MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2016 **MARTINA KOLÁČKOVÁ**

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav technologie potravin

OBSAH PUFA n-6 a n-3 VE VYBRANÝCH ŽIVOČIŠNÝCH TKÁNÍCH

Diplomová práce

Vedoucí práce

prof. MVDr. Ing. Tomáš Komprda, CSc.

Vypracovala

Bc. Martina Koláčková

Brno 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:……
…….……
……...vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.*

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne……

……..

podpis

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu diplomové práce panu prof. MVDr. Ing. Tomáš Komprda, CSc. za pomoc a odborný dohled.

ABSTRAKT

Teoretický přehled shrnuje charakteristiku polynenasycených mastných kyselin a problematiku jejich metabolismu, fyziologických účinků a výskytu v potravinách. Také se zabývá postupy a možnostmi stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie.

Experimentální část práce popisuje stanovení profilu mastných kyselin v daňčím, srnčím a jelením mase metodou plynové chromatografie na chromatografu Fison 8000 Series s plamenově-ionizačním detektorem. Pomocí statistického zpracování jsou sledovány průkazné rozdíly v obsahu jednotlivých mastných kyselin, skupin mastných kyselin a poměru n-6/n-3 polynenasycených mastných kyselin mezi jednotlivými druhy zvěřiny.

Klíčová slova:

PUFA, plynová chromatografie, zvěřina, daněk, srnec, jelen.

ABSTRAKT

The literature review summarizes characteristics of polyunsaturated fatty acids, problems of their metabolism, physiological effects and their occurrence in food. It pursues procedures and possibilities of fatty acids assessment with the help of gas chromatography.

Experimental part of the thesis describes an assessment of fatty acids profile in fallow deer meat, roe deer and deer meat using the gas chromatography method operating the Fison 8000 series gas chromatograph as well as flame ionization detector. Conclusive differences in content of particular fatty acids and n-6/n-3 fatty acids ratio among single types of venison are being monitored by means of statistic processing.

Key words:

PUFA, gas chromatography, venison, fallow deer, doe, deer.

OBSAH

1 ÚVOD ..... - 9 -

2 CÍL PRÁCE ..... - 10 -

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED ..... - 11 -

3.1 Charakteristika a rozdělení polynenasycených mastných kyselin (PUFA) - 11 -

3.1.1 Obecná charakteristika mastných kyselin ..... - 11 -

3.1.2 Charakteristika PUFA ..... - 12 -

3.1.3 Rozdělení ..... - 12 -

3.2 Biosyntéza ..... - 14 -

3.2.1 Metabolická řada n-6 PUFA ..... - 14 -

3.2.2 Metabolická řada n-3 PUFA ..... - 15 -

3.3 Oxidativní metabolismus PUFA ..... - 16 -

3.4 Fyziologické účinky PUFA ..... - 17 -

3.4.1 Fyziologické účinky eikosanoidů ..... - 18 -

3.4.2 Fyziologické účinky n-6 PUFA ..... - 19 -

3.4.3 Fyziologické účinky n-3 PUFA ..... - 20 -

3.4.4 Poměr n-6/n-3 PUFA ..... - 21 -

3.5 Výskyt PUFA ..... - 24 -

4 STANOVENÍ PUFA METODOU PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE ..... - 26 -

4.1 Obecný princip plynové chromatografie ..... - 26 -

4.2 Příprava vzorku ..... - 27 -

4.2.1 Extrakce ..... - 27 -

4.2.1.1 Metoda podle Soxhleta ..... - 28 -

4.2.1.2 Metoda dle Folche ..... - 28 -

4.2.1.3 Metoda dle Bligh and Dyer ..... - 28 -

4.2.1.4 Metoda dle Hara & Radim ..... - 29 -

4.2.1.5 Methyl-tert-butyl ether extrakce ..... - 29 -

4.2.1.6 Superkritická fluidní extrakce ..... - 29 -

4.2.2 Derivatizace ..... - 30 -
4.2.2.1 Kyselá transesterifikace ..... - 30 -
4.2.2.2 Zásaditá transesterifikace ..... - 31 -
4.2.2.3 Ostatní možnosti derivatizace ..... - 31 -
4.3 Vlastní stanovení PUFA plynovou chromatografií ..... - 32 -
4.3.1 Nástřik ..... - 32 -
4.3.2 Separace ..... - 33 -
4.3.3 Detekce ..... - 34 -
4.3.4 Vyhodnocení ..... - 35 -
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ..... - 37 -
5.1 Materiály a metodika ..... - 37 -
5.1.1 Vzorky ..... - 37 -
5.1.2 Chemikálie ..... - 37 -
5.1.3 Laboratorní pomůcky a přístroje ..... - 38 -
5.1.4 Metodika ..... - 38 -
5.1.4.1 Lyofilizace ..... - 39 -
5.1.4.2 Homogenizace, sonikace a filtrace ..... - 39 -
5.1.4.3 Extrakce ..... - 39 -
5.1.4.4 Derivatizace ..... - 40 -
5.1.4.5 Stanovení ..... - 40 -
5.1.4.6 Statistické vyhodnocení ..... - 41 -
5.2 Výsledky a diskuze ..... - 42 -
5.3 Závěr ..... - 53 -
6 POUŽITÁ LITERATURA ..... - 54 -
6.1 Publikace ..... - 54 -
6.2 Internetové zdroje ..... - 59 -
7 SEZNAM OBRÁZKŮ ..... - 61 -
8 SEZNAM TABULEK ..... - 62 -

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK ..... - 63 -

10 PŘÍLOHY ..... - 65 -

1 ÚVOD

Asociace mezi příjmem tuků a zdravím je velmi silná. Mastné kyseliny (MK), nejdůležitější složka tuků, mají jak pozitivní, tak negativní vliv na náš organizmus. V rámci zdravého životního stylu a zvýšené snahy o kvalitní stravování se tak tuky dostaly do popředí zájmu široké společnosti. Analýza množství a profilu mastných kyselin se stala důležitou jakostní charakteristikou potravin.

Významný podíl v příjmu tuků ve výživě člověka tvoří maso. Profil MK v živočišných tkáních závisí na mnoha faktorech: živočišný druh, pohlaví, věk, environmentální faktory či krmení. Vyjma ryb jsou živočišné tuky vnímány jako bohatý zdroj nasycených mastných kyselin a cholesterolu a jejich příjem je spojován s řadou onemocnění (kardiovaskulární choroby, obezita, chronické záněty, rakovina). Na druhou stranu jsou důležitým zdrojem bílkovin, vitamínů a minerálních látek. Tím se z nich stává velmi aktuální a kontroverzní téma.

Mezi nejčastěji vyhledávané živočišné druhy patří maso domestikovaných zvířat, a to vepřové, kuřecí a hovězí. Každým rokem v České republice, stejně jako ve světě, roste obliba konzumace zvěřiny. Je považována za druh masa s vyšším obsahem bílkovin, n-3 nenasycených mastných kyselin a nižším množstvím celkového tuku. Vyznačuje se charakteristickou chutí a vůní. Dle Dannenberga et al. (2013) informace o detailním chemickém složení zvěřiny jsou stále nedostatečné. Z těchto důvodů je analýza profilu MK zvěřiny předmětem praktické části předkládané diplomové práce.

2 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo:

1. Studium dostupné literatury týkající se metabolismu, fyziologických účinků a výskytu polynenasycených mastných kyselin řady n-6 a n-3.
2. Seznámení se s postupy extrakce, derivatizace a stanovení PUFA metodou plynové chromatografie.
3. Stanovení profilu mastných kyselin u vybraných druhů zvěřiny.
4. Vyhodnocení získaných dat vhodnými statistickými metodami.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

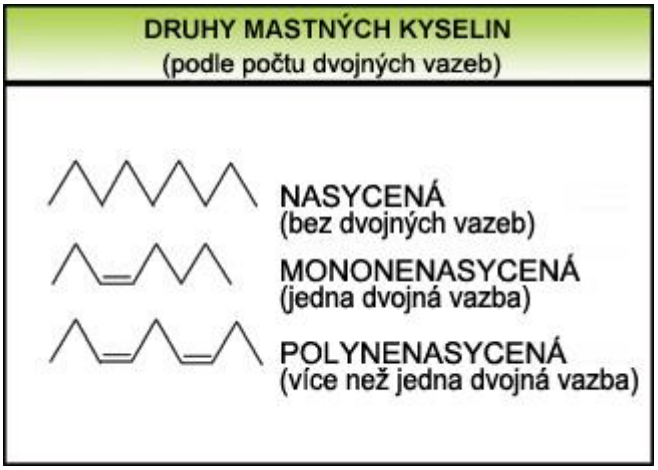
3.1 Charakteristika a rozdělení polynenasycených mastných kyselin (PUFA)

3.1.1 Obecná charakteristika mastných kyselin

Mastné kyseliny (MK) jsou nejdůležitější a z nutričního hlediska nejvýznamnější složkou lipidů (Velíšek, 2002). Jsou považovány za jejich základní stavební jednotku. Strukturní páteř MK tvoří uhlovodíkový řetězec, na který je navázána hydroxylová skupina (-COOH) na jednom konci a methylová skupina ($-CH_3$) na druhém. Většina MK má nerozvětvený řetězec se sudým počtem atomů uhlíku (Dostál, 2005). Výživové a funkční vlastnosti MK jsou ovlivněny délkou řetězce a stupněm nasycení (Casimir, 2006; Komprda, 2003).

Dle stupně nasycení dělíme MK na (Velíšek, 2002):

- nasycené mastné kyseliny, které obsahují pouze jednoduché vazby,
- nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (mononenasycené mastné kyseliny = MUFA),
- nenasycené mastné kyseliny, které obsahují dvě a více dvojných vazeb (polynenasycené mastné kyseliny = PUFA),
- mastné kyseliny s trojnými vazbami a různými substituenty (rozvětvené, cyklické, s kyslíkatými, sirnými nebo dusíkatými funkčními skupinami).



Obrázek č. 1: Obecné schéma MK (Eufic)

Zdroj: http://www.eufic.org/page/cs/page/energy-nutrition/?article=6&p=2

3.1.2 Charakteristika PUFA

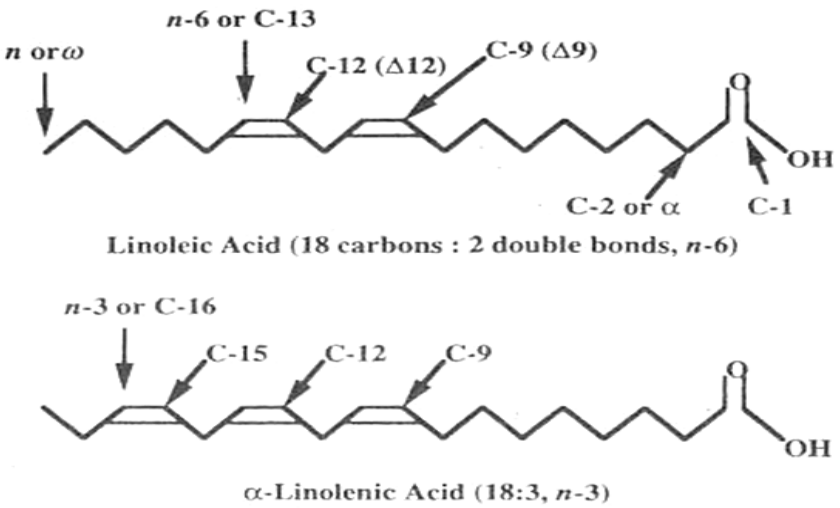
Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) obsahují dvě a více dvojných vazeb. Tyto vazby jsou izolované a mohou zaujímat prostorovou konfiguraci *cis* nebo *trans*. V *cis*-kyselinách jsou oba atomy uhlíku na dvojné vazbě v poloze k sobě bližší, v *trans*-kyselinách se nachází v poloze opačné. U přirozených sloučenin se zpravidla setkáme s *cis*-konformací (Velíšek, 2002). *Trans*-kyseliny se vyskytují v malém množství v tuku a mléce přežvýkavců a v semenech některých rostlin. Největší množství vzniká průmyslovou hydrogenací tuků (Dostál, 2005).

Nejčastěji se PUFA zapisují vzorcem N:M (N – počet atomů uhlíku, M – počet dvojných vazeb; Komprda, 2003).

3.1.3 Rozdělení

Běžné dělení PUFA je podle polohy první dvojné vazby (Velíšek, 2009), pomocí ní rozlišujeme n-3, n-6 a n-9 PUFA resp. omega-3 PUFA, omega-6 PUFA a omega-9 PUFA. Jednotlivá čísla vyjadřují, z jakého atomu uhlíku vychází první dvojná vazba od methylové konce molekuly MK, viz obrázek č. 2. Toto rozdělení je

stěžejní z hlediska výživy a fyziologických účinků (Komprda, 2009). Přehled nejdůležitějších PUFA uvádí tabulka č. 1.



Obrázek č. 2: Schéma symboliky n-9, n-6 a n-3 PUFA (Hofmanová, 2013)

(Zdroj: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/15_lipidy.html)

Tabulka č. 1: Přehled nejdůležitějších PUFA (Jirák & Zeman, 2007)

Triviální název PUFA	Funkční vzorec	Délka řetězce: počet dvojných vazeb
Hlavní n-3 PUFA		
Kyselina alfa-linolenová (ALA)	all-cis-9,12,15-oktadekatrienová	C 18:3
Kyselina eikosapentaenová (EPA)	ll-cis-5,8,11,14,17-eikosapentaenová	C 20:5
Kyselina klupanodová (DPA)	all-cis-7,10,13,16,19-dokosapentaenová	C 22:5
Kyselina dokosahexaenová (DHA)	all-cis-4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová	C 22:6

Tabulka č. 1: Přehled nejdůležitějších PUFA (Jirák & Zeman, 2007)

Hlavní n-6 PUFA		
Kyselina linolová (LA)	all-cis-9,12-oktadekadienová	C 18:2
Kyselina gama-linolenová (GLA)	all-cis-6,9,12-oktadekatrienová	C 18:3
Kyselina dihydro-gama-linolenová (DGLA)	all-cis-8,11,14-eikosatrienová	C 18:3
Kyselina arachidonová (AA)	all-cis-5,8,11,14-eikosatetraenová	C 20:4

3.2 Biosyntéza

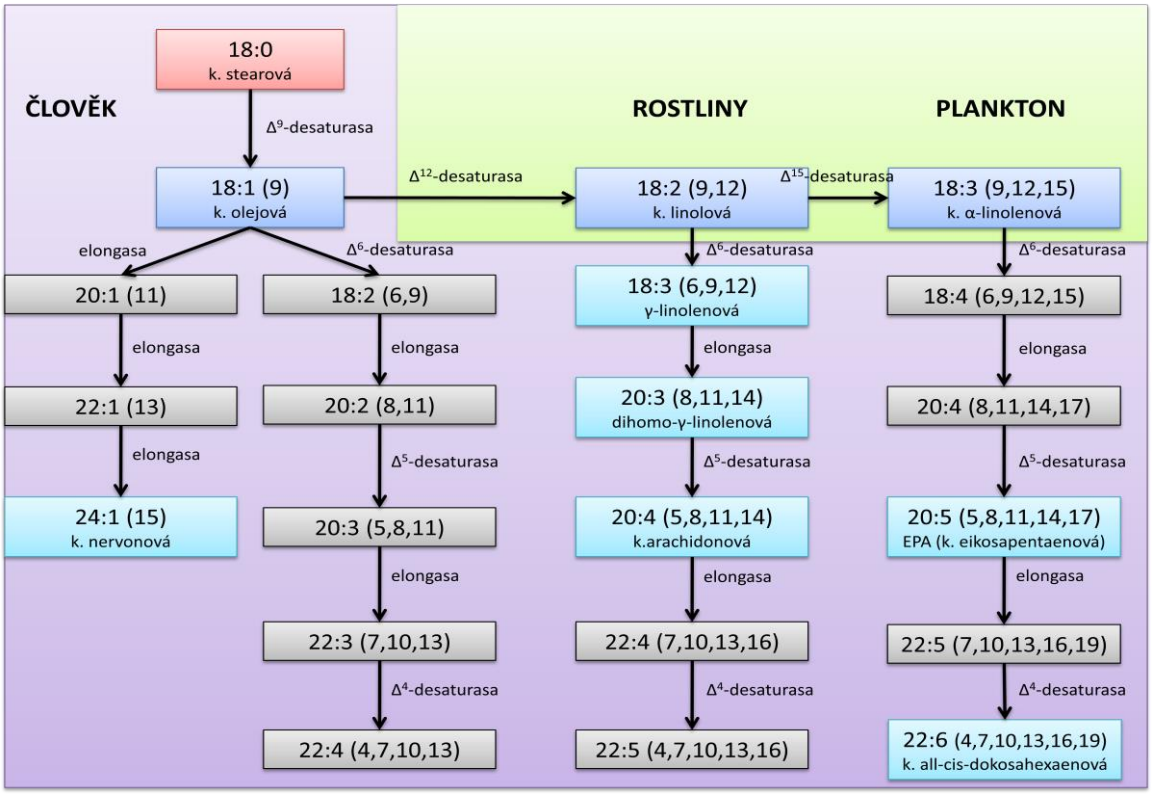
Organizmus člověka je schopen syntetizovat MK z acetylkoenzymu A. Tvorba PUFA se skládá z několika kroků: syntéza saturované MK, elongace a desaturace. Celý proces je katalyzován komplexem enzymů pro syntézu MK, elongačními a desaturačními enzymy. Člověk a jiní živočichové jsou vybaveni pouze omezeným typy desaturas, konkrétně Δ^9, Δ^6 a Δ^5-desaturasy. Důsledkem je, že za devátým uhlíkem od karboxylového konce nejsme schopni vytvořit další dvojnou vazbu. Proto komplex n-6 a n-3 PUFA řadíme mezi esenciální MK. Schopností tvořit tyto MK jsou obdařeny rostliny s Δ^{12} desaturasou či plankton a řasy s Δ^{15}-desaturasou (Ledvina, 2009; Jirák & Zeman, 2007; Komprda, 2003; Hurts, 2002).

3.2.1 Metabolická řada n-6 PUFA

Prekurzorem n-6 PUFA je kyselina linolová, ze které vzniká kombinací desaturace a elongace kyselina arachidonová a další n-6 PUFA, viz obrázek č. 3 (Ledvina, 2009).

3.2.2 Metabolická řada n-3 PUFA

Syntéza fyziologicky významných n-3 PUFA, kyseliny eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA), vychází z kyseliny α-linolenové (ALA), viz obrázek č. 3 (Ledvina, 2009).



Obrázek č. 3: Metabolická řada PUFA (Ledvina, 2009). Mastné kyseliny v zeleném poli jsou pro člověka nutričně esenciální. Mastné kyseliny ležící ve fialovém poli můžeme získat kombinací elongace a desaturace z prekurzorových mastných kyselin (kyselina olejová, kyselina linolová, kyselina α-linolenová).

Metabolické řady n-6 a n-3 PUFA se účastní stejná skupina enzymů. To způsobuje soutěžení o společné enzymy, jejichž množství je omezené. Ty působí přednostně v n-6 metabolické dráze. Účinnost konverze ALA -> EPA je u člověka pod 1 % (Anderson & Ma, 2009). Systém přeměny u n-3 PUFA se ještě více snižuje ve stáří, u kojenců a při nadměrném příjmu n-6 PUFA (Hofmanová, 2013).

3.3 Oxidativní metabolismus PUFA

Vyšší PUFA mají v organizmu člověka nezastupitelnou roli. Oxidativním metabolismem z nich vznikají důležité látky eikosanoidy (Komprda, 2012).

Eikosanoidy jsou látky působící jako lokální hormony. Jejich syntéza je konstantní nebo indukována podle potřeby z AA a EPA. Obecně se jedná o pestrou skupinu látek lišící se metabolickou dráhou vzniku a účinky.

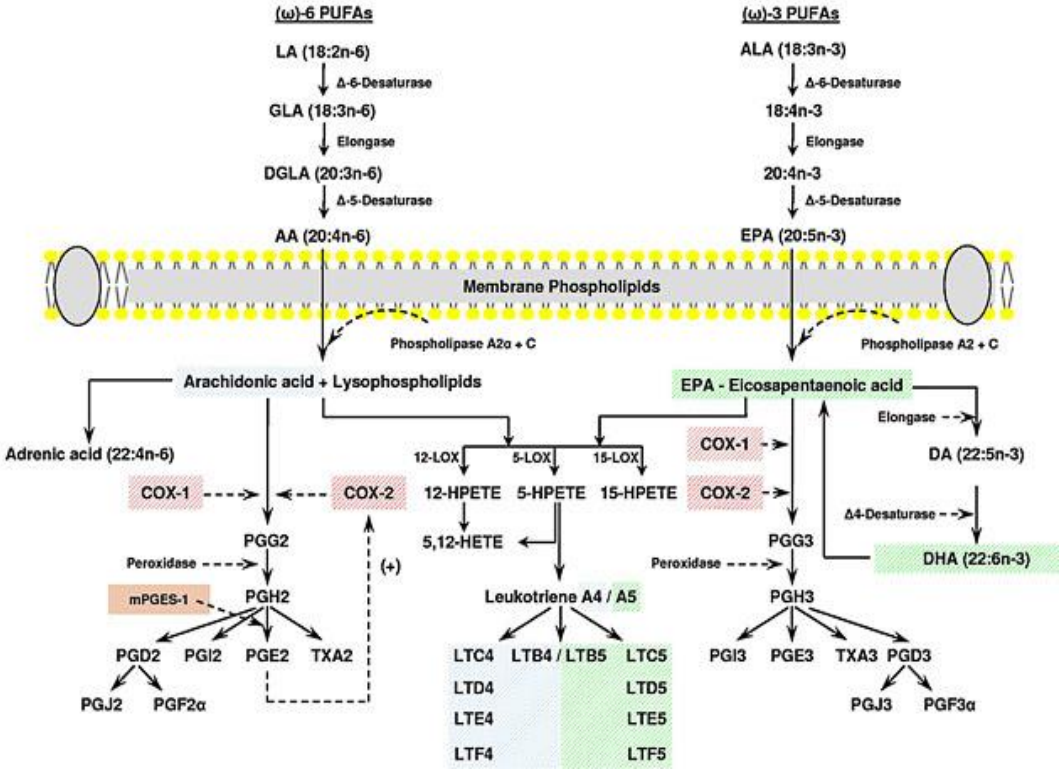
Rozdělení a dráha vzniku eikosanoidů:

- prostanoidy (prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany) vznikající cyklooxygenasovou drahou
- leukotrieny vznikající lipoxygenasovou drahou
- epoxykyseliny a dihydroxykyseliny vznikající epoxygenasovou drahou (Ledvina, 2009)

První krok syntézy všech typů eikosanoidů je shodný. Nejprve je nutné odštěpit PUFA z membránového fosfolipidu pomocí fosfolipázy A_2. Uvolněná MK je přes meziprodukty transformována cyklooxygenasovou, lipoxygenasovou či epoxygenasovou drahou na příslušné metabolity (Ledvina, 2009; Wilhelm, 2013; Komprda, 2012; Grofová, 2010).

Z AA vznikají působením cyklooxygenasy prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany řady 2. Lipoxygenasovou cestou jsou indukovány leukotrieny řady 4.

EPA je přeměňována na prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany řady 3 či leukotrieny řady 5 (Ledvina, 2009; Wilhelm, 2013; Komprda, 2003; Grofová, 2010). Zjednodušený oxidativní metabolismus AA a EPA je znázorněn na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4: Zjednodušené schéma syntézy eikosanoidů (Hofmanová, 2013)

(Zdroj: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/15_lipidy.html)

3.3.1.1 Fyziologické účinky PUFA

Největší množství PUFA se stává modulační složkou biologických membrán, kde ovlivňují fluiditu membrány, funkci integrálních proteinů a buněčnou signalizaci. Přibližně 1 % podléhá oxidativnímu metabolismu a přeměně na eikosanoidy.

Samotná PUFA nebo produkt jejího metabolismu může být ligandem pro receptor, který působí po aktivaci jako transkripční faktor a moduluje expresi velkého množství genů. V souvislosti s PUFA jsou studovány receptory: PPAR (peroxisome proliferator activated receptor), SREBP (sterol regulatory element binding protein), NF-κB (nukleární faktor κB) a HNF 4 (hepatocyte nuclear factor).

Receptory PPAR (PPAR α, PPAR β, PPAR γ) a HNF 4 jsou spojovány s metabolismem lipidů a glukosy. SREBP působí jako transkripční faktor ovlivňující expresi genů enzymů kódující metabolismus lipidů a cholesterolu v játrech. NF-κB a TNF jsou zkoumány v souvislosti s chronickým zánětem (Komprda, 2012; Calder, 2005; Jump, 2002; Tapiero et al., 2002).

3.3.2 Fyziologické účinky eikosanoidů

Eikosanoidy jsou fyziologicky a farmakologicky důležité látky působící autokrinně a parakrinně. Své účinky zprostředkovávají prostřednictví G-proteinu. Mohou také působit jako ligandy transkripčních faktorů a ovlivňovat expresi genů.

Jedná se obecně o rozsáhlý komplex signálních drah s různorodou odpovědí. Dle svého charakteru ovlivňují svalovou kontrakci, krevní tlak, dýchání, činnost střev, agregaci trombocytů či imunitní reakce organizmu (Ledvina, 2009; Wilhelm, 2013; Grofová, 2010; Tapiero et al., 2002; Jump, 2002; Prentice et al., 2005). Obecný přehled účinků eikosanoidů uvádí tabulka č. 2, některé konkrétní účinky tabulka č. 3. Metabolity n-3 PUFA působí antagonicky nebo slaběji než metabolity n-6 PUFA.

Tabulka č. 2: Obecný přehled účinků eikosanoidů (Komprda, 2003)

Metabolity n-6 PUFA	**Metabolity n-3 PUFA**
Prozánětlivé účinky	Protizánětlivé
Vasokonstrikční	Vasodilatační
Agregační	Antiagregační
Bronchokonstrikční	Bronchodilatační

Tabulka č. 3: Přehled biologických účinků některých konkrétních eikosanoidů řady n-6 PUFA (Ledvina, 2009)

Metabolity n-6 PUFA	
TXA_2	agregace trombocytů; kontrakce hladkého svalstva, zvýšení intenzity a trvání bolesti
PGE_2	inhibice kontrakce hladkého svalstva, vasodilatace, inhibice sekrece HCl a stimulace sekrece mucinu (= ochrana žaludeční sliznice), zvýšení teploty, zvýšení intenzity a trvání bolesti, zvýšení permeability cév (= červenání při zánětu)
PGD_2	navození spánku, kontrakce bronchiálního svalstva
PGE_2	vyvolává porod
PGF_2	kontrakce hladkého svalstva, zvýšení tělesné teploty
TXA_2	agregace trombocytů; kontrakce hladkého svalstva
PGI_2/PGI_3	antiagregační účinek; vyvolání relaxace hladkého svalstva; zvýšení intenzity a trvání bolesti

Tabulka č. 3: Přehled biologických účinků některých konkrétních eikosanoidů řady n-6 PUFA (Ledvina, 2009)

LTB_4	zvyšuje permeabilitu cévního entodelu, agregace lymfocytů
LTC_4	kontrakce plicních a koronárních cév

Jak naznačují tabulky č. 2 a 3, metabolity řady n-3 působí protektivně a ovlivňují pozitivně řadu faktorů v souvislosti s chronickým zánětem, srdečně-cévním onemocněním, autoimunitním onemocněním a rakovinou (Komprda, 2003). Jsou cílem mnoha medicínských a farmakologických studií. Odrazovou studií pro n-3 PUFA byla studie na grónských Eskymácích. Když v 80. letech upoutal dánských vědců fakt, že se Eskymáci dožívají vyššího věku. Následně bylo zjištěno, že důvodem je vyšší konzumace ryb bohatých na n-3 PUFA (Kalač, 2003).

3.3.3 Fyziologické účinky n-6 PUFA

N-6 PUFA jsou důležitou součástí membrán, u kterých ovlivňují jejich fluiditu a funkci integrálních membránových proteinů. Nutričně esenciální je kyseliny linolová, která je prekurzorem pro další n-6 PUFA. Podílí se také na zachování kožní integrity a blokaci vstupu škodlivých látek. Její metabolismus je narušen při kožních poruchách (atopická dermatitida, lupénka). V některých studiích je diskutován protektivní vliv její suplementace při těchto chorobách (Calder, 2005).

K nejvýznamnějším n-6 PUFA patří AA, která je v těle vázaná na membránové fosfolipidy. Je jejich zásadní modulační složkou, ligandem pro receptory a výchozí látkou pro syntézu eikosanoidů s prozánětlivými, vasokonstrikčními a agregačními účinky (Harris et al., 2009). V mozku je dále využívána k syntéze kannabinoidu annandamidu, který působí v buněčné signalizaci jako druhý posel (Piomelli, 2000).

N-6 PUFA snižují prostřednictvím PPAR plazmatickou hladinu TAG a LDL cholesterolu. Jejich významný hypocholesterolemický efekt je negativně ovlivněn současným snížením HDL cholesterolu (Calder, 2005; Jump, 2002).

3.3.4 Fyziologické účinky n-3 PUFA

N-3 PUFA mají široké spektrum účinků. Jsou modulační složkou biologických membrán, výchozí látkou syntézy protizánětlivých, vasodilatačních a antikoagulačních eikosanoidů nebo ligandy transkripčních faktorů. Mezi fyziologicky významné zástupce patří DHA a EPA (Tapiero et al., 2002).

Role n-3 PUFA v metabolismu glukosy a lipidů

N-3 PUFA aktivují PPAR α a současně inhibují SREBP 1. V důsledku stimulace β oxidace a potlačení syntézy MK dochází ke snížení plazmatické hladiny TAG. Dále prostřednictvím SREBP 1 ovlivňují expresi genů kódující enzymy zúčastňující se produkce cholesterolu (Komprda, 2012; Komprda et al., 2014; Calder, 2005; Jump, 2002; Tapiero et al., 2002; Hofmanová, 2013; Hurts, 2002).

Gonzalez-Periz et al. (2009) zjistili souvislost mezi n-3 PUFA a PPAR γ , IRS (insulin receptor signaling) a GLUT-2 / GLUT-4 (receptor pro transport glukózy). Prostřednictvím těchto receptorů určili pozitivní vliv n-3 PUFA na inzulinovou rezistenci a steatózu jater.

Role n-3 PUFA v procesu chronického zánětu

Na molekulární úrovni soutěží EPA, DHA s AA o pozici substrátu v cyklooxygenasové a lipoxygenasové dráze. Jinou dráhou, prostřednictvím NF-κB, modulují n-3 PUFA nebo produkty jejich metabolismu expresi genů kódující proliferaci lymfocytů, cytotoxickou aktivitu T-lymfocytů, NK buněk, chemotaxi neutrofilů a monocytů (Calder, 2006; Tapiero et al., 2002).

Oběma způsoby snižují hladiny prozánětlivých metabolitů AA (např. interleukin-6, tumor necrosis factor, interferon-c, C-reaktivní protein) a působí protektivně v procesu chronického zánětu.

Role n-3 PUFA v centrální nervové soustavě

Stěžejní MK pro činnost centrální nervové soustavy je DHA. Receptor RXR po aktivaci DHA vytváří α-dimer a působí jako transkripční faktor pro geny ovlivňující vývoj centrální nervové soustavy (Jump, 2002).

Jako součást membránových fosfolipidů v sítnici ovlivňuje DHA funkci rhodopsinu, který je zodpovědný za zrak. Její nedostatek zhoršuje komunikaci mezi neurony a tím i vidění (Jump, 2002).

DHA zvyšuje fluiditu membrány a zesiluje přenos signálu mezi neurony. Snížená hladina AA a DHA je společným rysem duševních poruch (např. deprese, násilí, agrese, schizofrenie, hyperaktivita nebo nesoustředěnost dětí) a neurodegenerativních nemocí (Parkinsona a Alzheimerova choroba; Jirák, 2007). Některé studie prokazují, že lidé s vyšší hladinou n-3 MK jsou tolerantnější a mají menší sklony k agresi (Shia, 2002).

Koletzko et al. (2001) doporučují zvýšený příjem PUFA, hlavně DHA, během těhotenství a kojení. Příjem dítěte závisí na saturaci PUFA v organizmu matky. Dostatečný příjem je nezbytný pro vývoj mozku a imunitu dítěte. U dětí s nízkou porodní hmotností a předčasným porodem byly naměřeny nízké hladiny PUFA. Vyhnánková (2010) poukazuje na protektivní vliv suplementace n-3 PUFA u předčasně narozených dětí. Poruchy kognitivních funkcí a chování byly prokázány u dětí s nízkým příjmem n-3 PUFA (Koletzko et al., 2001).

Role n-3 PUFA v procesu karcinogeneze

N-3 PUFA hrají roli v procesu karcinogeneze. Přesný mechanizmus působení je stále předmětem studií. Velká pozornost je věnována enzymu COX-2 (Hofmanová, 2013).

Bylo prokázáno, že nízké hladiny ALA v prsní tkáni zvyšují u žen riziko vzniku rakoviny prsu. Nízký příjem PUFA byl pozorován u pacientů s rakovinou prostaty (Hofmanová, 2013). Jump et al. (2002) ve své studii zveřejnili, že n-3 PUFA snižují riziko vzniku rakoviny prsu, kolonu a pankreatu.

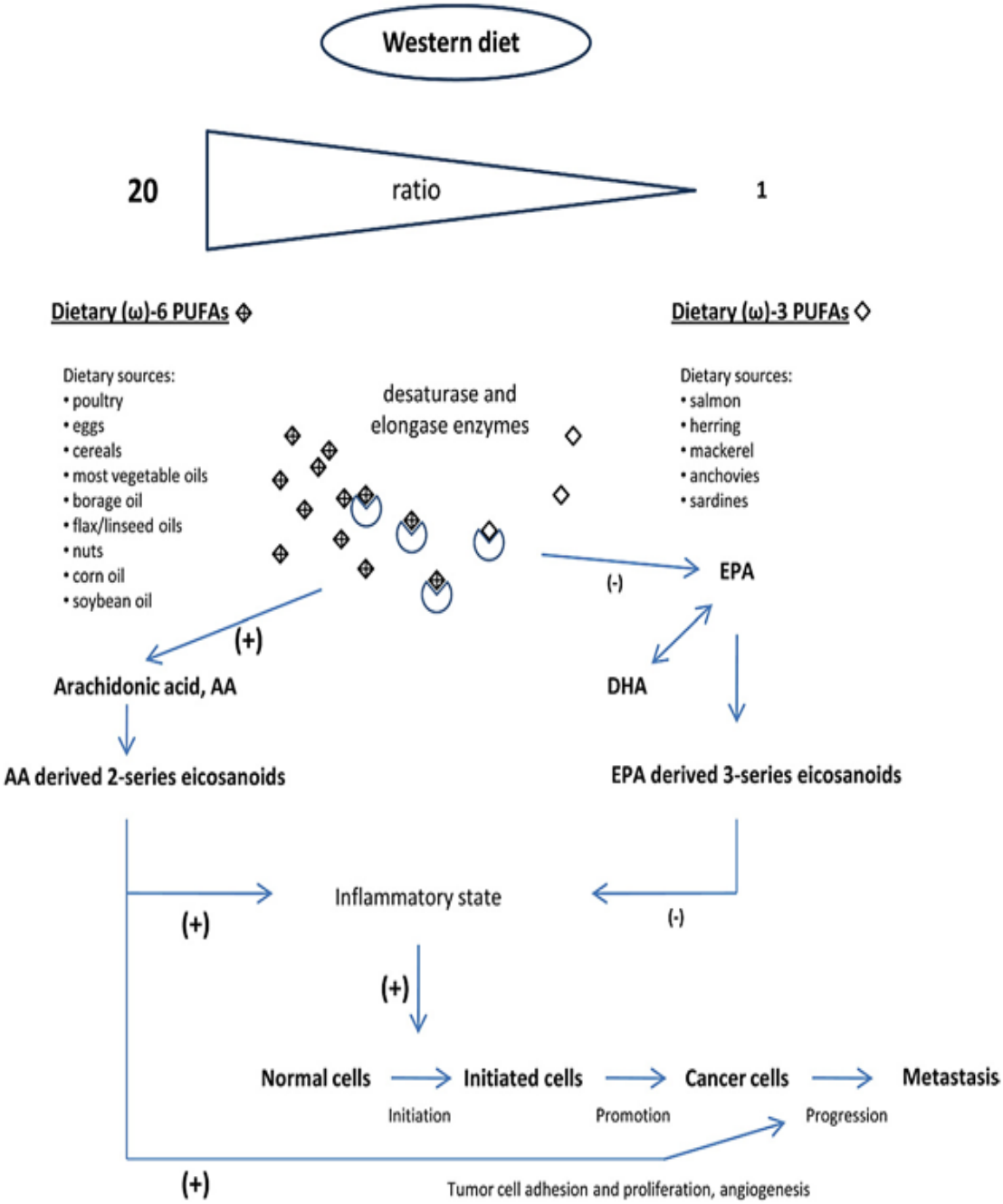
3.3.5 Poměr n-6/n-3 PUFA

Obě řady MK jsou pro organizmus důležité a musí být přijímány potravou. Pro správný chod organizmu a prevenci onemocnění je stěžejní správný poměr n-6/n-3 PUFA (Simopolous, 2006). Za optimální poměr se považuje 1 : 1. Česká společnost pro výživu (2012) doporučuje poměr n-6/n-3 PUFA do 5. Reálný příjem se však pohybuje v rozmezí 10 – 25 : 1. Tento nepoměr přispívá k zvýšenému riziku vzniku chronických degenerativních zánětlivých onemocnění, viz obrázek č. 5 (Simopolous, 2006; Komprda, 2012).

Byl prokázán vztah mezi vyšším příjmem n-6 PUFA a nižším příjmem n-3 PUFA v souvislosti se zvýšenou hladinou TNF R1 a R2 (receptor

pro tumor nekrotizující faktor). Tento typ receptoru působící jako transkripční faktor hraje významnou roli v chronických zánětlivých procesech (Simopolous, 2006).

Jak uvádí Jump (2002), existuje mnoho účinků a buněčných signalizací, které n-3 a n-6 PUFA zprostředkovávají v organizmu. Některé jsou více a některé méně prozkoumané a potvrzené. Obecně převládá názor nad protektivními účinky n-3 PUFA a vyváženého poměru n-6/n-3 PUFA.



Obrázek č. 5: Potenciální mechanizmy typické západní diety bohaté na n-6 PUFA podporující zánět a karcinogenezi (Hofmanová, 2013)

(Zdroj: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/15_lipidy.html)

3.4 Výskyt PUFA

PUFA se vyskytují v potravinách rostlinného i živočišného původu. Obecně převládá názor, že živočišné tuky jsou škodlivé. Tento názor je však zjednodušený. Jak mezi rostlinnými, tak živočišnými zdroji, můžeme najít prospěšné i nevhodné tuky. Vše záleží na profilu a množství MK v dané potravině.

Na kyselinu linolovou jsou bohatá rostlinná semínka a oleje (např. kukuřice, slunečnice, sója, pšeničné klíčky). AA se tvoří z kyseliny linolové pouze v živočišných buňkách. Vyskytuje se v mase, mléce a vejcích. Rostlinná strava ji neobsahuje.

Ze zdrojů n-3 PUFA lze uvést sóju, řepku, vlašské ořechy či lněné semínko, které obsahují kyselinu α-linolenovou. Nejlepším zdrojem n-3 PUFA, konkrétně EPA a DHA, však zůstávají mořské ryby žijící ve studené vodě (losos, makrela, pstruh, tuňák, sardinky; Russo, 2009). Přehled některých zdrojů uvádí tabulka č. 4.

Menší množství PUFA se nachází i v mase a vejcích. Obecně se maso a mastné výrobky vyznačují vyšším obsahem saturovaných MK, nižším obsahem PUFA a přítomností cholesterolu. Bylo vypozorováno, že obsah tuku mírně stoupá s věkem (Vompelli et al, 2002; Bureš et al., 2014).

Protože příjem masa tvoří významný podíl v příjmu tuku, některé studie se snaží modifikovat celkový profil MK v mase pomocí krmení. Bylo prokázáno, že vhodnou skladbou krmení, která je obohacena o n-3 PUFA, lze docílit pozitivních změn ve spektru MK v živočišných tkáních. Protože EPA+DHA nemusí být konvertovány pomocí desaturačních enzymů, lepších výsledků dosahují rybí oleje a formule obohacené o EPA+DHA než rostlinné oleje (bohaté na ALA; Russo, 2009; Howe et al., 2002). Byl potvrzen kladný efekt úpravy krmení u prasat, skotu, ovcí (Wood et al., 2005), ale i drůbeže (Barroeta et al., 2007). Výsledkem bylo navýšení množství PUFA a snížení SFA a MUFA.

Dále je prokazatelně vyšší množství n-3 MK pozorováno u zvířat živících se trávou než u zvířat krmených koncentrátem (Wood et al., 2003). Maso volně žijící zvěřiny vykazuje v mnoha studiích nižší hodnoty SFA, vyšší hodnoty PUFA a vhodný poměr n-6/n-3 MK v porovnání s jatečnými zvířaty (Cygan-Szczegielniak et al., 2010; Polak et al., 2008).

Tabulka č. 4: zdroje n-6 a n-3 PUFA (Russo, 2009)

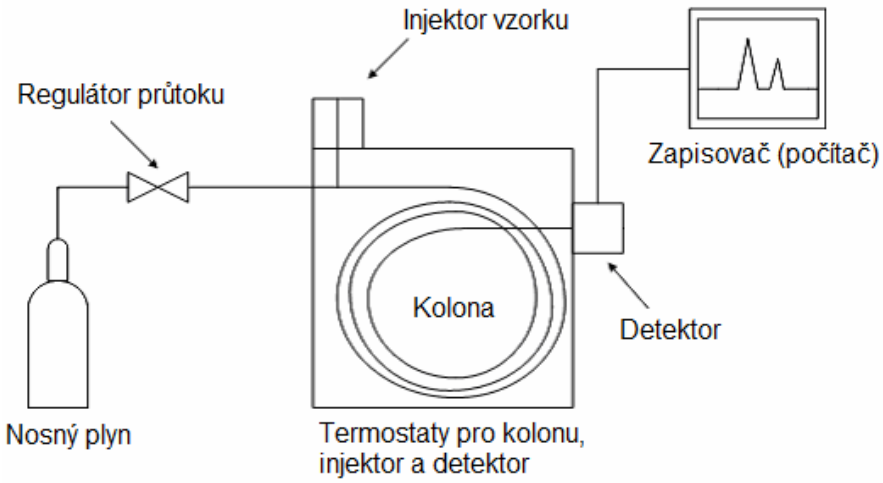
Potraviny bohaté na n-6 PUFA	**LA (mg/100g)**	**ALA (mg/100g)**	**AA (mg/100g)**	**EPA+DHA (mg/100g)**
kukuřičný olej	50000	900	-	-
arašídový olej	23900	-	-	-
sójový olej	53400	7600	-	-
slunečnicový olej	60200	500	-	-
margarin	17600	1900	-	-
sádlo	8600	1000	1070	-
vejce	3800	200	-	-
slanina	6080	250	250	-
šunka	2480	160	130	-
sójové boby	8650	1000	-	-
mandle	9860	260	-	-
brazilské ořechy	24900	-	-	-
arašídy	13900	530	-	-
vlašské ořechy	34100	680	590	-
Potraviny bohaté na n-3 PUFA	**LA (mg/100g)**	**ALA (mg/100g)**	**AA (mg/100g)**	**EPA+DHA (mg/100g)**
řepkový olej	19100	8600	-	-
lněný olej	13400	55300	-	-
sleď	150	61,66	36,66	1700
losos	440	550	300	1200
pstruh	74	-	30	500
tuňák	260	270	280	400
treska	4	2	3	300

4 STANOVENÍ PUFA METODOU PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

4.1 Obecný princip plynové chromatografie

Chromatografie je skupinou fyzikálně-chemických metod, které patří mezi nejpoužívanější techniky v laboratoři. Společným znakem těchto metod je dělení vzorku mezi dvěma nemísitelnými fázemi: stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou). Sloučeniny se separují na základě svých distribučních koeficientů pro tyto zvolené fáze. Jsou různá hlediska rozdělení chromatografií, např. dle mobilní fáze, podle způsobu provedení, podle principu separace nebo účelu použití (Klouda, 2003; Rozíková 2010; Christie, 1989).

Plynová chromatografie (GC) je jednou z chromatografických metod, kde mobilní fází je plyn nazývaný nosný plyn. Vzorek je dávkován do vyhřáté nástřikové komory, kde se odpaří. V podobě par je nosným plynem unášen do kolony, kde se separuje na základě různé schopnosti se poutat na stacionární fázi (SF). Složky, které opouštějí kolonu, zaznamenává detektor. Jeho signál je následně upraven a vyhodnocen počítačovým zařízením (Klouda, 2003).



Obrázek č. 6: Zjednodušené schéma plynové chromatografie

(Zdroj: http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf)

Podle povahy stacionární fáze rozlišujeme:

- plynová chromatografie v systému plyn – pevná látka (GSC), kde se při separaci uplatňuje adsorpce,
- plynová chromatografie v systému plyn – kapalina (GLC), která je založena na rozdílné rozpustnosti vzorku v kapalině a plynu.

Obecně se GC využívá pro separaci látek, které jsou nebo mohou být transferovány do plynné fáze. Podmínkou je dostatečný tlak syté páry, termostabilita a molekulová hmotnost menší než 1000. Nevyhovující analyty mohou být stanoveny ve formě derivátů (Klouda, 2003).

4.2 Příprava vzorku

Obecně se metodika stanovení MK skládá ze tří kroků: extrakce, derivatizace a vlastní stanovení GC. Podle povahy vzorku může extrakci předcházet lyofilizace, homogenizace nebo sonikace. Běžně se pro jednotlivé kroky používají různé metody v závislosti na typu vzorku a použitých chemikáliích.

Aby se minimalizovaly změny ve složení vzorku a byla zachována jeho původnost, je důležité, aby byla extrakce provedena co nejdříve. Pokud to není možné, je nezbytné zajistit vhodné skladování při nízkých teplotách. Přehled běžně používaných postupů uvádí následující podkapitoly (Christie, 1989; Seppänen-Laakso et al., 2002).

4.2.1 Extrakce

Cílem je převedení lipidů do rozpouštědla, které se následně odstraní. Tím je izolován čistý tuk, který se gravimetricky stanoví. Správně zvolený typ extrakce a rozpouštědlo (solvent) je stěžejní pro úspěšnou separaci. Nepolární rozpouštědla (např. hexan, petrolether) jsou vhodná pro extrakci jednoduchých neutrálních lipidů. Pro komplexní lipidy a fosfolipidy musí být použita polárnější rozpouštědla (např. methanol, acetonitril). Proto jsou pro získání celkových lipidů nejčastěji

používány směsi polárních a nepolárních rozpouštědel (Christie, 1989; Perkins et al., 1993).

4.2.1.1 Metoda podle Soxhleta

Spočívá v extrakci sušeného vzorku rozpouštědly: hexan, petrolether a diethylether v Soxhletově extraktoru po dobu 4-6 hodin. Patří mezi nejrozšířenější metody pro extrakci lipidů z potravin. Tato metoda je přednostně doporučována pro vzorky s vysokým obsahem neutrálních tuků a nízkým obsahem vody a sacharidů, např. olejniny (Christie, 1989; Perkins, 1993).

Tato technika byla použita např. při analýze lipidového složení svalové tkáně daňka (Piaskowska et al., 2015) nebo stanovení srnčího intramuskulárního tuku (Razmaite et al., 2015).

4.2.1.2 Metoda dle Folche

Jako rozpouštědlo využívá roztok chloroformu/methanolu v poměru 2 : 1. K vymytí nelipidických složek slouží solný roztok. Tato metoda se stala základem pro pozdější modifikace. Má uplatnění u vzorků bohatých na bílkoviny a vodu (např. maso). Nevýhodou je zátěž životního prostředí chloroformem, jeho regulace Evropskou unií a zdlouhavá filtrace (Christie, 1989; Perkins et al., 1993).

Jeho modifikovaná verze byla použita např. pro extrakci lipidů z mléka a másla (Jin-Man Kim et al., 2015), jehněčího masa (Phillip et al., 2005), daňčího masa (Milovanovic et al., 2007; Bureš et al., 2014) nebo jeleního masa (Dannenberger et al., 2013).

4.2.1.3 Metoda dle Bligh and Dyer

Bligh and Dyer (1959) nahradili binární systém podle autora Folche systémem terciálním, který zahrnuje chloroform/methanol/vodu (Cyberlipid; Christie, 1989; Perkins et al., 1993).

Iverson et al. (2001) prokázali, že metoda autorů Bligh and Dyer (1959) podhodnocuje množství celkových lipidů u vzorků obsahující více než 2 % lipidů. Nejběžnější modifikace spočívá v náhradě vody za 1 M NaCl a 0,2% roztok kyseliny fosforečné. Další možnou úpravou je přidání HCl, čímž bylo dosaženo vyšší výtěžnosti a zkrácení doby extrakce (Cyberlipid; Christie, 1989).

4.2.1.4 Metoda dle Hara & Radim

Jedná se o jednokrokovou extrakci rozpouštědlem hexan/isopropanol v poměru 3 : 2, filtraci a promytí vodným roztokem síranu sodného. Výhodou je použití netoxického rozpouštědla (Christie, 1989; Perkins et al., 1993).

Metoda Hara Radim byla použita např. pro získání tuku ze svaloviny králíků (Peiretti et al., 2012).

4.2.1.5 Methyl-tert-butyl ether extrakce

Metoda používá tři druhy rozpouštědel: methanol / methyl-*tert*-butyl ether / vodu. Některé studie prokazují stejné nebo lepší výsledky methyl-*tert*-butyl ether extrakce v porovnání s metodami od autorů Folche nebo Bligh and Dyer (Matyas et al., 2008).

4.2.1.6 Superkritická fluidní extrakce

Vhodnou univerzální metodou analýzy lipidů v různých druzích potravinách je superkritická fluidní extrakce (SFE). Je alternativou k extrakci pomocí organických rozpouštědel. Jako extrakční činidlo zde slouží kritická tekutina, nejčastěji oxid uhličitý, který má vlastnosti plynu i tekutin. Výhodou je rychlost, automatizace, všestranné využití a úspora rozpouštědel. Nevýhodou je pořizovací cena a požadavky na čistotu extrakční matrice (Klouda, 2003; Dionisi et al., 1999).

Tato metoda se jeví vhodnou technikou pro analýzu tuků z potravin. Výborných výsledků výtěžnosti lipidů dosahovala přednostně u mléka (Dionisi et al.,1999).

Cílem mnoha studií je najít vhodnou metodu extrakce pro určitý typ vzorku. Většina dnešních extrakcí v systému kapalina/kapalina vychází z výše uvedených metod. Některé práce se snaží malou modifikací těchto základních protokolů zvýšit výtěžnost lipidů (Christie, 1989). Volba vhodné metody závisí přednostně na typu vzorku a druhu lipidů, které chceme extrahovat. Je snaha nahradit zdlouhavé metody s velkými spotřebami rozpouštědel novými technikami např. extrakcí na pevné fázi, superkritickou fluidní extrakcí, extrakcí pomocí mikrovln, Fex® IKA extrakcí (Cyberlipid; Perkins et al., 1993).

4.2.2 Derivatizace

Zatímco krátké MK (méně než 10 C) mohou být analyzovány přímo, ostatní MK musí být podrobeny derivatizaci. Tímto procesem vzniká těkavější forma MK a dochází k poklesu polarity MK. Důsledkem je snížení adsorpce a dimerizace v plynné fázi. (Christie, 1989; Cazes, 2010).

Methylestery mastných kyselin (FAME), esterifikováné na –COOH koncích, jsou nejrozšířenější způsob derivatizace MK. FAME se získají zahříváním volných MK s přebytkem bezvodého methanolu za přítomnosti kyselého nebo bazického činidla (Cazes, 2010).

Podle použitých činidel rozlišujeme:

- kyselá transesterifikace
- zásaditá transesterifikace
- ostatní

4.2.2.1 Kyselá transesterifikace

Principem je atak protonu v místě karboxylového kyslíku, přesun elektronu a uvolnění glycerolu z esteru. Čím je vyšší reaktivita a přebytek přítomného alkoholu, tím reakce probíhá lépe. Mezi používaná činidla patří kyselina chlorovodíková, sírová, bortrifluorid (tzv. Lewisova kyselina) a acetylchlorid v methanolu.

Mezi nejčastěji popisované derivatizace v literatuře patří postup pomocí bortrifluoridu (12–14 % roztok BF_3 v methanolu), se kterou přišel Morrison et al. (1964). Je přednostně doporučována několika významnými institucemi např. Americkou organizací analytické chemie (Christie, 1989; Cazes, 2010; Eder et al., 1995).

4.2.2.2 Zásaditá transesterifikace

Princip je založen na zmýdelnění TGA a následné esterifikaci volných MK v bezvodém methanolu za přítomnosti bazického katalyzátoru. Nejběžnějšími činidly jsou sodný a draselný methoxidy (jejich 1-2% molový roztok v bezvodém methanolu).

Přesné postupy jsou popsány několika autory. Metodika pro analýzu esterů MK z triacyglycerolů a fosfolipidů byla sestavena Ichihara et al. (1996). Alternativní technika upravená pro vzorky mléka a rostlinných semínek používá draselný *tert*-butoxid a 2-methoxyethanol (Christie, 1989; Cazes, 2010, Seppänen-Laakso et al., 2002; Eder et al., 1995).

Výhodou zásadité transesterifikace je rychlost a použití nižších teplot. Je doporučována pro stanovení termolabilní MK a MK se středním řetězcem (Cazes, 2010).

4.2.2.3 Ostatní možnosti derivatizace

Jinou variantou je methylace bez předchozí extrakce. Vzorek tkáně, o maximální hmotnosti 10 mg nebo objemu 5 µl, je vložen do zkumavky se šroubovým uzávěrem. Poté je přidán 1 ml methanolické kyseliny chlorovodíkové, 1 ml methanolu a 0,5 ml hexanu. Zkumavka se pevně uzavře a je zahřívána na teplotu 100 ° C po dobu 1 h. Po ochlazení jsou napipetovány 2 ml hexanu a 2 ml vody. Hexanová vrstva se po krátkém odstátí odstraní (Eder, 1995).

Další možností, která je objasněna autory Woo et al., 1999, je použití *terc*-butyldimethylsilyl derivátů (tBDMSi.) Vyznačuje se zvýšenou sensitivitou,

termální a hydrolytickou stabilitou. Jedná se o potenciální postup pro stopové stanovení MK (Cazes, 2010; Eder et al., 1995).

Alternativou pro chromatografii s dusíkovo–fosfátovým detektorem je kyanomethyl derivatizace (Cazes, 2010; Eder et al., 1995).

Bylo prokázáno, že methylace není účinnou formou derivatizace pro MK s krátkým řetězcem. Vhodnou volbou jsou propyl a butyl estery mastných kyselin (Eder et al., 1995).

4.3 Vlastní stanovení PUFA plynovou chromatografií

GC byla poprvé použita pro stanovení MK v roce 1961. Od té doby zaznamenala značný pokrok. Dnes je nejpoužívanějším analytickým nástrojem pro stanovení MK se širokým uplatněním v nutriční, biochemické, biomedicínské, mikrobiologické a zemědělské oblasti. Celý proces analýzy se skládá ze čtyř kroků: nástřik, separace, detekce a vyhodnocení (Seppänen-Laakso et al., 2002).

4.3.1 Nástřik

Nástřik vzorku je popisován jako nejkritičtější krok analýzy. Nejčastěji je vzorek aplikován pomocí děliče toku (split injection). Při této technice jde část vzorku po odpaření do kolony a část je odvedena pryč. Množství vzorku aplikovaného do kolony vyjadřuje rozdělovací koeficient (split ratio). Potenciální nevýhodou je diskriminace (změna složení analytu) vzorku obsahující sloučeniny se širokou škálou různých hodnot teplot varu. MK s různě dlouhým řetězcem se v těchto hodnotách liší. Dle Banona lze diskriminaci složek analytu předejít použitím automatického vysokorychlostního nástřiku, malého objemu vzorku o nízké koncentraci a vysokou nástřikovou teplotou (250 - 300 °C). Druhou možností je nástřik bez děliče toku (splitness injection). Při této metodě se vzorek nedělí a vše je aplikováno přímo na kolonu.

Pro stanovení MK je doporučována technika nástřiku přímo na kolonu (cool on-column nástřik), která eliminuje možnost diskriminace složek (Seppänen-Laakso et al., 2002; Eder et al., 1995).

4.3.2 Separace

Separace vzorku probíhá v koloně na základě rozdílné schopnosti se poutat na stacionární fázi (SF). Pro GC jsou k dispozici dva typy kolon lišící se konstrukcí: náplňové a kapilární. Pro stanovení MK se využívají kapilární kolony, které jsou skleněné, plastové nebo křemenné. Vnitřní stěna působí jako nosič SF. Její povrch je chráněn polyimidovou vrstvou do 350 °C nebo hliníkovou do 425 °C.

Dělení kapilárních kolon podle způsobu zakotvení SF:

- SCOT *(Support-coated open tubular):* vrstvička nosiče se zakotvenou kapalinou
- PLOT (*Porous-layer open tubular*): vrstvička pevného sorbentu na vnitřní stěně
- WCOT (*Wall-coated open tubular*): tenký film kapalné fáze (Klouda, 2003)

Vlastnosti kolony, které ovlivňují její účinnost, jsou délka, vnitřní průměr, tloušťka filmu a polarita stacionární fáze. Délka kolony se pohybuje od 15 do 60 m. Typické varianty vnitřního průměru jsou 0,10; 0,15; 0,18; 0,25; 0,32 a 0,53 mm se sílou filmu SF 0,1 až jednotky μm. Delší kolony se vyznačují lepší separací, ale delšími retenčními časy. Užší kolony vykazují vyšší účinnost, ale nižší kapacitu. Polarita SF ovlivňuje retenční časy MK a účinnost separace. Velmi polární SF poskytují výborné výsledky, ale jsou tepelně nestálé. Nepolární volba SF je termostabilnější, ale nevykazuje vysokou selektivitu. Kompromisem pro mnoho analýz jsou středně polární SF. Příklady SF pro stanovení MK uvádí tabulka č. 5. Výběr parametrů kolony závisí na povaze analyzovaného vzorku a možnostech laboratoře. (Klouda, 2003; Cazes, 2010; Eder et al., 1995).

Tabulka č. 5: Příklady stacionárních fázi pro analýzu MK (Eder et al., 1998; Cazes, 2010)

Polarita stacionární fáze	**Příklad**	**Označení**
Nepolární SF	95% dimethyl-5% diphenylpolysiloxane	DB 5, PB-5
	methylpolysiloxane	SPB-1, DB1
Středně polární SF	35% phenyl polydimethylsiloxan	DB-35, HP-35
	50% phenyl polydimethylsiloxan	DB-17, HP-17
Polární SF	polyethylen glycol	DB-wax, OV 225
	25% cyanopropyl-25% phenyl-50% methyl	FFAP
	acidifikovaný polyethylen glycol	Supercolwax
	86% dimethyl-14% cyanopropylphenylpolysiloxane	DP 1701

4.3.3 Detekce

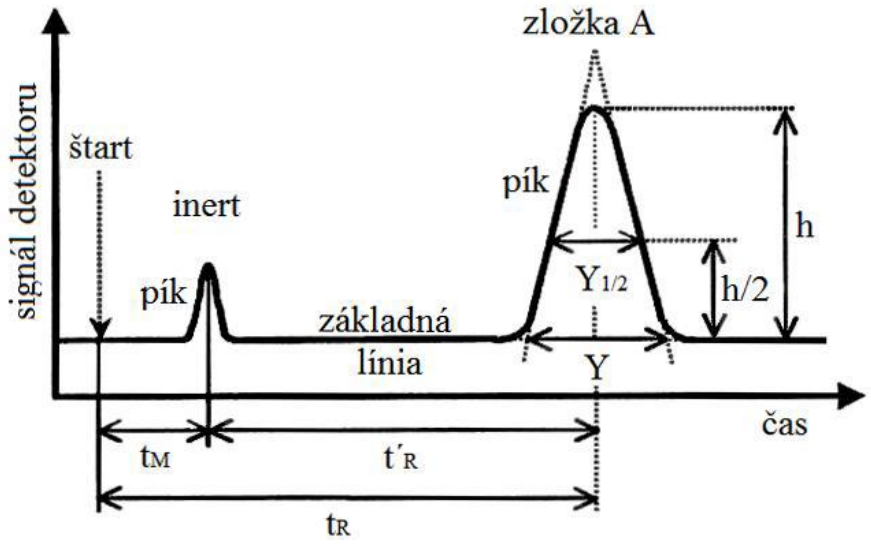
Detektor je zařízení, které reaguje na změnu signálu procházejícího nosného plynu. Tato změna je dána vlastností nosného plynu a složením analytu. Je označována za analytickou vlastnost. Signál detektoru je zpracován a vyhodnocen výpočetní technikou. Významnými požadavky na detektory jsou nízké detekční limity, stabilita, lineární odezva na koncentraci analytu a selektivita. Mezi nejpoužívanější patří tepelně-vodivostní detektor, plamenově ionizační detektor a detektor elektronového záchytu.

Plamenově ionizační detektor – FID (*Flame-Ionization Detector*) je nejpopulárnějším detektorem pro stanovení organických látek. Principem je ionizace molekul nosného plynu v kyslík-vodíkovém plamenu. Vzniklé ionty vedou elektrický proud mezi elektrodami. Přítomnost stanovené složky zvýší proud. Důležitým parametrem je nastavení průtoku nosného plynu, kyslíku a vzduchu u hořáku. Jedná se o velmi citlivý detektor s širokým rozsahem linearity. Detekční limity jsou v piktogramech analytu.

Dalšími možnostmi je infračervený detektor, chemiluminiscenční detektor, atomově absorpční nebo emisní detektor. Významné je spojení GC s hmotnostním detektorem (GC-MS), který separuje ionty podle poměru hmotnosti/náboje. Ionty jsou analyzovány pomocí magnetického, elektrostatického, kvadrupólového nebo průletového analyzátoru (Klouda, 2003).

4.3.4 Vyhodnocení

Vyhodnocování zahrnuje identifikaci a kvantifikaci MK výpočetní technikou, která zpracovává signál z detektoru. Grafickým výsledkem je chromatogram, závislost signálu na čase, viz obrázek č. 8. Lze z něho získat požadované informace k identifikaci a kvantifikaci analyzovaných složek (Klouda, 2003).



Obrázek č. 7: Chromatogram (Klouda, 2003)

Nejjednodušším způsobem identifikace MK je srovnání retenčních dat (retenční čas, retenční indexy) se standardy. Běžně dodávané komerční sady standardů zahrnují mix MK. Pro identifikaci neznámých MK je výhodné spojení GC s hmotnostním detektorem. Ten srovná hmotností spektrum MK s počítačovou databází a identifikuje MK (Klouda, 2003; Eder et al, 1995).

Za předpokladu lineární odezvy vychází množství a koncentrace analytu z plochy a výšky píku v chromatogramu. Data z chromatogramu jsou počítačovou integrací převedeny na plochu píku. Tyto informace mohou být vyhodnoceny různými technikami: metodou vnitřní normalizace, metodou absolutní kalibrace, metodou vnitřní standardizace nebo metodou standardního přídavku (Klouda, 2003; Eder et al., 1995).

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Materiály a metodika

5.1.1 Vzorky

Vybranými vzorky pro experimentální část bylo maso zvěřiny: srnčí, daňčí a jelení. Maso pocházelo ze hřbetu. Informace o původu, doby ulovení, pohlaví a stáří masa nebyly známy. Maso bylo po nákupu zmraženo. Stanovení spektra MK bylo provedeno po 5-6 měsících skladování.

Od každého druhu zvěřiny bylo šest vzorků. Souběžně se pro každý vzorek dělala dvě stanovení.

5.1.2 Chemikálie

Při praktické části byly použity následující chemikálie:

Použité chemikálie na extrakci celkových lipidů:

- směs dvou organických rozpouštědel: hexan: isopropanol v poměru 3 : 2 (označeno jako HIP 1) a v poměru 7 : 2 (označeno jako HIP 2),
- vodný roztok síranu sodného (koncentrace = 66,6 g Na_2SO_4, 1000 ml H_2O),
- bezvodý síran sodný.

Použité chemikálie na derivatizaci MK:

- isooktan s vnitřním standardem pentadekanové kyseliny (koncentrace = 1 mg/ml),
- fluorid boritý BF_3 (14% roztok v methanolu),
- nasycený roztok chloridu sodného,
- methanolát sodný (kovový sodík v množství 1,15 g na 100 ml methanolu).

Použité chemikálie a standardy při plynové chromatografii:

- standard 16 FAME (methylestery mastných kyselin; GLC Reference Standard 455, NU-CHECK PREP, Inc., Elysia MN, USA),
- nosný plyn: stlačený dusík s čistotou 99,999 %.

5.1.3 Laboratorní pomůcky a přístroje

Při praktické části byly použity následující laboratorní pomůcky a přístroje:

- analytické váhy: typ ABJ 220 – 4M, výrobce KERN & Sohn GmbH, Germany,
- lyofilizátor: Christ Alpha 1-2 LD,
- homogenizátor: Moulinex model D56,
- ultrazvuková lázeň: PS1000,
- vodní lázeň: K 10 E 1 Meningen,
- vakuová odparka: RV 05 - ST 1P-B model, IKA Labortechnik,
- chromatograf: plynový chromatograf Fisons 8000 Series (Fisons Instruments S.p.A., Rodano, Itálie) vybavený plameno-ionizačním detektorem (FID), autosamplerem HT300A (HTA, Brescia, Itálie) a kapilární kolonou DB-23 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm; Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA),
- chemické sklo v laboratoři: Erlenmeyerova baňka (250 ml), dělicí baňka (100 ml), odměrná baňka (10 ml, 25 ml, 50 ml), analytická nálevka, varné baňky se zábrusem (100 ml, 250 ml), vialky, kádinky, filtrační baňka (250 ml),
- další pomůcky: Büchnerova nálevka, pipety, pinzety, plastové zkumavky, stojan, držáky, filtrační papír.

5.1.4 Metodika

Byl použit postup podle autorů Komprda et al. (2015), který zahrnoval následující kroky: lyofilizace, homogenizace, extrakce, derivatizace MK a vlastní stanovení.

5.1.4.1 Lyofilizace

Vzorek masa (cca 15 g) byl navážen a rozkrájen na kousky. Takto připravený vzorek v hliníkových miskách byl vložen do lyofilizátoru Christ Alpha 1-2 LD s režimem: hlavní sušení při – 45 °C 24 hodin, finální sušení při – 50 °C 3 hodiny.

Lyofilizací byla odstraněna voda. Princip je založen na odnímání vody vakuovou sublimací.

5.1.4.2 Homogenizace, sonikace a filtrace

Zvážený zlyofilizovaný vzorek (cca 5 g) byl homogenizován přibližně dvě minuty za přídavku 30 ml HIP 1. Následně byl obsah převeden do Erlenmayerovy baňky a ponechán 15 min v ultrazvukové lázni. Aby byl všechen vzorek převeden, bylo vše průběžně proplachováno HIP 1.

Poté byla směs přefiltrována přes Büchnerovu nálevku a k filtrátu bylo přidáno 24 ml vodného roztoku síranu sodného o koncentraci 0,5 mol/l.

Homogenizací se docílilo rozmixování tkáně. Působením ultrazvuku se rozrušily membrány buněk a jejich obsah se uvolnil do roztoku. Filtrací došlo k odstranění nelipidových složek.

5.1.4.3 Extrakce

Vzorek byl následně přelit do dělicí nálevky, kde byl obsah pomalu protřepán (asi 30krát). Vše bylo průběžně proplachováno HIP 1. Po ustanovení rovnováhy v dělicí nálevce byla směs rozdělena na dvě nemísitelné kapaliny. Horní fáze byla tvořena lipidy a hexanem, dolní obsahovala isopropan a vodný roztok síranu sodného. Po oddělení horní fáze byla dolní vrstva podrobena reextrakci za přídavku 10 ml HIP 2. Po ustanovení nové rovnováhy byla horní organická fáze spojena s organickou fází z první extrakce. Tato směs byla následně přefiltrována přes bezvodý síran sodný do předem zvážené baňky se zábrusem.

Dalším krokem bylo odstranění rozpouštědla na vakuové odparce (při 50 °C, 50 otáčkách za minutu) a dusíkem. Po vychlazení byl vyextrahovaný tuk ze vzorku

změřen gravimetricky. Tímto krokem byly převedeny lipidy do rozpouštědla, které se následně odstranilo.

5.1.4.4 Derivatizace

Posledním krokem před samotným stanovením byla derivatizace. Cílem bylo převedení MK na methylestery mastných kyselin (FAME) v alkalickém prostředí methanolu pod zpětným chladičem za přídavku fluoridu boritého (BF_3).

Pro každý vzorek vyextrahovaného tuku byla provedena dvě stanovení. Cca 0,05 g tuku bylo naváženo do varné baňky se zábrusem a rozpuštěno v 3 ml isooktanu s vnitřním standardem pentadekanové kyseliny a 3 ml methonolátu sodného. Baňka se přichytila ke zpětnému chladiči a vložila do vodní lázně (teplota 60 °C, ±5 °C). Působením tepla byly uvolněny MK z TGA. Po 15 minutách byly napipetovány 3 ml BF_3 do zpětného chladiče. BF_3 umožnil přeměnu volných MK na FAME. Po dalších 5 minutách byla baňka odstavena.

Po zchlazení na laboratorní teplotu byly přidány 2 ml isooktanu, 5 ml nasyceného roztoku NaCl a vše dobře promícháno. Přídavkem NaCl byl vysrážen glycerol a FAME převedeny do isooktanu nacházejícího se v horní vrstvě. Z horní vrstvy byl odebrán vzorek a napipetován do vialky. Takto připravený vzorek byl uchován v ledničce, než bylo provedeno stanovení na GC (Komprda et al., 2015).

5.1.4.5 Stanovení

Vlastní stanovení probíhalo na plynovém chromatografu Fison 8000 Series s plamenově-ionizačním detektorem a autosamplerem HT300A. FAME byly separovány na kapilární koloně DB-23 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm, Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA). Jako nosný plyn byl použit dusík s čistotou 99,999 %. Nastavení chromatografu uvádí tabulka č. 6.

Tabulka č. 6: Nastavení chromatografu

Plyn:	N_2, průtok 1,23 ml/min
Tlak na kolonu:	200 kPa
Teplota injektoru:	250 ˚C
Teplota detektoru (FID):	260 ˚C
Teplotní program:	➢ 140 ˚C / 1 min, ➢ gradient 5 ˚C/min. do 200 ˚C se zádrží 2 min, ➢ gradient 3 ˚C/min. do 260 ˚C se zádrží 15 min.
Objem vzorku:	1 µl
Nástřik vzorku:	režim split, splitovací poměr 1 : 20

Kalibrace byla provedena pomocí standardu 16 FAME GLC 455 s přídavkem vnitřního standardu (methylpentadekanoát). Vyhodnocení vzorků probíhalo metodou vnitřního standardu.

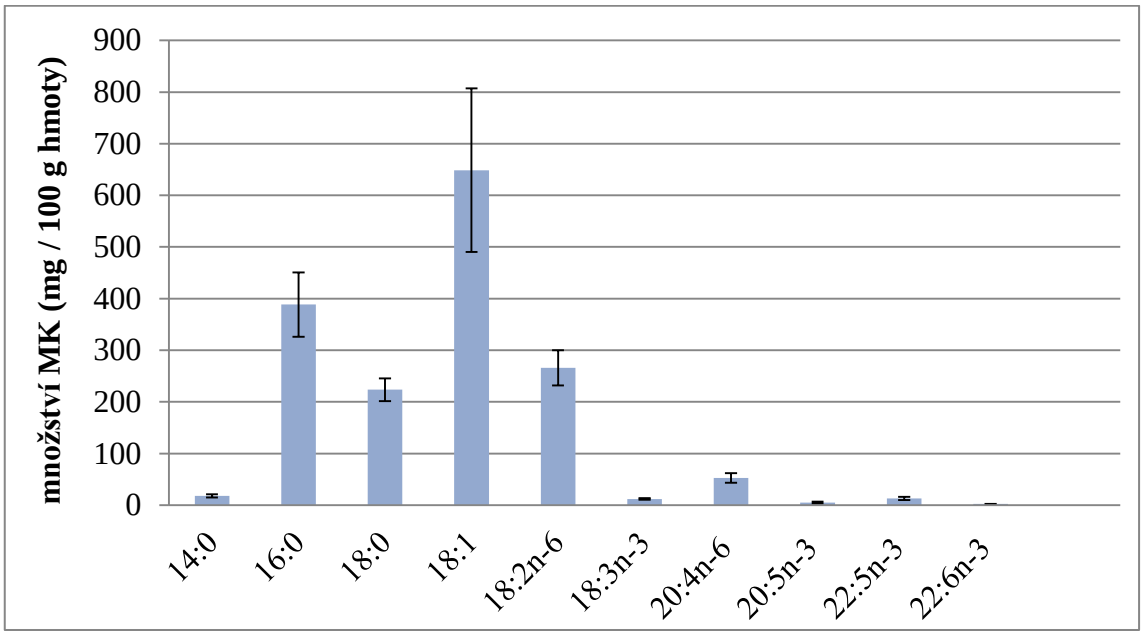
Kvantitativní a kvalitativní zpracování analýzy bylo provedeno na počítači v programu Clarity. Hodnoty naměřené jako procenta sumy MK byly přepočítány na hmotností jednotky mg/100 g daného materiálu. Vycházelo se z předpokladu, že ve 100 g tuku je 85 g MK.

5.1.4.6 Statistické vyhodnocení

Data byla zpracována pomocí programu Statistika 10 a Excel. Statistické zpracování bylo provedeno metodou analýzy variace (ANOVA), kdy rozdíly v obsahu MK mezi jednotlivými druhy zvěřiny byly vyhodnoceny pomocí *post-hoc* Tukeyova testu. Jednotlivé MK, skupiny MK a poměr n-6/n-3 PUFA byly graficky porovnány ve sloupcových grafech. Do grafů byly vloženy chybové úsečky, ve formě střední chyby průměru.

5.2 Výsledky a diskuze

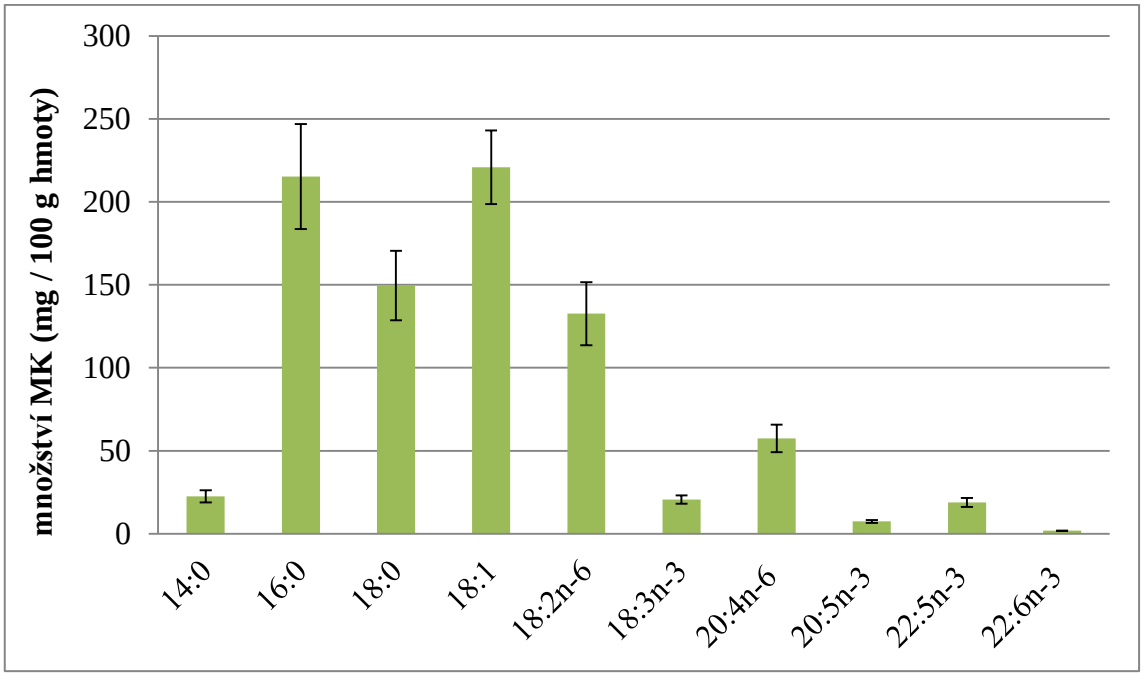
Profily MK v dančím, jelením a srnčím mase jsou znázorněny v grafech č. 8, 9 a 10.



Obrázek č. 8: Profil MK v daňčím mase. 14:0 (kyselina myristová), 16:0 (kyselina palmitová), 18:0 (kyselina stearová), 18:1 (kyselina olejová), 18:2n-6 (kyselinalinolová), 18:3n-3 (kyselina α-linolenová), 20:4n-6 (kyselina arachidinová), 20:5n-3(kyselina eikosapentaenová), 22:5n-3 (kyselina dokosapentaenová), 22:6n-3(kyselina dokosahexaenová), MK (mastné kyseliny), n = 6.

Jak vyplývá z grafu č. 8, nejvíce zastoupenou MK je kyselina olejová (průměr 648 mg/100 g masa), za ní se nachází kyselina palmitová (průměr 388 mg/100 g masa).

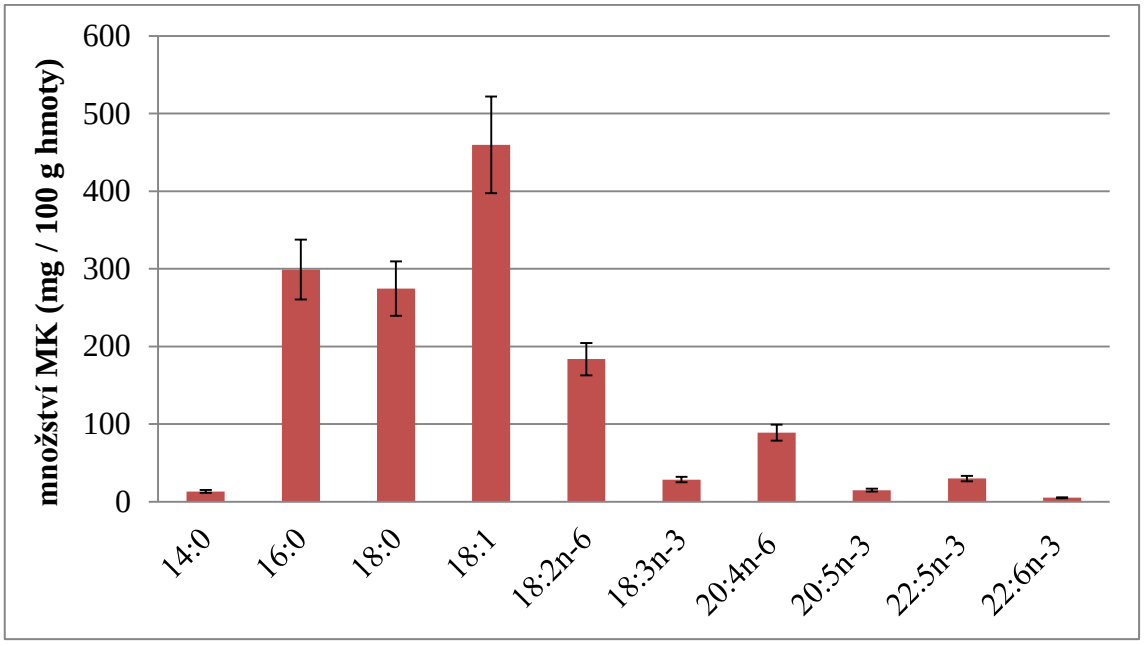
V analýze MK v daňčím mase provedeným Burešem et al. (2014) dosahovala nejvyšších naměřených hodnot kyselina palmitová. Za ní byly kyselina stearová a olejová. Volpelli et al. (2003) naměřili nejvyšší množství u kyseliny linolové.



Obrázek č. 9: Profil MK v jelením mase. 14:0 (kyselina myristová), 16:0 (kyselina palmitová), 18:0 (kyselina stearová), 18:1 (kyselina olejová), 18:2n-6 (kyselinalinolová), 18:3n-3 (kyselina α-linolenová), 20:4n-6 (kyselina arachidinová), 20:5n-3(kyselina eikosapentaenová), 22:5n-3 (kyselina dokosapentaenová), 22:6n-3(kyselina dokosahexaenová), MK (mastné kyseliny), n = 6.

Z naměřených výsledků není zřejmé, která MK převažuje. Nejvíce zastoupenými MK je kyselina olejová (průměr 220 mg/100 g masa) a palmitová (průměr 215 mg/100 g masa)

V analýze MK v jelením mase provedeným Burešem et al. (2014) dosahovala nejvyšších naměřených hodnot kyselina palmitová. Za ní byly kyselina stearová a olejová.



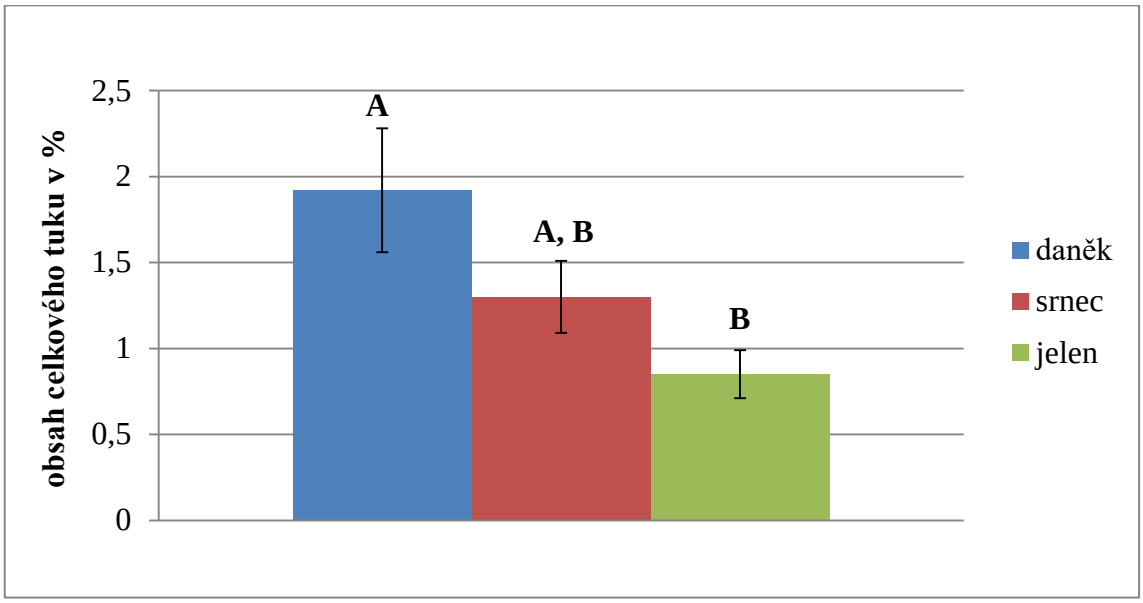
Obrázek č. 10: Profil MK v srnčím mase. 14:0 (kyselina myristová), 16:0 (kyselina palmitová), 18:0 (kyselina stearová), 18:1 (kyselina olejová), 18:2n-6 (kyselinalinolová), 18:3n-3 (kyselina α-linolenová), 20:4n-6 (kyselina arachidinová), 20:5n-3(kyselina eikosapentaenová), 22:5n-3 (kyselina dokosapentaenová), 22:6n-3 (kyselina dokosahexaenová), MK (mastné kyseliny), n = 6.

Z grafu č. 10 vyplývá, že nejvíce zastoupenou MK v srnčím mase byla kyselina olejová (průměr 460 mg/100 g masa), pak následovala kyselina palmitová (průměr 299 mg/100 g masa) a stearová (průměr 275 mg/100 g masa). Tyto MK patří mezi nejrozšířenější MK v různých druzích masa (Dannenberger, 2013).

Dannenberger et al. (2013) analyzovali srnčí maso od odlišně starých jedinců obojího pohlaví z různých lokalit. Obecně převažovala kyselina stearová. U srny z východní části Německa však kyselina olejová.

Volpelli et al. (2002), Bureš et al. (2014) a Dannenberger et al. (2013) prokázali vliv pohlaví, věku a krmení na spektrum MK v daňčím, jelením a srnčím mase. Menší rozdíly mezi naměřenými výsledky z předkládané diplomové práce (viz grafy č. 8, 9, 10) a hodnotami od autorů Bureš et al. (2014), Volpelli et al. (2002) a Dannenberger et al. (2013) mohou být způsobeny např. odlišnou metodikou postupu, stářím jedinců, pohlavím nebo environmentálními faktory.

Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska obsahu celkového tuku znázorňuje graf č. 11.



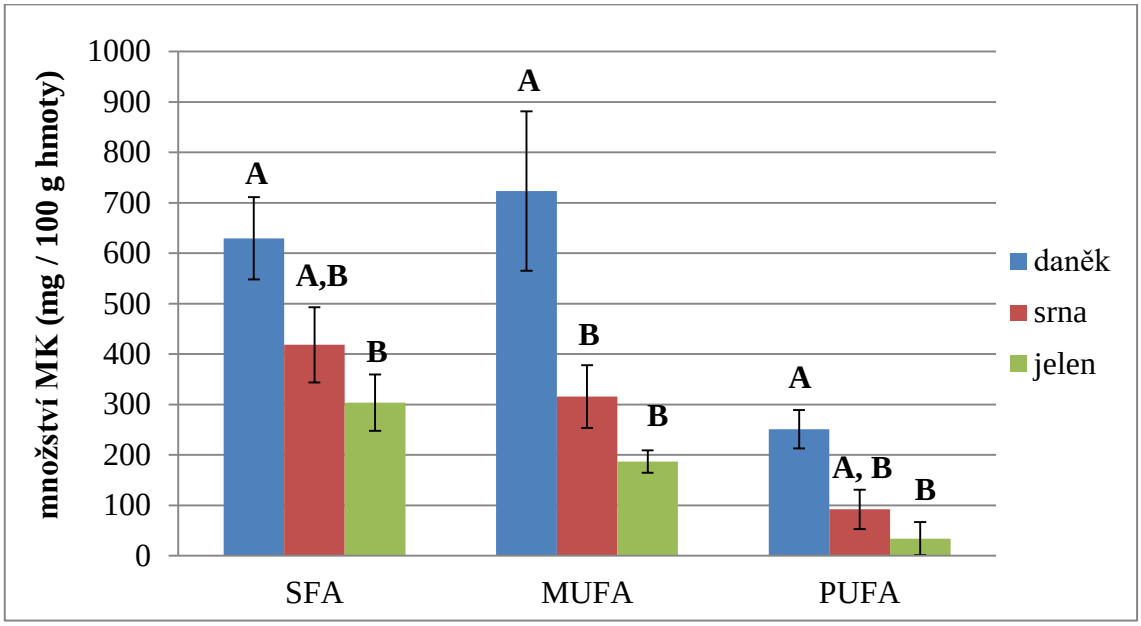
Obrázek č. 11: Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska obsahu tuku. A, B – průměry označené různými písmeny se liší při P < 0,05 (post-hoc Tukeyův test, n = 18), MK (mastné kyseliny).

Nejnižší obsah tuku byl naměřen v jelením mase, 0,71 %. Statisticky významný rozdíl byl pozorován mezi daňkem a jelenem (P < 0,05).

Celkový obsah tuku u všech druhů zvěřiny byl do 2 % a shodoval se s hodnotami uváděnými v literatuře, kde je průměrný obsah tuku uváděn do 3 % (Vompelli et al, 2002; Bureš et al., 2014; Wood et al., 2002; Hoffman at al., 2006).

I když to v předkládané diplomové práci nebylo sledováno, v mnoha studiích bylo vypozorováno, že obsah tuku mírně stoupá s věkem (Vompelli et al., 2002; Bureš et al., 2014). Zvěřina je obecně řazena mezi druhy masa s nejnižším obsahem tuku (Vompelli et al., 2002; Bureš et al., 2014; Wood et al., 2002; Hoffman et al., 2006; Milovanovic et al., 2007).

Porovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska množství SFA, MUFA a PUFA je znázorněno v grafu č. 12, jednotlivé MK pak v grafech č. 13, 14, 16 a 17.



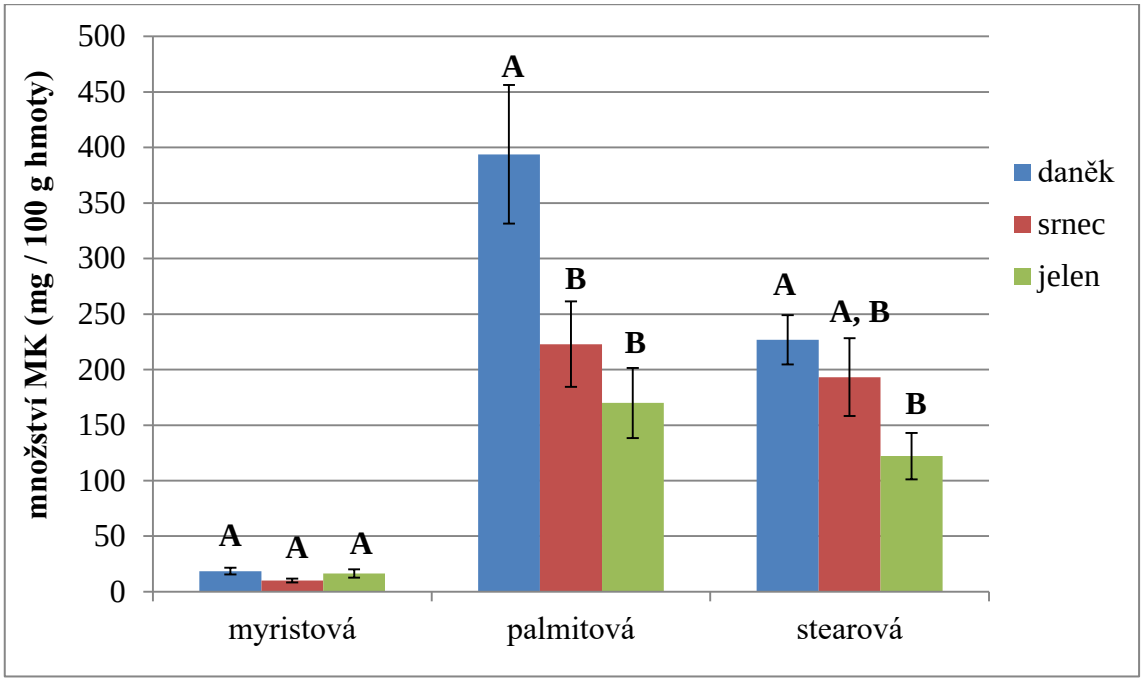
Obrázek č. 12: Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska množství SFA, MUFA, PUFA. A, B – průměry označené různými písmeny se liší v rámci testované skupiny MK při P < 0,05 (post-hoc Tukeyův test, n = 18), SFA (nasycené mastné kyseliny), MUFA (mononenasycené mastné kyseliny), PUFA (polynenasycené mastné kyseliny), MK (mastné kyseliny).

Průkazný rozdíl v obsahu všech skupin MK byl pozorován mezi daňkem a jelenem (P < 0,05). Zatímco u daňka převažují MUFA, u srnce a jelena SFA.

Srna se vyskytuje převážně na poli a je okusovačem. Daněk a jelen jsou typově podobní jedinci, oba jsou spásači a žijí v lese podobným způsobem. Výrazněji se liší pouze v původu. Daněk není evropský druh, je dovážený z Asie (Červený, 2010). Potenciálním důvodem rozdílu v profilu a množství MK mezi daňkem a jelenem může být rozdílná genetická výbava či pohlaví a věk. Hodnoty těchto ukazatelů však nebyly pro účely předkládané diplomové práce k dispozici.

Cygan-Szczegielniak et al. (2010) a Piaskowska et al. (2015) zjistili, že množství MUFA a PUFA roste se stářím jedince, MUFA jsou nezávislé na pohlaví jedince a PUFA jsou nižší u samičího pohlaví. Z důvodu nedostatečných podkladů k charakteristice zvěřiny nelze tento závěr v předkládané práci potvrdit.

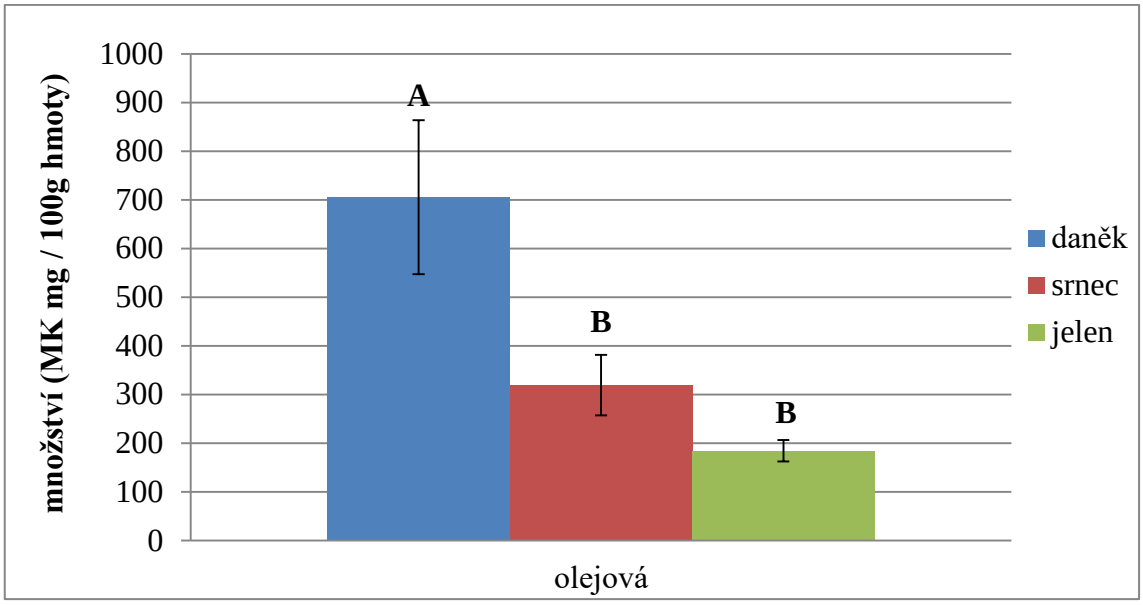
Ve výživovém doporučení je uváděno snížit příjem nasycených MK a zvýšit příjem polynenasycených MK ve vhodném poměru. Dle České společnosti pro výživu (2012) by měl být příjem SFA : MUFA : PUFA v poměru 1 : 1,4 : 0,6. Ve vzorcích testovaných v předkládané diplomové práci byly naměřeny následující poměry: u daňčího masa (1 : 1,2 : 0,4), srnčího (1: 0,8 : 0,3) a jeleního (1,6 : 1: 0,2). Vhodnému poměru se nejvíce přibližoval daněk.



Obrázek č. 13: Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska množství jednotlivých SFA. A, B – průměry označené různými písmeny se liší v rámci testované MK při P < 0,05 (post-hoc Tukeyův test, n = 18), SFA (nenasycená mastná kyselina), MK (mastná kyselina).

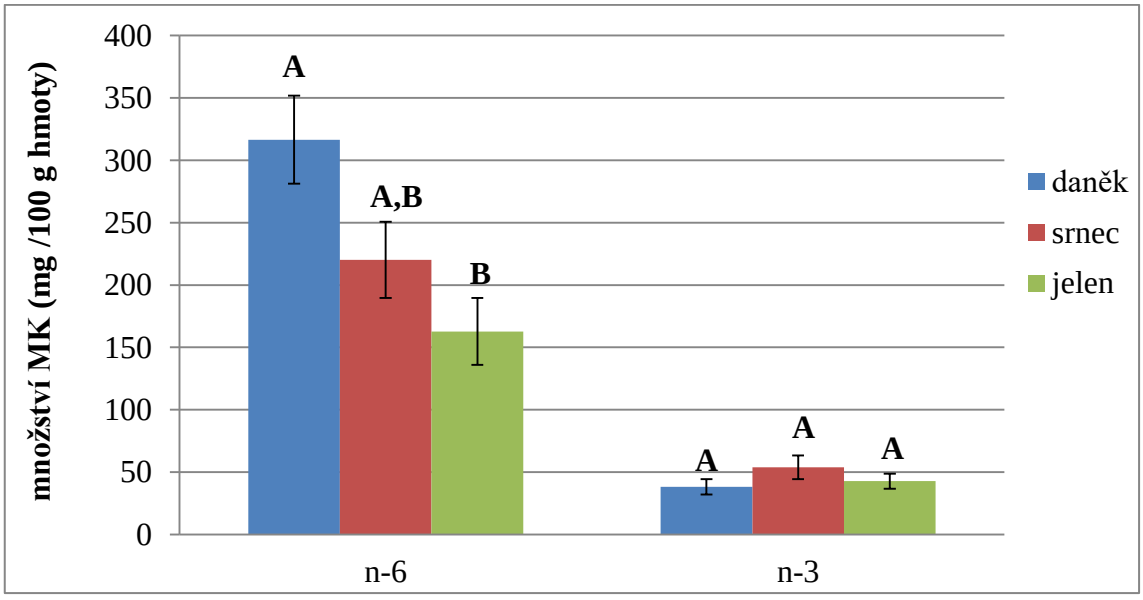
Jednotlivé druhy zvěřiny se od sebe v obsahu kyseliny myristové nelišily (P > 0,05). Rozdíl v množství kyseliny palmitové byl zjištěn u daňka (P < 0,05). V obsahu kyseliny stearové se od sebe průkazně lišil daněk a jelen (P < 0,05).

Nejvíce zastoupenou SFA byly kyselina palmitová a stearová, které patří mezi nejrozšířenější MK v mase a jsou významným zdrojem energie. Kyselina myristová a palmitová zvyšují hladinu TGA a LDL cholesterolu v plazmě a tím i riziko vzniku srdečně-cévních onemocnění. V důsledku rychlé přeměny na kyselinu olejovou působí kyselina stearová neurálně na hladinu krevních lipidů (Simopolous, 2006; Polak et al., 2008).



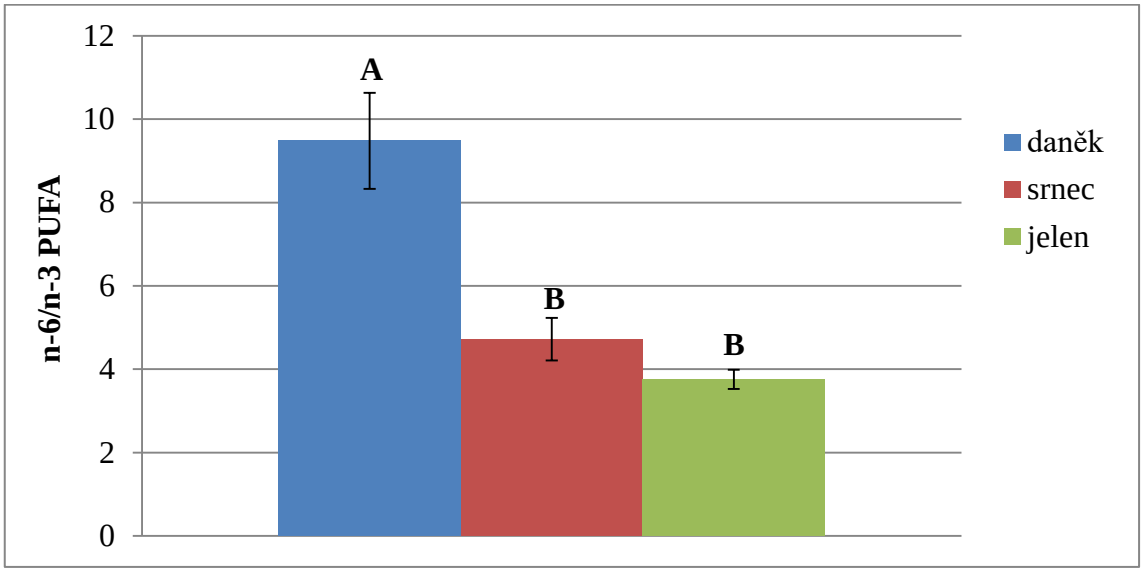
Obrázek č. 14: Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska množství kyseliny olejové. A, B – průměry označené různými písmeny se liší v rámci testované MK při P < 0,05 (post-hoc Tukeyův test, n = 18), MK (mastná kyselina).

Z mononenasycených MK se stanovovala pouze kyselina olejová, která je nejrozšířenější MUFA. Průkazně vyšší obsah této MK byl naměřen v daňčím mase (P < 0,05).



Obrázek č. 15: Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska množství n-6 PUFA a n-3 PUFA. A, B – průměry označené různými písmeny se liší v rámci testované skupiny MK při P < 0,05 (post-hoc Tukeyův test, n = 18), MK (mastné kyseliny), PUFA (polynenasycená mastná kyselina).

Průkazný rozdíl v množství n-6 PUFA byl zjištěn mezi daňčím a jelením masem ($P < 0,05$). V obsahu n-3 MK se jednotlivé druhy zvěřiny nelišily ($P > 0,05$). Obecně v mase převládají n-6 PUFA nad n-3 PUFA (Wood et al., 2007).



Obrázek č. 16: Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska poměru n-6/n-3 PUFA. A, B – průměry označené různými písmeny se liší při P < 0,05 (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test, n = 36), MK (mastná kyselina), PUFA (polynenasycená mastná kyselina).

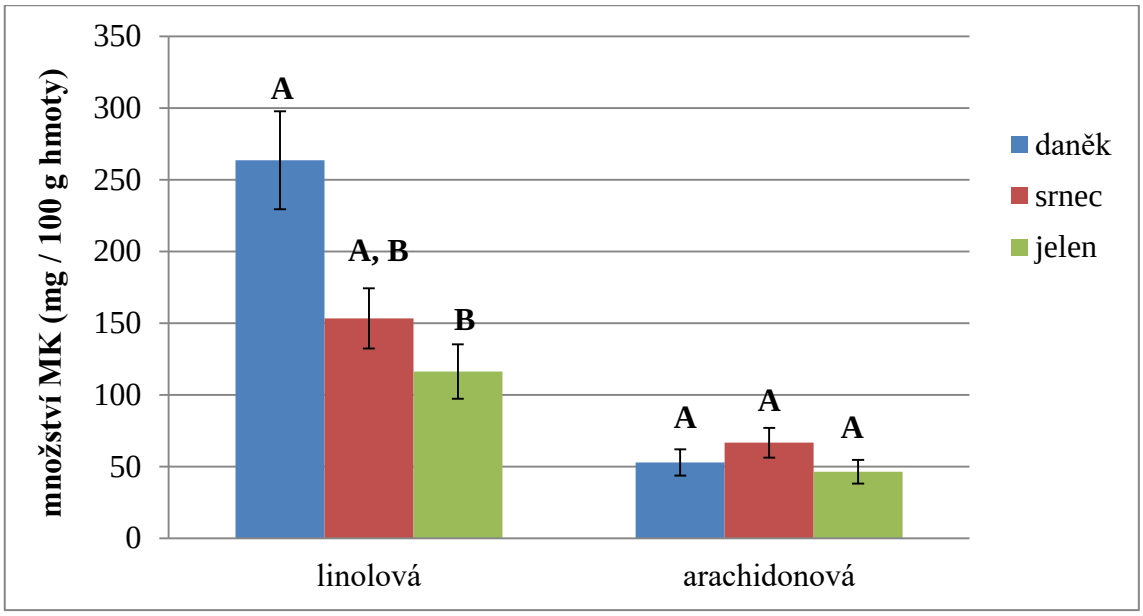
Vyšší poměr n-6/n-3 PUFA byl zjištěn u daňka ($P < 0,05$). Poměr srnčího a dančího masa se pohyboval kolem hodnoty 4 a splňoval požadavky České společnosti pro výživu (2012) na doporučovaný poměr do 5. Naměřené vysoké hodnoty u daňka mohou působit jako rizikový faktor řady chronických degenerativních onemocnění (Simopolous, 2006).

Naměřený poměr n-6/n-3 PUFA u jeleního masa odpovídal hodnotám získaným Polakem et al. (2008). Cygan-Szczegielniak et al. (2010) sledovali rozdíly ve složení MK v srnčím mase v závislosti na stáří a pohlaví. Poměr n-6 / n-3 PUFA se pohyboval kolem hodnoty 4. Nejnižší průměr 2.51 ± 1.56 byl naměřen u tří až čtyřleté srny. Razmaite et al. (2015) uvádí u srnčího masa hodnoty kolem 2,5. Volpelli et al. (2002) získali v daňčím mase poměr n-6/n-3 PUFA v rozmezí od 3,5 do 4,7.

Rozdíly mezi hodnotami získanými v předkládané diplomové práce a výsledky od autorů Cygan-Szczegielniak et al. (2010), Rozmaite et al. (2015) a Volpelli et al. (2002) mohou být způsobeny skladbou krmení a dobou ulovení.

Ve spektru MK u zvířat krmená koncentrátem během zimního období převažují n-6 PUFA. Volně žijící zvířata živící se trávou v letních obdobích jsou bohatší na n-3 PUFA (Wood, 2003). Informace o době ulovení a skladbě krmení zvěřiny nebyly v předkládané diplomové práci známy.

Sumy množství n-6 a n-3 PUFA jsou vyjádřeny v grafu č. 15, detailnější znázornění jednotlivých zástupců n-6 a n-3 PUFA je v grafech č. 17 a 18.



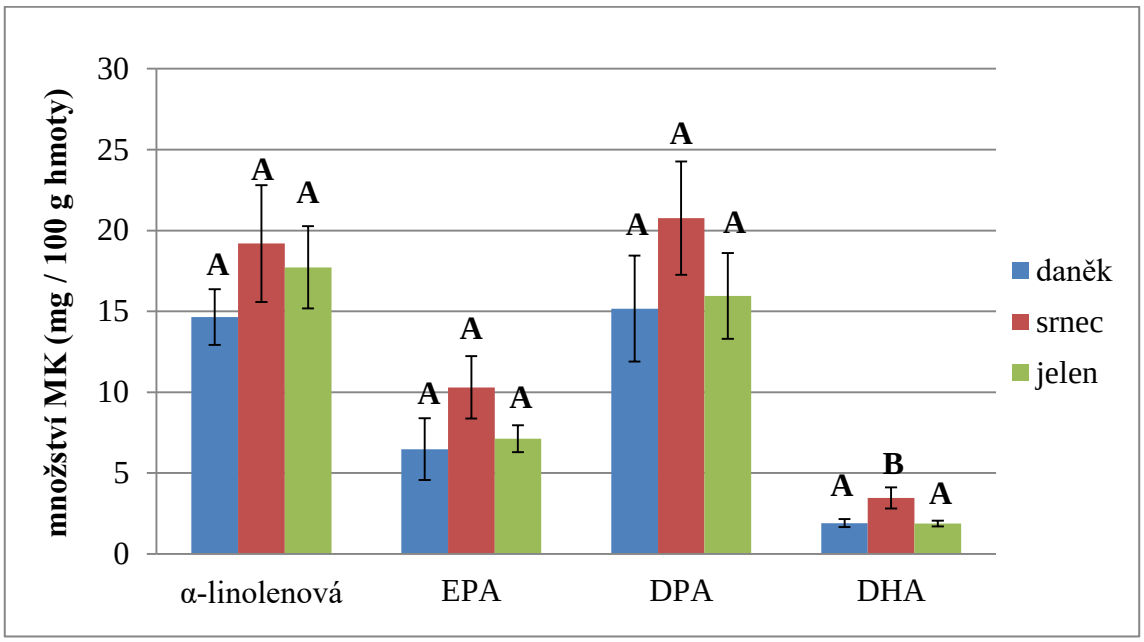
Obrázek č. 17: Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska množství jednotlivých n-6 PUFA. A, B – průměry označené různými písmeny se liší v rámci testované MK při P < 0,05 (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test, n = 18), MK (mastná kyselina), PUFA (polynenasycená mastná kyselina), kyselina linolová, kyselina arachidonová.

Jednotlivé druhy zvěřiny se v obsahu kyseliny arachidonové nelišily (P > 0,05). Rozdíl byl pozorován v obsahu kyseliny linolové mezi daňčím a jelením masem (P < 0,05).

Jak znázorňuje graf č. 17, průměrný obsah kyseliny linolové v daňčím mase byl 264 m/na 100 g masa, u kyseliny arachidonové 53 mg/100 g masa. Výsledky se shodovali s hodnotami uváděnými v práci Volpelli et al. (2002).

Průměrný obsah kyseliny linolové 153 mg/100 g masa a kyseliny arachidonové 67 mg/100 g masa v srnčím mase v předkládané diplomové práci se jen nepatrně lišil od výsledků autorů Cygan-Szczegielniak et al. (2010).

N-6 PUFA pozitivně ovlivňují plazmatickou hladinu TGA, zároveň negativně snižují frakci HDL cholesterolu (Simopolous, 2006). Dle EFSA (2010) doporučený denní příjem LA by měl být 10 g LA pro běžnou populaci. Příjem n-6 PUFA je v populaci dostatečný. Měla by být snaha o jeho snižování (Simopolous, 2006).



Obrázek č. 18: Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska množství jednotlivých n-3 PUFA. A, B – průměry označené různými písmeny se liší v rámci testované MK při P < 0,05 (post-hoc Tukeyův test, n = 18), MK (mastná kyselina), PUFA (polynenasycená mastná kyselina), EPA (kyselina eikosapentaenová), DPA (kyselina dokosapentaenová), DHA (kyselina dokosahexaenová).

Srnec vykazoval rostoucí trend v množství α-linolenové kyseliny, EPA a DPA. Rozdíly však byly statisticky neprůkazné (P > 0,05). Statisticky významné zvýšení bylo pozorováno pouze v obsahu DHA u srnce (P < 0,05).

Dle EFSA (2010) je minimální doporučovaný příjem EPA + DHA 250 mg, ALA 2 g. Některá literatura uvádí 350–400 mg EPA + DHA a 1 g ALA (Givens, 2006). Americká a evropská kardiologická společnost doporučuje příjem 1 g EPA + DHA v rámci prevence kardiovaskulárních chorob. Běžnou stravou bez ryb je nemožné pokrýt tyto vysoké hodnoty. Maso, ryby a rybí tuk jsou jediné významnější zdroje EPA + DHA. I když maso v porovnání s rybami a rybím tukem obsahuje mnohem menší množství těchto MK, jsou pro mnoho lidí pouze jediným zdroj EPA + DHA v potravě (Enser et al., 1996).

Podle mnoha autorů (Volpelli et al., 2002; Bureš et al., 2014; Wood et al., 2002; Hoffman et al., 2006; Milovanovic et al., 2007) je zvěřina dobrým zdrojem n-3 PUFA.

5.3 Závěr

Experimentální část této práce byla zaměřena na stanovení množství MK v daňčím, jelením a srnčím mase metodou plynové chromatografie na chromatografu Fison 8000 Series s plamenově-ionizačním detektorem.

V předkládané diplomové práci byl stanoven celkový obsah tuku u všech druhů zvěřiny do 2 %. Nejnižší obsah tuku ($P < 0,05$) byl naměřen v jelením mase 0,71 %. Vzhledem k výsledkům měření nejen v rámci diplomové práce, ale i s ohledem na výsledky vycházející z odborných publikací u ostatních autorů lze prohlásit, že zvěřina patří mezi druhy masa s nižším obsahem tuku.

V daňčím, srnčím i jelením mase byl největší výskyt kyseliny olejové, palmitové, stearové a linolové. Toto spektrum MK je typické pro živočišné tkáně.

Vztah mezi příjmem MK a zdravím je velmi silný. Důležitým aspektem v této souvislosti je poměr n-6/n-3 PUFA a množství n-3 PUFA. Vhodnému poměru n-6/n-3 PUFA se nejvíce přibližoval jelen (3,76), pak srna (4,7). Z hlediska sumy množství n-3 PUFA se od sebe jednotlivé druhy zvěřiny nelišily ($P > 0,05$). Statisticky průkazný rozdíl v obsahu fyziologicky důležité DHA ($P < 0,05$) byl pozorován u srnce (3,5 mg/100 g masa). Optimálnímu poměru SFA : MUFA : PUFA se nejvíce přibližoval daněk s hodnotou 1 : 1,2 : 0,4.

Nejvíce se od sebe v profilu MK lišili daněk a jelen. Vzhledem k podobnému životnímu stylu se jeví potenciálním důvodem odlišnosti rozdílná genetická výbava či pohlaví a věk. Hodnoty těchto ukazatelů však nebyly pro účely předkládané diplomové práce k dispozici.

Limitem diplomové práce může být větší míra variability. Z důvodu nedostatečných podkladů k charakteristice zvěřiny mohlo být rozpětí hodnot způsobeno širokou škálou faktorů, které ovlivňují složení tuků (pohlaví, věk, krmení, měsíc ulovení, environmentální faktory). Vliv zmíněných faktorů na profil MK potvrzuje mnoho studií (Vompelli et al., 2002; Bureš et al., 2014; Cygan-Szczegielniak et al., 2010; Razmaite et al, 2015; Barroeta et al., 2006).

Data diplomové práce společně s citovanými studiemi posilují vhodnost zařazení zvěřiny do jídelníčku. Zároveň však poukazují na nezbytnost dalších studií realizovaných na toto téma.

6 POUŽITÁ LITERATURA

6.1 Publikace

ANDERSON B. M. & MA WL. M., 2009: Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal?. *Lipids in Health and Disease*, 8, 33.

BARROETA A. C., 2007: Nutritive value of poultry meat: relationship between vitamin E and PUFA. *World's Poultry Science Journal*, 63, 281 - 284.

BUREŠ D. et al., 2014: Quality attributes and composition of meat from red deer (Cervus elaphus), fallow deer (Dama dama) and Aberdeen Angus and Holstein cattle (Bos taurus). *Jornal of the Science of Food and Agriculture*. 95, 2299 – 2306.

BLIGH, E. & DYER, W., 1959: A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911 - 917.

CALDER P. C., 2005: Polyunsaturated fatty acids and inflammation. 33, 423 – 427, in *Biochemical society: Inflammation and Haemostasis*. Institute of Human Nutrition.

CALDER P. C., 2006: N-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The Americal Journal of Clinical Nutrition*. 83, 1505 - 1519.

CALDER P. C., 2001: Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Lipids*. 36, 1007 – 104.

CASIMIR C., 2006: *Handbook of functional lipids*. Boca Raton: Press/Taylor & Francis, ISBN 978-1-4200-3918-4.

CAZES J., 2010: *Encyklopedia od chromatography*. Vyd.3. Danvers: CRP Press, ISBN 978-1-4200-8459-7.

CYGAN-SZCZEGIELNIAK D. et al. 1995: Influence of age and sex on the CLA and other fatty acids content in roe deer meat. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications: Chemistry/biochemistry*. 671(1-2), 113 - 131.

ČERVENÝ J., 2010: *Myslivost: Ottova encyklopedie*. vyd. 2, Praha: Ottovo nakladatelství. ISBN 978-80-7360-895-8.

DANNENBERGER D. et al., 2013: The effects of gender, age and region on macro- and micronutrient contents and fatty acid profiles in the muscles of roe deer and wild boar in Mecklenburg-Western Pomerania (Germany). *Meat Science*. 94, 39 - 46.

DIONISI F. et al., 1999: Supercritical CO2 extraction for fat analysis of food products. *Journal Of Food Science: Chemistry/Biochemistry*. 64(4), 612 - 614.

DOBSON G., 2002: Analysis od fatty acids in functional food with emphasis on omega 3 fatty acids and conjugated linoleic acids. in HURST W. J. *Methods of Analysis for Fuctional Foods and Nutraceuticals*. Vyd. 2. Florida: CRP Press.

DOSTÁL J., 2005: *Lékařská biochemie II: bioorganická chemie*. Vyd. 2. Brno: Masarykova univerzita, s. 115-126. ISBN 978-80-210-3789-2.

EDER K. et al., 1995: Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications: Chemistry/Biochemistry*. 671(1-2), 113 - 131.

EFSA, 2010: Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, *trans* fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*. 8(3):1461

ENSER M. et al., 1996: Fatty acid content and composition of english beef, lamb and pork at retail. *Meat Science*. 42(4), 443 - 456.

GIVENS D. et al. 2006: The role of meat as a source of n−3 polyunsaturated fatty acids in the human diet. *Meat Science*. 2006, 74(1), 209 - 218.

GONZALEZ-PERIZ A. et al., 2009: Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by n-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *The FASEB Journal*. 2009, 23(6), 1946 - 1957.

GROFOVÁ Z., 2010: Mastné kyseliny. *Med. pro Praxi*, 7(10), 338 – 390.

HARRIS W. S. et al., 2009: Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease. *AHA Science Advisory*. 119(6), 902 - 907.

HOFFMAN L. C. & WICKLUND E. 2006: Game and venison – meat for the modern consumer. *Meat Science*. 74, 197 - 208.

HOWE P. R. C., 2002: Tuna fishmeal as a source of DHA for n-3 PUFA enrichment of pork, chicken, and eggs. *Lipidy*. 11(37), 1065 - 1075.

ICHIHARA J. et al., 1996: An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids. *Lipid*. 31(5), 535 - 539.

JIRÁK R. & ZEMAN M. 2007: Vliv omega-6 a omega-3 mastných kyselin na psychické poruchy. Čes. a slov. Psychiat. 103, 420 - 426.

JUMP D. B. 2002: The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry*. 11(277), 8755 – 8758.

KIM J. et al. 2015: Determination of milk fat adulteration with vegetable oils and animal fats by gas ghromatographic analysis. *Journal of Food Science*. 80(9), 1945 - 1951.

KLOUDA P., 2003: *Moderní analytické metody*. Vyd. 2., Ostrava, ISBN 80-86369-07-2.

KOLETZKO B., 2001: Long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) and perinatal development. *Acta Pñ Diatr*., 2001, 90, 460 - 464.

KOMPRDA T. et al., 2015: Chromatografické stanovení polynenasycených mastných kyselin ve vybraných živočišných tkáních. *Chemické listy*. 109, 140 - 146.

KOMPRDA T. et al., 2014.: Effect of dietary eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on expression of rat liver genes controlling cholesterol homeostasis and on plasma cholesterol level. *Czech Journal of Animal Science* 59 (9), 391 - 398.

KOMPRDA T. et al., 2013: The effect of dietary Salvia hispanica seed on the content of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in tissues of selected animal species, including edible insects. *Journal of Food Composition and Analysis.* 32, 36 – 43.

KOMPRDA T., 2012: Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals. *Journal of Functional Food*. 4, 25 – 38.

KOMPRDA T., 2003: *Základy výživy člověka*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, ISBN 978-80-7157-655-6.

MATYASH V. et al. 2008: Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *The Journal of Lipid Research*. 49(5), 1137 - 1146.

MILOVANOVIĆ L. M. et al., 2007: Total lipids of the intramuscular tissue of fallow deer. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 89(3), 929 - 934.

MORRISON W. R. et al., 1964: Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride--methanol. *Journal of Lipid Research*. 5, 600 – 608.

LEDVINA M. et al., 2009: *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1414-4.

PIASKOWSKA N. 2015: The effect of gender on meat (Longissimus lumborum muscle) quality characteristics in the fallow deer (Dama dama L.). *Italian Journal of Animal Science: Chemistry/Biochemistry*. 14(3), 389 - 393.

PEIRETTI P. G., 2012: Effects of dietary fatty acids on lipid traits in the muscle and perirenal fat of growing rabbits fed mixed diets. *Animals*. 2(4), 55 - 67

POLAK T. et al., 2008: Cholesterol concentration and fatty acid profile of red deer (Cervus elaphus) meat. *Meat Science*. 80, 864 - 869.

POPL M. & KUBÁT J. 1981: *Základy chromatografie*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 44033158.

PRENTICE A. et al., 2005: *Encyclopedia of Human Nutrition.* Oxford: Elsevier, 2228 s. ISBN 0-12-150110-8.

RAZMAITĖ V. et al., 2015: Effect of different roe deer muscles on fatty acid composition in intramuscular fat. *Annals of Animal Science: Chemistry/Biochemistry*. 2015-01-1, 15(3), 775 – 784.

ROZÍKOVÁ V., 2010: *Plynová chromatografie esterů mastných kyselin ve vybraných druzích potravin*. Mendelova univerzita v Brně, 2010. Diplomová práce.

RUSSO G. L., 2009: Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *B i o ch e m i c a l Pharmacology*. 77, 9 3 7 – 9 4 6.

SEPPÄNEN-LAAKSO T. et al., 2002: Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*. 465, 39 - 62.

SIMOPOLOUS A. P., 2006: Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 60, 502 - 507.

KALAČ P., 2003: *Funkční potraviny: kroky ke zdraví*. Vyd. 1. České Budějovice: DONA. ISBN 80-7322-029-6.

TAPIERO H. et al., 2002: Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health. *Biomed Pharmacother*. 56, 215 - 222. DOI:

VELÍŠEK J. 2002: *Chemie potravin*. Vyd. 2., Tábor: OSSIS. ISBN 80-866-5900-3.

VYHNÁNKOVÁ L., 2007: PUFA omega 3 a jejich působení. *Pediatrie pro Praxi.* 3, 140 - 143

VOMPELLI L. et al., 2002: Meat quality in male fallow deer (Dama dama): effects of age and supplementary feeding. *Meat Sciences.* 65, 555 - 562.

WEBB E. C. & O'NEILL H. A., 2002: The animal fat paradox and meat quality. *Meat Sciences,* 80, 28 - 36.

WILHELM Z., 2013: Mastné kyseliny ω-3; od teorie po klinickou praxi. *Med. pro Praxi*. 10(2), 72 - 76.

WOOD J. D. et al., 2007: Fat deposition, fatty acid composition and meat quality. *Meat Science*. 78, 343 - 357.

WOOD J. D. et al., 2003: Effects of fatty acids on meat quality. *Meat Science. Elsevier: Meat science*. 2003, 66, 21 - 32.

ZOMBORZSKY Z. et al., 2000: Liver total lipids and fatty acid composition of shot red and fallow deer males in various reproduction periods. *Meat Sciences*. 126, 107 - 114.

6.2 Internetové zdroje

CYBERLIPID. Fats and oils [online]. [cit. 2016-02-23].
Dostupné z: http://www.cyberlipid.org/cyberlip/home0001.htm

ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD, 2013: Spotřeba potravin 2013: Zvěřina. [online]. [cit. 2016-02-22].
Dostupné z: http://www.apic-ak.cz/data_ak/14/k/Stat/SpotrebaPotravin2013.pdf

HOFMANOVÁ, J., 2013: Úloha lipidů v nádorovém procesu. In: *Genotoxicita a karciogeneze,* Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity Brno (online), [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/15_lipidy.html

CHRISTIE W. W., 1989: *Gas chromatography and lipids: A ractical quide* [online]. Vyd. 3. The Oily Press Ltd. [cit. 2016-02-24].
Dostupné z: www.lipidlibrary.co.uk

MUNI. Plynová chromatografie. *Muni* [online]. [cit. 2016-02-22]. Dostupné z: http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf

EUFIC. Tuky. [online]. [cit. 2015-09-15].
Dostupné z: http://www.eufic.org/page/cs/page/energy-nutrition/?article=6&p=2

PIOMELLI, D. 2000: Arachidonic acid. In: *American College of Neuropsychopharmacology* [online]. University of California, Irvine; Irvine, 2000. [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: http://www.acnp.org/g4/GN401000059/CH059.html

7 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Obecné schéma MK ……..12

Obrázek č. 2 Schéma symboliky n-9, n-6 a n-3 PUFA …….....13

Obrázek č. 3 Metabolická řada PUFA …….....15

Obrázek č. 4 Zjednodušené schéma syntézy eikosanoidů …….....17

Obrázek č. 5 Potenciální mechanizmy typické západní diety bohaté na n-6 PUFA podporující zánět a karcinogenezi …….....23

Obrázek č. 6 Zjednodušené schéma plynové chromatografie ……26

Obrázek č. 7 Chromatogram ……..35

Obrázek č. 8 Profil MK v daňčím mase ……42

Obrázek č. 9 Profil MK v jelením mase …….....43

Obrázek č. 10 Profil MK v srnčím mase …….....44

Obrázek č. 11 Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska obsahu tuku 45

Obrázek č. 12 Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska množství SFA, MUFA, PUFA ……..46

Obrázek č. 13 Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska množství jednotlivých SFA ……..47

Obrázek č. 14 Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska množství kyseliny olejové ……...48

Obrázek č. 15 Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska množství n-6 PUFA, n-3 PUFA ……..48

Obrázek č. 16 Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska poměru n-6/n-3 PUFA ……49

Obrázek č. 17 Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska množství jednotlivých n-6 PUFA ……50

Obrázek č. 18 Srovnání jednotlivých druhů zvěřiny z hlediska množství jednotlivých n-3 PUFA ……51

8 SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Přehled nejdůležitějších ……13, 14

Tabulka č. 2 Obecný přehled účinků eikosanoidů ……...18

Tabulka č. 3 Přehled biologických účinků některých konkrétních eikosanoidů řady n-6 PUFA ……..….... 18, 19

Tabulka č. 4 Zdroj n-6 a n-3 PUFA …….25

Tabulka č. 5 Příklady stacionárních fázi pro analýzu MK ……. 34

Tabulka č. 6 Nastavení chromatografu ……....41

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	Arachodonic Acid
ALA	Alfa-Linolenic Acid
COX	Cyklooxygenasa
HDL	High-Density Lipoprotein
EFSA	Europen Food Safety Authority (Evropský úřad pro bezpečnost potravin)
EPA	Eicosapentaenoic acid
FAO	Food And Agriculture Organization Of The United Nations
DGLA	Dihydro-Gama-Linolenic Acid
DHA	Docosahexaenoic Acid
FAME	Fatty Acid Methyl Ester
GC	Gas Chromatography (plynová chromatografie)
GLA	Gama-Linolenic Acid
GLC	Gas Liguid chromatography
GSC	Gas Solid chromatography
HIP 1	Hexan: Isopropanol v Poměru 3:2
HIP 2	Hexan: Isopropanol v Poměru 7:2
HNF 4	Hepatocyte Nuclear Factor
IRS	Insulin Receptore Signaling
LA	Linoleic Acid
LDL cholesterol	Low-Density Lipoprotein
MK	Mastné Kyseliny
MUFA	Monounsaturated Fatty Acid
n-6 PUFA	n-6 Pounsaturated Fatty Acid / Polynenasycené mastné kyseliny řady n-6
n-3 PUFA	n-3 Pounsaturated Fatty Acid / Polynenasycené mastné kyseliny řady n-3
NF	Nuclear Factor
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
SFA	Saturated Fatty Acid
SFE	Superkritická fluidní extrakce

SF	Stationary phase / Stacionární Fáze
TGA	Triacylglyceroly
TNF	Tumor Necrosis Factor
SREBP	Sterol-Regulatory Element-Binding Protein
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

10 Přílohy

Tabulka: Souhrnná tabulka naměřených hodnot

ZVĚŘINA		Tuk (% v FW)	14:0 (mg/100 g)	16:0 (mg/100 g)	18:0 (mg/100 g)
DANĚK	vzorek 1	1,01	14,283210	275,755423	180,985199
DANĚK	vzorek 2	1,01	17,352065	311,987282	205,043633
DANĚK	vzorek 1	4,34	37,667079	785,411216	319,036960
DANĚK	vzorek 2	4,34	39,229439	817,233163	377,964685
DANĚK	vzorek 1	1,33	9,943511	239,834399	107,705632
DANĚK	vzorek 2	1,33	9,077743	232,475546	122,231189
DANĚK	vzorek 1	0,66	5,941265	125,766411	294,464862
DANĚK	vzorek 2	0,66	11,646665	218,876846	249,754247
DANĚK	vzorek 1	2,45	21,515820	451,669226	210,620863
DANĚK	vzorek 2	2,45	21,007278	447,236368	211,377311
DANĚK	vzorek 1	1,78	19,108494	440,296220	237,317854
DANĚK	vzorek 2	1,78	16,070693	379,042099	204,673368
JELEN	vzorek 1	0,96	11,294438	186,553000	116,100146
JELEN	vzorek 2	0,96	14,445755	176,459306	134,624355
JELEN	vzorek 1	0,74	10,694113	131,497201	110,437204
JELEN	vzorek 2	0,74	9,023544	124,987838	106,880396
JELEN	vzorek 1	0,46	8,273208	91,876687	69,444750
JELEN	vzorek 2	0,46	10,185155	114,302591	68,293251
JELEN	vzorek 1	0,55	13,438741	91,783242	84,209857
JELEN	vzorek 2	0,55	12,415274	105,689249	83,255576
JELEN	vzorek 1	0,57	7,895096	105,102292	68,320792
JELEN	vzorek 2	0,57	11,391807	119,595255	82,301295
JELEN	vzorek 1	1,83	42,037460	398,198935	274,909922
JELEN	vzorek 2	1,83	45,056682	393,140159	266,887333
SRNEC	vzorek 1	1,44	10,087165	243,244394	160,040240
SRNEC	vzorek 2	1,44	15,419693	258,718287	187,915534
SRNEC	vzorek 1	0,46	3,506173	79,019903	55,927937
SRNEC	vzorek 2	0,46	3,457129	76,222761	59,866593
SRNEC	vzorek 1	0,41	3,408085	73,425620	63,805249
SRNEC	vzorek 2	0,41	3,432607	74,824191	61,835921
SRNEC	vzorek 1	1,68	13,329287	287,777711	244,812364
SRNEC	vzorek 2	1,68	11,054342	286,594030	242,370701
SRNEC	vzorek 1	2,41	20,186377	441,537359	394,131390
SRNEC	vzorek 2	2,41	20,463474	448,401417	400,926243
SRNEC	vzorek 1	1,45	7,3307116	194,015738	214,834543
SRNEC	vzorek 2	1,45	9,5970077	211,660216	232,069178

ZVĚŘINA		18:0 (mg/100 g)	18:1 (mg/100 g)	18:2n-6 (mg/100 g)	18:3n-3 (mg/100 g)
DANĚK	vzorek 1	180,985199	258,327538	240,168439	17,896758
DANĚK	vzorek 2	205,043633	294,806244	252,442162	22,505751
DANĚK	vzorek 1	319,036960	1865,951232	440,065426	24,958500
DANĚK	vzorek 2	377,964685	1664,695606	505,044786	22,698683
DANĚK	vzorek 1	107,705632	514,548536	141,167242	11,072693
DANĚK	vzorek 2	122,231189	498,635024	142,273145	12,325707
DANĚK	vzorek 1	294,464862	182,202446	111,212537	7,336384
DANĚK	vzorek 2	249,754247	238,504345	181,827349	14,921067
DANĚK	vzorek 1	210,620863	881,663750	310,990055	12,058087
DANĚK	vzorek 2	211,377311	894,087395	305,362298	12,126593
DANĚK	vzorek 1	237,317854	637,592937	287,495889	9,955749
DANĚK	vzorek 2	204,673368	535,140066	245,662588	7,966155
JELEN	vzorek 1	116,100146	236,911970	140,568555	11,616371
JELEN	vzorek 2	134,624355	207,069450	152,183388	14,190240
JELEN	vzorek 1	110,437204	131,225120	98,656439	22,394904
JELEN	vzorek 2	106,880396	127,467793	119,612497	17,005637
JELEN	vzorek 1	69,444750	97,396626	57,604309	11,866574
JELEN	vzorek 2	68,293251	98,821243	72,979702	14,573069
JELEN	vzorek 1	84,209857	176,379637	74,093685	14,937374
JELEN	vzorek 2	83,255576	171,550855	72,901108	13,302725
JELEN	vzorek 1	68,320792	152,870686	54,920685	10,479199
JELEN	vzorek 2	82,301295	166,722073	71,708532	11,668076
JELEN	vzorek 1	274,909922	327,863729	246,335773	36,742720
JELEN	vzorek 2	266,887333	321,465007	233,647961	33,929080
SRNEC	vzorek 1	160,040240	229,690363	220,885500	11,841572
SRNEC	vzorek 2	187,915534	251,866608	242,406848	15,319320
SRNEC	vzorek 1	55,927937	109,522355	88,745513	4,494443
SRNEC	vzorek 2	59,866593	112,249791	64,475056	5,553667
SRNEC	vzorek 1	63,805249	114,977227	40,204600	6,612891
SRNEC	vzorek 2	61,835921	113,613509	52,339828	6,083279
SRNEC	vzorek 1	244,812364	426,185511	214,972475	30,797331
SRNEC	vzorek 2	242,370701	428,655147	216,194147	30,746088
SRNEC	vzorek 1	394,131390	708,901970	194,036669	37,100723
SRNEC	vzorek 2	400,926243	707,789269	185,031641	37,302673
SRNEC	vzorek 1	214,834543	304,143674	168,903867	22,335861
SRNEC	vzorek 2	232,069178	323,873605	153,057413	22,129295

ZVĚŘINA		20:4n-6 (mg/100 g)	20:5n-3 (mg/100 g)	22:5n-3 (mg/100 g)	22:6n-3 (mg/100 g)
DANĚK	vzorek 1	96,686961	18,189548	30,872294	1,017230
DANĚK	vzorek 2	127,868132	21,047259	42,538366	2,017234
DANĚK	vzorek 1	30,2198432	2,483689	9,401679	1,374527
DANĚK	vzorek 2	36,861325	2,298431	12,569525	1,128560
DANĚK	vzorek 1	26,624737	3,258668	7,760074	1,894130
DANĚK	vzorek 2	30,568029	4,641917	9,157824	2,241750
DANĚK	vzorek 1	21,657224	2,305422	6,678603	0,996027
DANĚK	vzorek 2	74,762645	11,676341	24,608485	1,506630
DANĚK	vzorek 1	51,601077	3,287223	10,272351	3,493124
DANĚK	vzorek 2	52,484184	3,224100	10,444113	3,577525
DANĚK	vzorek 1	46,693263	3,281551	10,013998	2,364230
DANĚK	vzorek 2	38,506430	2,071794	7,776708	1,292012
JELEN	vzorek 1	38,697077	6,569023	13,602357	2,390572
JELEN	vzorek 2	37,665631	7,464552	12,550818	2,280017
JELEN	vzorek 1	51,718033	10,132856	21,546696	2,459593
JELEN	vzorek 2	45,207558	8,350940	17,574526	2,425083
JELEN	vzorek 1	26,067427	4,031011	7,705098	1,292982
JELEN	vzorek 2	37,743925	5,732152	11,225529	1,824714
JELEN	vzorek 1	22,549653	6,102973	10,157173	1,050057
JELEN	vzorek 2	27,417025	5,243031	10,279905	1,165461
JELEN	vzorek 1	28,019653	3,654420	9,012341	1,105753
JELEN	vzorek 2	32,284395	4,383088	10,402637	1,280865
JELEN	vzorek 1	109,343607	11,708761	35,681238	2,753485
JELEN	vzorek 2	101,145734	12,159366	31,853484	2,499996
SRNEC	vzorek 1	63,520193	7,442222	16,114768	2,171478
SRNEC	vzorek 2	100,546989	11,042571	21,835210	3,280483
SRNEC	vzorek 1	22,097218	2,821039	5,615693	0,956355
SRNEC	vzorek 2	20,162345	2,830717	5,714619	0,901668
SRNEC	vzorek 1	18,226794	2,840394	5,813544	0,846980
SRNEC	vzorek 2	19,194442	2,835555	5,764081	0,874324
SRNEC	vzorek 1	85,717815	20,981793	32,046853	6,539136
SRNEC	vzorek 2	85,406446	20,598710	31,627474	6,354249
SRNEC	vzorek 1	103,880590	14,807635	32,910722	4,260405
SRNEC	vzorek 2	100,948976	15,004157	33,834752	4,124131
SRNEC	vzorek 1	94,768717	11,228196	30,450282	5,808491
SRNEC	vzorek 2	85,254146	11,266519	27,441143	5,487018

ZVĚŘINA		suma SFA	suma MUFA	suma PUFA
DANĚK	vzorek 1	471,023833	258,327538	404,831233
DANĚK	vzorek 2	534,382980	294,806244	468,418836
DANĚK	vzorek 1	1142,115256	1865,951232	508,503659
DANĚK	vzorek 2	1234,427288	1664,695603	580,601304
DANĚK	vzorek 1	357,483542	514,548536	191,777539
DANĚK	vzorek 2	363,784478	498,635024	201,208365
DANĚK	vzorek 1	426,172539	182,202446	150,186197
DANĚK	vzorek 2	480,277764	238,504345	309,302515
DANĚK	vzorek 1	683,805910	881,663750	391,701914
DANĚK	vzorek 2	679,620959	894,087395	387,218808
DANĚK	vzorek 1	696,722568	637,592937	359,804616
DANĚK	vzorek 2	599,786162	535,140066	303,275691
JELEN	vzorek 1	313,947585	236,911970	213,443952
JELEN	vzorek 2	325,529416	207,069450	226,334648
JELEN	vzorek 1	252,628519	131,225120	206,908519
JELEN	vzorek 2	240,891780	127,467793	210,176235
JELEN	vzorek 1	169,594646	97,396626	108,567393
JELEN	vzorek 2	192,780998	98,821243	144,079084
JELEN	vzorek 1	189,431842	176,379637	128,890912
JELEN	vzorek 2	201,360100	171,550855	130,309253
JELEN	vzorek 1	181,318181	152,870686	107,192048
JELEN	vzorek 2	213,288358	166,722073	131,727594
JELEN	vzorek 1	715,146318	327,863729	442,565615
JELEN	vzorek 2	705,084176	321,465007	415,235598
SRNEC	vzorek 1	413,371800	229,690363	321,975729
SRNEC	vzorek 2	462,053516	251,866608	394,431302
SRNEC	vzorek 1	138,454014	109,522355	124,730260
SRNEC	vzorek 2	139,546485	112,249791	99,637730
SRNEC	vzorek 1	140,638955	114,977227	74,545199
SRNEC	vzorek 2	140,092720	113,613509	87,091463
SRNEC	vzorek 1	545,919363	426,185511	391,055397
SRNEC	vzorek 2	540,019073	428,655147	390,927115
SRNEC	vzorek 1	855,855127	708,901970	386,996644
SRNEC	vzorek 2	869,791135	707,789269	376,246203
SRNEC	vzorek 1	416,180994	304,143674	333,495408
SRNEC	vzorek 2	453,326402	323,873605	304,635525

ZVĚŘINA		suma n-6 PUFA	suma n-3 PUFA	poměr n-6/n-3 PUFA
DANĚK	vzorek 1	336,855401	67,975832	4,955517
DANĚK	vzorek 2	380,310223	88,108611	4,316379
DANĚK	vzorek 1	470,285265	38,218397	12,305206
DANĚK	vzorek 2	541,906106	38,695200	14,004478
DANĚK	vzorek 1	167,791978	23,985567	6,995538
DANĚK	vzorek 2	172,841161	28,367200	6,092993
DANĚK	vzorek 1	132,869757	17,316437	7,673042
DANĚK	vzorek 2	256,589991	52,712524	4,867723
DANĚK	vzorek 1	362,591122	29,110787	12,455558
DANĚK	vzorek 2	357,846478	29,372333	12,183113
DANĚK	vzorek 1	334,189084	25,615530	13,046346
DANĚK	vzorek 2	284,169029	19,106670	14,872764
JELEN	vzorek 1	179,265628	34,178324	5,245009
JELEN	vzorek 2	189,849023	36,485628	5,203391
JELEN	vzorek 1	150,374462	56,534050	2,659891
JELEN	vzorek 2	164,820048	45,356187	3,633904
JELEN	vzorek 1	83,671724	24,895667	3,360895
JELEN	vzorek 2	110,723613	33,355466	3,319504
JELEN	vzorek 1	96,643339	32,247578	2,996917
JELEN	vzorek 2	100,318129	29,991123	3,344927
JELEN	vzorek 1	82,940338	24,251714	3,419978
JELEN	vzorek 2	103,992929	27,734668	3,749564
JELEN	vzorek 1	355,679407	86,886206	4,093623
JELEN	vzorek 2	334,793666	80,441928	4,161929
SRNEC	vzorek 1	284,405687	37,570042	7,570012
SRNEC	vzorek 2	342,953718	51,477585	6,662195
SRNEC	vzorek 1	110,842725	13,887532	7,981455
SRNEC	vzorek 2	84,637057	15,000671	5,642217
SRNEC	vzorek 1	58,431384	16,113810	3,626168
SRNEC	vzorek 2	71,534221	15,557240	4,598130
SRNEC	vzorek 1	300,690281	90,365114	3,327504
SRNEC	vzorek 2	301,600593	89,326523	3,376383
SRNEC	vzorek 1	297,917157	89,079487	3,344396
SRNEC	vzorek 2	285,980494	90,265714	3,168207
SRNEC	vzorek 1	263,672579	69,822832	3,776308
SRNEC	vzorek 2	238,311546	66,323977	3,593143