v původní

matrici. Odebraný vzorek, pokud není ihned zpracován, by měl být uchován v uzavřené nádobě při nízké teplotě, aby nedošlo ke kontaminaci a nežádoucím změnám [3, 4].

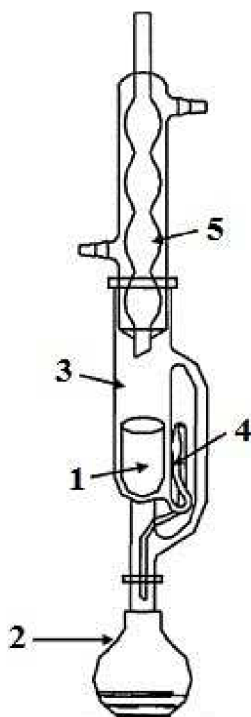
Než dojde k vlastnímu stanovení mastných kyselin, je nutné izolovat vzorek lipidů (mastných kyselin) z matrice potraviny [4, 5].

Jsou známé různé typy izolace lipidů. Vhodnost metody se volí podle matrice, ze které lipidy extrahujeme. Při extrakci je důležité teplota, při vyšších teplotách by mohlo dojít k enzymatickému štěpení [6]. Extrakce rozpouštědlem je často používaná metoda i přesto, že má mnohé nevýhody, jako je náročnost na čas a použitý materiál, může při ní docházet ke ztrátě analytu, ale také vzniká velké množství organického odpadu. Z toho důvodu se již dnes aplikují různé modernější extrakční techniky. Volba extrakční metody hlavně závisí na použité matrici, ze které extrahujeme [3, 6].

### 2.2.1 Extrakce podle Soxhleta

Jedná se o kontinuální extrakci, která se používá převážně k dělení organických látek. Aparatura je složena z destilační baňky, extraktoru a chladiče (Obr. č. 1.). Do střední části (3) přístroje se vkládá papírová extrakční patrona, která má válcový tvar a kulaté dno a která se plní vzorkem. Baňka (2) se naplní vhodným rozpouštědlem, ve kterém je dobře rozpustná extrahovaná složka. Baňka je zahřívána k varu rozpouštědla a jeho páry stoupají postranní trubičkou kolem střední části extraktoru do chladiče. Rozpouštědlo kondenzuje a kape na papírovou patronu, ve které je vzorek. Střední část extraktoru je postupně naplněna kondenzujícím rozpouštědlem, jehož hladina stoupá i v tenké přepadové trubičce (4). Stoupne-li hladina rozpouštědla ve střední části extraktoru k nejvyšší části přepadové trubičky, přeteče roztok do destilační baňky a celý proces se opakuje. Nakonec je získán roztok jedné nebo více složek v destilační baňce, ze které se po ukončení extrakce rozpouštědlo oddestiluje. Poté zůstane v baňce jen vyextrahovaná složka, případně složky.

Tato metoda se používá k izolaci tuků u potravinářských výrobků, k izolaci éterických olejů z květů a jiné. [7]



Obr. č. 1. Aparatura na extrakci dle Soxhleta [7]

### 2.2.2 Extrakce podle Folche

Metoda podle Folche je založena na extrakci vzorků směsí chloroformu a methanolu (2:1) a poté homogenizaci vzorku za studena. Homogenizace trvá minimálně 3 minuty, ale i déle v závislosti na konzistenci vzorku. Následně je suspenze zfiltrována nebo centrifugována, aby došlo k oddělení nerozpuštěných podílů vzorku. Extrakt je dále promýván roztokem NaCl, z důvodu dosažení konečného poměru směsi chloroformu, methanolu a vody a to 8:4:3. Na závěr je přidán metanol a tím je extrakt naředěn do požadovaného objemu chloroformu a methanolu na poměr 2:1. Poté se dojde k oddestilování rozpouštědla na vakuové rotační odparce při teplotě nepřevyšující 40 °C. Po oddestilování se produkt zváží. [8]

Metoda se hlavně využívá pro stanovení tuku v matricích s větším množstvím vody a polárních lipidů (fosfolipidů, komplexních lipidů) nebo pro maso a masné výrobky [6].

### 2.3 Předběžné rozdělení extraktu

Jedlé tuky a oleje jsou složitá směs triacylglycerolů (TAG) (90-95%), diacylglycerolů (DAG) (1-2%), volných mastných kyselin (FFA) ( $\approx 0,5\%$ ), fosfolipidů a dalších méně významných složek. Některé z komponent přispívají k textuře a chuti přírodních tuků a olejů a většina z nich hraje roli v lidské výživě. Přítomnost kyslíku, teploty, času a skladovacích podmínek může změnit sloučeniny uvedené výše [10].

Extrakční produkty získané pomocí extrakčních technik jsou tedy směsi obsahující různě polární lipidy, a to triacylglyceroly, volné mastné kyseliny, steroly, estery sterolů, fosfolipidy a další lipidické složky nebo látky doprovodné lipidům. Pro další analýzy je tedy zapotřebí skupiny lipidů odseparovat a k tomuto účelu využíváme různé adsorpční techniky [9].

#### 2.3.1 Extrakce na pevné fázi

Kolony pro extrakci na pevné fázi (Solid Phase Extraction SPE) byly vynalezeny v polovině 1970, v roce 1978 Waters podporoval kolonky Sep-Pak, pohodlné jednorázové kolonky na bázi oxidu křemíku. O dva roky později Williams, McCluer a také Paell zveřejnili první dokumenty o uplatnění SPE v oblasti lipidů. První z nich se zabývá izolací gangliosidů z extraktů zvířecí tkáň, druhý se zabývá frakčními metabolity kyseliny arachidonové. Později byly principy SPE metody, izolace a frakcionace lipidů v biologických a potravinářských matricích značně prozkoumány Wachobem, Chrisiem, Ebelerem a Schimotem, Ebelerem a Ebelerem [10].

Univerzálnost SPE umožňuje, aby byla použita pro velké množství účelů, např. jako efektivní čištění vzorků, nebo pro izolaci sloučenin a odstranění přebytku činidla a další. I vzorky methylesterů určené pro plynovou chromatografii (GC) mohou být čištěny průchodem přes SPE kolonku, která může odstranit peroxidy a hydroxidy. Velké množství kvantitativních metod (GC, HPLC) využívají výhod SPE a používají ji jako první krok. [10]

SPE je založena na principu kapalinové chromatografie, silné, ale reversibilní interakci mezi analytem a stacionární fází obsaženou v SPE kolonkách. Sloučeniny ze vzorku reagují více se stacionární fází než s rozpouštědlem, tím zůstávají ve stacionární fázi, ze které se pak vymývají vhodně zvolenými rozpouštědly [10].

Typické interakce jsou např. nepolární interakce mezi C-H vazbami analytu a C-H vazbami v absorbentu (Van der Waalovy síly). Nejběžnější podporou nepolárních interakcí jsou C18 kolonky, ale také C8 a C2 se používají pro separaci lipidů. Oproti tomu polární interakce jsou typické pro všechny kyano (CN), amino (NH<sub>2</sub>), dioly nebo oxidy křemíku. Dále se vyskytují iontoměničové interakce, jako jsou u kvarterních aminů, benzensulfonových kyselin nebo propylsulfonových kyselin. K těmto interakcím dochází tehdy, když analyty mají negativní nebo pozitivní iontový charakter [10].



Postup SPE, jak je aplikován na dělení lipidů, je v dostupných publikacích často špatně popsán, včetně úpravy vzorku před analýzou. I v případech, kdy jsou publikované metody popsány jako důkladné a reprodukovatelné, jsou v praxi obtížně úspěšně opakovatelné. Důvody týkající se zvolení SPE kolonky, mobilní fáze, objemu vzorku a/nebo průtokové rychlosti nejsou obvykle v publikacích komentovány [10].

### 2.3.1.1 Provedení SPE

Metoda SPE se skládá z pěti kroků, a to z kondicionování kolonky, dávkování vzorku, promývání, sušení a eluce (viz. Obr. č. 2.).

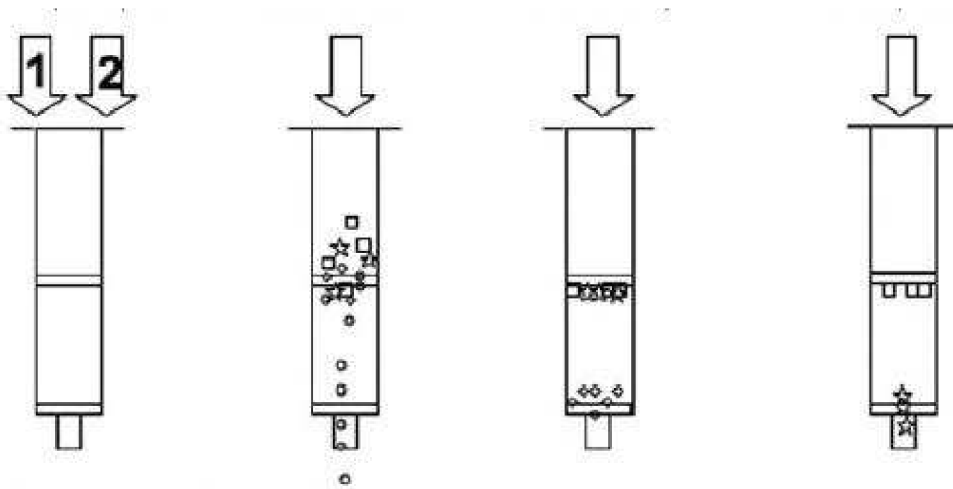
Kondicionování, jinak také označováno jako předúprava, kolonky se používá na přípravu kolonky na reprodukovatelnou interakci složek vzorku s pevnou fází. Kolonka je propláchnuta předepsaným rozpouštědlem z důvodu aktivace pevné fáze pro interakci se vzorkem [11].

Při dávkování vzorku je důležitý především výběr pevné fáze, protože dochází ke specifickým interakcím látek s pevnou fází, ostatní látky obsažené ve vzorku volně procházejí kolonou.

Promývání kolonky vhodným rozpouštědlem slouží k vymytí zbytků matrice vzorku z kolonky. Žádané složky vzorku zůstávají uchyceny na pevné fázi.

Sušení se provádí v případech, kdy se promývací roztok zásadně liší od roztoku elučního. K vysoušení se používá proud inertního plynu, nejčastěji se jedná o dusík.

Při promývání kolonky tzv. elučním činidlem dochází k selektivní desorpci složek vzorku z pevné fáze a tím k jejich vymytí z kolonky. Eluát se jímá a dále se upravuje pro další použití (např. chromatografická analýza) [11].



Obr. č. 2. Znárodnění pěti kroků metody SPE [10]

### 2.3.1.2 Instrumentace SPE

Na metodu SPE se používají buď kolonky, nebo extrakční disky. SPE kolonky mají tvar injekční stříkačky bez pohyblivého pístu a jsou naplněny povrchově modifikovanými sorbenty o různé velikosti částic. Jednotlivé kolonky charakterizuje typ pevné fáze (viz. Tab. č. 2.), objem kolonky (0,4 – 15 ml), maximální průtoková rychlost, kapacita (1 – 500 mg), minimální eluční objem (10  $\mu$ l – 50 ml) a materiál kolonky (polypropylen, sklo) [11].

Extrakční disky se používají jako moderní forma SPE, jedná se o tenké kompozitní membrány z teflonu a příslušného modifikovaného sorbentu (až 90 % hm. ). Výhody těchto disků: nejsou omezeny průtokovou rychlostí, zakoncentrování vzorku probíhá ve velmi úzké zóně membrány a k eluci se používá minimální množství elučního činidla (řádově  $\mu$ l) a díky tomu

se nemusí odpařovat nadbytečné množství rozpouštědla před chromatografickou analýzou vzorku [11].

Tab. č. 2. Charakterizace SPE kolonek [11]

Princip	Adsorbent	vzorek	Eluční činidlo
<b>Nepolární extrakce</b>	C18, C8, fenyl, CN	Pesticidy, antibiotika, kofein, vitaminy, PCB	Hexan, dichlormetan, acetonitril, alkoholy
<b>Polární extrakce</b>	Silikagel, NH <sub>2</sub> , CN, OH	Antibiotika, pesticidy, steroidy, vitaminy, aflatoxiny	di- a trichlormetan, ethylacetát, alkoholy, voda
<b>Kationová výměna</b>	Silně kyselý katex	Aminokyseliny, chlorofyl, PCB	Kyseliny, roztoky solí, pufrů
<b>Aniontová výměna</b>	Bazický anex	Organické kyseliny, kofein, sacharin	Zásady, roztoky solí, pufrů
<b>Extrakce ve smíšeném modu</b>	CN/SiOH, NH <sub>2</sub> /C18	PCB z odpadních olejů, tělní tekutiny	Chloroform, aceton, ethylacetát, methanol

### 2.3.1.3 Výhody a nevýhody SPE

Jedná se o rychlou a levnou metodu, výhodou je práce s menšími objemy vzorku, snížená spotřeba organických rozpouštědel a v neposlední řadě snadná automatizace [10,11].

Nevýhodou této techniky je, že pro některé specifické izolace nejsou dosud na trhu vhodné SPE kolony, ale sortiment SPE kolonek se neustále rozšiřuje. [10,11]

### 2.3.2 Chromatografie na tenké vrstvě

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) je další technika používaná pro kvantitativní rozdělení různých tříd lipidů.

Nevýhodou jsou problémy spojené se separací komplexních biologických vzorků, nežádoucí oxidace polynenasycených lipidů během procesu TLC a problémy, které vznikají při překročení maximální dávky vzorku.

Touto technikou mohou být volné mastné kyseliny snadno odděleny od zbytkových lipidů a následně stanoveny pomocí plynové chromatografie případně v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Pro podrobnější analýzu se používá impregnace TLC desek AgNO<sub>3</sub> [13].

TLC destičky impregnované AgNO<sub>3</sub> byly použity např. Wilsonem a Sametem k oddělení polynenasycených mastných kyselin, které mají velký fyziologický význam. Silikagel 60 TLC destičky byly potaženy AgNO<sub>3</sub> prostou sprejovou technikou, byly sušeny na vzduchu, zahřívány na 110 °C po dobu 30 minut k dosažení aktivace. Mastné kyseliny, po izolaci pomocí sloupcové chromatografie, byly naneseny na naimpregnované TLC destičky. Jako mobilní fáze byla použita směs toluenu a acetonitrilu (97:3, v/v). Následně byly destičky sušeny, poté lehce posprejovány 3 % octanem měďným, 8 % kyselinou fosforečnou a spálené při teplotě 180 °C po dobu 20 minut, na vizualizaci esterů. Pomocí tohoto postupu mohly být odděleny dieny od trienů a tetraenů [13].

Jako nejlepší metoda se jeví oddělení mastných kyselin s 0-2 dvojnými vazbami na jedné TLC destičce pokryté ionty stříbra a mastné kyseliny s 3 a více dvojnými vazbami na druhé destičce. Vhodné eluční činidlo pro první destičku je směs hexanu a diethyletheru (9:1, v/v) a pro druhou destičku směs hexan a diethylether (2:3, v/v). Obecně je ale toto oddělení poměrně obtížné a neumožňuje dobře reprodukovatelné výsledky [13].

Schwertner a Mosser ukázali, že kvantitativní stanovení různých mastných kyselin je možné pomocí jiné metody. Metoda je založená na extrakci lipidů směsí chloroformu, methanolu

a butylhydroxytoluenu (BHT) jako antioxidantu. Celkový extrakt lipidů se dále rozdělí na silikagelu za použití n-hexan-diethylether-kyselina octová-BHT (95:5:1:0,1; v/v/v/v). Destičky byly postříkány rhodominem 6G a jednotlivé složky lipidů sledovány pod UV světlem. Složky lipidů byly zmýdelněny pomocí KOH, pak esterifikovány BF<sub>3</sub> a následně kvantifikovány pomocí plynové chromatografie [13].

V dnešní době je TLC jen zřídka používána samostatně, ale obvykle se kombinuje s dalšími metodami [13].

## **2.4 Derivatizace (esterifikace) mastných kyselin**

Pro stanovení mastných kyselin se nejčastěji používá plynová chromatografie, proto musejí být analyzované mastné kyseliny převedeny na těkavou formu, kterou nejčastěji bývá methylester příslušné mastné kyseliny. Esterifikace se provádí několika možnými způsoby, které se dají použít na širší okruh maticí. Jako základní derivatizační reakce se používá bazicky a/nebo kysele katalyzovaná esterifikace [14].

### **2.4.1 Bazicky katalyzovaná esterifikace**

Bazicky katalyzované reakce jsou rychlejší a probíhají za mírnějších podmínek než kysele katalyzované esterifikace. Dochází k esterifikaci pouze vázaných mastných kyselin. Tyto esterifikace probíhají rychle v bezvodém methanolu za přítomnosti 0,5 mol·l<sup>-1</sup> roztoku methoxidu sodného v bezvodém methanolu. Méně často jsou využívány methoxid draselný a hydroxid draselný [9].

### **2.4.2 Kysele katalyzovaná esterifikace**

Kysele katalyzovaná esterifikace v přebytku bezvodého methanolu pomocí zahřívání se používá u volných mastných kyselin. Zahříváním dochází k urychlení esterifikace. Nejčastějším činidlem je 5 % bezvodý chlorovodík v methanolu, který vzniká probubláváním bezvodého methanolu chlorovodíkem. Na stejném principu funguje i esterifikace s 1-2 % roztokem kyseliny sírové v methanolu. Vzorky lipidů jsou pak s činidlem zahřívány asi 2 hodiny pod zpětným chladičem. Esterifikovány nejsou pouze volné mastné kyseliny, ale i ty vázané [9].

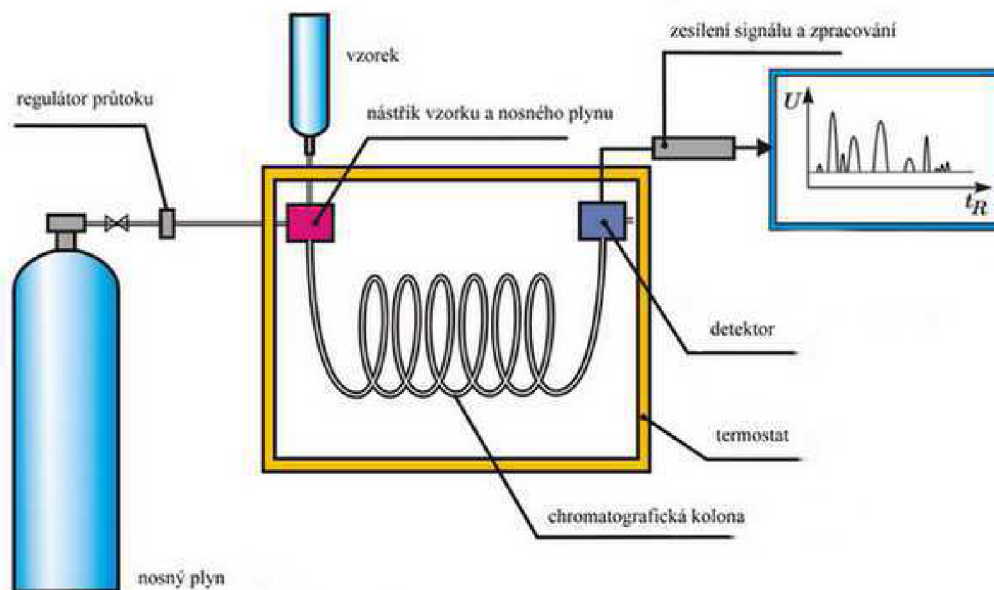
## **2.5 Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie (GC) je analytická separační metoda, která se využívá ke stanovení těkavých aromatických látek nejčastěji. Její hlavní výhodou je jednoduché a rychlé provedení analýzy, účinná separace látek a použití malého množství vzorku. Metoda je určena k dělení a stanovení pevných látek, plynů, kapalin s bodem varu do 400 °C.

Dělení složek směsi probíhá mezi mobilní a stacionární fází. Mobilní fází je nosný plyn, nejčastěji se používá dusík, vodík, helium nebo argon. Stacionární fází je pevný sorbent nebo kapalina nanosená v tenké vrstvě na pevný nosič.

Princip této metody je nanášení vzorku do vyhřívaného bloku nástřikové komory, kde dochází k odpaření a ve formě par je unášen nosným plynem do kolony. V koloně dochází k separaci složek na základě různé schopnosti složek se poutat na stacionární fázi. Takto oddělené složky opouštějí kolonu a jsou detekovány pomocí detektoru. Pro stanovení mastných kyselin se nejčastěji používá plameno-ionizační (FID), příp. hmotnostní (MS) detektor. Signál z detektoru se dále vyhodnocuje pomocí zařízení, nejčastěji je tímto zařízením počítač, který zaznamenává intenzitu signálu na čase (chromatogram). Z chromatogramu pak lze vyčíst,

o jakou látku se jedná a její zastoupení ve směsi. Na obr. č. 3. je znázorněno schéma chromatografu [15-17].



Obr. č. 3. Schéma plynového chromatografu

## 2.6 Možnosti stanovení volných mastných kyselin v potravinových maticích

Jak již bylo zmíněno, v případě stanovení volných mastných kyselin z výrobků je nutné je oddělit od ostatních frakcí lipidů. K tomu lze využít různé metody, nejčastěji jsou aplikovány SPE a TLC, ta obvykle v kombinaci s dalšími technikami [12]. Nevýhodou bývá v těchto případech poměrně velká časová náročnost [9].

Zatímco pro separaci různých složek lipidů z biologických matic je SPE široce využívána už dlouhou dobu, v analýze jedlých tuků a olejů její použití není příliš běžné [10].

V rostlinném materiálu stanovovali volné mastné kyseliny např. Čertík a kol. [22], kteří extrahovali tuk z rostlinné matrice metodou podle Folche, dělení takto získaných lipidů probíhalo metodou TLC s mobilní fází hexan/diethylether/kyselina octová (80:20:1 obj. v/v/v). Získané volné mastné kyseliny byly převedeny na methylestery pomocí methanolu a  $\text{BF}_3$  a následně stanoveny GC-FID.

Podobné stanovení volných mastných kyselin z piva na SPE kolonkách popisují Horák a kol. [21]. S tím rozdílem, že byly použity kolonky ethylvinyl benzen divinyl benzen polymer s extrémně specifickým povrchem, jako eluční činidlo byl použit chloroform. Převedení na methylestery bylo provedeno pomocí derivatizační směsi methanol a  $\text{BF}_3$ -methanol 14 % v/v, následné stanovení metodou GC-FID.

V mléčném tuku je 96 – 98 % z celkového obsahu mastných kyselin navázáno na glycerolu, nejčastěji se jedná o triacylglyceroly. V mléčných výrobcích, tedy i v sýrech, se vyskytují mastné kyseliny i ve formě volné, jedná se sice spíše o malá množství, ale i tato množství ovlivňují aromatické vlastnosti zmíněných produktů [18].

Z různých aplikací na mléčné výrobky lze uvést např. diplomovou práci Knotka [19] a/nebo disertační práci Šípalové [20], kde bylo provedeno stanovení volných mastných kyselin v jogurtu. Na separaci volných mastných kyselin byla použita metoda SPE, kde na eluci volných mastných kyselin z  $\text{NH}_2$  – kolonky byl použit 2 % roztok kyseliny mravenčí v diethyletheru; volné mastné kyseliny byly převedeny na methylestery pomocí methoxidu sodného v methanolu a stanoveny metodou GC-FID.

Tuomala a Kallio [23] stanovovali volné mastné kyseliny v sýru ementálského typu přímým spojením superkritické fluidní extrakce s plynovým chromatografem. Pomocí superkritické fluidní extrakce oxidem uhličitým byla získána ze vzorků těkavá frakce s volnými mastnými kyselinami a dalšími těkavými sloučeninami. Tato frakce pak byla analyzována na plynovém chromatografu s FID a MS detekcí.

Rychlou a jednoduchou metodu stanovení volných mastných kyselin v mléce popisují Amer a kol. [24]. Jedná se o metodu, kdy volné mastné kyseliny byly převedeny ethylesterem kyseliny chloromravenčí na ethylestery a následně stanoveny na plynovém chromatografu s MS detekcí.

Za zmínku stojí stanovení volných mastných kyselin ze vzorků sýru čedar od Wijesundera a kol. [18]. Pro sorpci volných mastných kyselin ze vzorku bylo použito SPME vlákno pokryté polyakrylátem, ty byly následně stanoveny GC-FID.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Laboratorní vybavení a chemikálie

#### 3.1.1 Plyny

- Dusík 5.0 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem a kovovou membránou;
- Vodík 5.5 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem;
- Vzduch 5.0 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem pro kyslík.

#### 3.1.2 Přístroje

- Plynový chromatograf TRACE GC (Thermoquest Italia S. p. A., Itálie) s plamenově ionizačním detektorem, split/splitless injektorem a kapilární kolonou DB-23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
- SPE manifold (SUPELCO VISIPREP™)
- Počítač PC, Intel Pentium Procesor
- Analytické digitální váhy HeLAGO, GR-202-EC, Itálie
- Lednice
- Vodní lázeň se stojany, Julabo TW2
- Digestoř
- Sušárna, memmert
- Vakuová rotační odparka, KIKA WERKE – RV06-ML, s příslušenstvím

#### 3.1.3 Pracovní pomůcky

- Mikropipeta Biohit-Proline (0,5 – 1000 µl)
- Běžné laboratorní sklo
- SPE kolonky Amino Bag, 10x3ml tubes 500 mg, USA
- TLC destičky Silikagel 60, 20 x 20 cm, MERCK, Německo
- Vyvíjecí komory
- Hemiltonova stříkačka
- Parafilm Pechiney PASTIC PACKAGING
- Nůž, nůžky
- Vialky

#### 3.1.4 Chemikálie

- Diethylether stabil. p.a., Lach-Ner, Česká Republika
- Ethanol 96 % p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Hexan p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Hydroxid draselný p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Chloroform p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Isooktan p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Jód
- Kyselina chlorovodíková 35 % p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Kyselina octová 99 % p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Methanol p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Petrolether p. a., Lach-Ner, Česká Republika

- Propanol čistý, LACHEMA, Česká Republika
- Standard methylesterů mastných kyselin, Supelco™ 37 Component FAME Mix

### 3.2 Analyzované vzorky

V experimentální části této práce byly analyzovány 2 typy vzorků – tavený analog sýru a sýr typu Gouda.

Tavený analog sýru byl vyroben na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně. Jako hlavní surovina byla použita eidamská cihla (30 % tuku v sušině) zralosti 2 týdnů, vyrobená v mlékárně v Kroměříži (Kromilk a. s.), dále tavicí soli, voda, máslo a rostlinný olej lisovaný za studena (rybíčovský).

Vzorky byly vyrobeny tak, že rozkrájená eidamská cihla byla vložena do tavicího zařízení, a poté k ní byl přidán tuk, tavicí soli a voda. Následoval nepřímý záhřev pláštěm za stálého míchání na 90 °C, po dosažení této teploty se udržovala ještě 1 minutu. Pak byla vzniklá směs plněna do plastových kelímků a uzavřena. Výrobky chladly samovolně a dále byly skladovány v lednici při teplotě 6 °C až do analýzy.

Sýr typu Gouda byl vyroben na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně. Jako hlavní surovina bylo použito odstředěné mléko (tučnost 0,1 %), které se po odstředění standardizovalo smícháním se smetanou (tučnost 18 %) na konečnou tučnost mléka 3,5 %. Poté se mléko pasterovalo diskontinuálně při zvolených režimech 65 °C po dobu 30 minut a 90 °C po dobu 5 minut.

Takto standardizované a pasterované mléko se zaočkovalo mezofilní koncentrovanou lyofilizovanou kulturou Chr. Hansen. K takto zaočkovanému mléku se přidal nasycený roztok CaCl<sub>2</sub> pro podpoření sýření. Směs mléka se dokonale promíchala a kultura se nechala 20 minut reaktivovat za současného míchání.

Následovalo sýření mléka při teplotě 32 ± 1 °C přidáním syřidla. Po 30 minutách sýření byla sýřenina prokrájena sýrařskou harfou (podélně i příčně). Během 10 minut klidu došlo k uvolnění syrovátky. Oddělení syrovátky od sýřeniny se provádělo pomocí sýrařských plachetek, nejprve předlisováním a poté lisováním podle zvoleného režimu lisu. Po vylisování byly sýry vloženy do solné lázně o koncentraci 20 % (w/v) po dobu 5 hodin.

Vylisované sýry se dále ošetřily antimykotickou suspenzí Delvocid po dobu 4 sekund. Takto ošetřené sýry se nechaly 1 hodinu oschnout a poté se balily do smrštitelné fólie. Vzorky byly uchovávány v lednici při teplotě do 6 °C.

Před analýzou byl vzorek Goudy vždy nastrouhán na jemném struhadle, promíchán a na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství pro jednotlivé zkoušky.

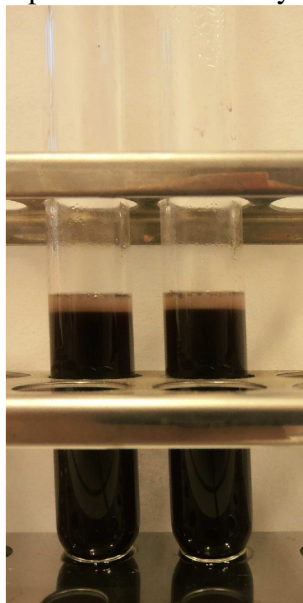
Tavený analog sýru byl pouze promíchán a na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství pro jednotlivé zkoušky.

### 3.3 Použité metody

#### 3.3.1 Extrakce lipidů ze vzorku dle normy ČSN 57 0107

Z jednotlivých vzorků byl odvážen 1 g na analytických vahách. Po kvantitativním převedení vzorku do zkumavky bylo přidáno 5 ml kyseliny chlorovodíkové. Tato směs byla vložena do vodní lázně nastavené na teplotu 80 °C. Vzorky byly v této lázni ponechány do změny barvy roztoku na temně fialovou (viz. Obr. č. 4). Poté byly zkumavky ochlazeny pod proudem studené vody. Po ochlazení bylo ke směsi přidáno 5 ml ethanolu a roztok byl převeden do dělicí nádoby. Do dělicích nádob byly přidány extrakční činidla, v prvním kroku 8,4 ml diethyletheru, po minutě třepání ještě 8,4 ml petroletheru a po minutovém protřepání se nechal roztok odstát 30 minut. Celý proces extrakce se opakoval ještě dvakrát s polovičním

množstvím extrakčních činidel. Horní vrstva (viz. Obr. č. 5.) se po jednotlivých 30 minutových odstáních odebírala pipetou do předem zvážených destilačních baněk. Rozpouštědlo bylo následně odpařeno na vakuové odparce a tuk byl převeden do hexanu a použit na další analýzu.



Obr. č. 4. Změna barvy směsi



Obr. č. 5. Dělicí nádoba po extrakci

### 3.3.2 Frakcionace lipidů metodou SPE

Kolonky byly připevněny do zařízení SPE manifold (viz. Obr. č. 6.), ve kterém se pomocí vodní výjevy vytvořilo vakuum. Poté byly  $\text{NH}_2$  – kolonky aktivovány pomocí hexanu. Průtok hexanu kolonkami se reguloval otočným ventilem. Po promytí kolonek hexanem byl na kolonku dávkován vzorek. Na první eluci byla použita směs chloroform : propanol v poměru 2 : 1, a na druhou eluci 2 % roztok kyseliny octové v diethyletheru. Získané frakce byly jímány do vialek, z nichž bylo následně odpařeno rozpouštědlo na vakuové odparce. Zakoncentrované frakce byly následně převedeny do 1 ml hexanu a zesterifikovány. Po esterifikaci byly jednotlivé frakce analyzovány na plynovém chromatografu s FID detekcí.





Obr. č. 6. Zařízení SPE manifold – umístění extrakčních kolonek

### 3.3.3 Frakcionace lipidů metodou TLC

Hliníková TLC deska pokrytá silikagelem se nejprve nechala aktivovat v sušárně při teplotě 100 °C po dobu 30 minut. Poté se na desce vyznačil start, na který se posléze nanášely vzorky pomocí Hamiltonovy stříkačky. Takto nanesené vzorky se nechaly na desce zaschnout a poté se nechaly vyvíjet v nádobách k tomu určených (vyvíjecích komorách). Jako vyvíjecí směs se používala směs hexan : diethylether : kyselina octová v poměru 80 : 20 : 1. Ve chvíli, kdy dosáhlo eluční činidlo čela (cca 1 cm od horního okraje desky), se deska z vyvíjecí komory vyjmula, nechala se v digestoři uschnout a byla dále vložena do další vyvíjecí komory s parami jódu. Ve druhé vyvíjecí komoře došlo k vizualizaci jednotlivých skvrn (frakcí lipidů) . Výsledek po vizualizaci jódem je patrný na Obr. č. 7. Poté byly vyškrabány frakce odpovídající volným mastným kyselinám (FFA) a triacylglycerolům (TAG). Takto vyškrabaná vrstva byla nasypána do vialky, kde byla následně esterifikována a analyzována na plynovém chromatografu s FID detekcí.

### 3.3.4 Esterifikace mastných kyselin

Na základě diplomové práce Pruknerové [24] byla pro esterifikaci použita metoda podle ČSN EN ISO 5509.

Z vyextrahovaného tuku (kap. 3.3.1) převedeného kvantitativně pomocí 1 ml hexanu do plastových Eppendorfových zkušavek bylo automatickou pipetou odebráno vypočtené množství směsi (viz rovnice 1) do vialek s pryžovou zátkou. Do vialky bylo dále přidáno 5 ml isooktanu a 0,5 ml methanického roztoku KOH o koncentraci 2 mol·l<sup>-1</sup> (příprava viz rovnice 2). Vialky pak byly 8 minut protřepávány a následně se nechaly 6 minut stát.

Po uplynuté době 6 minut byl z horní vrstvy odebrán 1 ml k analýze na plynovém chromatografu s FID detekcí.

**Výpočet 1:** množství extraktu, potřebné pro získání cílové koncentrace  $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (1)$$

Kde:

$c_1$  ..... koncentrace vyextrahovaného tuku [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]

$V_1$  ..... potřebné množství extraktu k odebrání [ml]

$c_2$  ..... cílová koncentrace [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]

$V_2$  ..... objem isooktanu [ml]

**Výpočet 2:** množství KOH, potřebné k přípravě methanolického roztoku, cílová koncentrace  $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

$$m = c \cdot V \cdot M_r \quad (2)$$

Kde:

$m$  ..... hmotnost KOH [g]

$c$  ..... cílová koncentrace KOH [ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]

$V$  ..... objem methanolu [l]

$M_r$  ..... molární hmotnost KOH [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]

Připravený roztok methanolického KOH byl uchován v lednici.

### 3.4 Podmínky metody pro stanovení methylesterů mastných kyselin

- **Plynový chromatogram** TRACE GC (ThermoQuest S.p.A., Itálie)
- **Autosampler** AI/AS 3000
- **Kapilární kolona:** DB-23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$
- **Oven – teplotní program**
  - 60 °C 10 min
  - Vzestupný gradient 12 °C·min<sup>-1</sup> do 200 °C s výdrží 10 min
  - Vzestupný gradient 5 °C·min<sup>-1</sup> do 220 °C s výdrží 15 min
  - Vzestupný gradient 10 °C·min<sup>-1</sup> do 240 °C s výdrží 10 min
  - Celková doba analýzy: 62,67 min
- **Inlet – PTV**
  - Teplota injektoru: 250 °C
  - Splitless time: 5 min
  - Dávkování: autosampler bez děliče toku (splitless) (1  $\mu\text{l}$ )
- **Carrier**
  - Průtok dusíku: 0,5 ml·min<sup>-1</sup>
- **Detektor FID (Plamenově ionizační)**
  - Teplota detektoru: 250 °C
  - Průtok vzduchu: 350 ml·min<sup>-1</sup>
  - Průtok vodíku: 35 ml·min<sup>-1</sup>
  - Make-up dusíku: 30 ml·min<sup>-1</sup>

### 3.5 Identifikace a kvantifikace mastných kyselin ve vzorcích

Mastné kyseliny byly stanoveny po převedení na methylestery (MeMK). Identifikace jednotlivých methylesterů mastných kyselin ve vzorcích byla provedena na základě srovnání retenčních časů identických standardů.

Kvantifikace mastných kyselin byla provedena výpočtem jejich koncentrace ( $c$ ) z ploch píků methylesterů mastných kyselin vzorků ( $P$ ) a známé koncentrace ( $c_s$ ) a ploch píků standardů ( $P_s$ ) (viz tab. č. 3.). Výsledná koncentrace pak byla přepočtena na množství methylesterů ( $m$ ) v 5 ml (původní objem ve vialce).

**Výpočet:**

$$c = \frac{c_s \cdot P}{P_s} \text{ [mg} \cdot \text{ml}^{-1}] \quad (3)$$

$$m = c \cdot V \text{ [mg]} \quad (4)$$

Vypočtené množství methylesterů mastných kyselin bylo vyděleno množstvím vyextrahovaného tuku a zpětně přepočteno na obsah mastných kyselin (viz. rovnice 5)

**Přepočet methylesterů mastných kyselin na mastné kyseliny:**

$$c_{MK} = \frac{c_{MeMK} \cdot Mr_{MK}}{Mr_{MeMK}} \quad (5)$$

Kde:

$c_{MK}$  ..... koncentrace MK ve vzorku [ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]

$c_{MeMK}$  ..... koncentrace MeMK ve vzorku [ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]

$Mr_{MK}$  ..... molární hmotnost MK [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]

$Mr_{MeMK}$  ..... molární hmotnost MeMK [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavním cílem této práce bylo zvolení vhodné metody stanovení volných mastných kyselin v různých typech přírodních a tavených sýrů. Jako matrice pro veškeré pokusy byly použity modelové vzorky sýrů typu Gouda a tavených sýrových analogů (s rybízovým olejem).

Pro extrakci lipidů ze vzorků byla použita směs diethyletheru a petroletheru dle ČSN 57 0107. Pro frakcionaci extraktu lipidů ze vzorků byly vyzkoušeny a porovnány dvě metody: TLC a SPE. Postup SPE byl převzat z práce Šípálové [19] a optimalizován na sýrovou matrici; postup TLC byl převzat z práce Čertíka a kol. [21]. Pro stanovení MK ve všech získaných frakcích byla použita plynová chromatografie s FID detekcí po jejich převedení na methylestery methanolickým KOH dle ČSN EN ISO 5509. Přehledné schéma testovaných postupů je uvedeno na Obr. č. 8.

### 4.1 Standardy mastných kyselin

V následující tabulce č. 3. jsou uvedeny standardy s jejich koncentracemi, plochami píků a molárními hmotnostmi potřebné k identifikaci a kvantifikaci mastných kyselin obsažených v jednotlivých vzorcích.

Tab. č. 3a. Přehled standardů použitých k identifikaci a kvantifikaci

Číslo píku	Mastná kyselina	Konc. ( $c_s$ ) [mg·ml <sup>-1</sup> ]	Plocha píků ( $P_s$ ) [mV·s]	$Mr_{MeMK}$ [g·mol <sup>-1</sup> ]	$Mr_{MK}$ [g·mol <sup>-1</sup> ]
1	másečná	0,04	1468312	102,133	88,106
2	kapronová	0,04	2400501	130,187	116,16
3	kaprylová	0,04	3557380	158,241	144,214
4	kaprinová	0,04	3061648	186,295	172,268
5	undekanová (undecylová)	0,02	1350435	200,322	186,295
6	laurová	0,04	2315169	214,349	200,322
7	tridekanová	0,02	999383	228,376	214,349
8	myristová	0,04	1666563	242,403	228,376
9	myristolejová	0,02	830174	240,387	226,36
10	pentadekanová	0,02	722222	256,43	242,403
11	cis-10-pentadecenová	0,02	713495	254,414	240,387
12	palmitová	0,06	2158637	270,457	256,43
13	palmitolejová	0,02	668278	268,441	254,414
14	heptadekanová	0,02	573988	284,484	270,457
15	cis-10-heptadecenová	0,02	614572	282,468	268,441
16	stearová	0,04	1258918	298,511	284,484
17	elaidová	0,02	648736	296,495	282,468
18	olejová	0,04	1360754	296,495	282,468
19	linolelaidová	0,02	520610	294,479	280,452
20	linolová	0,02	607511	294,479	280,452
21	gama-linolenová	0,02	499286	292,463	278,436
22	linolenová	0,02	489830	292,463	278,436
23	arachová	0,04	1067799	326,565	312,538
24	cis-11-eicosenová	0,02	518246	322,533	308,506
25	cis-11,14-eicosadienová	0,02	480540	322,533	308,506

Tab. č. 3a. Přehled standardů použitých k identifikaci a kvantifikaci

Číslo píkú	Mastná kyselin	Konc. ( $c_s$ ) [mg·ml <sup>-1</sup> ]	Plocha píkú ( $P_s$ ) [mV·s]	$Mr_{MeMK}$ [g·mol <sup>-1</sup> ]	$Mr_{MK}$ [g·mol <sup>-1</sup> ]
26	heneicosanová	0,02	498451	340,592	326,565
27	cis-8,11,14-eicosatrienová	0,02	438082	320,517	306,49
28	arachidonová	0,02	420071	318,501	304,474
29	cis-11,14,17-eicosatrienová	0,02	466524	320,517	306,49
30	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenová	0,02	956606	316,485	302,458
31	behenová	0,04	367333	354,619	340,592
32	eruková	0,02	474533	352,603	338,576
33	cis-13,16-docosadienová	0,02	450170	350,587	336,56
34	tricosanová	0,02	492037	368,646	354,619
35	lignocerová	0,04	991745	382,673	368,646
36	cis-4,7,10,13,16,19-docosaheptaenová	0,02	452122	342,523	328,496
37	nervonová	0,02	277490	380,657	366,63

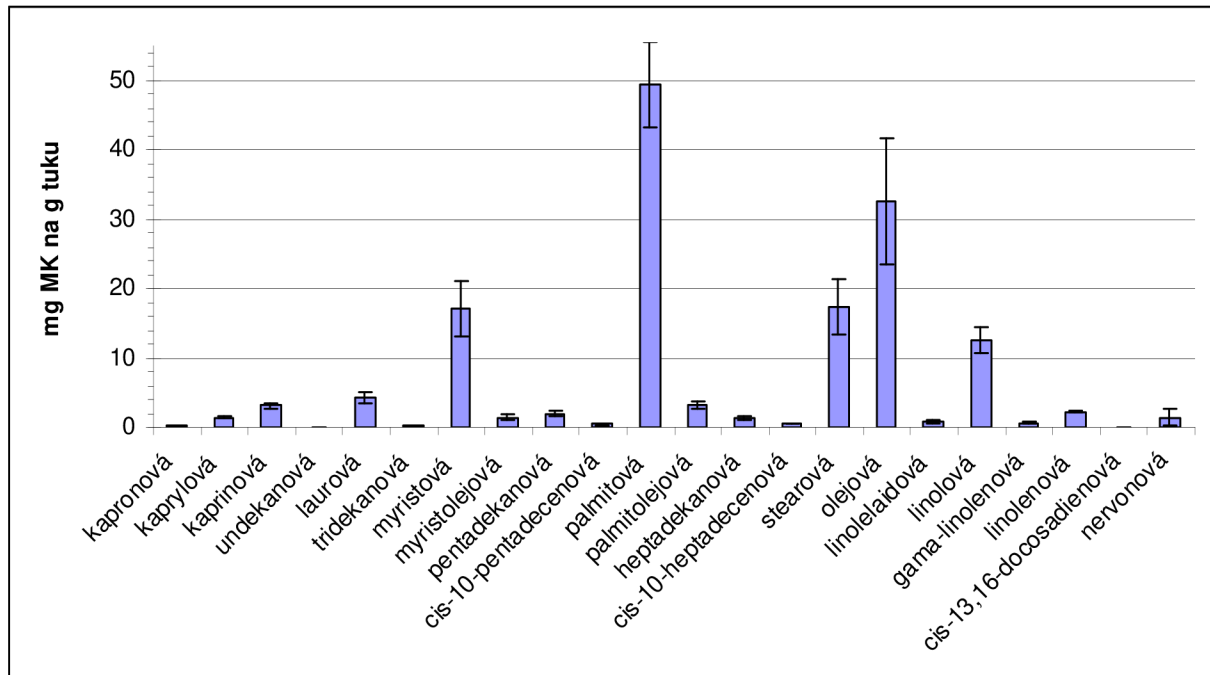
#### 4.2 Stanovení celkového obsahu mastných kyselin ve vzorcích

Během níže zmíněných experimentů byl pro úplnost měřen i celkový obsah MK v analyzovaných vzorcích. K tomuto účelu byla aplikována klasická metoda stanovení (tedy bez frakcionace), přesný postup je převzat z diplomové práce Pruknerové [24]. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulkách č. 4. a 5.

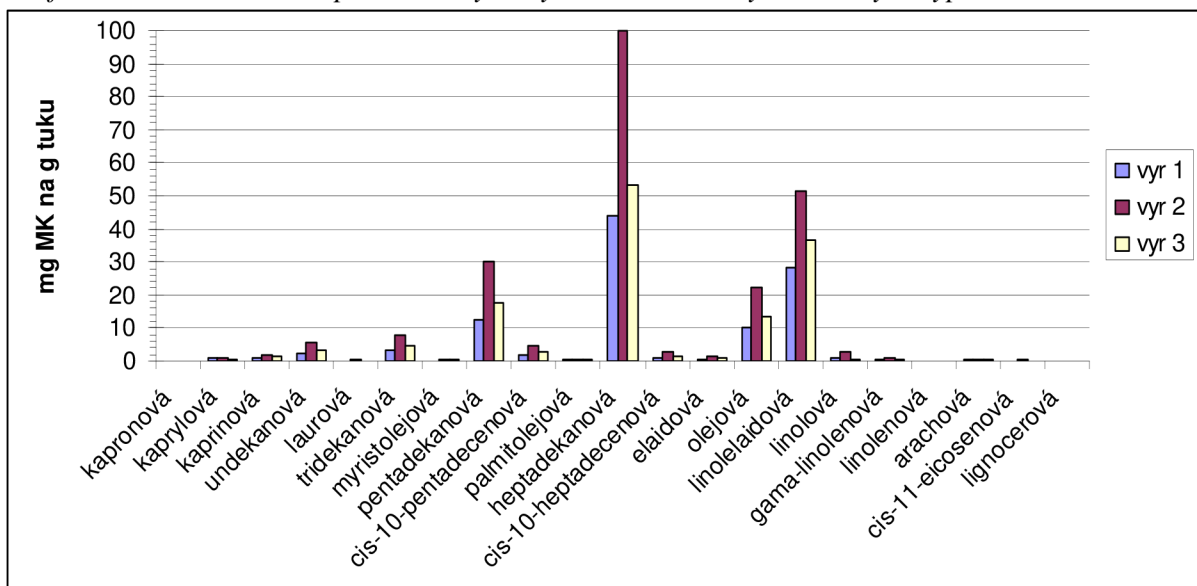
Z výsledků je patrné, že ve vzorcích analogů byly nejvíce zastoupené tyto mastné kyseliny: myristová, palmitová, stearová, olejová, linolová (viz graf č. 1.)

V grafu č. 2 jsou pro zajímavost uvedeny výsledky stanovení celkového obsahu MK ve třech různých výrobcích sýrů typu Gouda (vyr 1, vyr 2, vyr 3). Výroby se lišily způsobem tepelného ošetření mléka použitého pro jejich výrobu (mezi vzorky jsou patrné rozdíly, ale toto hodnocení bylo mimo záměr této práce). V sýrech byly nejvíce zastoupené tyto mastné kyseliny: pentadekanová, heptadekanová, olejová, linolelaidová.

Graf č. 1. Zastoupení jednotlivých MK v sýrovém analogu



Graf č. 2. Srovnání zastoupení mastných kyselin ve třech výrobcích sýru typu Gouda

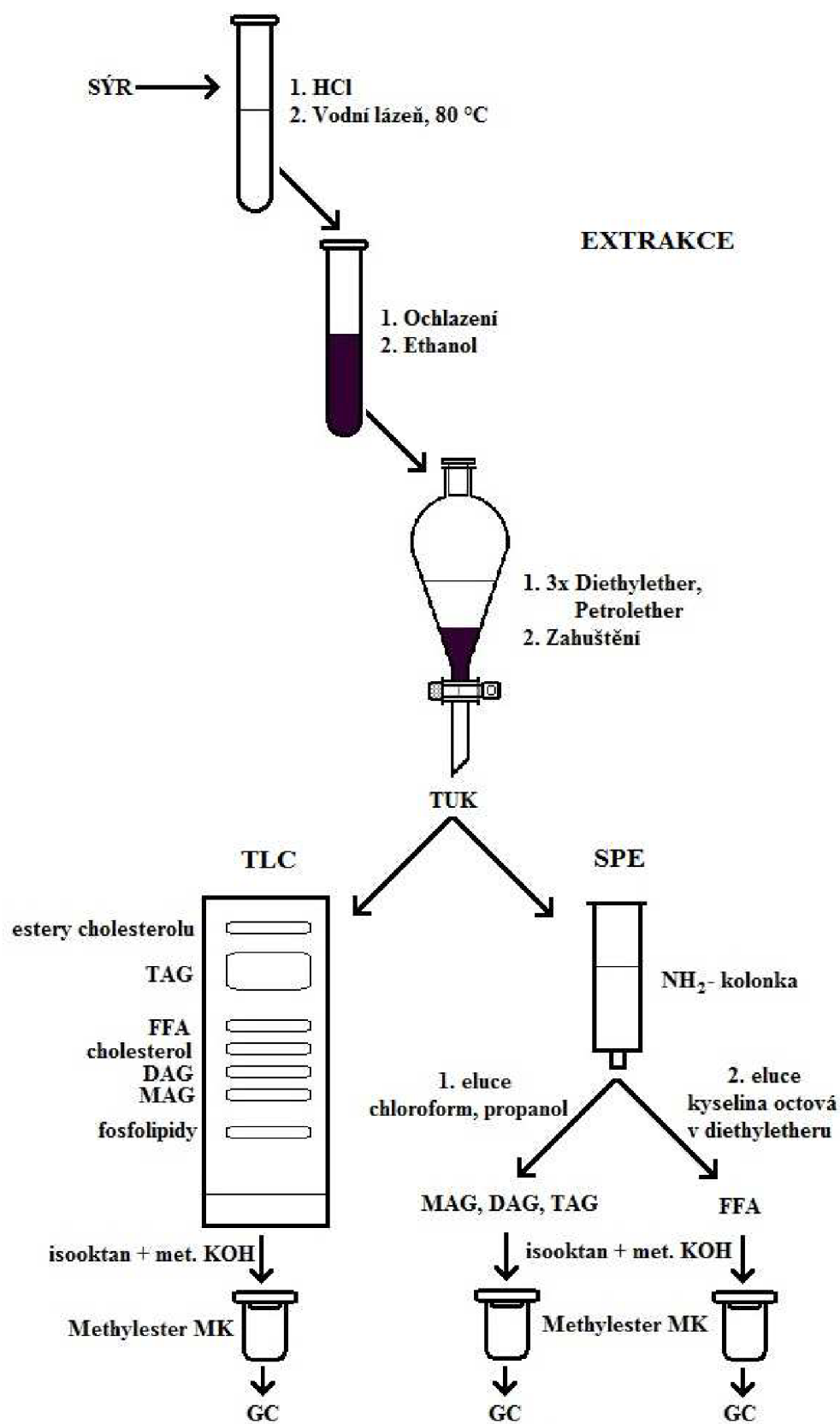


Tab. č. 4. Celkový obsah MK ve vzorcích analogu taveného sýra s rybízovým olejem (RO) [mg·g<sup>-1</sup> tuku]

Název mastné kyseliny	RO1	RO2	RO7	RO8	průměr	SD
kapronová	0,21	0,35	0,17	0,12	0,21	0,09
kaprylová	1,31	1,71	1,37	1,30	1,42	0,19
kaprinová	2,70	3,28	3,69	2,99	3,17	0,42
undekanová	0,07	nd	0,09	0,07	0,08	0,01
laurová	3,78	4,13	5,46	3,73	4,28	0,81
tridekanová	0,16	0,16	0,23	0,15	0,18	0,04
myristová	15,20	16,02	22,86	14,33	17,10	3,89
myristolejová	1,28	1,30	1,92	1,19	1,42	0,34
pentadekanová	1,74	1,89	2,64	1,71	1,99	0,44
cis-10-pentadecenová	0,41	0,45	0,61	0,42	0,47	0,09
palmitová	44,99	49,46	57,89	45,03	49,34	6,07
palmitolejová	3,72	2,92	3,75	2,58	3,24	0,58
heptadekanová	1,13	1,25	1,66	1,15	1,30	0,25
cis-10-heptadecenová	0,47	0,49	0,67	0,47	0,53	0,09
stearová	15,16	nd	22,07	14,77	17,33	4,11
olejová	28,95	40,78	21,25	39,25	32,56	9,19
linolelaidová	0,74	0,74	1,28	0,56	0,83	0,31
linolová	12,78	11,72	15,01	10,64	12,54	1,86
gama-linolenová	0,57	0,55	0,77	0,53	0,61	0,11
linolenová	2,18	2,18	2,35	1,98	2,17	0,15
cis-13,16-docosadienová	nd	0,10	0,10	nd	0,10	0,00
nervonová	0,57	2,60	0,22	2,28	1,42	1,19

Tab. č. 5. Celkový obsah mastných kyselin ve vzorcích sýru typu Gouda [mg·g<sup>-1</sup> tuku]

Název mastné kyseliny	VYR_1	VYR_2	VYR_3
kapronová	0,05 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,06 ± 0,00
kaprylová	1,02 ± 0,71	0,73 ± 0,20	0,56 ± 0,11
kaprinová	0,95 ± 0,22	1,89 ± 0,21	1,20 ± 0,02
undekanová	2,42 ± 0,57	5,33 ± 0,24	3,17 ± 0,09
laurová	0,10 ± 0,03	0,24 ± 0,01	0,14 ± 0,01
tridekanová	3,43 ± 0,82	7,83 ± 0,53	4,59 ± 0,19
myristolejová	0,18 ± 0,05	0,43 ± 0,03	0,25 ± 0,01
pentadekanová	12,70 ± 3,44	30,04 ± 2,13	17,44 ± 0,86
cis-10-pentadecenová	1,98 ± 0,54	4,67 ± 0,34	2,73 ± 0,11
palmitolejová	0,29 ± 0,08	0,67 ± 0,04	0,40 ± 0,01
heptadekanová	43,80 ± 12,02	99,83 ± 6,97	53,08 ± 11,45
cis-10-heptadecenová	1,08 ± 0,30	2,54 ± 0,22	1,52 ± 0,05
elaidová	0,51 ± 0,13	1,21 ± 0,09	0,71 ± 0,03
olejová	10,09 ± 2,06	22,37 ± 2,27	13,50 ± 0,89
linolelaidová	28,20 ± 8,08	51,30 ± 5,01	36,45 ± 4,79
linolová	0,80 ± 0,29	2,78 ± 0,09	0,69 ± 0,01
gama-linolenová	0,45 ± 0,11	0,98 ± 0,20	0,62 ± 0,02
linolenová	0,03 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,05 ± 0,00
arachová	0,26 ± 0,16	0,57 ± 0,09	0,28 ± 0,02
cis-11-eicosenová	0,13 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,17 ± 0,00
lignocerová	nd	0,13 ± 0,02	0,06 ± 0,00



Obr. č. 8. Přehledné schéma testovaných postupů



### 4.3 Frakcionace lipidů metodou tenkovrstvé chromatografie

Metoda tenkovrstvé chromatografie obsahuje několik časově náročných kroků. Na úplném začátku je zdržení ve formě aktivace TLC destičky, která probíhá po dobu 30 min v sušárně při 100 °C. Samotné dávkování vzorků není náročné na čas, ale spíše na zkušenost a zručnost osoby, která vzorek nanáší. TLC destička velice rychle vsakuje vzorek, a proto je nutné pracovat rychle a přesně, což samozřejmě vyžaduje delší praxi. Ideální varianta je možnost použít automatický dávkovač vzorku, který zatím ale není na ÚCHPBT vzhledem k poměrně velké finanční náročnosti k dispozici.

Vyvíjení ve vyvíjecí komoře trvá cca jednu a půl hodiny než dosáhne mobilní fáze čela (1 cm od horního okraje TLC desky). Po vyjmutí desky z první vyvíjecí komory musí deska důkladně oschnout v digestoři (přibližně 15 minut) a pak následuje vizualizace v parách jódu (dalších cca 15 minut).

Vzniklé skvrny je vhodné okamžitě označit tužkou (viz obr. č. 7), aby byla eventuálně možná jejich detekce i po vyprchání par jódu. Vzniklé skvrny je totiž třeba z TLC desky vyškrabat a převést pokud možno kvantitativně do vialky na pozdější esterifikaci. I tento krok je značně závislý na zručnosti a zkušenosti osoby, která práci provádí. Nejlepší způsob je pomocí malé špachtličky a po malých kouscích, které vždy po chvilce odsypáváme do vialky.

Vyškrabané frakce je nutné okamžitě dále zpracovávat, jinak silikagel ve vialce naváže vlhkost a při esterifikaci až druhý den vzniknou pouze shluky, které nejdou v esterifikačním činidle rozmíchat.



Obr. č. 7. TLC destička po vizualizaci jódem

#### 4.4 Frakcionace lipidů metodou extrakce na pevné fázi

Z hlediska časové náročnosti je SPE metoda poněkud rychlejší, i když průtok kolonky byl nastaven tak, aby docházelo pouze k pomalému odkapávání.

Po aktivaci kolonky hexanem byl mikropipetou nanesen vzorek, který byl následně eluován dvěma typy směsných rozpouštědel. První eluce směsí chloroform : propanol v poměru 2 : 1, druhá eluce 2 % roztokem kyseliny octové v diethyletheru. Podle předpokladu byla z první eluce získána směs mono-, di- a triacylglycerolů, z druhé eluce frakce obsahující pouze volné mastné kyseliny. Tento proces trvá celý s přípravou elučních činidel cca hodinu.

Dalším krokem bylo odpaření elučních činidel, což se ukázalo být v případě první eluce poněkud nesnadné, protože eluční činidlo obsahuje chloroform a propanol, které mají tendenci vzlínat; i přesto trvalo odpaření cca 15 minut. U frakce z druhé eluce, kde byla elučním činidlem 2 % kyselina octová v diethyletheru, trvalo odpaření velmi krátkou dobu. Obě získané frakce byly po odpaření převedeny do 1 ml hexanu a použity na esterifikaci. Takto připravené frakce lze uchovat v ledničce do druhého dne.

#### 4.5 Srovnání metod TLC a SPE

Jak je patrné z předchozích kapitol SPE metoda je rychlejší a co se týká provedení i jednodušší na obsluhu. Velkou výhodou je i možnost uchování frakcí do druhého dne v lednici beze změny, což v případě TLC není možné. Metoda TLC je navíc poměrně náročná na zručnost obsluhy a také rychlost a přesnost provedení.

Pro zajímavost jsou zde v Tabulce č. 6 uvedeny výsledky stanovení MK ve frakcích získaných metodou TLC. Pro tento účel byl použit sýrový analog s rybízovým olejem, totožný jako v dalších experimentech.

Označení vzorků:

TLC-TAG - frakce obsahující směs mono-, di- a triacylglycerolů

TLC-FFA - frakce obsahující volné mastné kyseliny

U frakcí označených číslem 1 a 2 bylo dávkované množství 15  $\mu\text{l}$  neředěného tuku na délku 3 cm. V případě frakcí s označením číslem 5 byl tuk naředěn na koncentraci 100  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a dávkované množství bylo 20  $\mu\text{l}$  na délku 5 cm. Z výsledků je patrné, že zisk byl ve srovnání s SPE (viz následující kapitola 4.6) nižší co do počtu i obsahu identifikovaných MK.

Na základě těchto výsledků byla pro další práci zvolena frakcionace extraktu lipidů pomocí metody SPE, která byla následně optimalizována.

Tab. č. 6. Obsah MK v jednotlivých frakcích získané metodou TLC [ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  tuku]

Název mastné kyseliny	TLC- FFA1	TLC- FFA2	TLC- FFA5	TLC- TAG1	TLC- TAG2	TLC- TAG5
kapronová	nd	nd	nd	0,07	nd	0,02
kaprylová	nd	nd	nd	0,03	0,03	0,01
kaprinová	nd	nd	nd	0,09	0,07	0,03
undekanová	0,06	0,05	0,03	0,05	0,05	0,05
laurová	0,14	0,09	0,05	0,18	0,16	0,11
myristová	1,32	0,62	0,28	0,80	0,75	0,51
myristolejová	nd	0,04	nd	0,05	nd	0,03
pentadekanová	0,05	0,07	nd	0,09	0,08	0,05
palmitová	5,24	3,68	0,77	3,92	3,69	2,97
palmitolejová	0,46	0,49	0,09	0,28	0,93	0,25
heptadekanová	nd	0,06	nd	nd	nd	0,05
stearová	2,10	1,16	0,23	1,52	1,21	1,23
elaidová	0,23	nd	nd	0,19	nd	0,17
olejová	11,53	8,88	1,07	16,38	8,50	16,04
linolová	9,97	5,74	1,19	7,82	7,43	7,84
linolenová	0,24	0,27	nd	1,09	0,37	0,57

## 4.6 Optimalizace metody SPE

Počáteční parametry byly nastaveny na základě práce Ruiz-Gutiérrez [10], kolonky byly zvoleny dle práce Knotka [19] a Šípalové [20], kteří je použili pro stanovení volných mastných kyselin v jogurtové matici.

Objem všech použitých činidel byl zvolen 10 ml také na základě citovaných prací.

V rámci optimalizace bylo především potřeba zjistit optimální množství vzorku dávkovaného na SPE kolonku, tak aby byla plně využita, ale na druhé straně nebyla překročena, její sorpční kapacita. Dále bylo provedeno ověření předpokládaného složení získaných frakcí.

Pro lepší přehlednost a srozumitelnost jsou zde uvedeny níže použité zkratky použité pro označení vzorků

RO - sýrové analogy s rybízovým olejem

SPE-TAG - první frakce z SPE obsahující směs mono-, di- a triacylglycerolů

SPE-FFA - druhá frakce z SPE obsahující volné mastné kyseliny

SPE-RO - zbytek po nadávkování vzorku na SPE

### 4.6.1 Experiment č. 1

Pro všechny experimenty v rámci optimalizace byly použity vzorky tavených sýrových analogů s přídavkem rybízového oleje.

V experimentu č. 1 byl použit extrakt lipidů bez konečného kroku odpaření rozpouštědla, experiment byl proveden dvakrát, extrakty byly označeny RO1 a RO2.

Po aktivaci kolonky 10 ml hexanu byl nadávkován 1 ml extraktu (směs diethyletheru, petroletheru a tuku). Byl jímán i zbytek (přesněji řečeno přebytek – jímáný jako první) po nadávkování vzorku označený jako SPE-RO.

Jako první eluční činidlo byla použita směs chloroform : propanol v poměru 2 : 1 o objemu 10 ml, takto byla získána první frakce, která by měla obsahovat směs mono-, di-

a triacylglycerolů (označena jako SPE-TAG a číslem podle toho z jaké navážky analogu byla provedena extrakce tuku).

Jako druhé eluční činidlo byl použit 2 % roztok kyseliny octové v diethyletheru, takto získaná frakce by měla obsahovat volné mastné kyseliny (označena SPE-FFA a také číslem podle toho z jaké navážky analogu byla provedena extrakce tuku).

Všechny tři získané frakce byly odpařeny na rotační vakuové odparce, zbytek převeden do 1 ml hexanu, zesterifikován (dle kap. 3.3.4) a analyzován GC-FID. Výsledky po identifikaci a kvantifikaci jsou v tabulce č. 7. Vzhledem k tomu, že na chromatogramu frakce SPE-RO1 byly přítomné píky, lze soudit, že dávkovaný vzorek přesahuje kapacitu kolonky, není zcela zachycen a je třeba snížit dávkovaný objem vzorku.

Tab. č. 7. Obsah MK v jednotlivých frakcích získané metodou SPE vzorku RO1 a RO2 [ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  tuku]

Název mastné kyseliny	SPE- FFA1	SPE- FFA2	SPE- TAG1	SPE- TAG2	SPE- RO1
kapronová	nd	nd	0,02	0,57	nd
kaprylová	nd	0,40	0,35	0,26	nd
kaprinová	nd	0,02	0,89	0,69	nd
undekanová	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06
laurová	0,11	0,11	1,36	1,04	0,11
tridekanová	nd	nd	0,08	0,07	nd
myristová	0,65	0,88	6,04	4,81	0,69
myristolejová	0,04	0,06	0,50	0,38	0,04
pentadekanová	0,08	0,12	0,75	0,62	0,07
cis-10-pentadecenová	nd	nd	0,20	0,16	nd
palmitová	4,83	4,92	20,00	17,57	4,32
palmitolejová	0,41	0,38	1,17	1,94	1,19
heptadekanová	0,10	0,12	0,50	0,40	0,06
cis-10-heptadecenová	nd	nd	0,21	0,17	nd
stearová	2,99	2,50	7,80	6,78	1,91
elaidová	nd	nd	1,02	nd	0,14
olejová	26,37	16,09	15,76	27,93	11,97
linolelaidová	nd	nd	0,21	0,22	nd
linolová	13,24	5,52	5,44	8,58	11,06
gama-linolenová	nd	nd	0,23	nd	0,06
linolenová	1,02	0,46	0,75	1,18	0,59
arachidonová	nd	nd	0,75	nd	nd
nervonová	nd	1,16	nd	1,28	nd

#### 4.6.2 Experiment č.2

V experimentu č. 2 byl vyextrahovaný tuk po odstranění rozpouštědla na vakuové odparce naředěn na koncentraci  $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; experiment byl proveden dvakrát, extrakty byly označeny jako RO3 a RO4. Vzorek RO3 byl rozpuštěn v hexanu, vzorek RO4 v diethyletheru. Po aktivaci kolonky a nadávkování 1 ml extraktu byl opět jímán i zbytek po nadávkování vzorku (SPE-RO), první frakce (SPE-TAG) a druhá frakce (SPE-FFA). Všechny tři jímání frakce byly následně odpařeny na rotační vakuové odparce, převedeny do 1 ml hexanu,

zesterifikovány a analyzovány GC-FID. Výsledky po identifikaci a kvantifikaci jsou v tabulce č. 8.

Z chromatogramů SPE-RO3 a SPE-RO4 bylo opět zjištěno, že dávkovaný vzorek není zcela zachycen na kolonce a tudíž byl v dalším kroku opět snížen objem vzorku dávkovaného na kolonku.

Dále bylo v tomto pokusu zjištěno, že lepší výsledky (vyšší obsah získaných MK) přináší dávkování vzorku tuku rozpuštěného v hexanu.

Tab. č. 8. Obsah MK v jednotlivých frakcích získané metodou SPE vzorku RO3 a RO4 [ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  tuku]

Název mastné kyseliny	SPE- FFA3	SPE- FFA4	SPE- TAG3	SPE- TAG4	SPE- RO3	SPE- RO4
kapronová	nd	nd	4,78	3,23	nd	nd
kaprylová	nd	nd	2,42	1,65	nd	nd
kaprinová	0,02	5,60	3,87	nd	nd	0,02
undekanová	0,05	0,09	0,14	0,10	0,06	0,07
laurová	0,11	0,15	7,51	5,42	0,12	0,11
tridekanová	nd	nd	0,31	0,23	nd	nd
myristová	0,64	1,64	31,03	23,17	0,70	0,55
myristolejová	0,04	0,09	2,64	1,89	0,05	0,04
pentadekanová	0,08	0,30	3,70	2,76	0,07	0,05
cis-10-pentadecenová	nd	0,09	0,93	0,67	nd	nd
palmitová	10,85	3,62	72,56	33,34	2,83	2,44
palmitolejová	0,47	0,56	6,27	4,20	0,24	0,26
heptadekanová	nd	0,33	2,47	1,78	0,04	0,06
cis-10-heptadecenová	nd	nd	1,04	0,75	nd	nd
stearová	1,24	4,77	23,07	0,17	1,31	0,93
elaidová	0,00	0,90	30,14	0,00	0,06	0,05
olejová	9,43	8,34	35,26	21,45	9,30	6,96
linolelaidová	nd	0,16	1,92	1,11	nd	nd
linolová	5,34	1,80	20,63	21,54	5,51	6,63
gama-linolenová	nd	nd	1,24	0,84	0,30	0,31
linolenová	0,21	0,31	10,53	3,80	8,42	5,19
arachová	nd	0,19	nd	nd	nd	nd
cis-11-eicosenová	nd	nd	0,68	0,06	nd	nd
arachidonová	0,59	nd	nd	nd	nd	nd
cis-13,16-docosadienová	nd	nd	0,12	0,09	nd	nd
nervonová	0,11	0,45	0,50	0,25	nd	nd

### 4.6.3 Experiment č.3

Obdobně jako v experimentu č. 2 byl vyextrahovaný tuk po odstranění rozpouštědla na vakuové odparce naředěn na koncentraci tentokrát  $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (označení 6-1) a  $25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (označení 6-2); extrakty byly označeny RO6.

Po aktivaci kolonky a nadávkování 1 ml extraktu byl opět jímán i zbytek po nadávkování vzorku (SPE-RO), první frakce (SPE-TAG) a druhá frakce (SPE-FFA). Všechny tři jímání frakce byly následně odpařeny na rotační vakuové odparce, převedeny do 1 ml hexanu,

zesterifikovány a analyzovány GC-FID. Výsledky po identifikaci a kvantifikaci jsou v tabulce č. 9.

Z chromatogramů SPE-RO6-1 a SPE-RO6-2 bylo opět zjištěno, že dávkovaný vzorek není zcela zachycen na kolonce a bude třeba výrazně snížit objem vzorku dávkovaného na kolonku.

Dále bylo v tomto pokusu zjištěno, že lepší výsledky (vyšší obsah získaných MK) přináší dávkování vzorku tuku naředěného na koncentraci  $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Tab. č. 9. Obsah MK v jednotlivých frakcích získané metodou SPE vzorku RO6 [ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  tuku]

Název mastné kyseliny	SPE- FFA6-1	SPE- FFA6-2	SPE- TAG6-1	SPE- TAG6-2	SPE- RO6-1	SPE- RO6-2
kapronová	nd	nd	nd	1,29	nd	nd
kaprylová	nd	nd	1,19	0,65	nd	nd
kaprinová	nd	0,03	2,57	1,45	nd	nd
undekanová	0,04	0,06	0,06	0,04	0,05	0,05
laurová	0,08	0,15	3,36	1,80	0,10	0,06
tridekanová	nd	nd	0,15	0,08	nd	nd
myristová	0,36	0,86	13,82	6,96	0,59	0,67
myristolejová	nd	0,06	1,09	0,56	0,07	0,04
pentadekanová	nd	0,09	1,68	0,84	0,10	0,12
cis-10-pentadecenová	nd	nd	0,41	0,21	nd	nd
palmitová	1,57	3,46	44,62	22,18	3,74	4,49
palmitolejová	0,15	0,28	2,95	1,33	0,28	0,23
heptadekanová	0,05	0,06	1,05	0,52	0,11	0,12
cis-10-heptadecenová	nd	nd	0,44	0,04	nd	nd
stearová	0,78	1,78	14,63	7,57	1,70	1,92
elaidová	nd	0,06	nd	nd	nd	nd
olejová	3,94	10,15	39,95	20,43	5,51	3,87
linolelaidová	nd	nd	1,10	0,21	nd	0,09
linolová	3,64	5,89	9,95	6,35	2,91	0,72
gama-linolenová	0,17	0,54	0,51	0,10	nd	nd
linolenová	2,78	8,89	1,73	0,75	1,69	0,12
arachová	nd	nd	nd	nd	nd	0,07
cis-11-eicosenová	nd	1,89	nd	nd	nd	nd
arachidonová	nd	0,63	nd	0,35	nd	nd

#### 4.6.4 Experiment č.4

Vyextrahovaný tuk po odstranění rozpouštědla na vakuové odparce byl naředěn na koncentraci  $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (vybráno v předchozím experimentu); extrakty byly označeny RO7.

Po aktivaci kolonky bylo dávkované množství extraktu sníženo na 500  $\mu\text{l}$  (označení SPE-RO7-500) a na 100  $\mu\text{l}$  (označení SPE-RO7-100). V tomto případě byl jímán vždy pouze zbytek po nadávkování vzorku, který byl následně odpařen, převeden do 1 ml hexanu, zesterifikován a analyzován GC-FID.

Z chromatogramů SPE-RO7-500 a SPE-RO7-100 bylo opět zjištěno, že dávkovaný vzorek není zcela zachycen na kolonce a tudíž byl v dalším kroku opět snížen objem vzorku dávkovaného na kolonku.

#### 4.6.5 Experiment č.5

První fáze totožná jako v experimentu č. 4, extrakty byly označeny RO8 a RO9.

Po aktivaci kolonky bylo dávkované množství sníženo na 5  $\mu\text{l}$  (označení 8-5 nebo 9-5) a 7  $\mu\text{l}$  (označení 8-7 a 9-7).

Výsledky po identifikaci a kvantifikaci jsou v tabulce č. 10. Dávkovaný vzorek byl již zcela zachycen na kolonce a tudíž nemusela být provedena další úprava dávkování. Dále bylo v tomto pokusu zjištěno, že lepší výsledky (vyšší zisk MK) přináší dávkování vzorku tuku v množství 7  $\mu\text{l}$ .

Proto jako optimální řešení bylo určeno ředění extraktů tuku na koncentraci 50  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a dávkované množství 7  $\mu\text{l}$ . V tomto zvoleném případě byla u frakce obsahující směs monoacyl, diacyl a triacylglycerolů provedena orientační tenkovrstvá chromatografie, která potvrdila zastoupení těchto tří složek ve zmíněné frakci. Výsledek je uveden na obr. č. 8.



Obr. č. 8. Potvrzení přítomnosti MAG, DAG, TAG v první frakci SPE

Tab. č. 10. Obsah MK v jednotlivých frakcích získané metodou SPE vzorku RO8 a RO9 [ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  tuku]

Název mastné kyseliny	SPE-TAG8_5	SPE-TAG8_7	SPE-TAG9_5	SPE-TAG9_7	SPE-FFA8_5	SPE-FFA8_7	SPE-FFA9_5	SPE-FFA9_7
kapronová	0,06	0,02	nd	nd	nd	nd	nd	nd
kaprylová	0,02	0,01	0,16	0,07	0,04	0,03	0,03	nd
kaprinová	0,04	0,03	nd	0,02	0,03	0,02	nd	0,02
undekanová	0,08	0,04	0,03	0,05	0,07	0,03	0,03	0,07
laurová	0,21	0,08	0,05	0,10	0,09	0,05	0,07	0,05
tridekanová	0,03	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
myristová	0,95	0,36	0,32	0,63	0,52	0,36	0,63	0,18
myristolejová	0,06	nd	nd	0,03	0,03	nd	nd	nd
pentadekanová	0,10	0,03	0,04	0,04	0,05	0,04	nd	nd
cis-10-pentadecenová	0,08	0,03	nd	nd	nd	nd	nd	nd
palmitová	4,75	1,17	1,23	2,96	2,99	1,57	2,42	0,50
palmitolejová	0,63	0,10	0,09	0,10	0,90	0,44	0,21	0,05
heptadekanová	0,08	0,09	nd	0,04	0,10	0,09	nd	nd
stearová	1,77	0,55	0,49	1,41	1,25	0,67	0,99	0,25
elaidová	0,24	0,17	nd	nd	0,09	nd	nd	nd
olejová	21,14	2,14	2,36	6,22	8,22	4,61	5,06	0,37
linolelaidová	0,65	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
linolová	38,30	1,81	2,11	7,24	7,54	1,65	4,38	nd
gama-linolenová	nd	0,08	nd	0,14	nd	nd	nd	nd
linoleová	0,78	1,28	0,11	2,30	0,39	0,44	0,13	nd
arachová	0,08	nd	nd	nd	0,06	nd	nd	nd
arachidonová	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,11	nd
nervonová	nd	nd	nd	nd	nd	0,14	nd	nd



Tab. č. 11. Obsah MK v 1. eluci získané metodou SPE vzorku Goudy [ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  tuku] ( $\cdot 10^{-2}$ )

Název mastné kyseliny	SPE-TAG1	SPE-TAG2	SPE-TAG3
máselná	4,51 ± 0,43*	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01
kaprylová	1,04 ± 0,19*	1,91 ± 0,37*	1,60 ± 0,02*
kaprinová	2,62 ± 0,26*	0,05 ± 0,01	4,56 ± 0,04*
undekanová	4,92 ± 0,79*	0,17 ± 0,03	0,11 ± 0,00
laurová	9,14 ± 0,32*	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,01
myristová	0,58 ± 0,01	0,73 ± 0,18	0,66 ± 0,04
myristolejová	2,66 ± 0,48*	nd	nd
pentadekanová	0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,02	8,48 ± 0,28*
palmitová	3,81 ± 0,90	2,01 ± 0,66	1,27 ± 0,48
palmitolejová	5,09 ± 0,24*	nd	6,74 ± 0,27*
heptadekanová	0,09 ± 0,03	nd	nd
stearová	2,38 ± 0,01	0,56 ± 0,22	0,78 ± 0,31
olejová	6,63 ± 0,82	1,35 ± 0,43	1,27 ± 0,01
linolová	0,07 ± 0,01	nd	nd
arachová	0,06 ± 0,01	nd	nd
heptadecenová	0,05 ± 0,01	nd	nd

Tab. č. 12. Obsah MK v 2. eluci získané metodou SPE vzorku Goudy [ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  tuku] ( $\cdot 10^{-2}$ )

Název mastné kyseliny	SPE-FFA1	SPE-FFA2	SPE-FFA3
kaprylová	1,19 ± 0,46*	0,02 ± 0,01	nd
kaprinová	nd	nd	0,02 ± 0,00
undekanová	7,5 ± 0,87*	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,01
laurová	0,04 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,8 ± 0,01
myristová	0,19 ± 0,05	0,84 ± 0,10	0,69 ± 0,05
myristolejová	nd	0,04 ± 0,00	nd
pentadekanová	nd	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01
palmitová	0,43 ± 0,17	5,07 ± 1,40	5,07 ± 1,21
palmitolejová	0,04 ± 0,01	0,82 ± 0,42	0,26 ± 0,03
heptadekanová	nd	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01
stearová	0,13 ± 0,05	2,23 ± 0,64	1,95 ± 0,35
olejová	0,42 ± 0,13	13,10 ± 7,17	5,93 ± 0,41
linolová	0,32 ± 0,04	4,90 ± 1,21	0,07 ± 0,00
arachová	nd	0,11 ± 0,04	0,10 ± 0,1

#### 4.7 Stanovení opakovatelnosti metody

Opakovatelnost vyjadřuje těsnost shody mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu provedených stejnou metodou, stejným pracovníkem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu [26].

Opakovatelnost metody byla ověřena na vzorku sýru typu Gouda. Stejný postup byl použit na šesti navážkách téhož sýru, všechny vzorky byly podrobeny analýze za výše uvedených optimálních podmínek.

Z naměřených dat byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka (SD) a relativní odchylka (RSD), která je hlavním ukazatelem opakovatelnosti. Výsledky jsou uvedené v Tabulce č. 13.

Hodnota relativní směrodatné odchylky podle doporučení IUPAC by měla být do 10 % [27], což nebylo splněno u MK. Hodnota relativní směrodatné odchylky se pohybovala v rozmezí 8,41 až 40,02 %. Vzhledem k neuspokojivým výsledkům bude muset být metoda SPE-GC-FID dále optimalizována aby ji bylo možno používat pro opakovaná stanovení MK.

Tab. č. 13. Výsledky opakovatelnosti metody SPE na vzorku Goudy

Název mastné kyseliny	volné mastné kyseliny		
	průměr [mg·g <sup>-1</sup> tuku]	SD [mg·g <sup>-1</sup> tuku]	RSD [%]
kaprylová	0,025	0,004	15,59
undekanová	0,062	0,009	14,73
laurová	0,071	0,009	12,88
myristová	0,479	0,079	16,39
pentadekanová	0,050	0,019	40,02
palmitová	3,420	0,448	13,09
palmitolejová	0,050	0,008	15,91
heptadekanová	0,069	0,006	8,41
stearová	1,816	0,330	18,18
olejová	4,281	0,482	11,26
linolová	3,029	0,571	18,86
arachová	0,051	0,009	16,86

#### 4.8 Aplikace na vybrané vzorky

Na závěr byl optimalizovaný postup (SPE-GC-FID) použit pro stanovení obsahu volných MK sýrů typu Gouda a tavených sýrových analogů (stejných jako byly použity při optimalizaci metody).

Výsledky stanovení jsou uvedeny v tabulce č. 14. a 15.

Porovnání volných mastných kyselin identifikovaných v obou typech sýru je vyobrazeno v grafu č. 3. a 4.

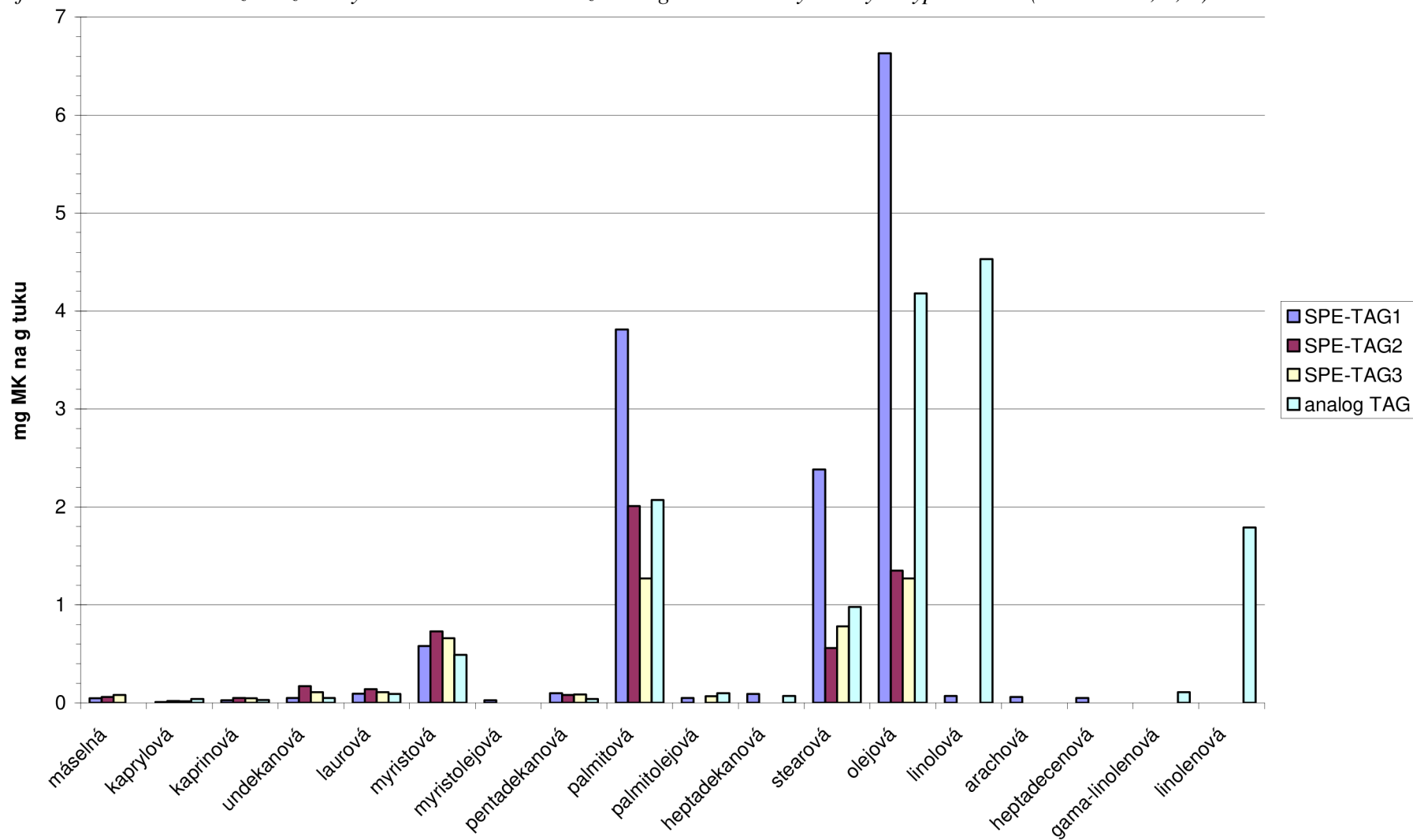
Tab. č. 14. Obsah MK v jednotlivých frakcích vzorku analogu taveného sýra [ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  tuku]

Název mastné kyseliny	SPE-TAG	SPE-FFA
kaprylová	$0,04 \pm 0,03$	nd
kaprinová	$0,03 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,00$
undekanová	$0,05 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,03$
laurová	$0,09 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,00$
myristová	$0,49 \pm 0,19$	$0,27 \pm 0,13$
pentadekanová	$0,04 \pm 0,01$	nd
palmitová	$2,07 \pm 1,26$	$1,04 \pm 0,75$
palmitolejová	$0,10 \pm 0,00$	$0,25 \pm 0,07$
heptadekanová	$0,07 \pm 0,04$	nd
stearová	$0,98 \pm 0,61$	$0,46 \pm 0,29$
olejová	$4,18 \pm 2,88$	$2,46 \pm 0,99$
linolová	$4,53 \pm 3,84$	nd
gama-linolenová	$0,11 \pm 0,04$	nd
linolenová	$1,79 \pm 0,72$	nd

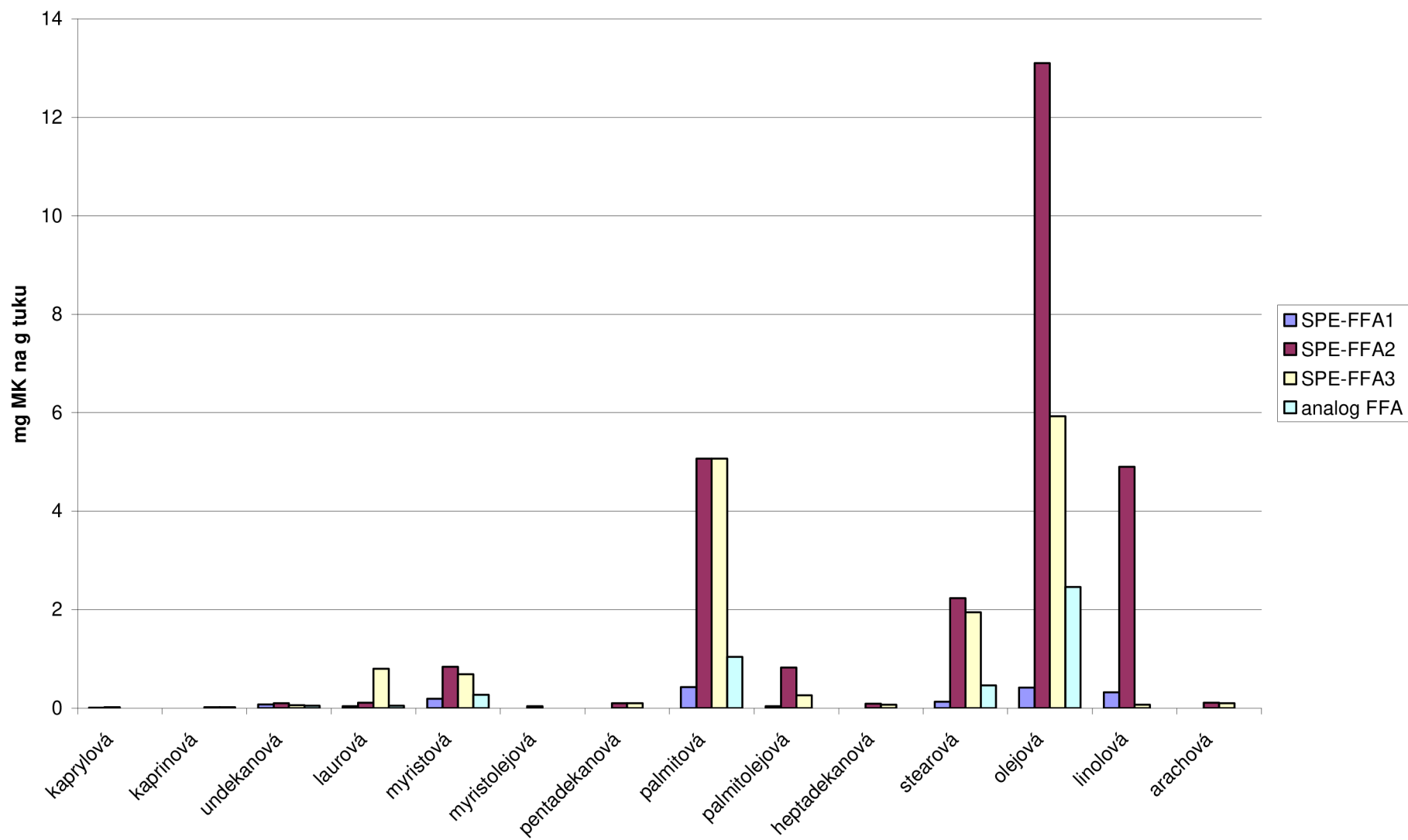
Tab. č. 15. Obsah MK v jednotlivých frakcích vzorku sýru typu Gouda [ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  tuku]

Název mastné kyseliny	SPE-TAG1	SPE-TAG2	SPE-TAG3	SPE-FFA1	SPE-FFA2	SPE-FFA3
máselná	$4,51 \pm 0,43^*$	$0,06 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	nd	nd	nd
kaprylová	$1,04 \pm 0,19^*$	$1,91 \pm 0,37^*$	$1,60 \pm 0,02^*$	$1,19 \pm 0,46^*$	$0,02 \pm 0,01$	nd
kaprinová	$2,62 \pm 0,26^*$	$0,05 \pm 0,01$	$4,56 \pm 0,04^*$	nd	nd	$0,02 \pm 0,00$
undekanová	$4,92 \pm 0,79^*$	$0,17 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,00$	$7,5 \pm 0,87^*$	$0,10 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$
laurová	$9,14 \pm 0,32^*$	$0,14 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,03$	$0,8 \pm 0,01$
myristová	$0,58 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,18$	$0,66 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,05$	$0,84 \pm 0,10$	$0,69 \pm 0,05$
myristolejová	$2,66 \pm 0,48^*$	nd	nd	nd	$0,04 \pm 0,00$	nd
pentadekanová	$0,10 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,02$	$8,48 \pm 0,28^*$	nd	$0,10 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$
palmitová	$3,81 \pm 0,90$	$2,01 \pm 0,66$	$1,27 \pm 0,48$	$0,43 \pm 0,17$	$5,07 \pm 1,40$	$5,07 \pm 1,21$
palmitolejová	$5,09 \pm 0,24^*$	nd	$6,74 \pm 0,27^*$	$0,04 \pm 0,01$	$0,82 \pm 0,42$	$0,26 \pm 0,03$
heptadekanová	$0,09 \pm 0,03$	nd	nd	nd	$0,09 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$
stearová	$2,38 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,22$	$0,78 \pm 0,31$	$0,13 \pm 0,05$	$2,23 \pm 0,64$	$1,95 \pm 0,35$
olejová	$6,63 \pm 0,82$	$1,35 \pm 0,43$	$1,27 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,13$	$13,10 \pm 7,17$	$5,93 \pm 0,41$
linolová	$0,07 \pm 0,01$	nd	nd	$0,32 \pm 0,04$	$4,90 \pm 1,21$	$0,07 \pm 0,00$
arachová	$0,06 \pm 0,01$	nd	nd	nd	$0,11 \pm 0,04$	$0,10 \pm 0,1$
heptadecenová	$0,05 \pm 0,01$	nd	nd	nd	nd	nd

Graf č. 3. Porovnání množství získaných MK v 1. eluci SPE z analogu taveného sýra a sýru typu Gouda (SPE-TAG1, 2, 3)



Graf č. 4. Porovnání množství získaných MK v 2. eluci SPE z analogu taveného sýra a sýru typu Gouda (SPE-FFA1, 2, 3)



## 5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo vybrat, optimalizovat a validovat metodu vhodnou pro stanovení volných mastných kyselin v sýrové matrici. Jako modelové matrice byly použity dva typy vzorků: tavený sýrový analog s přídavkem rybízového oleje a přírodní sýr typu Gouda, experimentálně vyrobené na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně.

Pro extrakci lipidů ze vzorku sýrů byla zvolena metoda dle ČSN 0107, pro esterifikaci mastných kyselin byla použita metoda podle ČSN EN ISO 5509 s použitím metanolového roztoku hydroxidu draselného. Na stanovení methylesterů mastných kyselin byla použita plynová chromatografie s FID detekcí.

Na základě provedené literární rešerše byly pro frakcionaci vyextrahovaných lipidů a získání frakce volných mastných kyselin vyzkoušeny a porovnány dvě metody: chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a extrakce na pevné fázi (SPE). Po porovnání těchto dvou metod byla jako vhodnější vybrána metoda SPE, protože je jednodušší, rychlejší a poskytuje vyšší výtěžky získaných mastných kyselin.

Celý proces SPE-GC-FID byl následně optimalizován, především z hlediska množství dávkovaného vzorku.

Byly aplikovány kolony obsahující silikagel modifikovaný aminoskupinami, pro jejich aktivaci byl použit hexan. Pro analýzu byly jímány dvě frakce: první byla eluována směsí chloroformu a propanolu v poměru 2 : 1 a obsahovala směs mono-, di- a triacylglycerolů. Složení této frakce bylo ověřeno pomocí tenkovrstvé chromatografie. Druhým elučním činidlem byl 2 % roztok kyseliny octové v diethyletheru, v této frakci byly obsaženy volné mastné kyseliny. V rámci validace byla ověřena opakovatelnost metody. Ostatní validační parametry budou z časových důvodů stanoveny v navazujících pracích.

Metoda SPE-GC-FID byla na závěr aplikována na vzorky modelových tavených a přírodních sýrů.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, xxii, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6
- [2] ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÉ EKONOMIKY A INFORMACÍ A VÝZKUMNÝ ÚSTAV POTRAVINÁŘSKÝ PRAHA. *Centrum pro databázi složení potravin: On-line databáze složení potravin ČR, verze 4.13* [online]. 2013. vyd. 2013 [cit. 2015-03-26]. Dostupné z: <http://www.nutridatabaze.cz/>
- [3] JANČÁŘOVÁ, Irena a Luděk JANČÁŘ. *Analytická chemie*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 195 s. ISBN 978-80-7157-647-12008.
- [4] JANÍČEK, Gustav, Karel ŠANDERA a Bohuš HAMPL. *Rukověť potravinářské analytiky*. Vyd. 1. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1962, 740 s.
- [5] The AOCS Lipid Library. CHRISTIE, W. *GAS CHROMATOGRAPHY AND LIPIDS* [online]. 1989, 2011 [cit. 2015-03-22]. Dostupné z: [http://lipidlibrary.aocs.org/GC\\_lipid/04\\_deriv/index.htm](http://lipidlibrary.aocs.org/GC_lipid/04_deriv/index.htm)
- [6] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 202 s. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [7] LUQUE DE CASTRO, M.D. a F. PRIEGO-CAPOTE. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*. 2010, vol. 1217, issue 16, s. 2383-2389. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309016884>
- [8] AMBROŽOVÁ, J. *Stanovení lipidů a mastných kyselin v řasách*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2011. 115 s. Vedoucí diplomové práce: Ing. Ladislava Mišurcová, Ph.D.
- [9] CHRISTIE, W. W. *Lipid library* [online]. 2011 [cit. 2014-08-03]. Dostupné z WWW: <http://lipidlibrary.aocs.org/index.html>
- [10] RUIZ-GUTIÉRREZ, V a M.C PÉREZ-CAMINO. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*. 2000, vol. 885, 1-2, s. 321-341. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00181-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300001813>
- [11] COUFAL, Pavel. *Separáčnı́ metody* [online]. 1996 [cit. 2014-04-23]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>
- [12] *LabPlanet: SPE* [online]. 2005 [cit. 2014-04-23]. Dostupné z: <http://blog.labplanet.com/2013/09/16/spe-2/>
- [13] FUCHS, Beate a M.C PÉREZ-CAMINO. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*. 2011, vol. 1218, issue 19, s. 321-341. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.11.066. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300001813>
- [14] CHRISTIE, W.W. MRS Lipid Analysis Unit. *Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis*. 2006, vol. 43, issue 3, s. 31.
- [15] BUTOROVÁ, L. *Vybrané validační parametry metody stanovení aromatických látek v tavených sýrových analozích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 83 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [16] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. upr. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [17] SOMMER, L. *Základy analytické chemie 2*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.



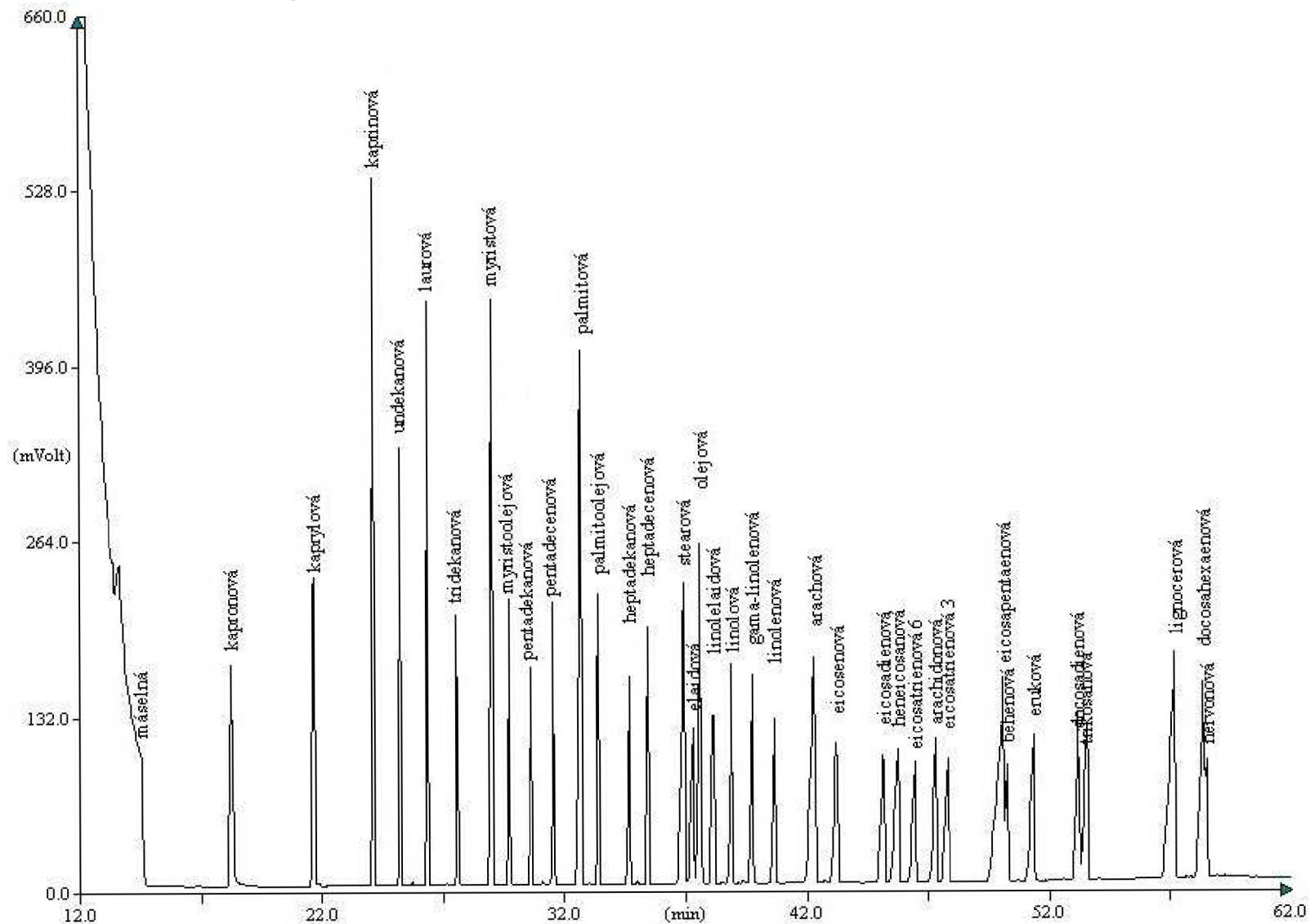
- [18] WIJESUNDERA, C, L DRURY a T WALSH. Determination of free fatty acids and lactones in cheese by solid phase microextraction (SPME). *Australian Journal of Dairy Technology* [online]. 1998, vol. 53, issue 2 [cit. 2014-05-10]. Dostupné z: <http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/199495906?accountid=17115>
- [19] KNOTEK, J. *Stanovení volných mastných kyselin v jogurtech v závislosti na skladování*. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Markéta Šípalová.
- [20] ŠÍPALOVÁ, M. *Změny jakostních parametrů mléka a mléčných výrobků*. Zlín, 2011. Disertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc.
- [21] HORÁK, T., J. ČULÍK, M. JURKOVÁ, P. ČEJKA a J. OLŠOVSKÁ. Stanovení mastných kyselin v pivu rychlou, rutinní metodou. *Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s.* 2013, č. 58
- [22] Čertík, M., Andráš, P., Šajbidor, J. Effect of extraction methods on lipid yield and fatty acid composition of lipid classes containing  $\gamma$ -linolenic acid extracted from fungi. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1996, vol. 73, issue 3, s. 357-365. ISSN: 0003-021X. DOI: 10.1007/BF02523431.
- [23] TUOMALA, Terhi a Heikki KALLIO. Identification of free fatty acids and some other volatile flavour compounds from Swiss cheese using on-line supercritical fluid extraction-gas chromatography. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* [online]. 1996, vol. 203, issue 3, s. 236-240 [cit. 2014-05-07]. DOI: 10.1007/BF01192870.
- [24] PRUKNEROVÁ, K. *Stanovení mastných kyselin v tavených sýrech*. Brno. Vysoké Učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 80 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [25] AMER, Bashar, Caroline NEBEL, Hanne C. BERTRAM, Grith MORTENSEN, Kjeld HERMANSEN a Trine K. DALSGAARD. Novel method for quantification of individual free fatty acids in milk using an in-solution derivatisation approach and gas chromatography-mass spectrometry. *International Dairy Journal* [online]. 2013, vol. 32, issue 2, s. 199-203 [cit. 2014-05-08]. DOI: 10.1016/j.idairyj.2013.05.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694613001489>
- [26] *Vhodnost analytických metod pro daný účel: laboratorní příručka pro validaci metod a související činnosti*. 1. vyd. Editor Miloslav Suchánek. Praha: Eurachem-ČR, c1999, iii, 61 s. Kvalimetrie, 9. ISBN 80-901-8687-4.
- [27] RUPRICOVÁ, L. *Zavedení metody stanovení konjugované linolové kyseliny (CLA)*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 63 s. Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Vítová, Ph.D.

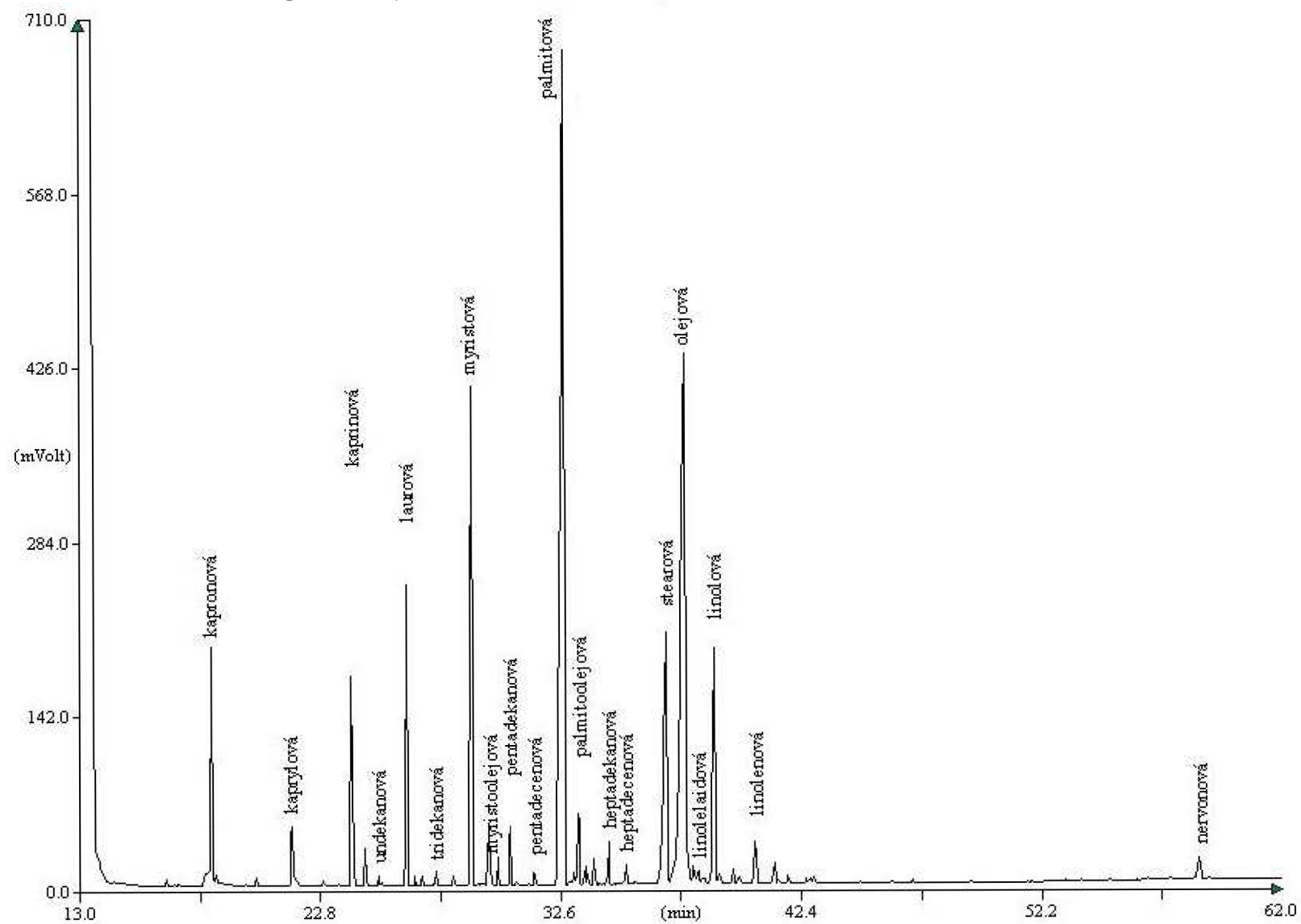
## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

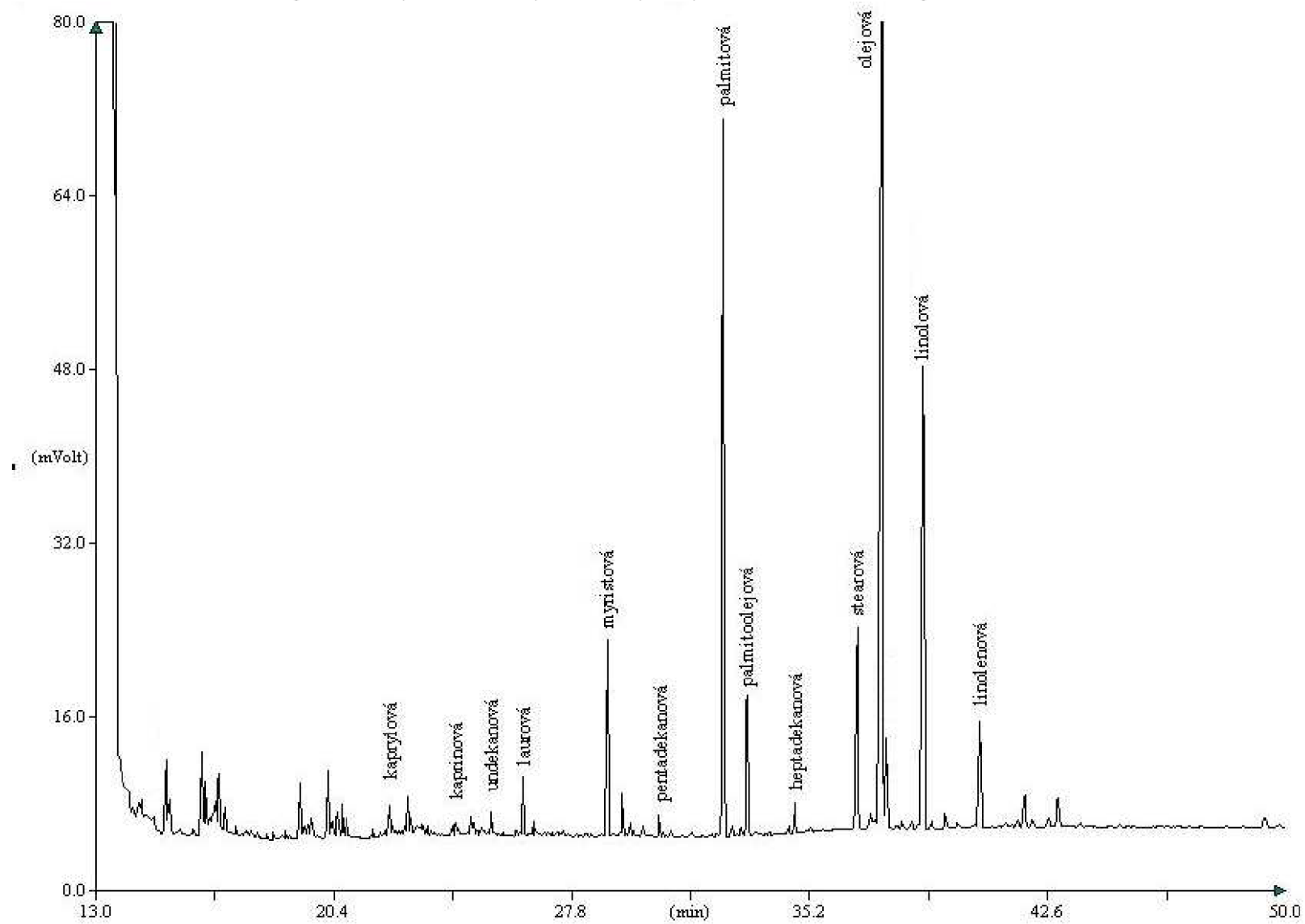
BHT	butylhydroxytoluen
DAG	diacylglyceroly
FFA	volné mastné kyseliny (Free Fatty Acids)
FID	plamenově ionizační detektor (Flame Ionization Detector)
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
MAG	monoacylglyceroly
MeMK	methylestery mastných kyselin
MK	mastné kyseliny
$M_r$	molární hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
PCB	polychlorované bifenyly
SPE	extrakce na pevné fázi (Solid Fase Extraction)
TAG	triacylglyceroly
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)

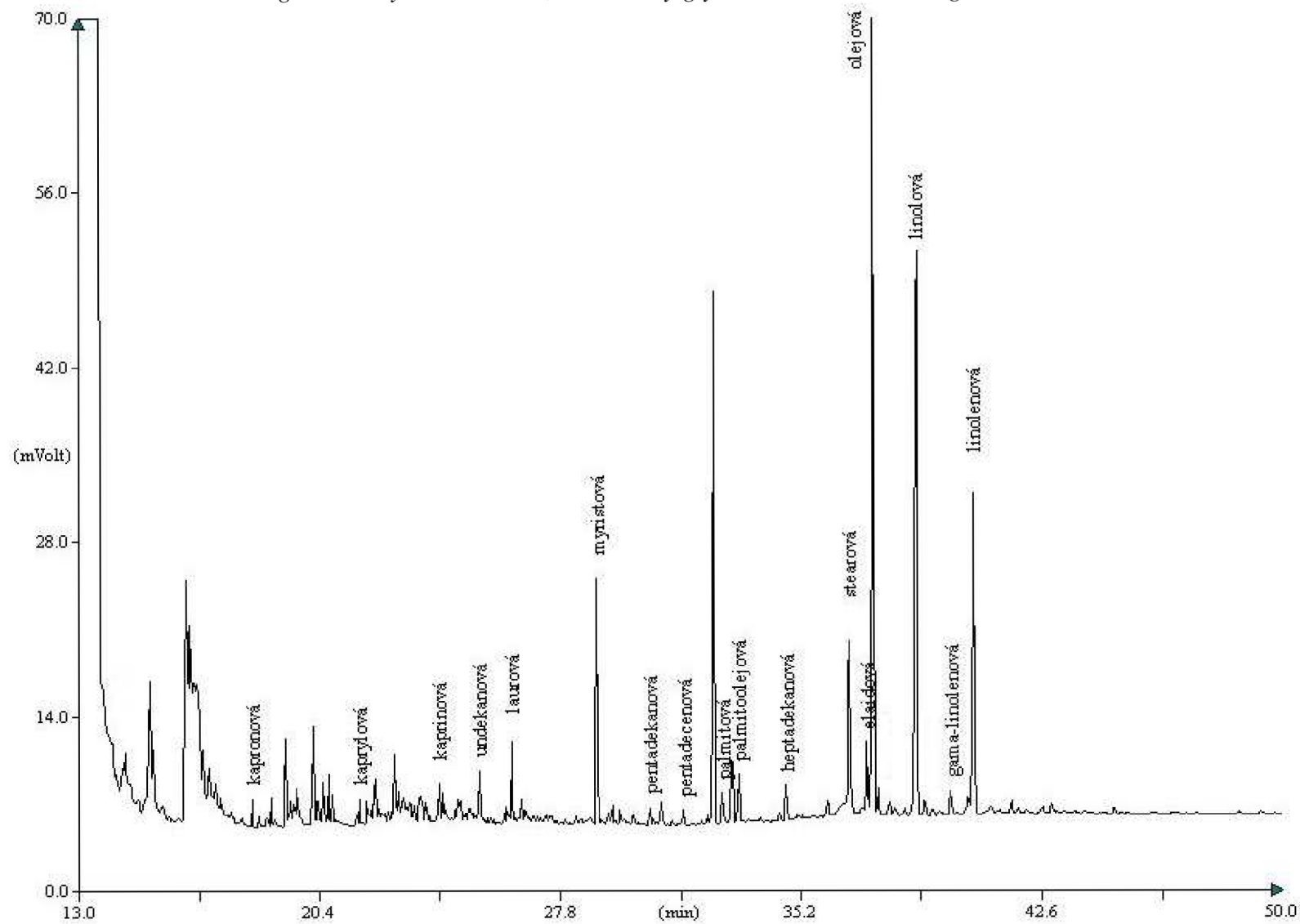
## 8 PŘÍLOHY

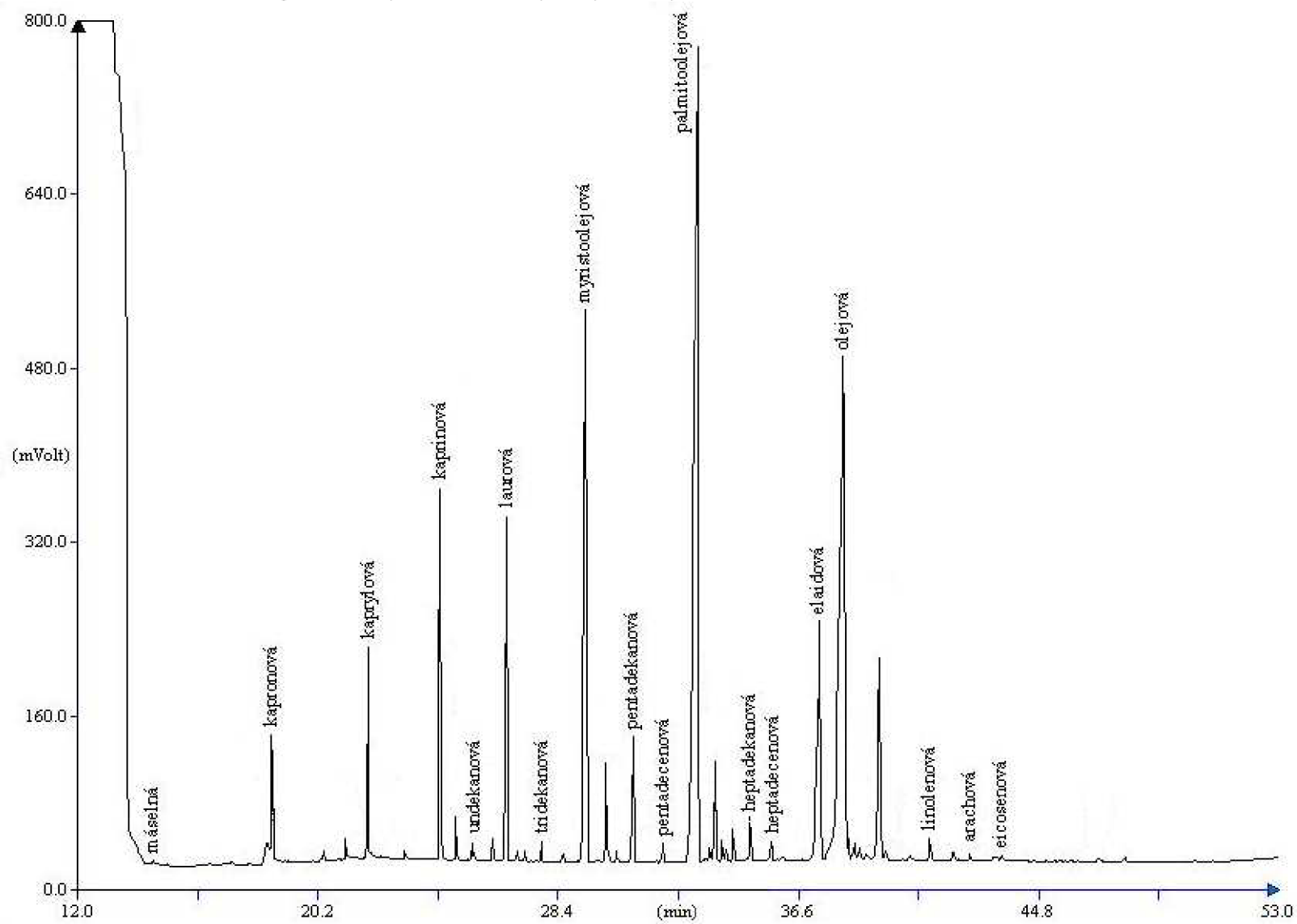
Příloha 1	Chromatogram standardů methylesterů mastných kyselin
Příloha 2	Chromatogram methylesterů mastných kyselin taveného analogu
Příloha 3	Chromatogram methylesterů volných mastných kyselin taveného analogu
Příloha 4	Chromatogram methylesterů mono-, di- a triacylglycerolů taveného analogu
Příloha 5	Chromatogram methylesterů mastných kyselin sýru Gouda
Příloha 6	Chromatogram methylesterů volných mastných kyselin sýru Gouda
Příloha 7	Chromatogram methylesterů mono-, di- a triacylglycerolů sýru Gouda







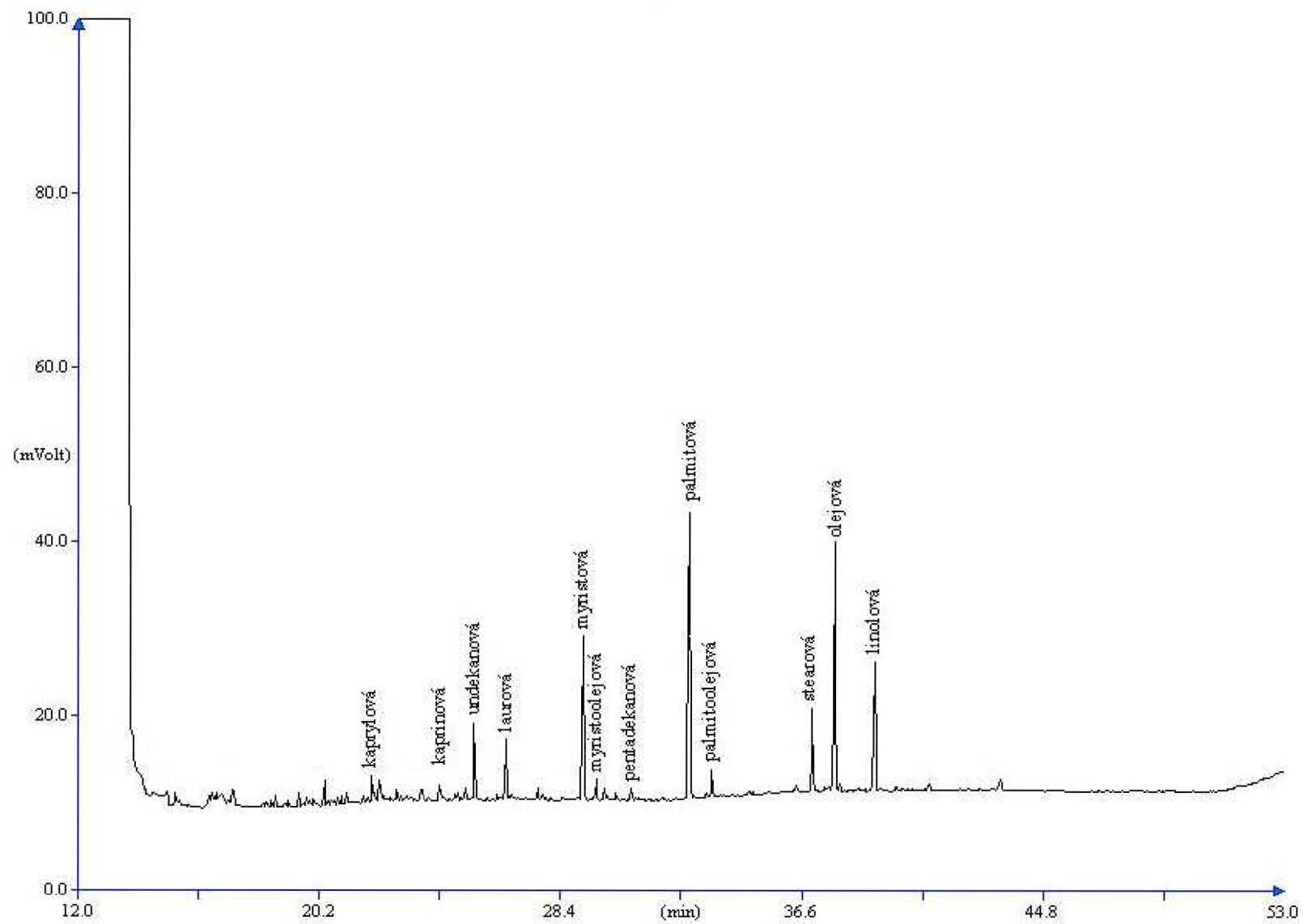






Příloha 6

Chromatogram methylesterů volných mastných kyselin sýru Gouda



Příloha 7

Chromatogram methylesterů mono-, di- a triacylglycerolů sýru Gouda

