



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

OVĚŘENÍ OPAKOVATELNOSTI METODY STANOVENÍ VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN

THE REPEATABILITY OF THE METHOD FOR ASSESSMENT OF FREE FATTY ACIDS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Martin Buldra

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1279/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Martin Buldra**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **Ing. Eva Vítová, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Ověření opakovatelnosti metody stanovení volných mastných kyselin

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
– přehled metod vhodných pro stanovení MK a volných MK (izolace z matrice vzorku, derivatizace, stanovení)
2. Vyberte jednoduchou metodu vhodnou pro stanovení volných MK
3. Ověřte její opakovatelnost aplikací na vybrané vzorky potravin

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Martin Buldra
student(ka)

Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá problematikou stanovení volných mastných kyselin ve slunečnicovém oleji.

Teoretická část se zabývá charakteristikou mastných kyselin a lipidů obecně. Dále jsou zde popsány experimentální metody vhodné ke stanovení mastných kyselin s důrazem na plynovou chromatografii, základní metodu jejich stanovení.

V experimentální části byly porovnány dvě metody stanovení volných mastných kyselin: s/bez předchozí frakcionace, a ověřena opakovatelnost a reprodukovatelnost vybrané metody stanovení pomocí přímé esterifikace za použití BF_3 jako katalyzátoru. Vlastní stanovení methylesterů mastných kyselin bylo provedeno na plynovém chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the assessment of free fatty acids in sunflower oil.

Theoretical part focuses on the general characteristics of fatty acids and lipids. The experimental methods suitable for assessment of fatty acids are described, with the emphasis on gas chromatography, the basic method of their assessment.

In experimental part two methods for free fatty acids assessment: with/without previous fractionation, were compared and then the repeatability and reproducibility of selected method – the direct esterification of free fatty acids using BF_3 as a catalyst, were verified.

The assessment of fatty acids methyl esters was done using gas chromatograph with flame-ionization detector.

KLÍČOVÁ SLOVA

sýry, GC, MK, VMK

KEY WORDS

cheese, GC, FA, FFA

CITACE

BULDRA, M. *Ověření opakovatelnosti metody stanovení volných mastných kyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 33 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská 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

Rád bych poděkoval paní Ing. Evě Vítové, PhD. za její cenné rady, odborné vedení, a hlavně za její trpělivost a veškerý čas, který mi věnovala při psaní této práce. Dále bych chtěl poděkovat přátelům, se kterými jsme spolupracovali v laboratoři, a kteří mají také svůj díl na této práci. Nemalý dík také patří mé rodině, která mě po celou dobu studia podporuje.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Lipidy.....	8
2.2	Rozdělení lipidů.....	8
2.3	Mastné kyseliny.....	9
2.3.1	Nasycené mastné kyseliny.....	9
2.3.2	Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou.....	10
2.3.3	Nenasycené mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami.....	10
2.3.4	Mastné kyseliny s trojnými vazbami a s různými substituenty.....	10
2.3.5	Esenciální a neesenciální mastné kyseliny.....	10
2.4	Metody vhodné pro stanovení mastných kyselin.....	10
2.4.1	Vzorkování.....	11
2.4.2	Extrakční metody.....	11
2.4.3	Frakcionace lipidů.....	11
2.4.4	Esterifikace.....	12
2.4.5	Stanovení mastných kyselin pomocí chromatografických metod.....	13
2.5	Stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie.....	13
2.5.1	Princip plynové chromatografie.....	13
2.5.2	Instrumentace plynové chromatografie.....	15
3	Experimentální část.....	17
3.1	Použité laboratorní vybavení a chemikálie.....	17
3.1.1	Laboratorní přístroje.....	17
3.1.2	Laboratorní pomůcky.....	17
3.1.3	Chemikálie pro kyselou esterifikaci.....	17
3.1.4	Chemikálie pro frakcionaci lipidů.....	17
3.1.5	Chemikálie pro stanovení mastných kyselin.....	18
3.1.6	Plyny pro plynový chromatograf.....	18
3.2	Analyzované vzorky.....	18
3.3	Použité metody a experimentální postupy.....	18
3.3.1	Frakcionace lipidů metodou SPE.....	18
3.3.2	Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem (TAG).....	19
3.3.3	Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem (VMK).....	20
3.4	Podmínky stanovení methylesterů mastných kyselin.....	20
3.5	Identifikace mastných kyselin.....	21

4	Výsledky a diskuze.....	23
4.1	Možnosti stanovení volných mastných kyselin	23
4.2	Porovnání reprodukovatelnosti metod	23
4.3	Ověření opakovatelnosti metody stanovení volných mastných kyselin	25
5	Závěr.....	27
6	Seznam použité literatury	28
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	31
8	Seznam příloh.....	32
9	Přílohy	33

1 ÚVOD

Člověk je savec, takže příjem mastných kyselin v podobě mateřského mléka začíná ihned po narození. Tyto látky hrají důležitou roli pro správný vývoj a fungování organismu, a to jak u novorozenců, tak u dospívajících a dospělých lidí. Mimo mateřského mléka, přijímá člověk v potravě mastné kyseliny už od počátku věků, kdy postupně začínal s lovem zvěře – zdrojem mastných kyselin bylo maso, a poté s domestikací zvěře – mléko, maso, vejce. Později si lidé osvojili i výrobu různých tuků/olejů.

Dnešní doba nabízí širokou škálu zdrojů mastných kyselin od rybího masa bohatého na Omega 3 a 6 mastné kyseliny, až po oleje, sýry a další mléčné výrobky. Vzhledem ke zvyšujícímu se zájmu o nutričně kvalitní potraviny se lidé začínají zajímat i o to, jaké množství a zastoupení mastných kyselin se v každém výrobku nachází, příp. v jaké formě se zde nachází. Proto je žádoucí mít k dispozici analytické metody, které jednoduše a spolehlivě stanoví jak množství, tak zastoupení jednotlivých mastných kyselin.

Spolehlivost těchto metod se dá posoudit pomocí stanovení jejich opakovatelnosti. To jinými slovy znamená, zda použití jedné metody k analýze jednoho vzorku za dodržení stejného postupu při stejných podmínkách dává stále stejné výsledky. Cílem této práce tedy bylo ověřit opakovatelnost/reprodukovatelnost jednoduché metody stanovení mastných kyselin, a zvláště frakce volných mastných kyselin.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lipidy

Lipidy patří k významným složkám potravin, přičemž z hlediska výživy člověka tvoří jednu z hlavních živin, velmi důležitou pro zdraví a vývoj organismu. Lipidy se obvykle definují jako přírodní sloučeniny, obsahující vázané mastné kyseliny o více než třech atomech uhlíku v molekule. V potravinách se však často nacházejí také sloučeniny mastných kyselin, které vznikly průmyslovou činností nebo jinými lidskými aktivitami (např. estery cukrů a cukerných alkoholů s vyššími mastnými kyselinami), které nejsou považovány za přírodní látky, a přesto se v praxi řadí mezi lipidy. Dnes se tedy za lipidy považují mastné kyseliny a jejich deriváty odvozené biochemicky a funkčně, včetně netěkavých lipofilních sloučenin doprovázejících vlastní lipidy, tzv. doprovodné látky lipidů (např. steroidy, karotenoidy, lipofilní vitaminy, některá barviva, antioxidanty a jiné lipofilní sloučeniny). Hlavními vlastnostmi lipidů je jejich hydrofobnost a dobrá rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech.

V potravinářské praxi se název lipidy příliš neužívá. Z technologického hlediska se rozeznávají jen tuky, oleje, mastné kyseliny, vosky, případně lecitin [1, 2].

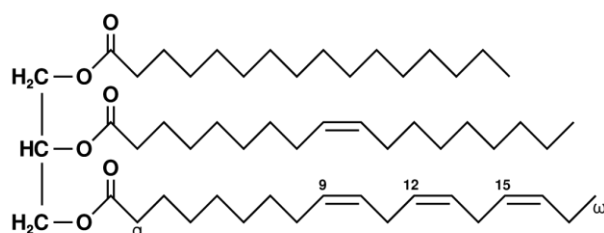
2.2 Rozdělení lipidů

Podle chemického složení se lipidy klasifikují do čtyř hlavních skupin:

- Homolipidy
- Heterolipidy
- Komplexní lipidy
- Prekurzory a odvozené lipidy [1, 2].

Homolipidy, někdy také jednoduché lipidy, jsou estery mastných kyselin a alkoholů, které se dále dělí podle struktury vázaného alkoholu na tuky a vosky.

Tuky jsou estery mastných kyselin s glycerolem, proto také nesou název acylglyceroly. Nejpočetnější skupinu pak tvoří triacylglyceroly (TAG), které mají jen zřídka na všech esterových pozicích stejnou mastnou kyselinu (viz Obrázek 1), tudíž se jedná o smíšené acylglyceroly. Nejčastěji jsou TAG tvořeny kombinacemi mastných kyselin stearové, palmitové a olejové [1, 3].



Obrázek 1: Příklad triacylglycerolu tvořený (shora) kyselinou palmitovou, olejovou, a α -linolenovou [4].

V případě vosků se jedná také o estery mastných kyselin, avšak tyto estery jsou tvořeny s vyššími jednosytnými alkoholy. Rozlišujeme vosky živočišné (včelí vosk, vorvaňovina), rostlinné (kutikulární vosky) a minerální (montánní vosk) [1].

Heterolipidy, někdy také složené lipidy, obsahují kromě mastných kyselin a alkoholu ještě další kovalentně vázané sloučeniny, např. kyselinu fosforečnou (fosfolipidy) nebo D-galaktosu (glykolipidy):

- Fosfolipidy – dále dělené na glycerolfosfolipidy a sfingofosfolipidy
- Glykolipidy
- Ostatní složené lipidy – sulfolipidy a aminolipidy [1, 2].

V případě komplexních lipidů se setkáme z hlediska stavby s kombinací heterolipidů a homolipidů. Ty jsou kromě kovalentních vazeb vázány i jinými druhy vazeb, např. vodíkovými můstky nebo hydrofobními interakcemi. Do této kategorie spadají hlavně lipoproteiny [1, 5].

Do kategorie prekurzorů a odvozených lipidů spadají mastné kyseliny, glycerol, steroidy, uhlovodíky, v tučích rozpustné vitaminy, hormony atd. [1, 2].

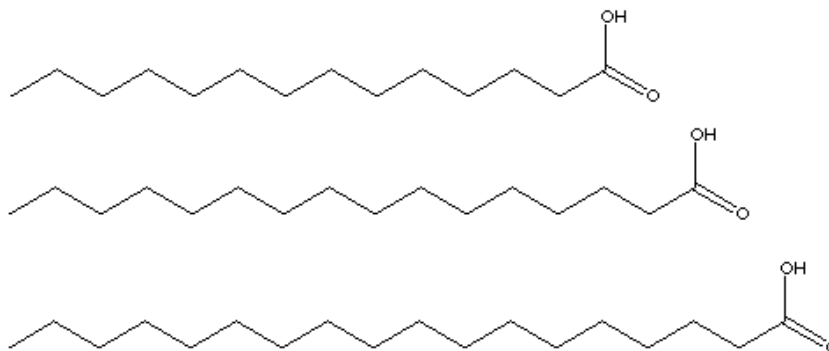
2.3 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou nejdůležitější a nejvýznamnější složkou lipidů, hlavně z hlediska výživy. Vyskytují se nejčastěji ve formě esterů v přírodních tučích a olejích, ale mohou být i ve formě volných mastných kyselin. V přírodních tučích pak mají mastné kyseliny zpravidla nevětvený řetězec, který obsahuje sudý počet uhlíků. Tento řetězec může být nasycený (bez dvojných vazeb) nebo nenasycený (obsahující jednu případně více dvojných vazeb). Dělení mastných kyselin podle počtu dvojných vazeb je tedy následující:

- Nasycené mastné kyseliny
- Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (monoenové)
- Nenasycené mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami (polyenové)
- Mastné kyseliny s trojnými vazbami a s různými substituenty [1].

2.3.1 Nasycené mastné kyseliny

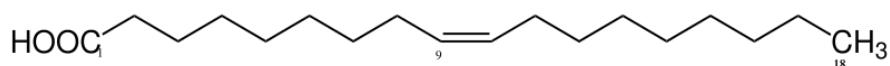
V angličtině jsou označovány *Saturated Fatty Acids* (SFA nebo SAFA), v češtině se můžeme setkat i s pojmem satureované mastné kyseliny. Jedná se o běžnou složku přírodních lipidů tvořící většinou 10–40 % z celkových mastných kyselin. Běžně tyto kyseliny obsahují 4–38 uhlíků (většinou sudý počet), které tvoří zpravidla lineární a nevětvené řetězce neobsahující žádné dvojně vazby. Mezi nejvýznamnější zástupce nasycených mastných kyselin patří kyselina myristová (14 C), palmitová (16 C) a stearová (18 C) (viz Obrázek 2) [1, 2, 5].



Obrázek 2: Nasycené mastné kyseliny, (shora) kyselina myristová, palmitová, stearová [6–8].

2.3.2 Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou

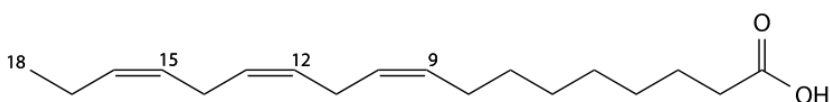
Protože obsahují jedinou dvojnou vazbu, nazývají se monoenové mastné kyseliny, v angličtině pak *Monounsaturated Fatty Acids* (MUFA). Tyto kyseliny se liší navzájem počtem atomů uhlíků a polohou dvojných vazeb, která navíc umožňuje různé prostorové konfigurace. Typickým zástupcem této skupiny je kyselina olejová s osmnácti uhlíky a dvojnou vazbou na devátém uhlíku (viz Obrázek 3). Dalším zástupcem této skupiny je kyselina elaidová [1–3, 5].



Obrázek 3: Kyselina olejová [9].

2.3.3 Nenasycené mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami

Vzhledem k tomu, že tyto kyseliny obsahují více dvojných vazeb, můžeme se setkat s označením polyenové mastné kyseliny (respektive také dienové, trienové, tetraenové atd.), v angličtině se nazývají *Polyunsaturated Fatty Acids* (PUFA). Nejvýznamnějším zástupcem je linolová kyselina s dvěma dvojnými vazbami na třetím a pátém uhlíku. Další mastné kyseliny patřící do této skupiny jsou například α -linolenová kyselina se třemi dvojnými vazbami (viz Obrázek 4) a arachidonová kyselina se čtyřmi dvojnými vazbami [1, 3, 5].



Obrázek 4: α -linolenová kyselina [10].

2.3.4 Mastné kyseliny s trojnými vazbami a s různými substituenty

Do této skupiny patří celá řada dalších mastných kyselin, např. rozvětvené, cyklické, nebo s kyslíkatými, sirnými nebo dusíkatými funkčními skupinami. Ve srovnání s mastnými kyselinami zmíněnými výše jsou tyto mastné kyseliny v potravinářství a ve výživě méně důležité. Z cyklických kyselin jsou známé prostaglandiny (místní hormony) případně thromboxany (krevní destičky) [1, 2].

2.3.5 Esenciální a neesenciální mastné kyseliny

Další možné dělení mastných kyselin je na esenciální a neesenciální. Kromě mastných kyselin, které člověk přijímá v potravě, je on sám schopen nasycené a některé nenasycené mastné kyseliny syntetizovat. Těmto kyselinám se říká neesenciální mastné kyseliny. Jsou však i mastné kyseliny, které člověk musí přijímat výhradně z potravy, protože není schopen tyto kyseliny syntetizovat – proto jsou pro něj esenciální. Jedná se o kyselinu α -linolenovou, kyselinu linolovou a kyselinu arachidonovou (také známé pod názvem Omega 3 a Omega 6 mastné kyseliny). Všechny tři esenciální kyseliny hrají důležitou roli ve výživě člověka [1].

2.4 Metody vhodné pro stanovení mastných kyselin

Celý proces stanovení mastných kyselin má několik dílčích kroků: vzorkování, extrakce, frakcionace, esterifikace a vlastní stanovení pomocí chromatografických metod (samostatná podkapitola je věnována plynové chromatografii).

2.4.1 Vzorkování

Při odběru vzorku je třeba dbát na to, aby byl stejného složení jako je složení celého zkoumaného výrobku. Vzhledem k homogenitě zkoumaných výrobků (sýr, olej) je možné uvažovat i stejné složení vzorku. Pokud vzorek není ihned podroben analýze, je nutné ho uschovat za nízké teploty v uzavřené nádobě [11–13].

2.4.2 Extrakční metody

Druhým krokem je extrakce, tj. způsob izolace mastných kyselin (lipidů) ze vzorku. Použitá extrakční metoda závisí na druhu vzorku – pro každý vzorek je preferován jiný způsob extrakce. Dále je třeba zohlednit teplotu, protože působením vyšších teplot je možné aktivovat lipolytické enzymy ve vzorku, které mají vliv na kvantitativní výsledek extrakce [14].

2.4.2.1 *Extrakce podle Soxhleta*

Soxhletova extrakce se používá pro stanovení celkového obsahu lipidů ve vzorku. Homogenizovaný vzorek se přenese do extrakční patrony, která je utěsněna vatovou zátkou a následně umístěna do Soxhletova extraktoru. Přes chladič se nalije rozpouštědlo (petrolether) do předem zvážené destilační baňky, a extrahuje se podle druhu potraviny 4 až 5 hodin. Poté se rozpouštědlo oddestiluje, baňka se nechá sušit do konstantní hmotnosti a po ochlazení v exsikátoru se zváží [14].

2.4.2.2 *Extrakce podle Folche*

Homogenizovaný vzorek je v kádince za stálého míchání extrahován směsí rozpouštědel chloroform/methanol v poměru 2:1 (v/v). Poté se nerozpuštěné podíly odstraní filtrací nebo centrifugací, a celý extrakční krok se znovu opakuje s polovičním množstvím rozpouštědla. Získané extrakty se smíchají a nelipidické podíly se odstraní přidávkem vody. Poté je vzorek odstředěn, horní část se odebere a spodní část se prosuší bezvodým síranem sodným a zfiltruje do předem zvážené destilační baňky. Následuje odpaření rozpouštědla na vakuové rotační odparce a zvážení vyextrahovaného tuku [15].

2.4.2.3 *Extrakce směsí diethyletheru a petroletheru*

Tato normovaná extrakce využívá směsi diethylether/petrolether v poměru 1:1 (v/v). Do zkumavky se odváží homogenizovaný vzorek, přidá se k němu kyselina chlorovodíková a směs se nechá zahřívát na vodní lázni při 80 °C, aby došlo k rozpuštění netukových látek. Následně je směs ochlazená pod tekoucí vodou a je ethanolem převedena do dělicí nálevky. Dalším krokem je přidávek extrakčních činidel a poté je směs protřepávána. Vždy po protřepání se nechá směs odstát do rozdělení fází a horní fáze je odebrána do předem zvážené destilační baňky. Celkem se provedou tři extrakce vždy s polovičním množstvím rozpouštědla. Extrakty se poté smíchají a baňka je umístěna na vakuovou rotační odparce. Posledním krokem je zvážení vyextrahovaného tuku [16].

2.4.3 Frakcionace lipidů

Pokud chceme stanovit konkrétně frakci volných mastných kyselin, je třeba před samotnou esterifikací zařadit krok frakcionace lipidů, např. pomocí metody SPE (*Solid-Phase Extraction*). Jednotlivé frakce lipidů, tedy volné mastné kyseliny a směs mono-, di-, a triacylglycerolů, jsou separovány v SPE kolonce na základě rozdílných interakcí s vhodným sorbentem (např. NH₂-kolonky). Navíc je využíváno elučních sil různých rozpouštědel. Z první

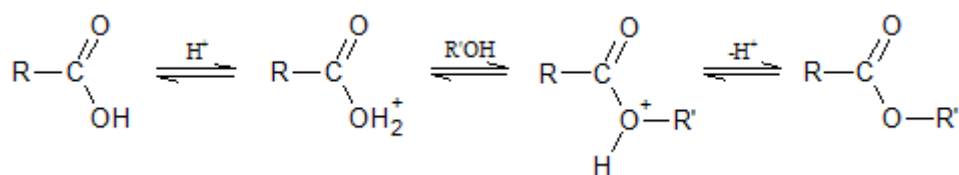
eluce lze získat směs acylglycerolů za použití eluční směsi chloroform/propanol v poměru 2:1 (v/v). Druhou elucí lze získat volné mastné kyseliny s použitím 2% kyseliny octové v diethyletheru. V obou případech se frakce jímají do předem zvážených destilačních baněk s kulatým dnem. Po ukončení frakcionace je rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce, výtěžek může být zvážen a ihned poté podroben esterifikaci [17].

2.4.4 Esterifikace

Pro vlastní stanovení mastných kyselin se nejčastěji používá plynová chromatografie, což znamená, že je nutné je převést na těkavější deriváty; lze připravit různé alkylderiváty, nejčastěji jde ale o methylestery, které mají ze všech příbuzných esterů největší těkavost. Toho lze dosáhnout několika esterifikačními postupy [18, 19].

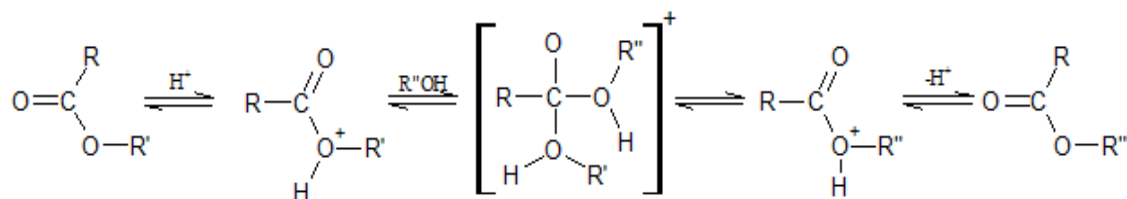
2.4.4.1 Kyselá katalyzovaná esterifikace (transesterifikace)

Metoda kyselé esterifikace (viz Obrázek 5) je vhodnou metodou pro esterifikaci volných mastných kyselin. Probíhá v přebytku bezvodého methanolu za zvýšené teploty v přítomnosti kyselých katalyzátorů jako jsou například HCl, H₂SO₄, BF₃ aj. Všechny zmíněné kyselá katalyzátory musí být také bezvodé, proto se připravují tak, že se v plynném stavu nechají probublávat přes bezvodý methanol (vznikají tak vlastně jejich methanolické roztoky). Přítomnost vody by znamenala vznik původní kyseliny [18, 19, 20].



Obrázek 5: Schéma kyselá esterifikace.

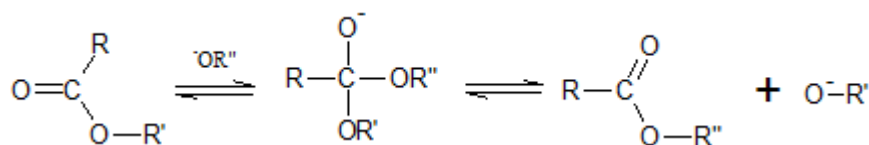
Kromě toho, že při kyselá katalyzované esterifikaci reagují volné mastné kyseliny, reagují také vázané mastné kyseliny, a to mechanismem kyselá katalyzované transesterifikace (viz Obrázek 6). Jelikož tato reakce trvá o poznání déle, je nutné pro dobrý výtěžek obsahující výhradně volné mastné kyseliny nechat směs reagovat jen několik málo minut [17].



Obrázek 6: Schéma kyselá katalyzované transesterifikace.

2.4.4.2 Bazický katalyzovaná transesterifikace

Transesterifikace může probíhat i za bazický katalýzy (viz Obrázek 7). Tato reakce probíhá za mírných podmínek v nadbytku bezvodého methanolu v přítomnosti silné báze, například NaOH, KOH, případně amonné soli. V praxi se připravují bezvodé methanolické roztoky těchto solí [18, 19].



Obrázek 7: Schéma bazicky katalyzované transesterifikace.

Bazickou transesterifikací reagují pouze vázané mastné kyseliny, protože z volných mastných kyselin v bazickém prostředí vznikají anionty, které nejsou kvůli zápornému náboji cílem nukleofilního útoku báze [18, 19].

2.4.5 Stanovení mastných kyselin pomocí chromatografických metod

Kromě stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií, které je věnovaná vlastní podkapitola, lze provést jejich kvantitativní i kvalitativní stanovení i dalšími chromatografickými metodami.

Jednou z možností je použití kapalinové chromatografie, nejčastěji v podobě vysokoúčinné kapalinové chromatografie (*HPLC – High Performance Liquid Chromatography*). Jako mobilních fází se zde používá kombinace směsi methanolu, vody, dále hexanu, acetonitrilu apod. Kolony jsou buď skleněné nebo ocelové, obsahují různé stacionární fáze, například jsou známy C_8 kolony či *Silica* kolony. Metod detekce je také celá řada, od hmotnostní spektrometrie (*MS – Mass Spectrometry*), přes vakuové UV detektory, až po detektory fluorimetrické [21–24].

Další možností je použití tenkovrstvé chromatografie (*TLC – Thin Layer Chromatography*). Pomocí této metody je možné určit například molekulovou hmotnost, případně délku uhlíkatého řetězce či zastoupení jednotlivých mastných kyselin porovnáním s naneseným standardem o známém složení. Pro tuto metodu se používají destičky pokryté silikagelem. Vzorek je možno rozpustit například v etheru a pomocí kapiláry jej nanést na předem připravenou startovní čáru kousek od okraje destičky. Následně je destička vysušena a umístěna do chromatografické komory obsahující eluční činidlo (například směs butanolu a vody). Eluční činidlo se nechá vystoupat do určité výše od startovní čáry, a označí se konec. Destička je poté vysušena a postříkána roztokem kyseliny sírové obsahující dichroman draselný, což umožní vybarvení vzorku v podobě skvrn. Změřením vzdáleností jednotlivých skvrn od startu a vzdálenosti startu a konce lze jednoduše poměrem těchto dvou hodnot určit tzv. retardační faktor, který je pro každou mastnou kyselinu při daném měření specifický [25, 26].

2.5 Stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie

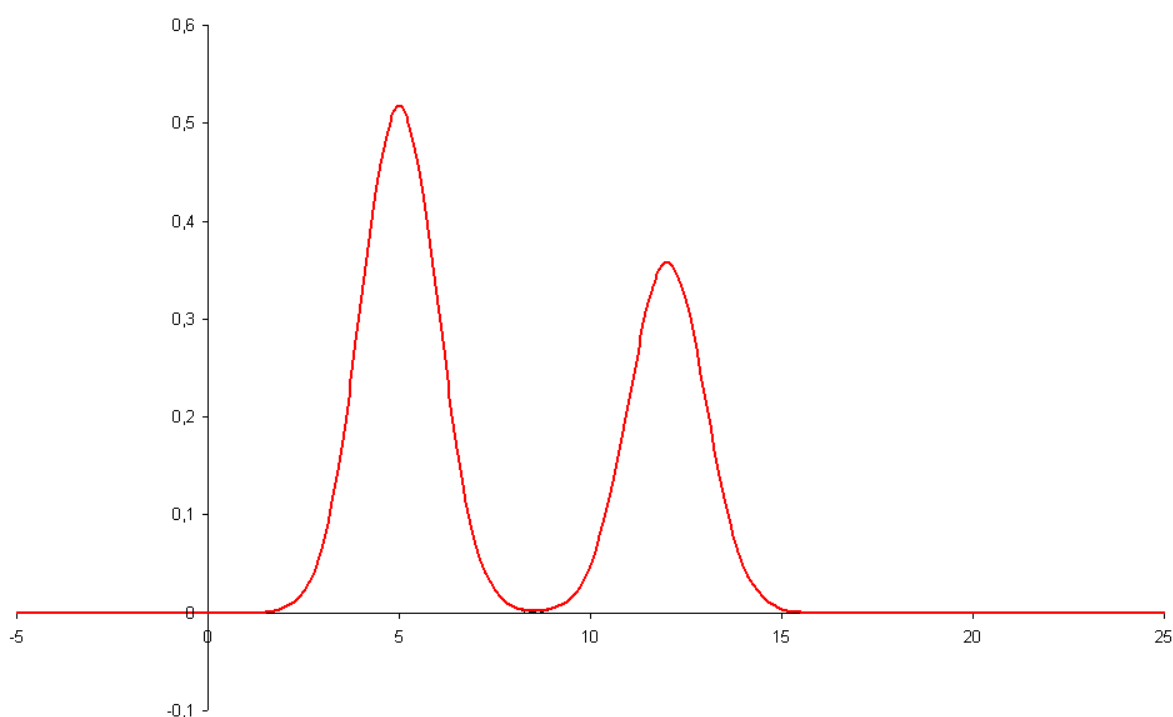
Metoda plynové chromatografie je oblíbenou metodou pro stanovení látek, které lze snadno převést do plynného stavu. Zejména se jedná o těkavé sloučeniny, v našem případě methylestery mastných kyselin [14, 27, 28].

2.5.1 Princip plynové chromatografie

Plynová chromatografie je separační analytická metoda, která využívá k dělení směsi látek systém s plynnou mobilní (pohyblivou) fází. Nejčastěji se používá eluční technika vnášení vzorku po jednorázovém nástřiku na kolonu. Jednotlivé složky vzorku jsou v koloně separovány na základě odlišných interakcí se stacionární (nepohyblivou) fází a následně postupně eluovány (vymývány) nosným plynem. Nosný plyn musí být inertní a nesmí jakkoli

interagovat s mobilní či stacionární fází, ani s jednotlivými složkami směsi. Frakce směsi jsou pak na výstupu z kolony detekovány, a signál, který odpovídá jejich koncentraci v nosném plynu, je registrován jako funkce času nebo objemu. Nejčastěji se setkáme se dvěma základními variantami plynové chromatografie: adsorpční (plyn-pevná stacionární fáze), která je použitelná v omezené míře pro plyny a některé kapaliny o nízké molekulové hmotnosti; a rozdělovací, která využívá jako stacionární fázi film netěkavé kapaliny na povrchu tuhého nosiče s minimálními adsorpčními vlastnostmi. Separace se provádí buď při konstantní nebo proměnlivé teplotě (tzv. izokratická, resp. gradientová eluce) [27, 29].

Finálním výstupem z měření je chromatogram, kde mají jednotlivé látky ze směsi podobu tzv. chromatografického píku, který by v ideálním případě měl mít Gaussovský tvar (viz Obrázek 8) [27, 29].



Obrázek 8: Příklad ideálního průběhu chromatografických píků [30].

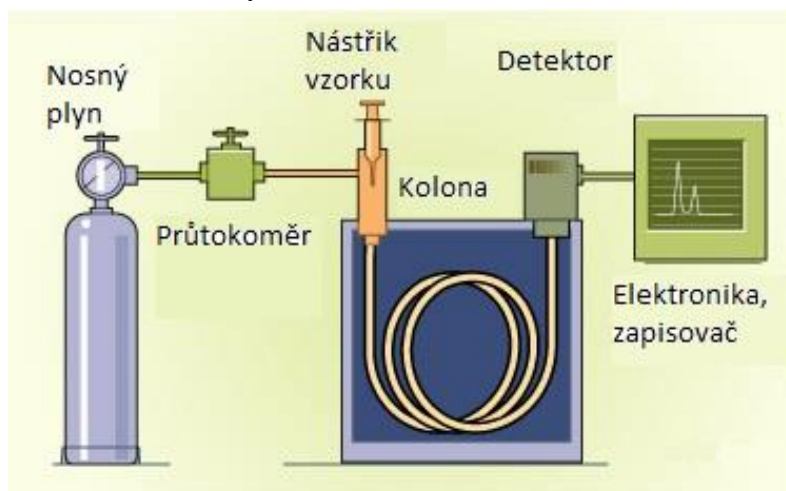
Z chromatogramu je pak možné vyčíst výsledky kvalitativního i kvantitativního charakteru.

Kvalitativní výsledek čili identifikaci jednotlivých látek ve směsi, lze získat z polohy píku na vodorovné ose. Jelikož dochází k postupnému eluování jednotlivých frakcí, jsou i tyto frakce postupně zaznamenány detektorem, a pro každou z nich je specifický tzv. retenční čas (tj. čas od nástřiku na kolonu po detekci na výstupu kolony). Porovnáním retenčních časů neznámého vzorku a standardního vzorku, na který je daná metoda kalibrována, jsme pak schopni určit jednotlivé složky směsi.

Kvantitativní výsledek neboli množství dané frakce ve směsi (často v podobě koncentrace), je možné obdržet z výšky píku, respektive výpočtem jeho plochy pomocí integrace. Často už je ale plocha píku automaticky vypočítána systémem. Přepočtem na navážku vzorku je pak možné určit konkrétní obsah určité frakce v celém vzorku [14, 29].

2.5.2 Instrumentace plynové chromatografie

Zařízení pro plynovou chromatografii se skládá z několika částí. Zpravidla se jedná o zdroj nosného plynu (mobilní fáze), nástřikového bloku (injektoru), chromatografické kolony umístěné v termostatu, detektoru a vyhodnocovacího zařízení (viz Obrázek 9) [14, 27, 29].



2.5.2.1 Mobilní fáze, nosný plyn

Jak bylo zmíněno výše, jako mobilní fáze se používá inertní plyn, který má hlavní úkol transportovat složky vzorku kolonou. Nejčastěji se používá vodík, dusík, helium nebo argon podle zvoleného způsobu detekce. Zdrojem nosného plynu jsou tlakové lahve nebo generátory (pracující např. na principu molekulových sít). Vlastní průtok nosného plynu je pak regulován mechanickými nebo elektronickými regulátory [27, 29].

2.5.2.2 Injektory

Pomocí injektoru je možné dávkovat vzorek na začátek kolony, převést ho do plynného stavu a poté vnést do proudu nosného plynu. Dávkování probíhá buď ručně nebo automaticky, a to pomocí mikrostříkačky nebo dávkovacího ventilu. Vzorek může být dávkován buď nad ústí kolony umístěné na konci injektoru (zpravidla u náplňových kolon), nebo přímo na kolonu (především v případě kapilárních kolon). V rámci dávkování přímo na kolonu existuje několik provedení v závislosti na požadavcích analýzy: dávkování s děličem toku (*Split injector*) pro vzorky s velkým množstvím analyzovaných složek (především kvalitativní zastoupení složek), bez děliče toku (*Splitless injector*) pro analýzu zředěných vzorků (hlavně kvantitativní stanovení), přímo do kapilární kolony (*On column injector*) pro vzorky rozkládající se těsně nad bodem varu, nebo s programově zvyšovanou teplotou vypařování vzorku [27].

2.5.2.3 Stacionární fáze, kolony

V koloně dochází k vlastnímu rozdělení vzorku na jednotlivé frakce. V praxi rozeznáváme pro plynovou chromatografii dva druhy kolon – náplňové a kapilární.

Náplňové kolony se vyrábí z kovu (hliník, měď, nikl nebo nerezová ocel), nebo ze skla. Vnitřní průměr těchto kolon je 2–6 mm a jejich délka je 1–5 m. Náplň těchto kolon jsou různé druhy adsorbentů na bázi silikagelů a aktivního uhlí, případně molekulová síta.

Kapilární kolony jsou skleněné, křemenné, plastové nebo kovové kapiláry. Jejich vnitřní průměr je 100–700 μm a jejich délka se pohybuje v rozmezí 15–100 m. Stacionární fáze je

v tomto případě nanese na vnitřní straně kapiláry, případně je kapilára stacionární fází naplněna v celém objemu. Kvůli zpevnění se křemenné kapiláry vyrábí s polyimidovým potahem. Podle charakteru stacionární fáze nanášené na vnitřní stěnu kapiláry se rozlišují kolony s kapalnou stacionární fází WCOT (*Wall-Coated Open Tubular*), kolony s kapalnou stacionární fází zakotvenou na vnitřní stěně kapiláry pomocí nosiče SCOT (*Support-Coated Open Tubular*), a kolony s vrstvou pevného aktivního sorbentu PLOT (*Porous-Layer Open Tubular*) [27, 32].

2.5.2.4 Termostat kolon

Termostatem je udržována konstantní teplota kolony případně injektoru a jeho činností je tvořen program pro gradientovou eluci. Požadavkem je teplotní stabilita uvnitř termostatu a možnost přesné regulace teploty. Právě kvůli přesné regulaci teploty se používá hlavně vzduchový termostat [14, 33].

2.5.2.5 Detektory

Detektory slouží k zaznamenání změny složení protékající mobilní fáze, přičemž tuto změnu převádí na elektricky měřitelné veličiny. Detektor reaguje buď na koncentraci nebo na množství složky vstupující do detektoru (koncentračně, resp. hmotnostně závislé detektory). Základní vlastnosti detektorů jsou citlivost, odezva, rychlost odezvy, šum produkovaného signálu, nejmenší detekovatelná koncentrace, efektivní objem a lineární dynamický rozsah odezvy (odezva závislá na koncentraci) [27].

V plynové chromatografii se využívá široké škály detektorů: tepelně vodivostní (TCD – *Thermal Conductivity Detector*), plamenový ionizační (FID – *Flame Ionization Detector*), plamenový termoionizační (AFID, TID – *Alkali Flame Ionization Detector*, *Thermionic Ionization Detector*), plamenový fotometrický detektor (FPD – *Flame Photometric Detector*) a detektor elektronového záhytu (ECD – *Electron Capture Detector*) [27, 29, 32].

Pro účely stanovení MK byl použitý plynový chromatograf s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID – *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector*).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité laboratorní vybavení a chemikálie

3.1.1 Laboratorní přístroje

- Váhy analytické GR-202-EC, HELAGO, Itálie
- Vodní lázeň se stojany, Julabo TW 2, Německo
- Topné hnízdo 100 ml, BRNĚNSKÁ DRUTĚVA v.d., Česká republika
- Plynový chromatograf TRACE GC 2000, (ThermoQuest Italia S. p. A, Itálie) s plameno-ionizačním detektorem, split/splitless injektorem a s kapilární kolonou DB 23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
- PC-pracovní stanice, POWER PROFIT
- Digestoř
- Vakuová rotační odparka, KIKA®-WERKE, Německo
- Lednice a mrazák ERB nerez, Elektrolux, Švédsko
- Sušárna, Memmert
- Supelco Visiprep™ SPE Manifold, SIGMA-ALDRICH, Německo
- SampliQ Silica Amino (NH₂) SPE kolonky, Agilent Technologies, USA

3.1.2 Laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Automatická mikropipeta 100–1 000 µl, labopette®, Německo
- Automatická mikropipeta 100–1 000 µl, sartorius, Německo
- Automatická mikropipeta 10–100 µl, BIOHIT, Finsko
- Vialky
- Nože, špachtle, struhadlo
- Parafilm, PECHIENY PLASTIC PACKAGING

3.1.3 Chemikálie pro kyselou esterifikaci

- Bortrifluorid methanolický roztok 10 %, SIGMA-ALDRICH, Německo
- Isooktan p. a., SIGMA-ALDRICH, Německo
- Chlorid sodný p. a., PENTA, Česká republika
- Destilovaná voda, FCH VUT
- Síran sodný bezvodý p. a., Lach:ner, Česká republika
- Methanol p. a., Lach:ner, Česká republika
- Hydroxid sodný p. a., PENTA, Česká republika

3.1.4 Chemikálie pro frakcionaci lipidů

- Hexan p. a., Lach:ner, Česká republika
- Chloroform p. a., PENTA, Česká republika
- Diethylether p. a., PENTA, Česká republika
- Propanol p. a., PENTA, Česká republika
- Kyselina octová 99 % p. a., PENTA, Česká republika

3.1.5 Chemikálie pro stanovení mastných kyselin

- Hexan p. a., Lach:ner, Česká republika
- Směsný standard metylesterů mastných kyselin, Supelco™ 37 Component FAME Mix, SIGMA-ALDRICH, Německo

3.1.6 Plyny pro plynový chromatograf

- Vodík 5.5, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem
- Vzduch 5.0, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem
- Dusík 5.0, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

3.2 Analyzované vzorky

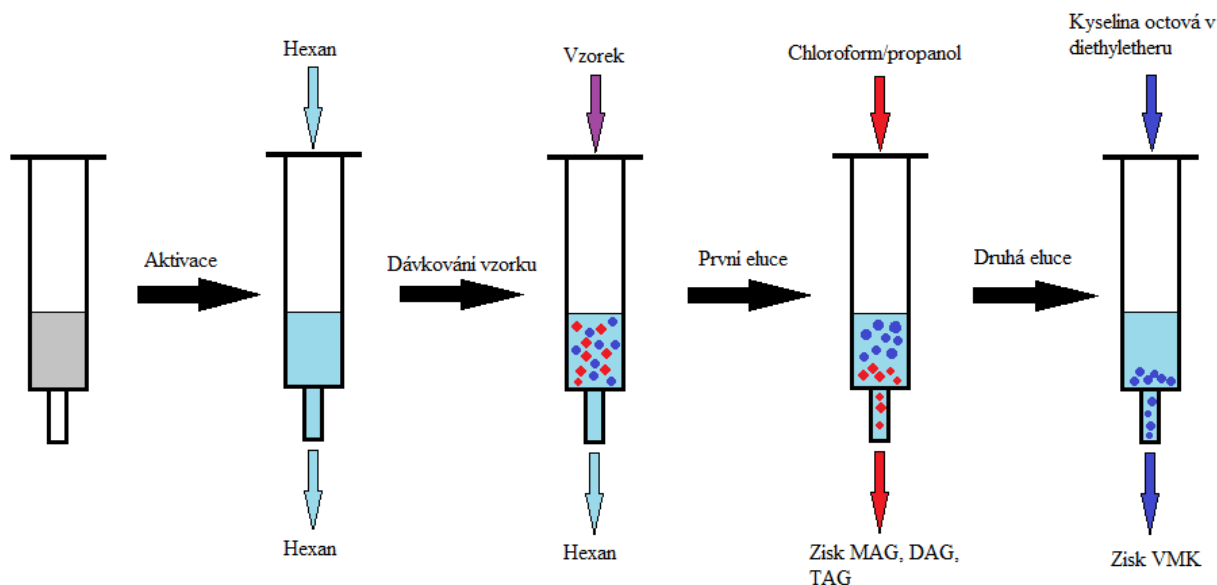
Pro ověření opakovatelnosti/reprodukovatelnosti byl jako testovací vzorek použit slunečnicový olej zakoupený v běžné obchodní síti. Vzorek byl uchováván v chladničce při teplotě 5 °C.

3.3 Použité metody a experimentální postupy

3.3.1 Frakcionace lipidů metodou SPE

Postup frakcionace je schematicky uveden na Obrázku 10. SPE kolonky byly zasunuty do otočných ventilů umístěných v horní části zařízení SPE Manifold (viz Obrázek 11), ve kterém bylo pomocí vodní vývěvy vytvořeno vakuum. Nejprve bylo nutné aktivovat kolonky 3 ml hexanu, přičemž v průběhu celého procesu nesměla náplň kolonky vyschnout. Průtok hexanu i elučních rozpouštědel bylo možné kontrolovat pomocí otočného ventilu (rychlost přibližně jedna až dvě kapky za sekundu). Po promytí hexanem byl na kolonku nadávkován vzorek (buď dávkováno 100 µl oleje přímo na kolonku, nebo bylo těchto 100 µl nejprve rozpuštěno v 1 ml hexanu a až poté dávkováno).

Na první eluci, tedy pro získání MAG, DAG a TAG (dále pro zjednodušení označována jako frakce TAG), bylo použito 7 ml eluční směsi chloroform/propanol 2:1 (v/v). Na druhou eluci, tedy pro získání VMK, bylo použito 7 ml 2% roztoku kyseliny octové v diethyletheru. Obě frakce byly zvlášť zachyceny do předem zvážených a vysušených 50ml destilačních baněk s kulatým dnem. Rozpouštědlo bylo poté odpařeno na vakuové rotační odparce a jednotlivé frakce mohly být stanoveny gravimetricky. Ihned po zvážení byly tyto frakce podrobeny esterifikaci. Eluční činidla bylo nutné připravovat těsně před zahájením frakcionace, kvůli jejich vysoké těkavosti (mohlo by dojít ke změně poměru rozpouštědel, případně ke změně koncentrace elučního roztoku).



Obrázek 10: Průběh frakcionace vzorku.



Obrázek 11: Zařízení SPE Manifold s NH_2 -kolonkami.

3.3.2 Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem (TAG)

Destilační baňka se 100 μl oleje či s frakcí TAG byla umístěna do topného hnízda, byly přidány 4 ml methanolického roztoku NaOH ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a varný kamínek. Baňka byla osazena zpětným chladičem a byl započat ohřev. Obsah baňky byl vařen, dokud nevymizely kapičky tuku (5–10 minut). Každých 30 sekund bylo zapotřebí krouživými pohyby promíchat obsah baňky, aby nedocházelo ke srážení NaOH na jejích stěnách.

Po rozpuštění veškerého tuku bylo přes zpětný chladič pipetováno 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu. Přesně po 3 minutách byly přes chladič pipetovány 3 ml isooktanu,

destilační baňka byla vyjmuta z topného hnízda a var byl zastaven. Ihned bylo do směsi přidáno 20 ml nasyceného vodného roztoku NaCl, baňka byla uzavřena a protřepána. Poté byla doplněna roztokem NaCl až po hrdlo baňky, aby bylo zřetelně vidět rozhraní dvou fází. Baňka se nechala 5 minut odstát k řádnému rozdělení fází.

Z horní isooktanové vrstvy byly odpipetovány 2 ml do 4ml vialky. Na prosušení vzorku bylo do vialky přidáno malé množství bezvodého síranu sodného, a z takto upraveného roztoku byl odebrán 1 ml vzorku do vialky k analýze na plynovém chromatografu.

Příprava methanolického roztoku NaOH ($c = 0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)

Do odměrné baňky (100 ml) byly naváženy 2 g NaOH, které byly posléze rozpuštěny za mírného ohřevu na vodní lázni ve 100 ml methanolu. Takto připravený roztok je možné skladovat v chladničce maximálně tři měsíce.

3.3.3 Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem (VMK)

Postup při esterifikaci VMK se liší pouze v tom, že se zde vynechává první krok – přidavek methanolického roztoku NaOH. Do baňky obsahující olej nebo frakci VMK byly tedy rovnou pipetovány 4 ml methanolického roztoku bortrifluoridu a směs byla přivedena k varu. Po 3 minutách byly přidány 3 ml isooktanu, baňka byla vyjmuta z topného hnízda a var byl ukončen.

Stejně jako v předchozím případě bylo zde přidáno 20 ml nasyceného vodného roztoku NaCl, a směs byla protřepána. Dále byla baňka doplněna roztokem NaCl až po hrdlo a ponechána stát k rozdělení fází. Hned na to byla odebrána horní vrstva, ta byla prosušena bezvodým síranem sodným a 1 ml upraveného vzorku byl opět převeden do vialky k analýze na plynovém chromatografu.

Vzhledem k toxicitě bortrifluoridu bylo nezbytné celý proces provádět v digestoři, navíc všechno sklo muselo být po jeho použití co nejrychleji umyto vodou.

3.4 Podmínky stanovení methylesterů mastných kyselin

- **Plynový chromatograf** TRACE GC (ThermoQuest Italia S. p. A)
- **Autosampler** AI/AS 3000
- **Kapilární kolona** DB 23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25 μm
- **Oven-teplotní program:**
 - 60 °C 10 minut
 - Vzestupný gradient 12 °C·min⁻¹ do 200 °C s výdrží 10 minut
 - Vzestupný gradient 5 °C·min⁻¹ do 220 °C s výdrží 15 minut
 - Vzestupný gradient 10 °C·min⁻¹ do 240 °C s výdrží 7 minut
- **Vstup:**
 - Teplota injektoru: 250 °C
 - Doba bezděličového dávkování: 5 minut
 - Dávkování: autosampler bez děliče toku (splitless) 1 μl
- **Nosný plyn:**
 - Průtok dusíku: 0,5 ml·min⁻¹
- **Plameno-ionizační detektor (FID):**
 - Teplota detektoru: 250 °C
 - Průtok vzduchu: 350 ml·min⁻¹

- Průtok vodíku: 35 ml·min⁻¹
- Make-up dusíku: 30 ml·min⁻¹

3.5 Identifikace mastných kyselin

Mastné kyseliny v oleji byly stanoveny jako methylestery (MEMK) pomocí plynové chromatografie. Identifikace MEMK byla provedena na základě srovnání retenčních časů identických standardů. Potřebné parametry standardů byly převzaty z práce Kovala [34] a jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled standardů pro identifikaci MEMK.

	Mastná kyselina (triviální názvy)	Ret. čas (min)
C6:0	kapronová	5,74
C8:0	kaprylová	6,87
C10:0	kaprinová	8,01
C11:0	undekanová	8,64
C12:0	laurová	9,37
C13:0	tridekanová	10,20
C14:0	myristová	11,19
C14:1	myristoolejová	11,67
C15:0	pentadekanová	12,35
C15:1	pentadecenová	12,92
C16:0	palmitová	13,72
C16:1	palmitoolejová	14,19
C17:0	heptadekanová	15,25
C17:1	heptadecenová	15,79
C18:0	stearová	16,99
C18:1	olejová	17,47
C18:2	linolová	18,46
C18:3n6	gama-linolenová	19,21
C18:3n3	linolenová	20,02
C20:0	arachová	21,56
C20:1	eicosenová	22,30
C20:2	eicosadienová	23,93
C21:0	heneicosanová	24,80
C20:3n6	eicosatrienová 6	25,02
C20:3n3	eicosatrienová 3	25,99
C20:4	arachidonová	26,47
C20:5 a C22:0	behenová	28,96
C22:1	eruková	30,16

Tabulka 1 – pokračování.

	Mastná kyselina (triviální názvy)	Ret. čas (min)
C22:2	docosadienová	32,90
C23:0	trikosanová	34,29
C24:0	lignocerová	41,21
C24:1	nervonová	43,29
C22:6	docosahexaenová	43,79

Statistické vyhodnocení výsledků

Všechna data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu Microsoft Excel 2016. Každé měření bylo provedeno třikrát, resp. pětkrát ($n = 3$ resp. $n = 5$), zvláště pro VMK a TAG.

Zastoupení MK je vyjádřeno semikvantitativně jako plocha píku na chromatogramu a opakovatelnost/reprodukovatelnost je vyjádřena formou relativní směrodatné odchylky (RSD).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci našeho ústavu se zabýváme problematikou sýrů nejrůznějších typů a lipidů v nich obsažených. K této problematice byla vyvinuta analytická metoda pro stanovení mastných kyselin. Mastné kyseliny se v sýrech nacházejí jednak ve formě vázané (mono-, di- a triacylglycerolů) a jednak ve formě volné. Vzhledem k tomu, že volné MK hrají významnou roli v chuti/aroma sýrů, pokoušíme se již zavedenou metodu rozšířit o možnost stanovení i volných MK. Kompletní proces optimalizace a validace metody je popsán v práci Kovala [34], cílem této bakalářské práce bylo ověřit opakovatelnost/reprodukovatelnost, především metody stanovení VMK.

Opakovatelnost metody vyjadřuje těsnost shody mezi výsledky nezávislých měření získaných použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týmž pracovníkem za použití týchž přístrojů v krátkém časovém rozmezí [35].

Reprodukovatelnost také vyjadřuje těsnost shody mezi výsledky, ale za odlišných podmínek: jednotlivá měření jsou provedena s různými měřicími přístroji, různými pracovníky, v různých laboratořích, po časovém intervalu dostatečně dlouhém ve srovnání s délkou trvání jednotlivého měření, za různých obvyklých podmínek provozu užívaných přístrojů [35].

Vzhledem k tomu, že opakovatelnost extrakce tuku ze vzorku sýrů již byla ověřena v práci Kovala [34], dosažené RSD byly cca do 12 %, pro zjednodušení byl v rámci této práce použit vzorek slunečnicového oleje, čímž odpadá zdlouhavý proces extrakce. Pro esterifikaci MK byla použita kyselá esterifikace s BF_3 jako katalyzátorem, vzniklé MEMK byly stanoveny plynovou chromatografií s FID detekcí. Přesný postup a podmínky stanovení jsou uvedeny v kap. 3.3.

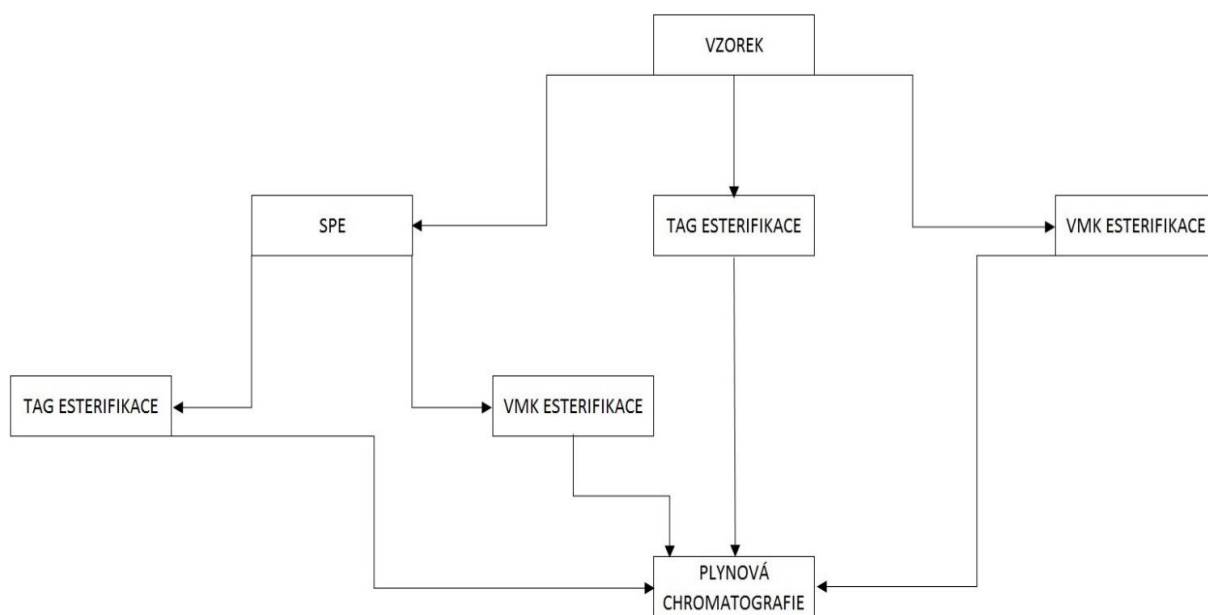
4.1 Možnosti stanovení volných mastných kyselin

Jak již bylo zmíněno, pro stanovení VMK se v praxi používá předběžná frakcionace, kdy se VMK oddělí od ostatních lipidických frakcí; v rámci našich experimentů bylo testováno použití metody SPE (viz kapitola 2.4.3).

Vzhledem k tomu, že použití SPE má své nevýhody: nižší výtěžnost, vysoká cena SPE kolonek aj., byla zároveň testována možnost přímé esterifikace VMK. Tato metoda je založena na předpokladu, že VMK jsou esterifikovány podstatně rychleji, než jsou ostatní lipidy transesterifikovány. Funguje však spolehlivě pouze za ideálních podmínek, je tedy nezbytné dodržovat konstantní veškeré parametry metody. Pro stanovení VMK není nutné předchozí zmýdelnění s NaOH a estery se mohou připravit přímo reakcí s BF_3 (viz kapitola 3.3.3) [12].

4.2 Porovnání reprodukovatelnosti metod

V prvním experimentu byla porovnána reprodukovatelnost obou výše zmíněných metod – s/bez předchozí frakcionace metodou SPE. Uspořádání experimentu je uvedeno na Obrázku 12.



Obrázek 12: Uspořádání experimentu – schéma analýzy vzorku; SPE – frakcionace lipidů metodou SPE; TAG – frakce acylglycerolů; VMK – frakce volných mastných kyselin.

Tabulka 2: Reprodukovatelnost metod s/bez předchozí frakcionace metodou SPE pro vybrané mastné kyseliny.

MK	TAG SPE	TAG	VMK SPE	VMK
RSD [%]				
laurová	11,6	19,4	18,3	nd
myristová	17,8	20,6	13,1	25,4
pentadekanová	19,1	16,9	nd	nd
palmitová	4,5	10,3	11,1	10,6
palmitoolejová	3,9	18,1	nd	nd
heptadekanová	11,2	10,3	nd	nd
stearová	3,4	9,6	12,6	18,8
olejová	1,4	3,5	11,9	4,6
linolová	1,1	3,3	25,3	9,9
linolenová	5,1	4,9	nd	11,3
arachová	1,3	5,9	nd	nd

TAG – frakce acylglycerolů; VMK – frakce volných mastných kyselin; nd – nebylo detekováno.

Reprodukovatelnost byla ověřena sérií 3 experimentů (u obou metod) téhož vzorku oleje, realizovaných čtyřmi osobami v průběhu několika dnů. Výsledky RSD (ploch piků) jednotlivých vybraných MK jsou uvedeny v Tabulce 2. Hodnoty RSD získaných frakcí se pohybovaly v rozsahu:

- Metoda s předchozí frakcionací SPE – TAG 1,1–19,1 %; VMK 11,1–25,3 %,
- Metoda bez předchozí frakcionace SPE – TAG 3,3–20,6 %; VMK 4,6–25,4 %.

Metoda je považována za dostatečně přesnou, pokud RSD nepřesáhnou 10 % [35]. Z výsledků je patrné, že metoda vykazuje vyšší přesnost pro stanovení TAG než pro VMK. VMK se v tucích i sýrech nacházejí v nízkých koncentracích (< 1 %) a jejich detekce je tedy obtížnější. Některé se pravděpodobně mohou nacházet i pod LOD metody.

Co se týká porovnání SPE/bez SPE, z Tabulky 2 nejsou patrné významné rozdíly, reprodukovatelnost obou metod je srovnatelná. Metoda přímé esterifikace je však jednodušší a rychlá a pro rutinní využití vhodnější.

4.3 Ověření opakovatelnosti metody stanovení volných mastných kyselin

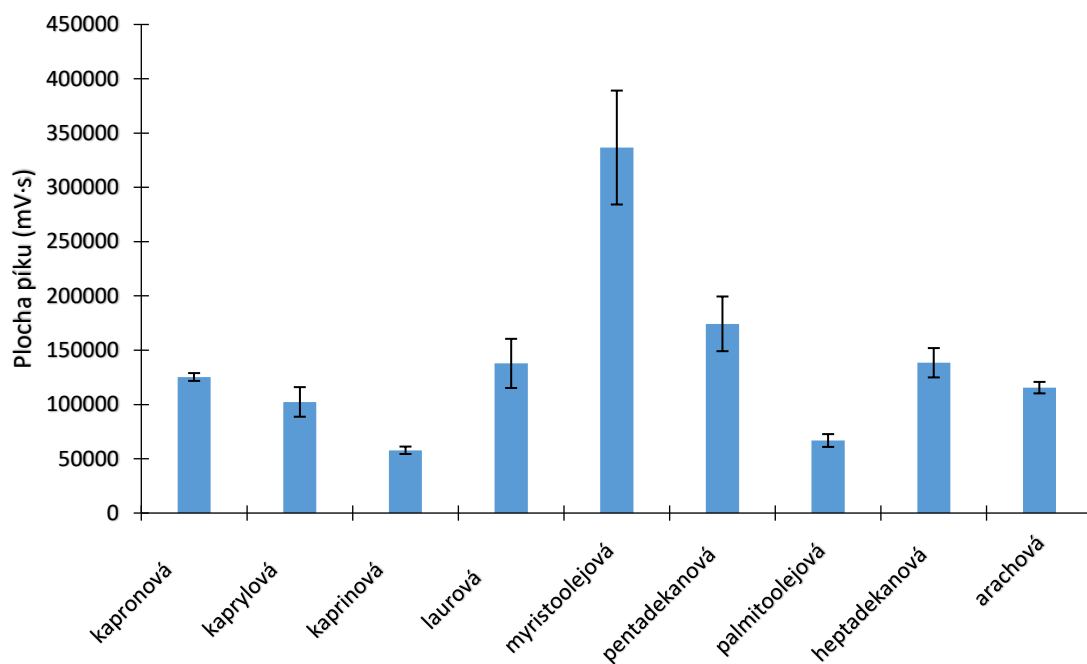
Hlavním cílem této práce bylo ověřit opakovatelnost metody stanovení VMK. Na základě provedených experimentů byla vybrána metoda s přímou esterifikací VMK především pro svou jednodušost.

Opakovatelnost této metody byla ověřena sérií 5 experimentů téhož vzorku oleje, realizovaných jednou osobou v jednom dni. Výsledky RSD jednotlivých vybraných MK jsou uvedeny v Tabulce 3. Hodnoty RSD se pro vybrané MK v tomto případě pohybovaly od 2,9 % do 16,4 %.

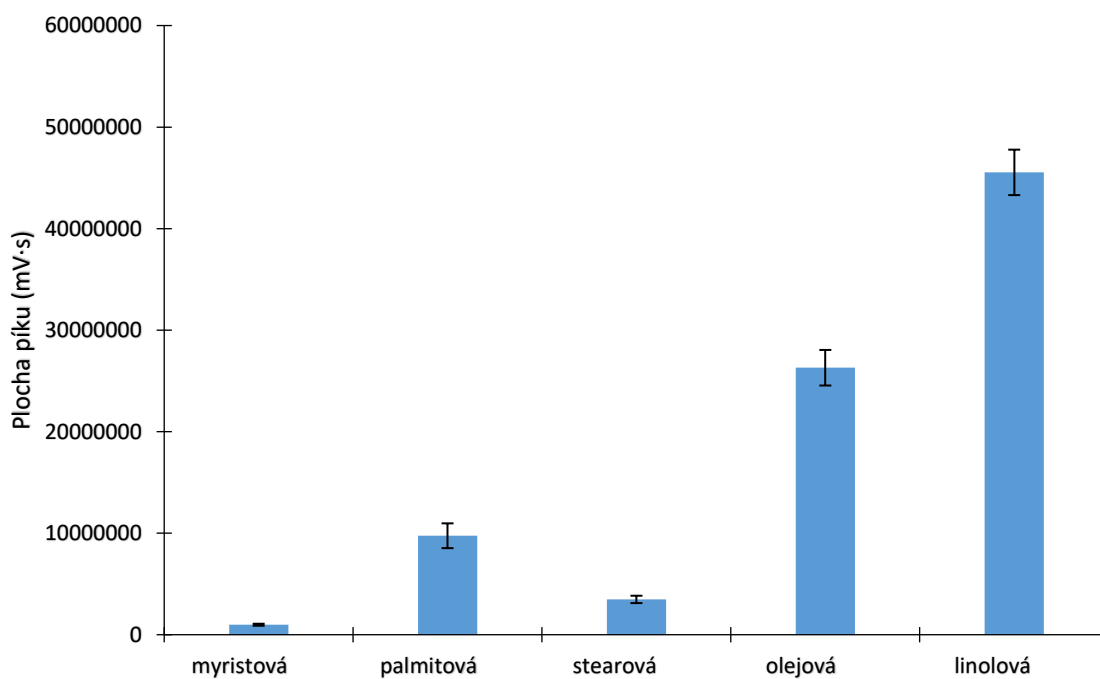
V Příloze 1 je na ukázkou uveden chromatogram MK identifikovaných ve slunečnicovém oleji, průměrné zastoupení jednotlivých mastných kyselin je vyobrazeno na Grafu 1a a Grafu 1b. Kvůli velkým rozdílům ve velikosti plochy píku a dobré čitelnosti byla data rozdělena do dvou skupin. Slunečnicový olej patří do skupiny olejů s převahou PUFA, je charakterizován vysokým obsahem kyseliny linolové, z nasycených masných kyselin obsahuje především kyselinu palmitovou a stearovou, z ostatních nenasyčených kyselinu olejovou. Ostatní MK jsou zastoupeny minoritně.

Tabulka 3: Opakovatelnost metody pro vybrané mastné kyseliny.

VMK	RSD [%]
kapronová	2,9
kaprylová	13,3
kaprinová	5,9
laurová	16,4
myristová	10,3
myristoolejová	15,6
pentadekanová	14,5
palmitová	12,5
palmitoolejová	8,8
heptadekanová	9,8
stearová	10,4
olejová	6,7
linolová	4,9
arachová	4,6



Graf 1a: Znáznornění průměrného zastoupení vybraných mastných kyselin ve slunečnicovém oleji.



Graf 1b: Znáznornění průměrného zastoupení vybraných mastných kyselin ve slunečnicovém oleji.

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo ověřit opakovatelnost metody stanovení volných mastných kyselin ve vzorku slunečnicového oleje. Mastné kyseliny byly esterifikovány za použití BF_3 jako katalyzátoru, vlastní stanovení methylesterů mastných kyselin bylo provedeno na plynovém chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem.

Nejprve byly porovnány dvě metody: s/bez předchozí frakcionace pomocí extrakce na pevné fázi – SPE.

V současnosti je metoda SPE za tímto účelem často používána, je jednoduchá a poskytuje vysoce čisté lipidické frakce. Má však i své nevýhody – nutnost použití rozpouštědel, poměrně vysoká cena SPE kolonek, časová náročnost, horší reprodukovatelnost.

Přímá esterifikace volných mastných kyselin je oproti tomu jednoduchá, rychlá, poskytuje vyšší výtěžky mastných kyselin.

Vzhledem k tomu, že mezi zařazením kroku frakcionace metodou SPE a přímou esterifikací nebyly patrné významné rozdíly v reprodukovatelnosti (RSD byla pro stanovení bez SPE 4,6–25,4 % a pro stanovení s SPE 11,1–25,3 %), byla k finálnímu stanovení díky své jednoduchosti a menší časové náročnosti zvolena metoda přímé esterifikace. Na závěr byla ověřena její opakovatelnost (RSD pro vybrané mastné kyseliny 2,9–16,4 %). Z výsledků je patrné, že zvolená metoda je velmi náročná na přesné provedení, zvláště při stanovení nízkých koncentrací volných mastných kyselin – vyžaduje zručnost, pečlivost a přesnou kontrolu všech parametrů. Za těchto podmínek lze dosáhnout přijatelné opakovatelnosti, pro rutinní využití v praxi je zásadní výhodou její jednoduchost a rychlost.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- 2 MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. Jinočany: H&H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- 3 LEHNINGER, Albert L., David L. NELSON a Michael M. COX. *Lehninger principles of biochemistry*. 6th ed. New York: W.H. Freeman, c2013. ISBN 978-1429234146.
- 4 Fat triglyceride shorthand formula. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2017, 21 July 2017 [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fat_triglyceride_shorthand_formula.svg
- 5 VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- 6 Myristic. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2005, 24 April 2005 [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Myristic.png>
- 7 Palmiticacid. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2005, 24 April 2005 [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Palmiticacid.png>
- 8 Stearicacid. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2005, 24 April 2005 [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Stearicacid.png>
- 9 Kyselina olejová. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Kyselina_olejová.svg
- 10 Alpha-linolenic acid. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2008 [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alpha-linolenic_acid.svg
- 11 ČSN EN ISO 12966-1 (588767). *Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin: Část 1: Směrnice pro moderní plynovou chromatografii methylesterů mastných kyselin*. Praha: Český normalizační institut, 2015.
- 12 ČSN EN ISO 12966-2 (588767). *Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin: Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin*. Praha: Český normalizační institut, 2015.
- 13 ČSN EN ISO 12966-4 (588767). *Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií: Část 4: Metoda kapilární plynové chromatografie*. Praha: Český normalizační institut, 2016.
- 14 PRÍBELA, Alexander. *Analýza potravin: cvičenie*. 2. vyd. Bratislava: STU, 1991. ISBN 80-227-0398-2.
- 15 DAVÍDEK, J. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha: SNTL, 1977, 718 s.
- 16 ČSN EN ISO 1735. *Sýry a tavené sýrové výrobky: Stanovení obsahu tuku – Gravimetrická metoda (Referenční metoda)*. Praha: Český normalizační institut, 2005.

- 17 SÝKORA, M. *Optimalizace a validace metody stanovení volných mastných kyselin*. Brno, 2016, 68 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- 18 W. CHRISTIE, William. Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids for Chromatographic Analysis. *AOCS Lipid Library* [online]. [cit. 2018-02-19]. Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=40374>
- 19 LIU, Ke-Shun. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1994, **71**(11), 1179-1187. DOI: 10.1007/BF02540534. ISSN 0003021X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1007/BF02540534>
- 20 MCMURRY, John. *Organická chemie*. V Brně: Vutium, 2007. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-802-1432-918.
- 21 WEATHERLY, Choyce A., Ying ZHANG, Jonathan P. SMUTS, Hui FAN, Chengdong XU, Kevin A. SCHUG, John C. LANG a Daniel W. ARMSTRONG. Analysis of Long-Chain Unsaturated Fatty Acids by Ionic Liquid Gas Chromatography: revue littéraire mensuelle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, [1923]-, **64**(6), 1422-1432. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05988. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.5b05988>
- 22 LU, Chi-Yu, Hsin-Lung WU, Su-Hwei CHEN, Hwang-Shang KOU a Shou-Mei WU. Simple and Sensitive Analysis of Long-Chain Free Fatty Acids in Milk by Fluorogenic Derivatization and High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, **50**(1), 71-73. DOI: 10.1021/jf010986b. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf010986b>
- 23 NAGY, Kornél, Annamária JAKAB, Jenő FEKETE a Károly VÉKEY. An HPLC-MS Approach for Analysis of Very Long Chain Fatty Acids and Other Apolar Compounds on Octadecyl-Silica Phase Using Partly Miscible Solvents. *Analytical Chemistry*. 2004, **76**(7), 1935-1941. DOI: 10.1021/ac034944t. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac034944t>
- 24 LÍSA, Miroslav, Hana VELÍNSKÁ a Michal HOLČAPEK. Regioisomeric Characterization of Triacylglycerols Using Silver-Ion HPLC/MS and Randomization Synthesis of Standards. *Analytical Chemistry*. 2009, **81**(10), 3903-3910. DOI: 10.1021/ac900150j. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac900150j>
- 25 SINGH, Eric J. a Frederick P. ZUSPAN. Determining the molecular weight of N-fatty acids by thin layer chromatography. *Journal of Chemical Education*. 1973, **50**(9), 625-. DOI: 10.1021/ed050p625. ISSN 0021-9584. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed050p625>
- 26 SINGH, Eric J. a Leon L. GERSHBEIN. Determining the carbon number of n-fatty acids by TLC. *Journal of Chemical Education*. 1966, **43**(1), 29-. DOI: 10.1021/ed043p29.1. ISSN 0021-9584. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed043p29.1>
- 27 SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: Vutium, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- 28 MILLER, Lt. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty-acid methyl-esters, including hydroxy-acids. *Journal of clinical microbiology*. 1982, **16**(3), 584-586. ISSN 0095-1137.

- 29 RISBY, Terence H., Larry R. FIELD, Frank J. YANG a Stuart P. CRAM. Gas chromatography. *Analytical Chemistry*. 2002, **54**(5), 410-428. DOI: 10.1021/ac00242a030. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00242a030>
- 30 Rt 5 12. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2006, 3 September 2006 [cit. 2018-02-08]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rt_5_12.png
- 31 MCNAIR, Harold. Introduction to GC: Practical Aspects. In: *Chromedia Analytical Sciences* [online]. USA: Virginia Tech, c2018 [cit. 2018-03-28]. Dostupné z: <http://www.chromedia.org/dchro/gfx/ZapdlvkHC.jpeg>
- 32 EICEMAN, Gary A., Herbert H. HILL a Jorge GARDEA-TORRESDEY. Gas Chromatography. *Analytical Chemistry*. 1998, **70**(12), 321-340. DOI: 10.1021/a1980016l. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/a1980016l>
- 33 The Column Oven and Temperature Programmer. *Chromatography Online* [online]. Chromatography Online [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: http://www.chromatography-online.org/Temperature-Programmer/rs_2_36.php
- 34 KOVAL, D. Výběr a optimalizace metody stanovení volných mastných kyselin. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. XY s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D
- 35 BAREK, J a kol. Nomenklatura a terminologie: Metrologická terminologie v chemii. *Chemické listy*. 2000, 94(7), 439-444. ISSN 1213-7103.

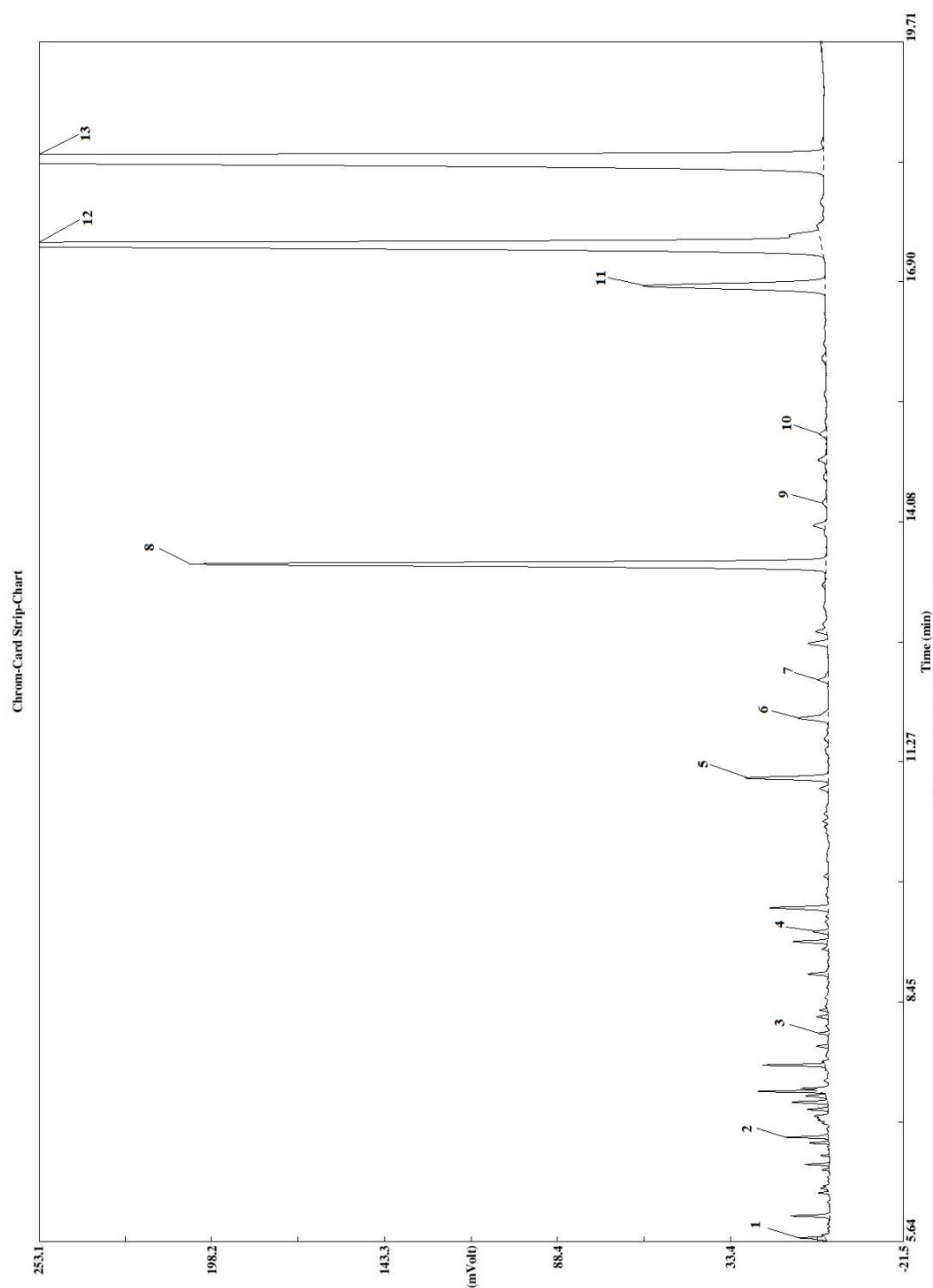
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

DAG	diacylglyceroly
FID	plamenový ionizační detektor
GC	plynový chromatograf
LOD	limit detekce (<i>limit of detection</i>)
MAG	monoacylglyceroly
ME	methylestery
MEMK	methylestery mastných kyselin
MK	mastné kyseliny
MUFA	mono-nenasycené mastné kyseliny
PUFA	poly-nenasycené mastné kyseliny
RSD	relativní směrodatná odchylka (<i>relative standard deviation</i>)
SAFA	nasycené mastné kyseliny
SPE	extrakce na pevné fázi
TAG	triacylglyceroly
VMK	volné mastné kyseliny

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Ukázka chromatogramu MK identifikovaných ve slunečnicovém oleji.

9 PŘÍLOHY



Příloha 1: Ukázka chromatogramu identifikovaných MK ve slunečnicovém oleji.

Identifikace píků – mastné kyseliny: 1 – kapronová, 2 – kaprylová, 3 – kaprinová, 4 – laurová, 5 – myristová, 6 – myristolejová, 7 – pentadekanová, 8 – palmitová, 9 – palmitolejová, 10 – heptadekanová, 11 – stearová, 12 – olejová, 13 – linolová.