

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Stanovení spektra mastných kyselin ve vybraných pokrmových tucích

bakalářská práce

Autor práce: Jana Razimová

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant (ZLP)

Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Špička, CSc.

Datum odevzdání práce: 3.5.2013

Abstrakt

Stanovení spektra mastných kyselin ve vybraných potravinářských tucích

Cílem této práce je seznámit se s metodami pro stanovení spektra mastných kyselin, především s plynovou chromatografií s využitím plamenově ionizačního a hmotnostně spektrometrického detektoru.

První část práce se zabývá rozdělením lipidů, dále přehledem mastných kyselin a jejich vlastnostem. Nastíněno je dělení a výroba potravinářských tuků. Další oddíl se věnuje možnostem stanovení mastných kyselin v tucích, přičemž největší důraz je kladen na plynovou chromatografii.

Druhá část se věnuje praktickému stanovení mastných kyselin ve vybraných potravinářských tucích (Hera, Stela, Zlatá Haná, Sluna, Perla máslová, Flora, Rama máslová, Alfa máslová). Byly provedeny tři měření s odstupem 3 měsíců. Od každého tuku byly při každém odběru odebrány 3 vzorky, takže se celkem pracovalo se 72 vzorky. Vzorky se před vlastním měřením musely připravit z důvodu zvýšení jejich těkavosti. V tomto případě se konkrétně provedla esterifikace, při které se mastné kyseliny převedly na methylestery mastných kyselin.

Vlastní měření bylo provedeno plynovým chromatografem s využitím plamenově ionizačního a hmotnostně spektrometrického detektoru. Pro vyhodnocení a konečné zpracování vzorků byly použity programy MS Workstation 6.9, Microsoft Excel – Statistické programy a Program Statistica od firmy StatSoft CR, s.r.o.

Převládající mastnou kyselinou ve všech tucích je kyselina olejová. Další silně zastoupenou kyselinou ve všech tucích je kyselina palmitová. Jedinou výjimku tvoří tuk Flora, kde má největší procentuální zastoupení kyselina linolová. Mastné kyseliny typické pro mléčný tuk (kyselina máselná a kapronová, TFA a kyseliny s lichým počtem uhlíků (C15 a C17)) jsou nejvíce zastoupeny v tuku Zlatá Haná. U ostatních tuků se tyto MK vyskytují jen ve velmi malých množstvích.

Při porovnání jednotlivých odběrů je patrné, že se od sebe více či méně odlišují. Příčina vzniku rozdílů u jednotlivých odběrů je pravděpodobně v tom, že výrobky jsou tvořeny míšením tuků. Tudíž může docházet při výrobě k menším odchylkám ve složení.

Z analýzy hlavních komponent je patrné, že se tuk Zlatá Haná od ostatních tuků nejvíce odlišuje. Příčinou jsou MK typické pro mléčný tuk, které se v tomto tuku vyskytují v největším množství. Samostatnou skupinu tvoří i tuk Flora, kde je naopak největší množství polynenasycených MK (kyselina linolová). Tuky Stela a Sluna si jsou složením MK velmi podobné, převažují u nich totiž kyselina olejová a palmitová. To samé platí i o tucích Perla máslová a Rama máslová, kde se navíc ve větší míře objevila i kyselina linolová.

Klíčová slova

Lipidy, mastné kyseliny, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie.

Abstract

Determination of the fatty acids composition in selected shortenings

The objective of this work is to get acquainted with methods for determination of fatty acids profile, especially with gas chromatography using the flame ionization detector and the mass spectrometer.

The first part of the work deals with lipids classification, summary of fatty acids and their properties. It contains also a draft of edible fats division and their production. Other section deals with ways of determination of fatty acids in fats and puts the main emphasis on gas chromatography.

The second part deals with the determination of fatty acids in selected shortening fats (Hera, Stela, Zlatá Haná, Sluna, Perla máslová, Flora, Rama máslová, Alfa máslová) in practice. Three measurements were taken at three months intervals. There were taken three samples from each fat during each sampling, it means 72 samples were taken in total. Samples had to be adjusted to increase their volatility. In this case specifically the esterification was made where fatty acids were transformed into fatty acids methyl esters.

The measurement was made by the flame chromatograph using the flame ionization detector and the mass spectrometer. For final samples evaluation softwares MS Worskstations 6.9, Microsoft Excel – Statistical programs and software Statistica by Stat Soft ČR, s.r.o. were used.

The prevailing fatty acid in all fats is oleic acid. Another acid widely presented in all fats is palmitoleic acid. The only exception is fat Flora where linoleic acid has the biggest percentage. Fatty acids typical for milk fat (butyric and caproic acids, TFA and acids with odd number of carbon atoms (C15 a C17)) are chiefly presented in fat Zlatá Haná. In other fats these fatty acids are found just in small quantities.

By comparing single samplings it becomes clear that they are more or less different. The reason of these differences lies probably in fats mixing. That is why during production some small differences in their composition may occur.

The principal komponent analysis shows that Zlatá Haná is the most different fat. The reason is that this fat contains the most fatty acids typical for milk fat. Another separate group is represented by fat Flora where the biggest quantity of polyunsaturated fatty acids (linoleic acid) can be found. Fats Stela and Sluna have very similar fatty acids compositions, the prevailing fatty acids are oleic acid and palmitoleic acid. That is also the case of Perla máslová and Rama máslová where even linoleic acid was found in quite a big quantity.

Key words

Lipids, fatty acids, gas chromatography, mass spektrometry.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5.2013

.....

Jana Razimová

Poděkování

Mé poděkování a vděčnost patří především doc. Ing. Jiřímu Špičkovi, CSc. za jeho čas, pozornost, neocenitelnou pomoc, rady, připomínky, ochotu a zájem. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Tamaře Pelikánové za pomoc v laboratoři.

Nakonec patří můj velký dík mé rodině za pomoc a podporu při studiu.

Obsah

Seznam použitých zkratek	10
Úvod	11
1 Teorie	12
1.1 Lipidy	12
1.1.1 Homolipidy	12
1.1.2 Heterolipidy	13
1.1.3 Komplexní lipidy	14
1.2 Mastné kyseliny	14
1.2.1 Nasycené MK	15
1.2.2 Nenasycené MK s jednou dvojnou vazbou	16
1.2.3 Nenasycené MK s několika dvojnými vazbami	19
1.2.4 Další mastné kyseliny	20
1.3 Výroba tuků	22
1.3.1 Výroba ztužených tuků	22
1.3.2 Výroba směsných tuků	23
1.3.3 Výroba másla	23
1.4 Stanovení MK	24
1.5 Plynová chromatografie	25
1.5.1 Derivatizace v plynové chromatografii	26
1.5.2 Přístrojové vybavení	27
1.5.3 Chromatogramy a hmotnostní spektra	35
2 Cíl práce a předpokládané hypotézy	36
3 Materiál a metoda	37

3.1 Materiál.....	37
3.1.1 Jednotlivé tuky.....	37
3.2 Přístrojové vybavení	39
3.3 Příprava vzorku.....	40
3.3.1 Chemikálie	40
3.3.2 Pracovní postup při přípravě vzorků před zavedením do GC.....	40
3.4 Vyhodnocení a zpracování vzorku	41
3.4.1 Analýza hlavních komponent	42
4 Výsledky a diskuse	43
4.1 Výběr mastných kyselin	43
4.2 Spektrum vybraných MK u jednotlivých tuků	44
4.2.1 Alfa máslová.....	44
4.2.2 Flora.....	45
4.2.3 Hera.....	46
4.2.4 Perla máslová.....	47
4.2.5 Rama máslová.....	48
4.2.6 Sluna	49
4.2.7 Stela	50
4.2.8 Zlatá Haná.....	51
4.3 Rozdíly mezi jednotlivými odběry	52
4.4 Aplikace analýzy hlavních komponent.....	54
5 Závěr.....	60
6 Seznam informačních zdrojů	61

Seznam použitých zkratek

MK – Mastné Kyseliny

SAFA – nasycené MK (Saturated Fatty Acids)

MUFA – nenasycená MK s jednou dvojnou vazbou (MonoUnsaturated Fatty Acids)

PUFA – nenasycená MK s několika dvojnými vazbami (PolyUnsaturated Fatty Acids)

TAG – TriAcylGlycerol

LDL – lipoproteiny s nízkou hustotou (Low-Density Lipoproteins)

HDL - lipoproteiny s vysokou hustotou (High-Density Lipoproteins)

TFA – trans-nenasycené MK (Trans Fatty Acid)

GC – plynová chromatografie (Gas Chromatography)

FID – plamenově ionizační detektor (Flame Ionization Detector)

MS – hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

EI – elektronová ionizace (Electron Ionization)

CI – chemická ionizace (Chemical Ionization)

FAME – methylestery mastných kyselin (Fatty Acid MethylEsters)

Úvod

Uplatnění pokrmových tuků v běžné domácnosti je velmi široké ve studené kuchyni i při pečení. Mají však využití i v potravinářském průmyslu – v pekárenství, při výrobě trvanlivého pečiva nebo cukrárenských výrobků.⁽³⁰⁾

Z různých literárních zdrojů se můžeme dočíst, jaké mastné kyseliny jsou prospěšné a jaké naopak škodí. Ovšem samotné stanovení jednotlivých pokrmových tuků až tak dostupné není.

Cílem této práce je tedy seznámit se s metodami stanovení mastných kyselin, konkrétně s plynovou chromatografií. A následně, na základě tohoto seznámení, stanovit spektrum mastných kyselin u vybraných pokrmových tuků.

V teoretické části bude zpracován přehled dělení lipidů a mastných kyselin. Dále vliv jednotlivých mastných kyselin na lidský organismus a nastínění dělení a výroby potravinářských tuků. Další kapitola se bude věnovat možnostem stanovení mastných kyselin, přičemž největší část bude věnována již zmíněné plynové chromatografii s využitím plamenově ionizačního a hmotnostně spektrometrického detektoru.

Poslední část se bude zabývat praktickým stanovením spektra mastných kyselin ve vybraných pokrmových tucích pomocí plynové chromatografie s využitím MS-EI a MS-CI detekce pro identifikaci, a následným statistickým zpracováním výsledků.

1 Teorie

1.1 Lipidy

Jsou to přírodní látky, jejichž výraznou charakterní vlastností je hydrofobnost – schopnost odpuzovat vodu. Chemickým složením jde o značně nejednotnou skupinu. Často jsou to deriváty (například estery) mastných kyselin a hydroxysloučenin (např. glycerol) nebo aminosloučenin (např. sfingosin). Obecně o nich lze říct, že se jedná o nízkomolekulární sloučeniny.^(18,24)

Lipidy jsou důležitou složkou potravy nejen pro svou vysokou energetickou hodnotu, ale i pro obsah esenciálních mastných kyselin a v tucích rozpustných vitamínů. V těle slouží tuk jako vydatný zdroj energie, ať přímý nebo potenciální, uložený do zásoby v tukové tkáni. Má též význam jako tepelný izolátor v podkožní tkáni a v okolí některých orgánů. Dále jsou z lipidů tvořeny i obaly neuronů a cytoplasmatické fosfolipidové membrány.^(3,18,19)

Podle chemického složení můžeme lipidy rozdělit do tří hlavních skupin na homolipidy, heterolipidy a komplexní lipidy. Ve všech těchto skupinách jsou přítomny mastné kyseliny (MK).^(1,14)

1.1.1 Homolipidy

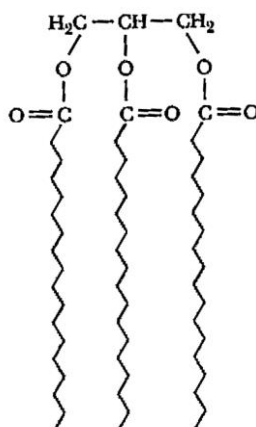
Homolipidy, neboli jednoduché lipidy, se skládají z mastných kyselin, na kterých jsou esterovou vazbou vázány alkoholy. Podle struktury vázaného alkoholu je dělíme na:

a) Tučky, což jsou estery vyšších mastných kyselin a glycerolu. Podle počtu navázaných mastných kyselin rozeznáváme monoacylglyceroly (navázána jedna mastná kyselina), diacylglyceroly (navázány dvě mastné kyseliny) a nejčastěji se vyskytující triacylglyceroly (navázány tři mastné kyseliny). Z technického hlediska se dělí na tuhé

tuky a kapalné oleje (za pokojové teploty). Jsou důležitou součástí potravy i technickou surovinou.

b) Vosky jsou estery vyšších mastných kyselin a jednosytných alkoholů. Hlavním významem vosků je, že tvoří hydrofobní vrstvu na povrchu organismů. ^(1,2,3,14,25,27)

Obrázek 1: Schéma triacylglycerolu – na glycerolu jsou navázané tři MK. ⁽²⁷⁾



1.1.2 Heterolipidy

Obsahují kromě mastných kyselin a alkoholu ještě další kovalentně vázané sloučeniny. Podle těchto sloučenin se dělí do skupin.

a) Fosfolipidy jsou lipidy, které obsahují esterově vázanou kyselinu fosforečnou. Vyskytují se u všech živočichů a rostlin jako součást buněčných membrán.

b) Glykolipidy jsou estery vyšších mastných kyselin, které obsahují glykosidovou vazbou navázané cukry. Podobně jako fosfolipidy bývají součástí buněčných struktur.

c) Sulfolipidy obsahují vázanou kyselinu sírovou. Také doprovází fosfolipidy v buněčných strukturách. ^(1,2,3,27)

1.1.3 Komplexní lipidy

Jsou to makromolekulární látky, obsahující lipidovou složku, na kterou je vodíkovými můstky, hydrofobními interakcemi a jinými fyzikálními vazbami navázán polysacharid nebo také protein.

Z lipoproteinů stojí za zmínku lipoproteiny krevního séra, protože mají velký význam v rozvoji chorob krevního oběhu. V jádru jsou tvořeny nepolárními triacylglyceroly a esterifikovaným cholesterolem, zatímco na povrchu nacházíme více polární lipidy (volný cholesterol a fosfolipidy) a bílkoviny. Označují se podle hustoty nepolárních lipidů na lipoproteiny s nízkou (LDL) nebo lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL). Ze zdravotního hlediska je významný HDL, který například přenáší přebytečný cholesterol z buněčných membrán do jater.⁽¹⁾

V praxi se pro zjednodušení častěji používá dělení na polární a neutrální lipidy. K polárním lipidům jsou řazeny fosfolipidy a také mnohé další heterolipidy. Neutrální lipidy zahrnují estery glycerolu, steroly a jejich estery a také volné mastné kyseliny, ačkoli nejsou neutrální.⁽¹⁾

1.2 Mastné kyseliny

Jsou nejvýznamnější složkou lipidů z hlediska výživy. Podle názvosloví používaného v organické chemii se jako mastné kyseliny označují karboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem. Struktura MK je typu R-COOH, kde R je uhlíkový řetězec skládající se z lichého počtu uhlíků.^(1,6)

V přírodě a i v potravinách se vyskytují v lipidech tyto skupiny MK:

- Nasycené MK (SAFA)
- Nenasycené MK s jednou dvojnou vazbou (monoenové, MUFA)
- Nenasycené MK s několika dvojnými vazbami (polyenové, PUFA)

Dále se můžeme setkat s MK s trojnými vazbami a s různými substituenty (s kyslíkatými, sírnými nebo dusíkatými funkčními skupinami), nebo také s rozvětvenými či cyklickými MK. Tyto MK se ale vyskytují v lipidech pouze v malých množstvích.

V odborné literatuře se pro stručnost používají schematické zkratky MK ve formě C N:M. Kde N je počet atomů uhlíku v molekule a M je počet dvojných vazeb (např. C 18:2 znamená MK s 18 atomy uhlíku a dvěma dvojnými vazbami – oktadekadienová kyselina). Pokud je potřeba uvést polohu dvojných vazeb, často se v literatuře uvádí symbol $\Delta^{a, b, c, d}$, kde písmena udávají polohy dvojných vazeb od karboxylového konce. Vedle systematických názvů se používají i názvy triviální, které převládají zvláště v běžné praxi.^(1,27)

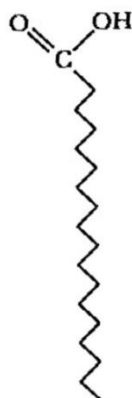
1.2.1 Nasycené MK

Jsou běžnou součástí přírodních lipidů. Nejčastěji mají sudý počet atomů uhlíku a zpravidla rovný, nerozvětvený řetězec, neobsahující žádnou dvojnou vazbu. Nejhojnějšími nasycenými MK ve tkáni živočichů i rostlin jsou rovné řetězce s 14, 16 a 18 atomy uhlíku. V esterifikované formě se vyskytuje celá řada MK s délkou řetězce 2 až 36 atomů uhlíku. Nasycené mastné kyseliny jsou chemicky celkem stálé. Ve struktuře dochází ke změnám až po dlouhodobějším zahřívání nebo vystavení vysokým teplotám.^(1,4)

K významným nasyceným MK patří kyselina butanová (máselná), kterou najdeme ve významném množství v kravském mléku. Dále kyselina hexadekanová (palmitová), která je považována za nejrozšířenější nasycenou MK v přírodě a nachází se ve

výrazných množstvích v živočišných i rostlinných lipidech. Kyselinu oktadekanovou (stearovou) nacházíme opět ve většině živých tkání. Vyskytuje se ve větší koncentraci v tuku přežvýkavců (mléčný tuk a lůj) nebo v rostlinných tucích (kakaové máslo), a samozřejmě v průmyslově hydrogenovaných tucích.⁽²⁾

Obrázek 2: Schéma kyseliny stearové.⁽²⁷⁾



Nasyčené MK jsou nepostradatelné pro tvorbu steroidních hormonů a zajišťují tělu dodávku cholesterolu. Na druhé straně při vyšší spotřebě představují jednu z příčin mnoha chronických onemocnění. Zhoršují okysličování krve a tkání, urychlují proces stárnutí, zvyšují hladinu cholesterolu v krvi a tím i riziko vzniku srdečně-cévních onemocnění. Nacházejí se v živočišných produktech. Nejvíce jsou obsaženy v červeném mase, tučných mléčných produktech, sádle a másle. Z rostlinných zdrojů je obsahuje palmový a kokosový olej.^(6,28)

1.2.2 Nenasycené MK s jednou dvojnou vazbou

Nenasycené MK s jednou dvojnou vazbou (monoenové) se liší od nasyčených MK tím, že obsahují dvojnou vazbu. Tato vazba vzniká odebráním dvou atomů vodíku uprostřed řetězce od přilehlých atomů uhlíku. Délka řetězce monoenových mastných kyselin je nejčastěji 10 až 30 atomů uhlíku. Řetězec obsahuje jednu dvojnou vazbu v poloze cis neboli Z (mnohem méně v poloze trans neboli E). Dvojná vazba může být

v různých pozicích a podle pozice je uvedena ve svém názvosloví ve vztahu s karboxylovou skupinou. Mnohé monoenoové MK mají také opět své triviální názvy, které jsou běžně používány.^(1,4,6)

K významnějším monoenovým MK patří kyselina oktadecenová (olejová), která je zdaleka nejhojnější monoenová MK v rostlinných a živočišných tkáních. Například olivový olej obsahuje až 78 % kyseliny olejové.⁽²⁾

Obrázek 3: Schéma kyseliny olejové.⁽²⁷⁾



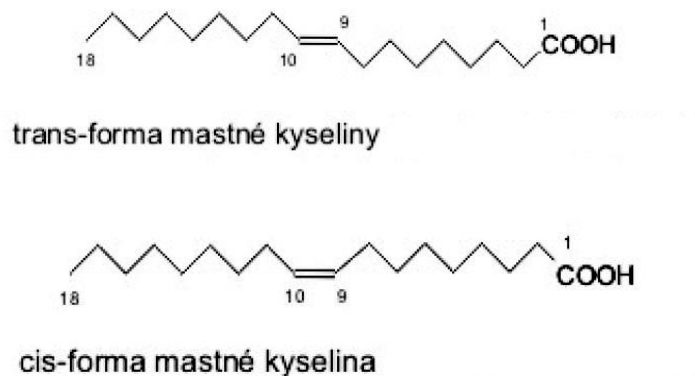
Dalšími důležitými zdroji monoenových MK je olivový olej, dále pak olej kanolový (odřůda řepky), hroznový, arašídový, mandlový, makadamový a avokádový. Z živočišných zdrojů pak hovězí lůj, husí a vepřové sádlo.⁽⁶⁾

Oleje bohaté na monoenové MK jsou považovány za ideální, protože jejich pravidelná konzumace dokonce snižuje hladinu LDL. Kromě toho podléhají monoenové MK méně oxidačním změnám než polyenové MK. Na celkovém energetickém příjmu by se měly podílet 10 až 15 %.⁽⁶⁾

1.2.2.1 Trans-nenasycené mastné kyseliny (TFA)

Každá dvojná vazba u nenasycených MK může mít dvojí prostorové uspořádání, a to cis- nebo trans-. Podstata spočívá v orientaci atomů vodíků vzhledem k ose dvojných vazeb. Forma cis- obsahuje oba atomy vodíku na stejné straně dvojně vazby, oproti tomu forma trans- má vodíkové atomy na různých stranách.⁽⁶⁾

Obrázek 4: Schéma trans-MK a cis-MK.⁽³⁾



Tato nepatrná změna má za následek značnou změnu tvaru molekuly MK. Nenasycené MK s vazbou trans- mají tvar molekuly podobný nasyceným MK, tedy řetězec přímý. To má velký význam v enzymových reakcích a při tvorbě membrán, kde se tyto kyseliny nejvíce uplatňují.⁽⁶⁾

Jsou stabilní vůči oxidačnímu žluknutí, což jim umožňuje mít dlouhou trvanlivost, a mají přechodný bod tání mezi nasycenými a nenasycenými MK. Z těchto důvodů byly široce používány v potravinářském průmyslu. Na základě epidemiologických a klinických důkazů v posledních letech TFA pravděpodobně zvyšují riziko ischemické choroby srdeční. Vše nasvědčuje tomu, že trans-izomery mastných kyselin mají podobné, popřípadě ještě horší účinky na hladinu cholesterolu v krvi než nasycené mastné kyseliny v živočišných tucích. Dále se ukazuje, že trans-izomery MK zhoršují schopnost tkání reagovat na inzulin a zvyšují riziko diabetu 2. typu.^(23,33)

Do potravního řetězce se TFA mohou dostávat v podstatě třemi cestami. První způsob je tzv. enzymovou hydrogenací, kterou způsobují bakterie v zažívacím traktu přežvýkavců (např. ovcí a skotu). Ze zažívacího traktu se vstřebávají střevní stěnou a následně ukládají do podkožního a mléčného tuku. V dalším případě mohou vznikat při vysokém zahřívání olejů (například při prudkém smažení pokrmů nad teplotu 220°C). Největší množství trans-nenasycených MK však vznikalo při výrobě ztužených

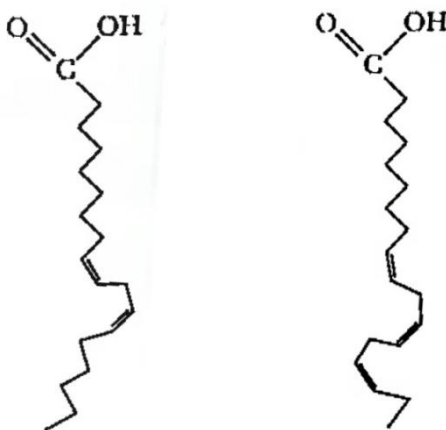
tuků neboli margarínů. V posledních letech je však tento zastaralý způsob úpravy tuků nahrazen způsoby novými, při kterých TFA nevznikají (nebo jen v zanedbatelném množství).⁽⁶⁾

Podle doporučení Mezinárodní margarínové asociace by roztíratelné margaríny měly obsahovat nejvýše 1 % TFA a směsné tuky a margaríny pro další průmyslové využití nejvýše 5 %.⁽²³⁾

1.2.3 Nenasycené MK s několika dvojnými vazbami

MK se dvěma dvojnými vazbami (dienové) se vyskytují v tucích jen stopově. Nejvýznamnější z dienových MK je (cis, cis)-oktadeka-9,12-diénoová kyselina neboli kyselina linolová. K významným nenasyceným MK s více dvojnými vazbami (polyenové MK) se řadí (cis, cis, cis)-oktadeka-9,12,15-trienová kyselina (α -linolenová kyselina). Opět existují jak polohové tak prostorové izomery.^(2,6,32)

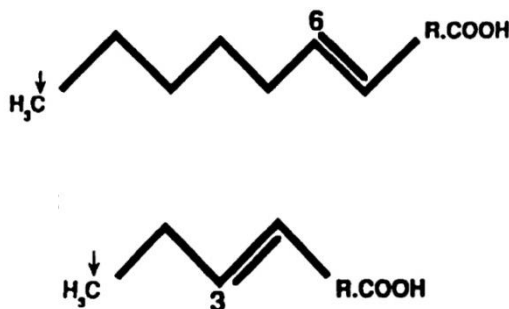
Obrázek 5: Schéma kyseliny linolové a kyseliny α -linolenové.⁽²⁷⁾



Některé MK si člověk nedokáže sám syntetizovat a musí je v dostatečné míře přijímat v potravě. Těmto kyselinám se říká esenciální MK. Tato skupina polyenových MK je charakteristická tím, že obsahuje na ve svém řetězci dvě dvojně vazby v poloze

cis na šestém a třetím uhlíku od methylového konce řetězce. Kyseliny s dvojnou vazbou v poloze cis na šestém uhlíku se také nazývají n-6 kyseliny nebo ω -6 kyseliny. Kyseliny s dvojnou vazbou v poloze cis na třetím uhlíku můžeme nalézt i pod názvem n-3 kyseliny nebo ω -3 kyseliny.^(6,24,32)

Obrázek 6: Schéma ω -6 kyseliny a ω -3 kyseliny (šipka značí methylový konec).⁽³⁾



Příznivý vliv ω -6 a ω -3 kyselin na lidský organismus je rozsáhlý. Největší množství těchto kyselin se spotřebuje na tvorbu buněčných a intracelulárních membrán, včetně membrán pokožky. Dále mají významnou úlohu při rozmnožování a při výstavbě nervových tkání. Jejich dostatečná konzumace vede ke snížení LDL a nepatrně zvyšuje obsah HDL v krevní plazmě.^(6,28,31)

Kyselina linolová a linolenová se nachází zejména v klíčcích obilovin (pšenice, kukuřice, atd.), v suchých plodech (vlašských ořeších, mandlích, lískových oříšcích, atd.) a ve slunečnicovém, řepkovém či sezamovém oleji. Dalším významným zdrojem esenciálních MK jsou mořské ryby. Asi v desetkrát menším množství jsou obsaženy také v živočišném tuku přežvýkavců. Jejich nedostatek může způsobit poškození kůže, poruchy zraku, růstu, reprodukce a deprese.^(1,2,28,31,32)

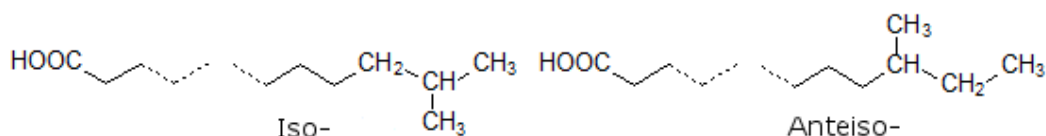
1.2.4 Další mastné kyseliny

Ve srovnání s výše uvedenými typy MK se tyto MK v potravinářství a ve výživě člověka uplatňují podstatně méně.

1.2.4.1 MK s rozvětveným řetězcem

Jde o MK, které mají boční řetězec, tvořený většinou jedním uhlíkem, jde tedy o methylderiváty. Tato methylóvá skupina bývá vázána nejčastěji na předposledním atomu uhlíku. Tyto MK se obvykle označují jako isokyseliny. Když je methylóvá skupina vázána na třetím atomu uhlíku od methylóvého konce, jde o anteisokyseliny. Výjimečně je methylóvá skupina vázána také uprostřed uhlovodíkového řetězce.⁽¹⁾

Obrázek 7: Schéma isokyseliny a anteisokyseliny.⁽²⁾



1.2.4.2 Cyklické MK

Obvykle jde o alicyklické sloučeniny (s uzavřeným uhlíkovým řetězcem). Cyklopropanový, nebo cyklopropanový kruh je většinou vázán uprostřed uhlovodíkového řetězce, kdežto cyklopentenový kruh je zpravidla na konci řetězce. Ostatní cykly v molekule jsou vzácné.⁽¹⁾

Obrázek 8: Schéma cyklické MK.⁽²⁾



1.2.4.3 MK s kyslíkatou funkční skupinou

V přírodě se vyskytují jen jako méně významné MK. Jde o MK obsahující hydroxyskupinu. Z dalších kyslíkatých substituentů se vyskytuje ketoskupina a epoxidová skupina.^(1,2)

Obrázek 9: Schéma MK obsahující hydroxyskupinu.⁽²⁾



1.3 Výroba tuků

V dnešní době jsou dostupné různé druhy tuků, které můžeme použít ke konzumaci. V základním dělení můžeme rozlišovat tuky vyrobené čistě z rostlinných olejů, z mléčného tuku a směsné (obsahující rostlinný i mléčný tuk). Výroba jednotlivých druhů tuků se liší.

1.3.1 Výroba ztužených tuků

Vlastní výroba ztužených tuků neboli margarínů je založena pouze na fyzikálních procesech a začíná u rostlinných olejů a tuků, které tvoří 25 až 100 % konečného produktu. Tuky a oleje použité ve výrobcích se získávají zejména z olejnatých semen buď lisováním nebo extrakcí, nebo kombinací obou způsobů. Surový olej se musí rafinovat, z důvodů odstranění nepříjemných organoleptických vlastností. Rafinace neboli čištění surového kapalného oleje i tuhého tuku je soubor technologických operací, při kterém se odstraňují z olejů netukové složky.

Dalšími fázemi tvorby margarínů jsou hydrogenace (ztužování), interesterifikace a frakcionace.

Hydrogenace je přeměna tekutých tuků v pevné, působením vodíku za přítomnosti katalyzátoru niklu, za určité teploty a tlaku. Do začátku 90. let byla rozšířená částečná katalytická hydrogenace, v dnešní době se kvůli vysokému obsahu trans-izomerů MK začala nahrazovat novější technologií a to interesterifikací. Nejprve se vyrobí plně nasycený tuk (hydrogenace je totální, vzniklý tuk obsahuje pouze nasycené mastné kyseliny). Tento tuk se smísí s olejem a za přítomnosti speciálních katalyzátorů dojde k výměnám mastných kyselin uvnitř molekul triacylglycerolů i mezi jednotlivými molekulami triacylglycerolů. Výsledný tuk pak má žádoucí vlastnosti a přitom neobsahuje trans-izomery mastných kyselin.^(17,23,30)

Cílem frakcionace je oddělit kapalnou frakci od pevných krystalů podle bodu tání jednotlivých složek za dané teploty nebo podle rozpustnosti jednotlivých složek ve vhodném organickém rozpouštědle.

Výroba margarínů na závěr pokračuje třemi fyzikálními procesy: intenzivním mícháním předem připravené směsi tukové a vodní fáze vznikne homogenní směs, která se nechá krystalizovat na chlazených válciích a současně se mechanicky zpracovává hnětením.⁽¹⁵⁾

Margaríny byly původně koncipovány jako náhražka másla. Od svého vzniku se v průběhu 130 let postupně rozvinuly v samostatnou kategorii jako plnohodnotný produkt s řadou předností. Tyto výhody můžeme spatřovat z pohledu funkčních i nutričních vlastností. Jako příklad dobrou roztíratelnost tuků určených pro přímou spotřebu ihned po vyjmutí z chladničky.⁽¹⁶⁾

1.3.2 Výroba směsných tuků

Výrobky, ve kterých je část mléčného tuku nahrazena olejem, jsou označovány jako směsné emulgované tuky (pokrmové). Podíl mléčného tuku je požadován v rozmezí 10 – 80%. Jejich uplatnění v domácnosti je velmi široké. Používají se ve studené kuchyni i při přípravě těst. Dále se uplatňují v pekárenství, při výrobě trvanlivého pečiva a cukrárenských výrobků.⁽³⁰⁾

Pro výrobu směsných emulgovaných tuků se využívá buď emulgačního způsobu, kdy je pro přípravu tukové násady použit bezvodý mléčný tuk a vhodný rostlinný olej, nebo způsobu zpěňovacího (viz výroba másla).⁽³⁰⁾

1.3.3 Výroba másla

Označení máslo může mít jen výrobek, který obsahuje minimálně 80 % mléčného tuku. Obsah netuků (mléčné bílkoviny apod.) je obvykle do 2 % a maximální povolený obsah vody do 16 %. Klasické máslo se tedy skládá z emulze mléčné plazmy v mléčném tuku. Ten je tvořen z 97-98 % homolipidy (estery glycerolu a MK), z 2-3 % heterolipidy (fosfolipidy, glykolipidy) a ostatními látkami rozpustnými v tucích, tzv. doprovodnými látkami lipidů (lipofilní vitaminy, komplexní lipidy a steroidy včetně

cholesterolu). Pro mléčné tuky jsou typické nasycené MK s krátkým a středně dlouhým řetězcem (např. máselná kyselina), MK s lichým počtem uhlíků, rozvětvené a TFA.^(29,30,40)

Máslo lze vyrobit třemi možnými způsoby, a to zpěňovacím způsobem, koncentračním způsobem a emulgačním způsobem. Principem zpěňovacího způsobu je nahromadění tukových kuliček při šlehání smetany, oddělení vzniklého máselného zrna od uvolněné mléčné plazmy (podmáslí) a jeho spojení a úprava hnětením. Koncentrační způsob spočívá v přípravě vysokotučné smetany talířovou odstředivkou a následném obrácení fázi mechanickým zpracováním při chlazení a řízené krystalizaci tuku v chladičích se stíraným filmem. Třetí způsob zahrnuje emulgaci mléčné plazmy v čistém mléčném tuku. Podobně je tomu u výroby margarínů.⁽³⁰⁾

1.4 Stanovení MK

Stanovením mastných kyselin, obsažených v různých olejích a tucích, můžeme zjistit kvalitu a zdravotní nezávadnost potravin. Pro tato stanovení existuje řada metod. Velké procento zastoupení mají chromatografické metody. K nejpoužívanějším patří plynová chromatografie (GC) s využitím plamenově ionizačního detektoru. Další možností pro stanovení MK je propojení GC s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), zejména ve spojení s chemickou ionizací, případně dalších specifických technik.

V poslední době se značně využívá i vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC – high performance liquid chromatography). Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina, na rozdíl od GC, kde je to plyn. Mezi mobilní a stacionární fází se analyt rozděluje během separace. Čas, jaký stráví v každé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Protože je možno pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn, je kapalinová chromatografie vhodná i pro separaci tepelně netěkavých a stálých látek jako jsou celé molekuly lipidů (např. TAG).^(14,22,24,32,34)

Podrobná analýza složení MK je velmi náročná, proto se používají i speciálnější metody, které nejsou tak časté. Pro určení spektrálních vlastností MK u jedlých olejů se může použít ^1H NMR spektroskopie (nukleární magnetická rezonance) i NIR spektroskopie (spektroskopie v blízké infračervené oblasti). Výsledky jsou srovnatelné s hodnotami měřenými plynovou chromatografií.^(14,35,36)

1.5 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je analytická separační metoda, která v systému chromatografických metod zaujímá významné místo. Rychlý rozvoj GC a její rozšíření plyne ze skutečnosti, že jde o metodu jednoduchou, citlivou a vyznačující se velkou separační účinností.^(7,10)

Chromatografická separace využívá dělení složek mezi dvěma heterogenními fázemi. První fáze je nepohyblivá, neboli stacionární, může mít různou formu. Druhá fáze je pohyblivá neboli mobilní a je tvořena nosným plynem. Stacionární fáze je tvořena buď tuhým adsorbentem, např. aktivní uhlí, silikagel, (adsorpční plynová chromatografie, GSC) nebo kapalinou, což je zakotvená fáze nanesená na pevném nosiči (rozdělovací plynová chromatografie, GLC).^(5,8,9)

Pokud chceme, aby byl vzorek analyzován metodou GC, musí být všechny složky vzorku převedeny do plynného stavu definovaným způsobem. V praxi to znamená, že GC je vhodná především pro organické látky s teplotou varu do 400°C. Pokud chceme stanovit touto metodou vzorek, který nemá tyto vlastnosti, musí se provést derivatizace.⁽⁸⁾

1.5.1 Derivatizace v plynové chromatografii

Jedná se o zavedení určitých atomů či funkčních skupin do molekuly analyzované látky a tím její převedení na látku s odlišnými vlastnostmi. Změnou chemické struktury můžeme docílit zvýšení citlivosti a selektivity a tedy usnadnění identifikace řady látek.

Analyzované látky se působením různých činidel převedou chemickou reakcí na deriváty, tj. na látky nové, s odlišnými chemickými a fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Hlavním důvodem vedoucí k derivatizaci v plynové chromatografii je zvýšení těkavosti analyzovaných látek. Velmi mnoho organických látek není totiž možno chromatografovat v plynné fázi, protože je nelze převést do plynného stavu, anebo se při pokusu o zplynění rozkládají. Dalším důvodem může být zamezení nežádoucí sorpce, což se využívá tam, kde přítomná funkční skupina vytváří silné interakce se stacionární fází.

V plynové chromatografii mastných kyselin je nejobvyklejší derivatizační reakcí esterifikace. Estery patří k látkám s dobrými chromatografickými vlastnostmi (jsou těkavější než jim odpovídající kyseliny, netvoří vodíkové můstky, nedimerizují ani nedisociují). Nejvíce těkavé a nejčastěji připravované jsou methylestery mastných kyselin (FAME).^(2,5,8)

Mezi nejzákladnější typy derivatizací při stanovení mastných kyselin patří kysele nebo zásaditě katalyzované esterifikace.

1.5.1.1 Kysele katalyzovaná esterifikace

Volné mastné kyseliny se esterifikují zahříváním v přebytku bezvodého methanolu v přítomnosti kyselého katalyzátoru. Aby reakce proběhla správně, musí být vzorek zbaven vody. Nejběžnějším činidlem je 5 % bezvodá kyselina chlorovodíková v methanolu. Dále se vzorek lipidů s činidlem zahřívá zhruba 2 hodiny pod zpětným chladičem.

Nepolární lipidy (jako například estery triacylglycerolů) se jen velmi těžko rozpouštějí v metanolových rozpouštědlech, pokud nepřidáme další činidlo. K tomu se

využívalo dříve benzenu, který je však velmi toxický. Jako vhodnější činidlo se dnes používá toluen nebo tetrahydrofuran.

Tímto způsobem jsou vzniklé methylestery MK extrahovány do organických rozpouštědel (hexanu nebo heptanu). Oddělená uhlovodíková vrstva je dále vysušována bezvodým síranem sodným.^(2,24)

1.5.1.2 Zásaditě katalyzovaná esterifikace

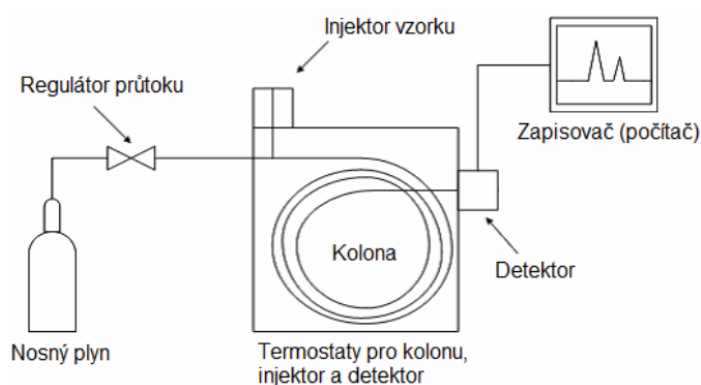
Při použití zásadité esterifikace probíhá esterifikace lipidů velmi rychle. Lipidy jsou esterifikovány v bezvodém methanolu se zásaditým katalyzátorem. Nejběžnějším činidlem je roztok hydroxidu draselného v bezvodém methanolu (0,5 mol/l). Vzorky s činidlem jsou opět zahřívány na teplotu přes 50°C. Methylestery MK jsou opět jako u kyselé esterifikace extrahovány do hexanu či heptanu. Vzniklá vrchní vrstva je opět vysušena za pomoci bezvodého síranu sodného.

Jestliže jsou ve vzorku obsaženy polární lipidy, přidá se opět další rozpouštědlo, jako například toluen nebo tetrahydrofuran.^(2,24)

1.5.2 Přístrojové vybavení

Separace probíhá na plynovém chromatogramu. Jeho základní části jsou zdroj a regulace nosného plynu, dávkovací systém (injektor), kolona, detekční zařízení, termostaty a vyhodnocující systém.⁽⁷⁾

Obrázek 11: Schéma přístrojového vybavení GC. ⁽¹⁰⁾



1.5.2.1 Nosný plyn

Mobilní fáze je v plynové chromatografii míněn nosný plyn. Nosný plyn transportuje složky rozdělované směsi analytickou kolonou a přitom se sám neúčastní separačního procesu. Jako nosné plyny se používají dusík, vodík, helium a argon. Faktory ovlivňující výběr nosného plynu jsou: viskozita, účinnost, čistota, reaktivita, typ používaného detektoru a cena plynu. Důležité je, aby měl nosný plyn vysokou čistotu a neobsahoval kyslík a vodu. Jako zásobník nosného plynu se používají tlakové láhve.^(8,10)

1.5.2.2 Regulátory tlaku a průtoku

Jedná se o elektronické regulační zařízení, sloužící k ovládní průtoku a tlaku nosného plynu. Regulátor průtoku zajišťuje stálý průtok plynu kolonou a detektorem bez ohledu na typ nosného plynu, rozměry kolony a teplotu. Tlak je potom proměnnou veličinou a nastaví se automaticky podle viskozity plynu, délky kolony a vnitřního průměru kolony tak, aby průtok kolonou byl konstantní.⁽¹⁰⁾

1.5.2.3 Dávkovací zařízení

Dávkovacím zařízením vstupuje analyzovaná látka do plynového chromatografu. Analyzovaná látka se nejčastěji vstříkne pomocí speciální injekční stříkačky přes septum, které je ze zvláštní pryže odolné vysokým teplotám. Septum odděluje vnitřní

prostor injektoru od vnějšího prostoru. Teplota v injektoru musí být vyšší oproti teplotě varu nejméně těkavé složky vzorku.^(8,10)

1.5.2.4 Kolony

V GC se používají dva typy kolon: náplňové a kapilární. Při stanovení MK se využívají především kolony kapilární.

1.5.2.4.1 Náplňové kolony

Náplňové kolony jsou tvořeny trubicí vyrobenou ze skla či nerezové oceli a plněny granulovaným materiálem (např. adsorbentem nebo nosičem pokrytým kapalnou stacionární fází.) Jako nosič zde slouží křemelina o průměru částic 0,1-0,15 mm. Vnitřní průměr kolon je 2-4 mm a délka max. 4 m.

1.5.2.4.2 Kapilární kolony

Kapilární kolony jsou otevřené kapiláry, kde vnitřní stěny kapiláry fungují jako nosiče. Vnitřní stěny kapiláry jsou potaženy kapalnou stacionární fází. Kolony se vyrábějí z taveného křemene, kde je povrch potažený vrstvičkou polyimidu, který dává koloně pružnost. Průměr kolon bývá nejčastěji 0,2-0,75 mm a délka 50 m. Existují různé typy těchto kolon, přičemž nejvíce používanou je kolona WCOT.

WCOT (wallcoated open tubular) je kolona s tenkým filmem kapalné stacionární fáze, který je přímo nanesen na vnitřní stěně kolony. Tloušťka kapalného filmu bývá v rozmezí 0,01 do 5 μm , vnitřní průměr kolony se pohybuje od 100 μm do 1 mm.

SCOT (support coated open tubular) na nosiči, který je zachycený na vnitřních stěnách kapiláry, je zakotvena kapalina. Tloušťka náplně je 1-5 μm .

PLOT (porouslayer open tubular) je kolona, kde se na vnitřní stěně kapiláry nachází pórovitá vrstva o tloušťce kolem 10 μm .^(2,8,10,20,24,37)

Jako adsorbenty je možno použít aktivní uhlí, silikagel, uhlíkové saze, molekulová síta a syntetické makromolekulární sorbenty. Více používanou variantou jsou kapalné stacionární fáze. Kapalné stacionární fáze musí dobře rozpouštět separované látky, mají mít nízkou těkavost, musí být teplotně stálé a nesmí reagovat s analyzovanými látkami.

Aby se zabránilo úniku kapalné stacionární fáze z kolony, zakotvují se tyto kapaliny na nosič chemickými vazbami.⁽³⁷⁾

1.5.2.5 Detektory

Úkolem detektoru je, aby při průchodu samotného nosného plynu a při průchodu nosného plynu obsahující zkoumaný vzorek, poskytl rozdílné signály na výstupu z kolony chromatografu. Teplota detektoru musí být opět vyšší než teplota kolony, aby nedošlo ke kondenzaci nosného plynu. Základem úspěšné detekce je správné rozdělení analyzované látky na koloně. Od detektoru se vyžaduje rychlá odezva, stabilita základního signálu a vysoká citlivost.^(8,10)

Mezi nejpoužívanější detektory v plynové chromatografii patří Plamenově ionizační detektor (FID) a Hmotnostně spektrometrický detektor (MS). Dále může být použit Tepelně vodivostní detektor (TCD, katarometr) nebo Detektor elektronového záchytu (ECD).^(5,10,24,37)

1.5.2.5.1 Plamenově ionizační detektor

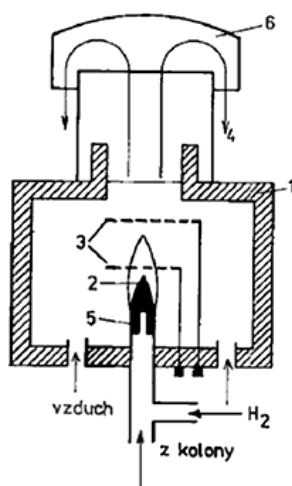
Pomocí plamenově ionizačního detektoru (Flame Ionization Detector) určujeme množství (kvantitu) jednotlivých látek ve vzorku, proto slouží pro kvantitativní analýzu. Plyn z chromatografické kolony je zaváděn ocelovou tryskou do kyslíko-vodíkového plamene hořáku, kde probíhají chemionizační reakce vedoucí ke vzniku nabitých částic. Na špičce mikrohořáku pak dochází ke spálení této směsi na ionty, které se detekují na polarizovaných elektrodách.

FID poskytuje odezvu téměř na všechny organické látky, pro uhlovodíky je odezva úměrná počtu uhlíkových atomů v molekule. Použití FID při stanovování MK pomocí GC je výhodné, protože pro všechny MK poskytuje poměrně stejnou odezvu bez ohledu na délku řetězce, takže není třeba kalibrovat všechny kyseliny.

Nastavení průtoku vodíku a vzduchu je velmi důležité a musí být provedeno i s ohledem na nosný plyn. Odchytky od optimálního poměru mají za následek nestabilní plamen a velký šum. Jednotlivé konstrukční typy FID se od sebe liší zejména tvarem a umístěním elektrod, které se umísťují např. jako dvě destičky rovnoběžné

s plamenem nebo jednou z elektrod je elektricky odizolovaná kovová tryska hořáku.^(2,8,10,24)

Obrázek 12: Schéma plamenově ionizačního detektoru. 1 – těleso detektoru, 2 – plamínek, 3 – elektrody, 4 – výstup spalin, 5 – tryska hořáku, 6 – víko detektoru.⁽³⁰⁾

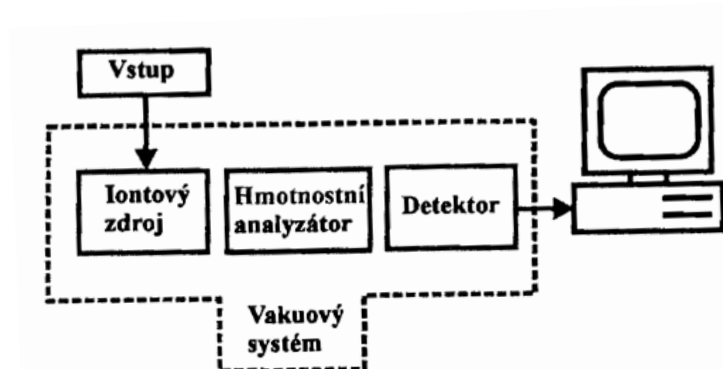


1.5.2.5.2 Hmotnostně spektrometrický detektor

Hmotnostní spektrometrie (MS) je fyzikálně-chemická metoda, která určuje hmotnosti atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné nebo záporné ionty. Tato metoda má, při vhodné interpretaci výsledků měření, velmi dobrou vypovídající schopnost o struktuře stanovovaných látek. Hlavním využitím je především stopová analýza organických látek s důrazem na zjištění jejich struktury. Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami (zejména GC) tedy umožňuje kromě obvyklé registrace zón látek vycházejících z kolony provést i jejich identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra.^(8, 11, 12)

Běžný hmotnostní spektrometr se skládá z ionizovaného zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru se zesilovačem a záznamovým zařízením a z vakuového systému.⁽³⁷⁾

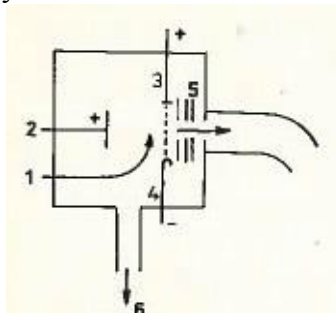
Obrázek 13: Schéma hmotnostně spektrometrického detektoru.⁽¹¹⁾



MS dává veškeré, informace týkající se pouze částic nesoucích náboj. K převedení analyzované látky do ionizovaného stavu slouží iontový zdroj. V prostoru iontového zdroje dochází k většině fragmentačních reakcí, které vedou k destrukci vazeb vzniklého iontu. Naprosto nezbytným předpokladem analýzy je tedy ionizace analyzované látky. Ionizační techniky se podle množství dodané energie dělí na tzv. měkké, jejichž energetický přebytek dodaný molekule je malý a pravděpodobnost fragmentace nízká, a tvrdé, při nichž nadbytek vnitřní energie postačuje k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu.^(8, 11, 12)

Elektronová ionizace (EI) je příkladem tvrdé ionizační techniky v plynné fázi. Jde o nejběžnější a nejlépe propracovaný způsob ionizace, běžně používaný u kombinace GC-MS. Energetickým procesem vedoucím k tvorbě iontů je interakce molekul analyzované látky M s proudem urychlených elektronů. Pro zdroj elektronů se používá elektricky žhavené rheniové nebo wolframové vlákno (katoda). Množství emitovaných elektronů určuje velikost žhavicího proudu. Proud elektronů je směřován směrem k anodě. Potenciálový proud mezi žhavenou katodou a anodou určuje energii elektronu, přicházejících do kontaktu s ionizovanou látkou. Za standard se považuje energie 70eV. Vzniklé ionty jsou z ionizačního prostoru vytlačovány elektrostatickými repelery (pomocnými elektrodami) udržovanými na vhodném potenciálu. Proud iontů je dále urychlován a směřován z iontového zdroje soustavou akceleračních a fokusačních elektrod.^(8,11)

Obrázek 14: Schéma iontového zdroje s ionizací nárazem elektronů. 1 – přívod vzorku, 2 – vytlačovací elektroda, 3 – anoda, 4 – žhavená katoda, 5 – urychlovací a fokusační elektrody, 6 – snížený tlak.⁽³⁷⁾

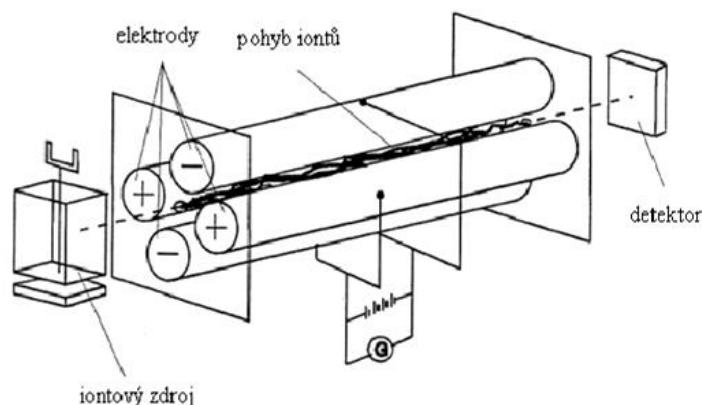


Chemická ionizace (CI) je příkladem běžně používané měkké ionizační techniky z plynné fáze. Spolu s EI je běžně používána u kombinace GC-MS. Primárním zdrojem je opět proud urychlených elektronů, jejich energie je však přenášena zprostředkovaně přes reakční médium. Reakční médium je v ionizační komůrce pod poměrně velkým tlakem (50-100 Pa). Díky vyššímu tlaku se zvyšuje pravděpodobnost mezimolekulárních a meziiontových interakcí. Běžným reakčním médiem je methan nebo amoniak. Ve speciálních případech lze použít i kapalné reakční médium jako je acetonitril nebo methanol. Jeho využití se ukázalo například při chemické ionizaci pro určení polohy dvojných vazeb v methylesterech mastných kyselin. Konstrukce iontového zdroje je skoro totožná s konstrukcí zdroje EI.^(11,13,38,39)

Hmotnostní analyzátor umožňuje rozlišit směs iontů o různých m/z (poměr hmotnosti ku náboji) v prostoru nebo čase. Pro stanovení MK se využívá kvadrupólový analyzátor nebo iontová past. Kvadrupólový detektor je složen ze čtyř tyčí hyperbolického nebo kruhového průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a střídavého napětí. Ionty, které vlétnou do prostoru mezi tyče, se dostanou do střídavého elektrického pole, kde začnou oscilovat. Změnou vkládaných napětí je možné nechat projít filtrem postupně ionty v celém rozsahu m/z . Iontová past umožňuje účinkem elektrického pole uzavřít ionty v ohraničeném prostoru. Ty jsou nuceny se uvnitř pohybovat po uzavřených kruhových drahách. S rostoucím napětím se

ionty s rostoucím m/z dostávají na nestabilní trajektorie a opouštějí prostor iontové pasti směrem do detektoru.^(2,8,11)

Obrázek 15: Schéma kvadrupólového analyzátoru.⁽⁵⁾



Detektor poté poskytuje analogový signál, který je úměrný počtu dopadajících iontů. Signál z detektoru je po digitalizaci převeden do počítače a programovým vybavením zpracován do formy hmotnostních spekter. Kromě sběru dat v reálném čase a jejich zpracování zajišťuje počítač další řídicí a kontrolní funkce související s chodem přístroje.^(5,8,11)

Hmotnostní spektrometr pracuje za velmi nízkých tlaků. Klíčovou součástí zařízení je i výkonný, většinou dvoustupňový vakuový čerpací systém, který umožňuje držet nízký tlak za všech provozních podmínek.^(8,11)

1.5.2.6 Termostat

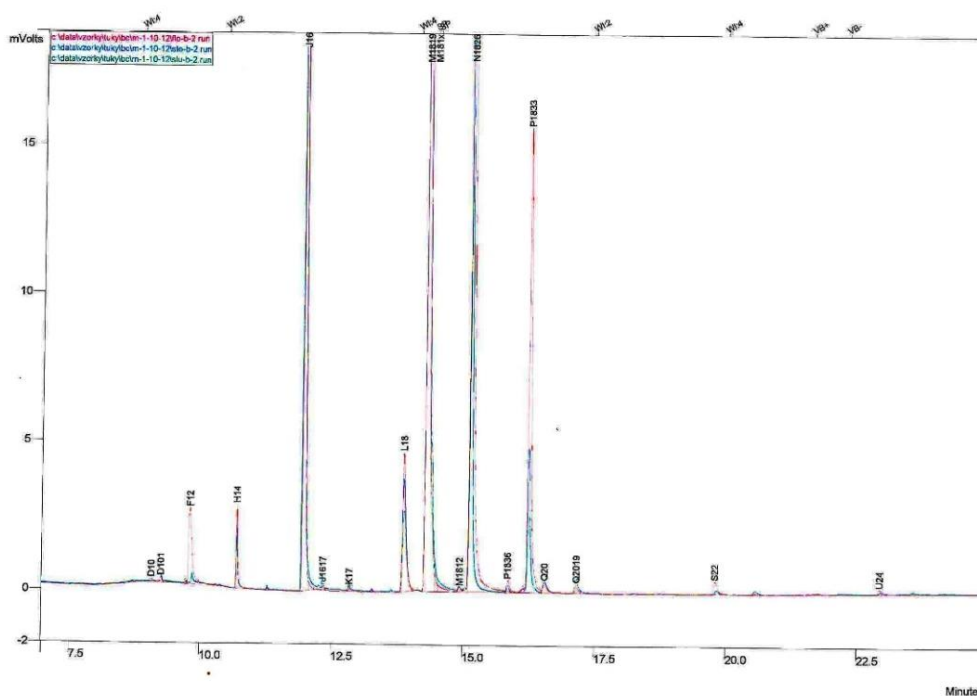
Zajišťuje dostatečnou teplotu injektoru, kolony a detektoru, aby byl vzorek stále v plynném stavu. Teplota kolony se může programově měnit. S rostoucí teplotou kolony roste rychlost analýzy, ale klesá kvalita separace. V dnešní době se používají zvláště teplovzdušné termostaty. Vzduch je po zahřátí vyhřívacími tělisky vháněn ventilátorem do prostoru. Rozsah dnešních termostatů je přibližně v rozmezí -70°C až 450°C .^(5,21,37)

1.5.3 Chromatogramy a hmotnostní spektra

Předností techniky GC/MS je spojení vysoké separační schopnosti plynové chromatografie s identifikačními možnostmi hmotnostní spektrometrie. Z toho tedy vyplývá, že získáváme dva druhy záznamů, a to chromatogram, který nás zhruba informuje o počtu složek přítomných ve vzorku, a hmotnostní spektra jednotlivých píků, z nichž usuzujeme na kvalitu složek.⁽³⁷⁾

Chromatogram je tedy grafický záznam závislosti napěťové odezvy detektoru na čase. Ze získaných chromatogramů lze vyhodnotit retenční parametry jednotlivých signálů, plochy a výšky píků atd. Ukázku chromatogramu znázorňuje obrázek 16.⁽¹⁰⁾

Obrázek 16: Příklad chromatogramu.



Hmotnostní spektrum umožňuje určit spektrum analyzované látky. Je to záznam iontů vzniklých z analyzované sloučeniny uspořádaný podle vzrůstajícího poměru m/z , vyneseny proti absolutnímu či relativnímu zastoupení jednotlivých iontů. Osa y představuje odezvu detektoru, která je úměrná intenzitě iontového proudu a na ose x je vynesena hodnota m/z . Píky ve spektru jsou zobrazeny v čárové (centroidové) formě.^(5,8,11)

2 Cíl práce a předpokládané hypotézy

Hlavním cílem této práce je seznámení se s metodou plynové chromatografie s využitím MS-CI a MS-EI detekce pro identifikaci. Poté, na základě tohoto seznámení, stanovení touto metodou složení MK u vybraných pokrmových tuků a zpracování získaných výsledků.

Předpokládáme, že vybrané pokrmové tuky budou obsahovat alespoň malé množství mléčného tuku. Dále předpokládáme, že se jednotlivé odběry nebudou lišit procentuálním zastoupením jednotlivých MK.

3 Materiál a metoda

3.1 Materiál

Bylo vybráno 8 typů pokrmových tuků. Zaměřila jsem se především na tuky, které představují náhražku pravého másla. Můžeme tedy u nich předpokládat výskyt jak mléčného tak rostlinného tuku.

Byly provedeny 3 měření, při kterých se od každého tuku odebraly vždy tři vzorky. První měření (A) bylo provedeno 26.6., druhé (B) 26.9. a třetí (C) 19.12.2012. Tuků pro všechny tři měření byly zakoupeny v obchodním řetězci Tesco.

3.1.1 Jednotlivé tuky

3.1.1.1 Alfa máslová

Roztíratelný margarín se sníženým obsahem tuku 60 %. Složení: rostlinné oleje a tuky, jedlá sůl (0,2 %), voda, sušená syrovátka, emulgátory (sójový lecitin, mono a diglyceridy MK), konzervant (sorbát draselný), regulátor kyselosti (kyselina citronová), máslové aroma, barvivo beta-karoten, vitamíny A, E, D. 100 g máslové alfy obsahuje 60 g tuku, z toho nasycené MK 21g, mononenasycené MK 27 g a polynenasycené MK 12 g.

Vyrobeno v Litvě, distributor pro ČR KAKA.

3.1.1.2 Flora

Rostlinný roztíratelný pomazánkový tuk se sníženým obsahem tuku (48 %). Složení: voda, rostlinné oleje a tuky, emulgátor (mono a diglyceridy MK, slunečnicový lecitin), jedlá sůl (0,3 %), regulátor kyselosti (kyselina citronová), aromata, vitamíny A, E, D, barvivo beta-karoten. 100 g Flory obsahuje 48 g tuku, z toho nasycené MK 9 g, mononenasycené 13 g, polynenasycené 25 g a transizomery < 0,5 g.

Vyrobeno v EU, distributor UNILEVER ČR, spol. s r. o.

3.1.1.3 Hera

Roztíratelný rostlinný tuk (75 %) na pečení. Složení: rostlinné oleje a tuky, voda, emulgátor (slunečnicový lecitin, mono a diglyceridy MK), jedlá sůl (0,2 %), sušená syrovátka, regulátor kyselosti (kyselina citronová), barvivo (beta-karoten), aroma, vitamíny A, D. 100 g Hery obsahuje 75g tuku, z toho nasycené MK 32 g a transizomery MK < 0,5 g.

Tuk se vyrábí v EU, distributor pro ČR UNILEVER ČR, spol. s r. o.

3.1.1.4 Perla máslová

Margarín s nízkým obsahem tuku (39 %) s přídavkem másla. Vhodný pro studenou kuchyni. Složení: voda, rostlinné oleje a tuky, modifikovaný škrob (tapioka), máslo (0,5 %), emulgátor (mono a diglyceridy MK, slunečnicový lecitin, polyglycerol-polyricin-okát), jedlá sůl (0,3 %), sušené podmásli, konzervant (sorbát draselný), regulátor kyselosti (kyselina citronová), vitamíny E, A, D, aroma, barvivo beta-karoten. 100g tuku obsahuje 39 g tuku, z toho nasycené MK 12 g a transizomery < 0,5 g.

Vyrobeno v EU, distributor pro ČR UNILEVER ČR, spol. s r. o.

3.1.1.5 Rama máslová

Margarín se sníženým obsahem tuku 60 %. Složení: rostlinné oleje (39,5 %) a tuky, voda, sušené podmásli, emulgátor (mono a diglyceridy MK, slunečnicový lecitin), jedlá sůl (0,2 %), konzervant (sorbát draselný), regulátor kyselosti (kyselina citronová), aroma, barvivo, vitamíny A, D, E. 100 g Máslové rama obsahuje 60 g tuku, z toho nasycené MK 18 g, mononenasycené 28 g, polynenasycené 14g a transizomery < 0,5 g.

Vyrobeno v EU, distributor pro ČR UNILEVER ČR, spol. s r. o.

3.1.1.6 Sluna

Rostlinný margarín na pečení, tuk 80 %. Složení: rostlinné oleje a tuky (80 %), voda, emulgátory (sójový lecitin, E 471), jedlá sůl (0,3 %), konzervant (E 202), regulátor kyselosti (E 330), máslové aroma, barvivo beta-karoten, vitamíny A, D3.

Vyrobena v EU, distributor pro ČR KAKA.

3.1.1.7 Stela

Jedlý roztíratelný tuk na pečení (80 %). Složení: rostlinné oleje a tuky (80 %), voda, emulgátory (sójový lecitin, E 471), jedlá sůl (0,3 %), konzervant (E 202), regulátor kyselosti (E 330), máslové aroma, barvivo beta-karoten, vitamíny A, D.

Vyrobena v EU, distributor pro ČR KAKA.

3.1.1.8 Zlatá Haná

Roztíratelný směsný tuk, obsah tuku 73 % z toho 85 % rostlinný a 15 % mléčný. Složení: rostlinný tuk, mléčný tuk, smetanový zákys, emulgátory E 471, barvivo beta-karoten. 100 g tuku obsahuje 74 g tuku, z toho nasycené MK 38 g, nenasycené MK 36 g, transizomery MK 1 g a ω -3 MK 1 g.

Vyrobena v Olomouci (OLMA).

3.2 Přístrojové vybavení

Pro stanovení MK byl použit plynový chromatograf typu 3800 firmy Varian Techtron (USA) s detektorem FID, hmotnostní spektrometr typ 4000 firmy Varian Techtron, standardy od firmy Supelco a další běžné laboratorní vybavení. Parametry plynového chromatografu obsahuje tabulka 1.

Tabulka 1: Parametry plynového chromatografu.

Parametr	Hodnota
Kolona – délka/průměr – teplota	SelectFAME (firma Farian) -50 m/0,25 mm S teplotním gradientem: 55°C po dobu 5 min 170°C s nárůstem teploty 40°C/min 196°C s nárůstem teploty 2°C/min 210°C s nárůstem 10°C/min po dobu 8 min
Detektor – teplota	FID - 250°C
Injektor – teplota – nástřik – split	250°C 1 µl 10
Nosný plyn – průtok	Helium - 1,8 ml/min

3.3 Příprava vzorku

3.3.1 Chemikálie

- Petrolether p.a.
- Bezvodý síran sodný
- Hydroxid draselný rozpuštěný v methanolu (2 mol/l)
- Kyselina chlorovodíková v methanolu (1 mol/l)

3.3.2 Pracovní postup při přípravě vzorků před zavedením do GC

Od každého vybraného pokrmového tuku byly odebrány 3 vzorky do předem popsaných lahviček. Hmotnost vzorků se odvíjela od procentního obsahu tuku – čím méně % tuku pokrmový tuk obsahoval, tím měl vzorek větší hmotnost. Například

u výrobku Hera, který obsahuje 75 % tuku, bylo odváženo 5 mg. Pro odvážení vzorků byly použity analytické váhy.

Dále byl ke každému vzorku přidán pipetou 1 ml petroletheru a špičku lžičky bezvodého síranu sodného. Po řádném protřepání bylo do každé lahvičky přidáno 200 μ l roztoku hydroxidu draselného rozpuštěného v methanolu o koncentraci 2 mol/l.

Následně byly opět důkladně uzavřené lahvičky vloženy do vodní lázně se 60°C, kde se třepaly 2 min. Poté byly lahvičky vyjmuty z lázně a ponechány vychladnout.

Dále bylo do každé lahvičky přidáno 400 μ l roztoku kyseliny chlorovodíkové v methanolu o koncentraci 1 mol/l, čímž došlo k neutralizaci hydroxidu draselného. Dále byly ještě přidány 2 ml petroletheru pro naředění směsi.

Nakonec bylo z horní vrstvy odebráno pipetou 1,5 ml do lahviček, které byly poté důkladně uzavřené víčkem. Takto připravené lahvičky se vložily do autosampleru přístroje k analýze.

3.4 Vyhodnocení a zpracování vzorku

Kvantifikace zastoupení MK v tucích byla určena z poměru ploch píků jednotlivých methylesterů MK k celkové ploše jejich píků. Korekce na odezvu plamenově ionizačního detektoru byla provedena pomocí kvantitativních standardů.

Identifikace jednotlivých methylesterů kyselin byla provedena pomocí kvalitativních standardů firmy Supelco (USA) a hmotnostně spektrometrického detektoru v režimu chemické ionizace. Jako reakční médium při chemické ionizaci byl využit acetonitril.

Pro vyhodnocení vzorků byl použit program MS Workstation 6.9. Pro následné zpracování vzorků byly použity programy Microsoft Excel – Statistické programy a Program Statistica od firmy StatSoft CR, s.r.o.

3.4.1 Analýza hlavních komponent

Analýza hlavních komponent (PCA, principal component analysis) patří k nejjednodušším vícerozměrným metodám. Řeší problém, jak redukovat počet proměnných, jež popisují určitou skupinu proměnných, tím, že se sestrojí menší počet nových proměnných, hlavních komponent, které jsou vzájemně nezávislé. Hlavní komponenty vznikají jako lineární kombinace původních proměnných.

Hlavní komponenty se uspořádávají podle toho, kolik variability původní množiny proměnných objasňují. První hlavní komponenta objasňuje největší část této variability. Zkoumáním hodnot nových proměnných (hlavních komponent) místo původních hodnot nám tedy umožňuje snadněji porozumět posuzovaným datům.⁽⁴¹⁾

4 Výsledky a diskuse

4.1 Výběr mastných kyselin

Vzhledem k velkým relativním směrodatným odchylkám ve výsledcích u kyselin (tabulka 2), které jsou v tucích obsaženy v malém množství, byly vybrány z konečných výsledků pouze kyseliny s obsahem nad 0,5 %. Výjimkou byly kyseliny typické pro mléčný tuk – kyselina máselná a kapronová, TFA a kyseliny s lichým počtem uhlíků (C15 a C17)). Relativní směrodatná odchylka vybraných MK je tedy pod 5 %. Přehled vybraných MK ke statistickému zpracování zahrnuje tabulka 3. Obsahy kyselin typických pro mléčný tuk byly sečteny dohromady. Množství vyloučených výsledků tvoří asi 1 %.

Tabulka 2: Relativní směrodatné odchylky v závislosti na průměrném obsahu MK.

Průměrný obsah MK [%]	Relativní směrodatná odchylka [%]
0,06	17,08
0,12	16,04
0,29	7,23
0,40	4,51
0,55	3,71
0,70	3,25
0,10	2,38
1,94	1,29

Tabulka 3: Přehled vybraných MK.

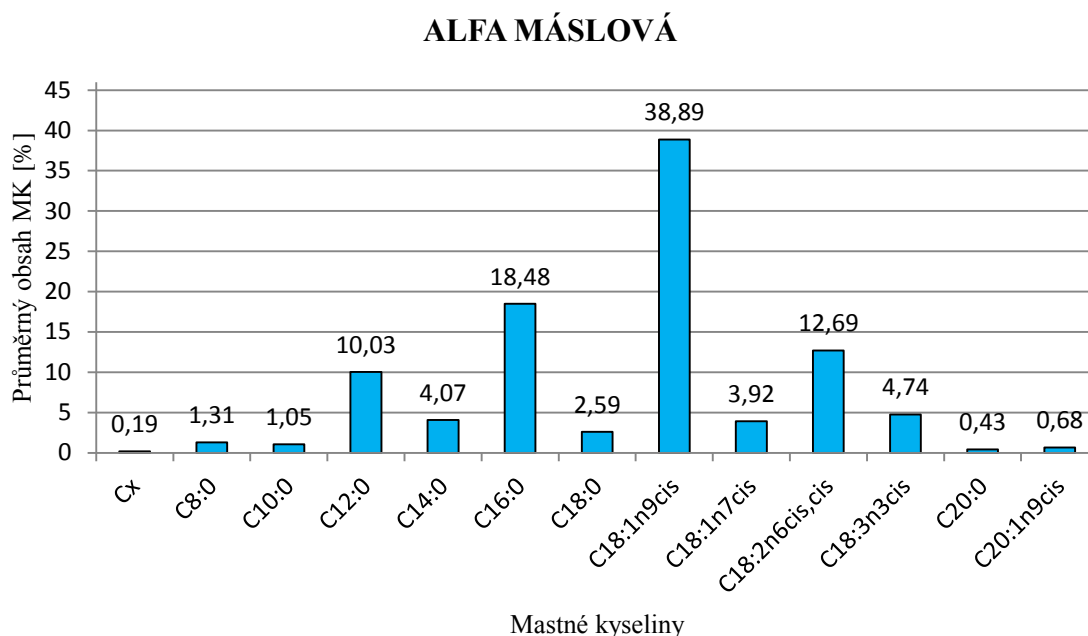
Pracovní zkratka	Mastná kyselina
C _x	MK typické pro mléčný tuk: kyselina máselná, kapronová, trans MK a kyseliny s lichým počtem uhlíků (C 15:0, C 17:0)
C 8:0	Kyselina kaprylová
C10:0	Kyselina kaprinová
C12:0	Kyselina laurová
C 14:0	Kyselina kristová
C 16:0	Kyselina palmitová
C 18:0	Kyselina stearová
C 18:1n9cis	Kyselina olejová
C 18:1n7cis	Kyselina vakcínová
C 18:2n6cis,cis	Kyselina linolová
C 18:3n3cis	Kyselina linolenová
C 20:0	Kyselina arachová
C 20:1n9cis	Kyselina gadolejová

4.2 Spektrum vybraných MK u jednotlivých tuků

4.2.1 Alfa máslová

V tuku Alfa má největší procento zastoupení kyselina olejová a to 38,02 až 40,22 %. Poněkud menší zastoupení mají kyselina palmitová (17,86-19,03 %), linolová (12,51-12,92 %) a laurová (9,75-10,31 %). Procentuální zastoupení ostatních MK je menší než 5 %. MK typické pro mléčný tuk se v tomto tuku vyskytují jen v nepatrném množství (0,17-0,25 %). Průměrný obsah vybraných MK v tuku Alfa je znázorněn v grafu 1.

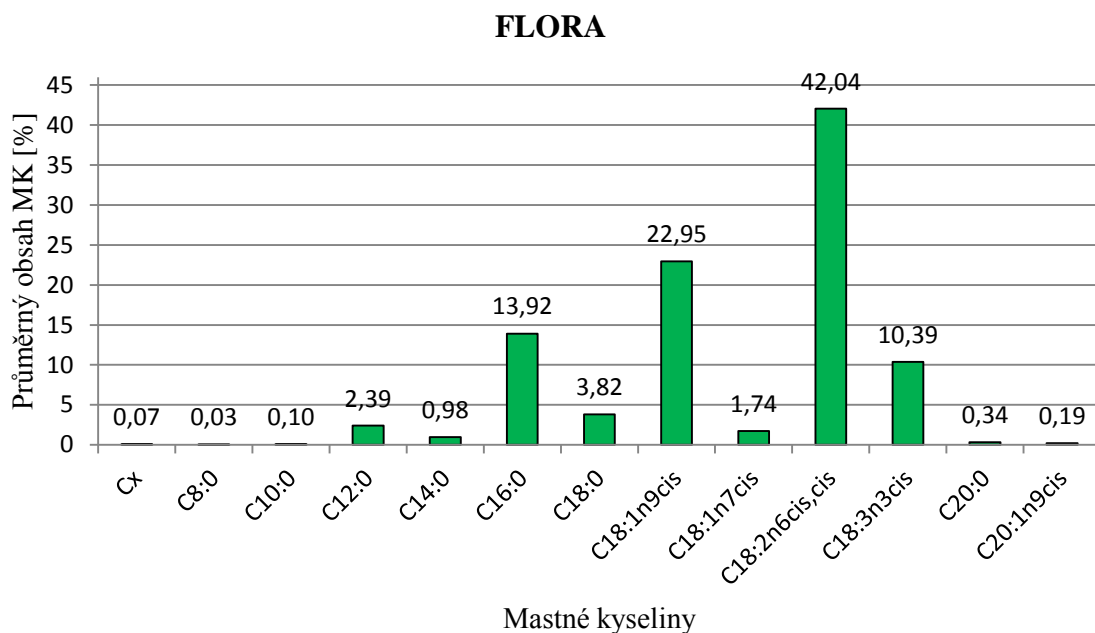
Graf 1: Průměrný obsah MK v tuku Alfa máslová [%].



4.2.2 Flora

Převažující MK v tuku Flora je kyselina linolová s 36,74-45,72 %. Dalšími vysoce zastoupenými MK jsou kyselina olejová (21,80-24,29 %), palmitová (12,78-15,69 %) a linolenová (9,02-12,08 %). Ostatní MK jsou zastoupeny pod 4 %. MK typické pro mléčný tuk se v tomto tuku téměř nevyskytují (0,06-0,12 %). Průměrný obsah vybraných MK v tuku Flora je znázorněn v grafu 2.

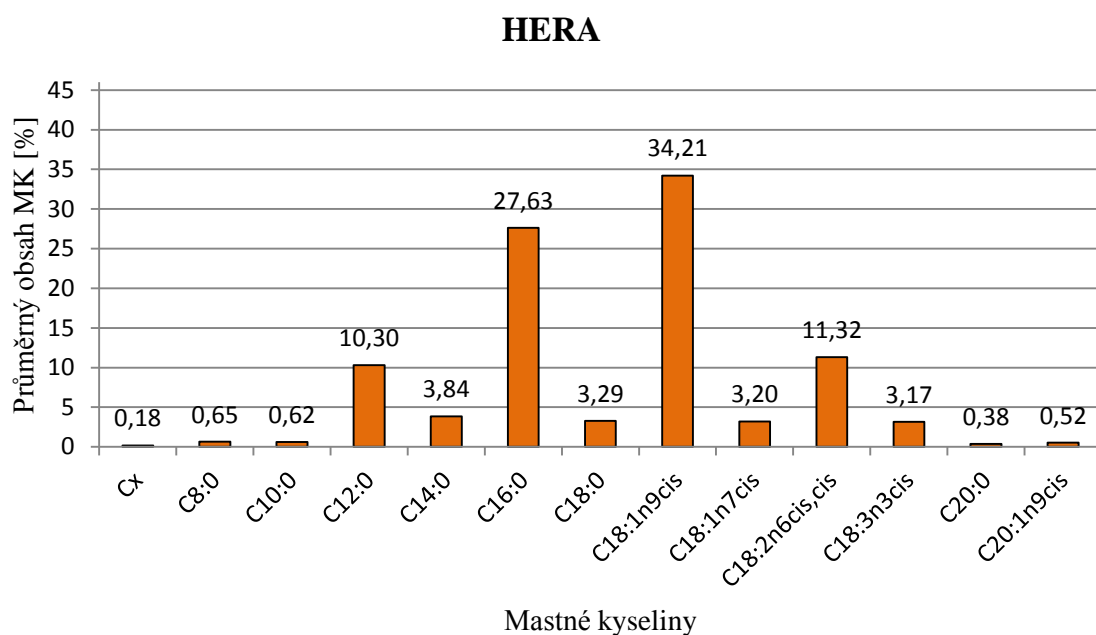
Graf 2: Průměrný obsah MK v tuku Flora [%].



4.2.3 Hera

Největší procentuální zastoupení v tuku Hera mají kyseliny olejová (33,50-34,92 %) a palmitová (27,27-27,89 %). V menším množství jsou zastoupeny kyselina linolová (11,19-11,61 %) a laurová (10,09-10,62 %). Ostatní MK jsou zastoupeny pod 4 %. MK typické pro mléčný tuk se v tomto tuku vyskytují jen v nepatrném množství (0,0,09-0,27 %). Průměrný obsah vybraných MK v tuku Hera je znázorněn v grafu 3.

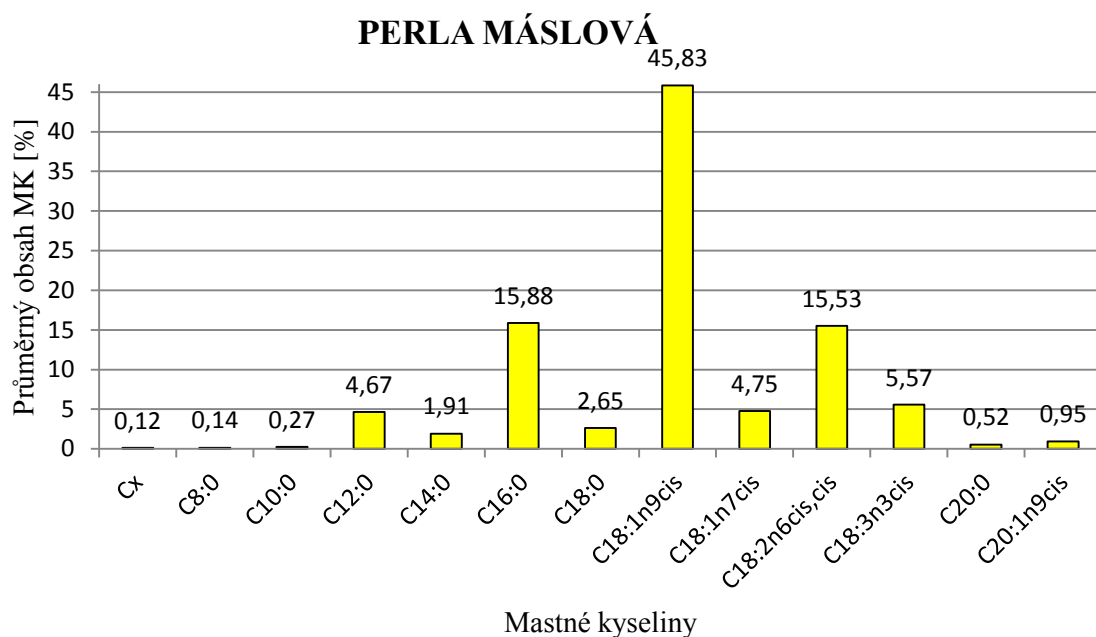
Graf 3: Průměrný obsah MK v tuku Hera[%].



4.2.4 Perla máslová

V tuku Perla máslová je převažující MK kyselina olejová. Poměrně stejné zastoupení mají kyseliny palmitová (15,44-16,64 %) a linolová (15,03-16,22 %). Ostatní MK jsou zastoupeny pod 6 %. MK typické pro mléčný tuk se v tomto tuku vyskytují jen v nepatrném množství (0,10-0,15 %). Průměrný obsah vybraných MK v tuku Perla máslová je znázorněn v grafu 4.

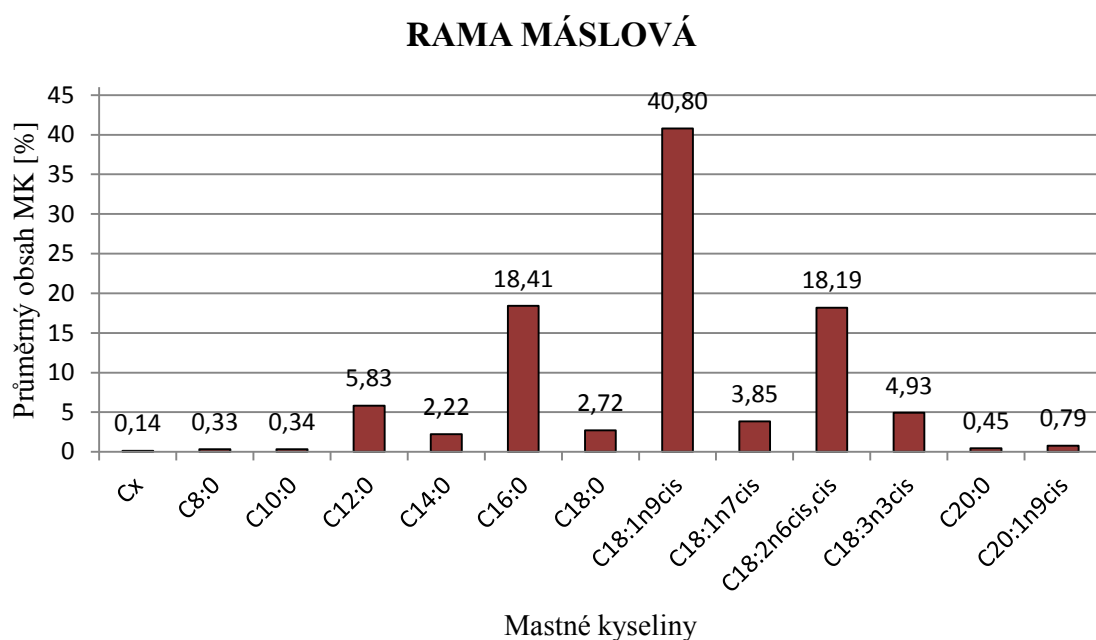
Graf 4: Průměrný obsah MK v tuku Perla máslová [%].



4.2.5 Rama máslová

Největší procentuální zastoupení v tuku Rama máslová má kyselina olejová (40,06-41,36 %). Poměrně stejné zastoupení mají kyseliny palmitová (18,02-18,96 %) a linolová (17,72-18,94 %). Ostatní MK jsou zastoupeny pod 6 %. MK typické pro mléčný tuk se zde vyskytují jen v nepatrném množství. Průměrný obsah vybraných MK v tuku Rama máslová je znázorněn v grafu 5.

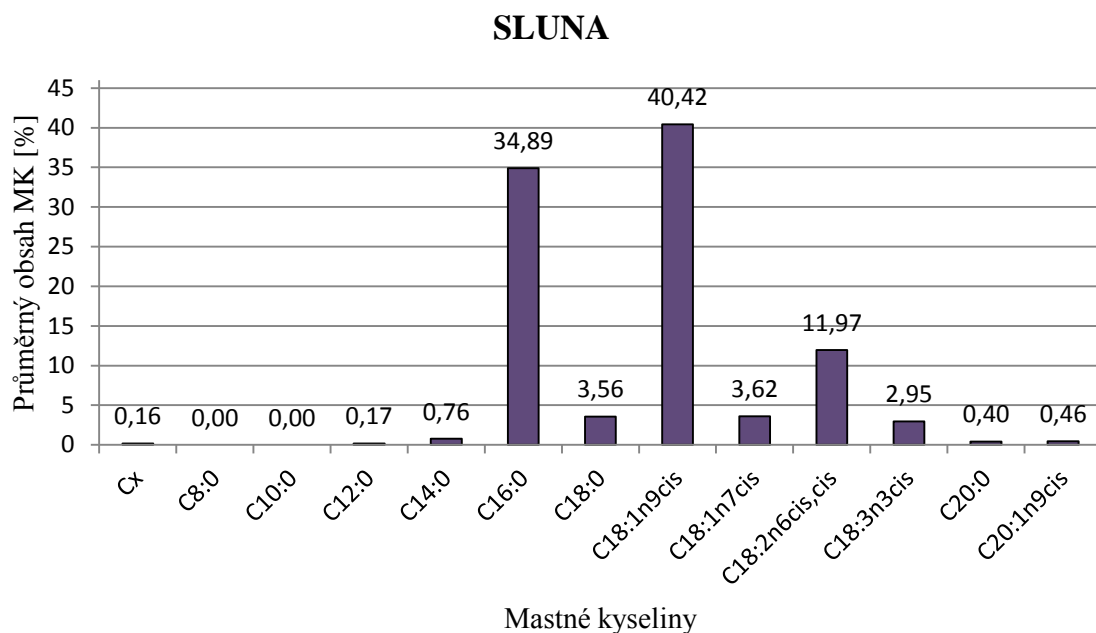
Graf 5: Průměrný obsah MK v tuku Rama máslová [%].



4.2.6 Sluna

Vysoké procento zastoupení mají v tuku Sluna kyselina olejová (39,69-41,12 %) a palmitová (33,50-36,06 %). Poměrně méně je zastoupena kyselina linolová (11,75-12,37 %). Kyseliny kaprylová a kaprinová se v tuku nevyskytují vůbec. Ostatní MK jsou zastoupeny pod 4 %. MK typické pro mléčný tuk se v tomto tuku vyskytují jen v opravdu malém množství (0,09-0,24 %). Průměrný obsah vybraných MK v tuku Sluna je znázorněn v grafu 6.

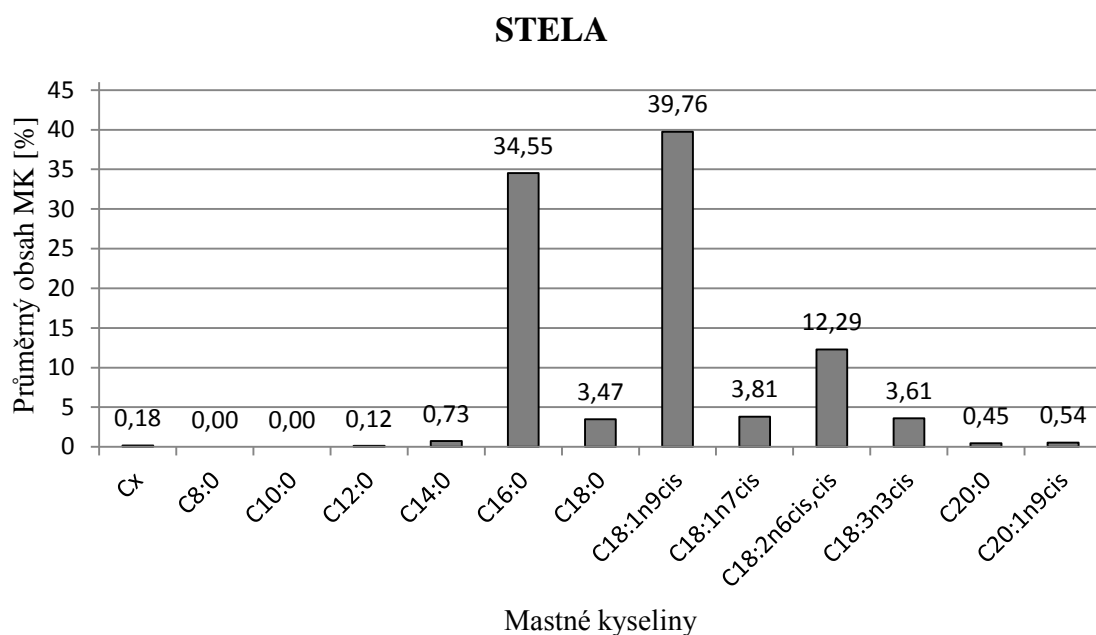
Graf 6: Průměrný obsah MK v tuku Sluna[%].



4.2.7 Stela

Převažujícími MK v tuku Stela jsou kyseliny olejová (39,01-40,36 %) a palmitová (33,90-35,16 %). Poměrně méně je zastoupena kyselina linolová (12,02-12,54 %). Kyseliny kaprylová a kaprinová se v tuku nevyskytují vůbec. Ostatní MK jsou zastoupeny pod 4 %. MK typické pro mléčný tuk se v tomto tuku vyskytují jen v nepatrném množství (0,15-0,23 %). Průměrný obsah vybraných MK v tuku Stela je znázorněn v grafu 7.

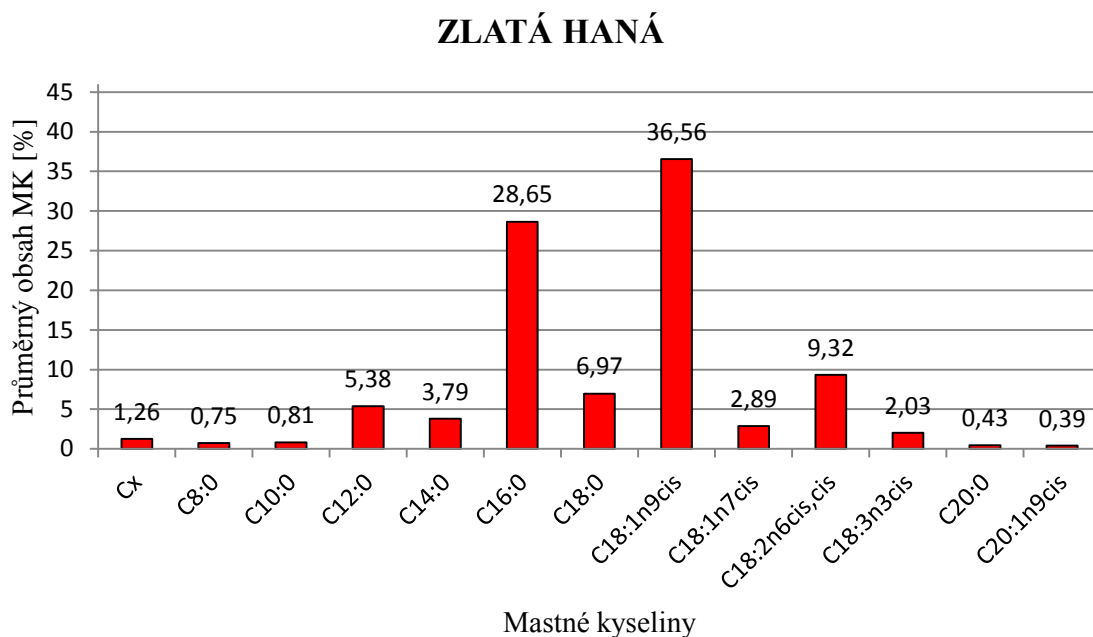
Graf 7: Průměrný obsah MK v tuku Stela [%].



4.2.8 Zlatá Haná

Převládajícími MK v tuku Zlatá Haná jsou kyseliny olejová (35,60-37,74 %) a palmitová (27,35-30,55 %). Dále obsahuje kyselinu linolovou (8,93-9,46 %), stearovou (5,71-7,82 %) a laurovou (5,10-5,63 %). Ostatní MK jsou zastoupeny pod 4 %. Jako jediný má tento tuk významné procento MK charakteristických pro mléčný tuk (0,92-1,59 %). Průměrný obsah vybraných MK v tuku Zlatá Haná je znázorněn v grafu 8.

Graf 8: Průměrný obsah MK v tuku Zlatá Haná [%].



Celkově můžeme říci, že ve všech tucích převládá kyselina olejová. Další silně zastoupenou kyselinou ve všech tucích je kyselina palmitová. Jedinou výjimku tvoří tuk Flora, kde má největší procentuální zastoupení kyselina linolová. Pokud se zaměříme na MK typické pro mléčný tuk, jako jsou kyselina máselná a kapronová, trans-kyseliny a MK s lichým počtem uhlíků (C15 a C17), tak jsou nejvíce zastoupeny v tuku Zlatá Haná. U ostatních tuků se tyto MK vyskytují jen ve velmi malých množstvích. Toto zjištění můžeme brát jako velmi pozoruhodné, když přihlídneme k faktu, že již v názvu tří výrobků se objevuje přídomek „máslová“. S pravým máslem (z mléčného tuku) tedy tyto výrobky nemají prakticky nic společného.

4.3 Rozdíly mezi jednotlivými odběry

Jak je uvedeno výše, jednotlivé odběry se méně či více od sebe odlišují. Dokazuje to i jednofaktorová analýza rozptylu, při které se hodnotily statistické rozdíly u MK pro každý tuk. Tabulka 4 ukazuje, u kterých MK se hodnoty významně liší na hladině

pravděpodobnosti menší než 0,05 (označeny hvězdičkou). V tabulce 5 jsou pro příklad zobrazeny konkrétní hodnoty Analýzy rozptylu kyseliny olejové u jednotlivých tuků. Příčina vzniku rozdílů u jednotlivých měření je pravděpodobně v tom, že výrobky jsou tvořeny míšením tuků. Tudíž může docházet při výrobě k menším odchylkám ve složení.

Tabulka 4: Analýza rozptylu MK u jednotlivých tuků (hvězdička značí, že se hodnoty u této MK významně liší na hladině pravděpodobnosti menší než 0,05).

Tuk	Mastná kyselina					
Alfa máslová	C8:0*	C12:0*	C16:0*	C18:1n9cis*	C18:2n6cis,cis*	C20:0
Flora	C8:0*	C12:0*	C16:0*	C18:1n9cis*	C18:2n6cis,cis*	C20:0
Hera	C8:0*	C12:0*	C16:0	C18:1n9cis*	C18:2n6cis,cis	C20:0
Perla máslová	C8:0*	C12:0	C16:0*	C18:1n9cis*	C18:2n6cis,cis*	C20:0
Rama máslová	C8:0*	C12:0*	C16:0*	C18:1n9cis*	C18:2n6cis,cis*	C20:0
Sluna	C8:0	C12:0*	C16:0*	C18:1n9cis*	C18:2n6cis,cis*	C20:0*
Stela	C8:0	C12:0*	C16:0*	C18:1n9cis*	C18:2n6cis,cis*	C20:0
Zlatá Haná	C8:0*	C12:0	C16:0*	C18:1n9cis*	C18:2n6cis,cis*	C20:0

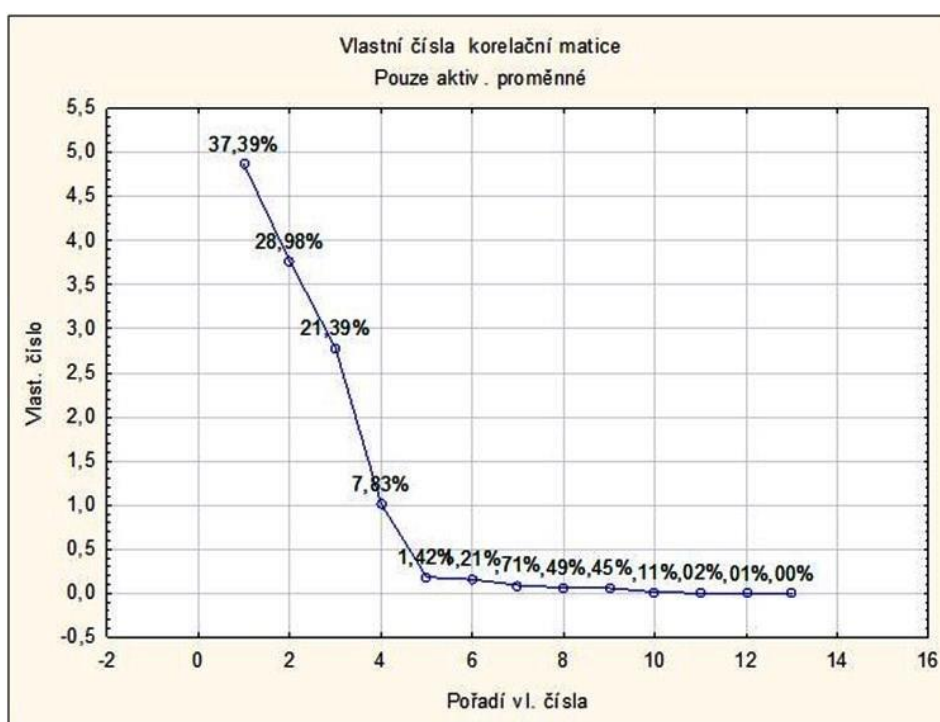
Tabulka 5: Analýza rozptylu kyseliny olejové u jednotlivých tuků.

Tuk	Hladina pravděpodobnosti
Alfa máslová	0,0000766
Flora	0,0000004
Hera	0,0019910
Perla máslová	0,0008554
Rama máslová	0,0044780
Sluna	0,0027348
Stela	0,0000550
Zlatá Haná	0,0001016

4.4 Aplikace analýzy hlavních komponent

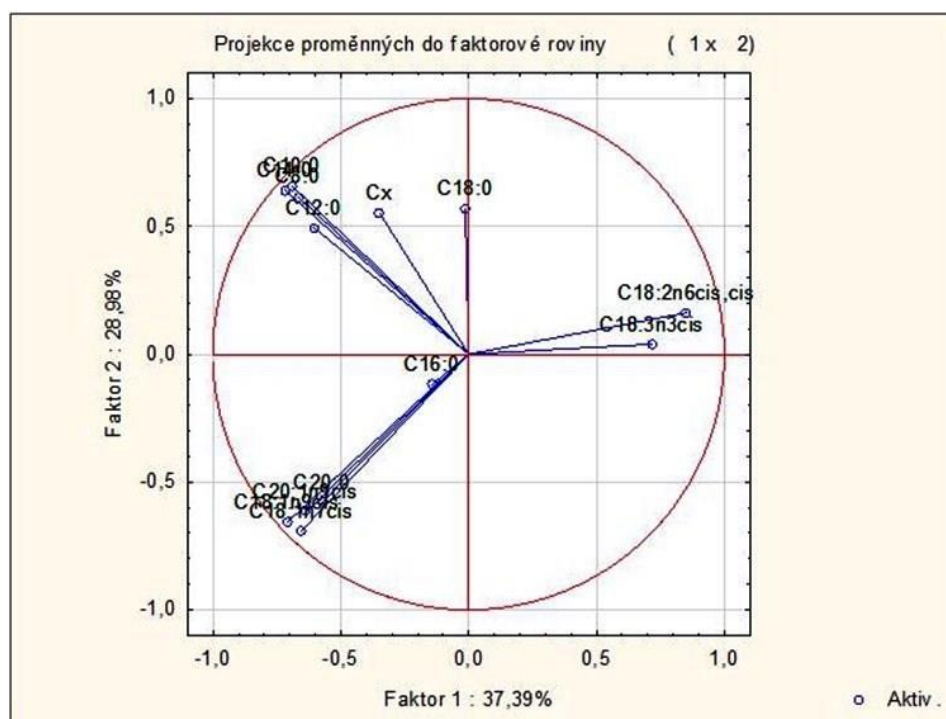
Tato analýza vyhledá faktory, které jsou nějakým způsobem společné pro všechny vzorky. Sutinový graf (graf 9) znázorňuje, z kolika procent faktory popisují variabilitu systému. V případě této analýzy jsou důležité první tři faktory. Součet procent těchto tří faktorů dává přes 85 %, což je v literatuře běžně považováno za dostatečné pro další zpracování dat. První faktor je tedy tvořen 37,39 %, druhý 28,98 % a třetí 21,39 %.

Graf 9: Vlastní čísla korelační matice (tzv. sutinový graf).

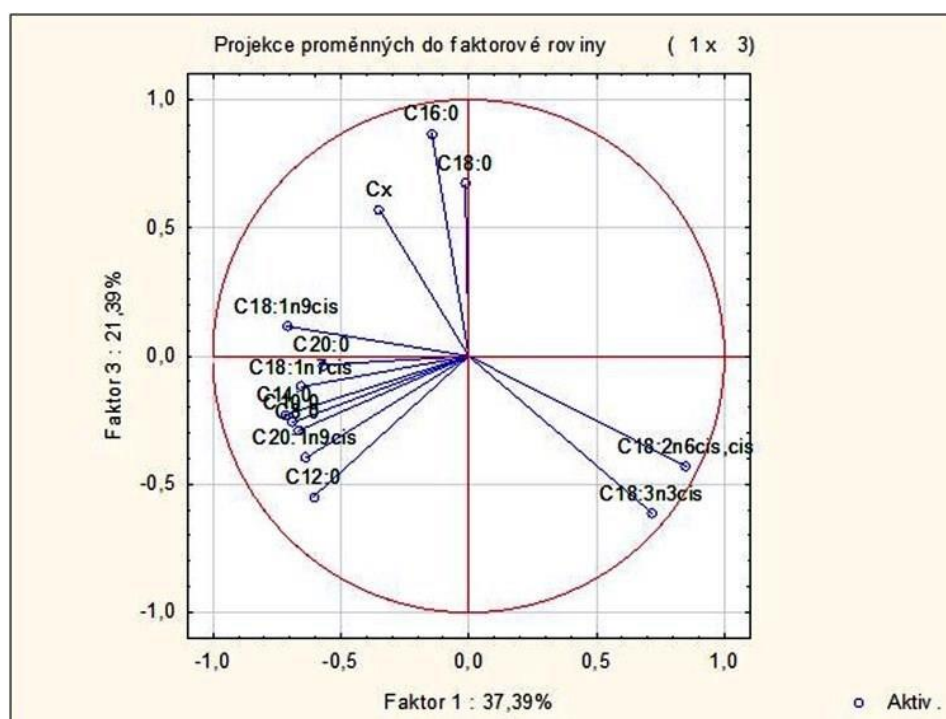


Grafy 10, 11 a 12 znázorňují podíl jednotlivých původních proměnných (mastných kyselin) a nových proměnných (faktorů). V grafu 10 jsou promítnuty původní proměnné (mastné kyseliny) do faktorové roviny tvořené hlavními Faktory 1 a 2. V grafu 11 jsou promítnuty původní proměnné do faktorové roviny tvořené hlavními Faktory 1 a 3. A v grafu 10 jsou promítnuty původní proměnné do faktorové roviny tvořené hlavními Faktory 2 a 3.

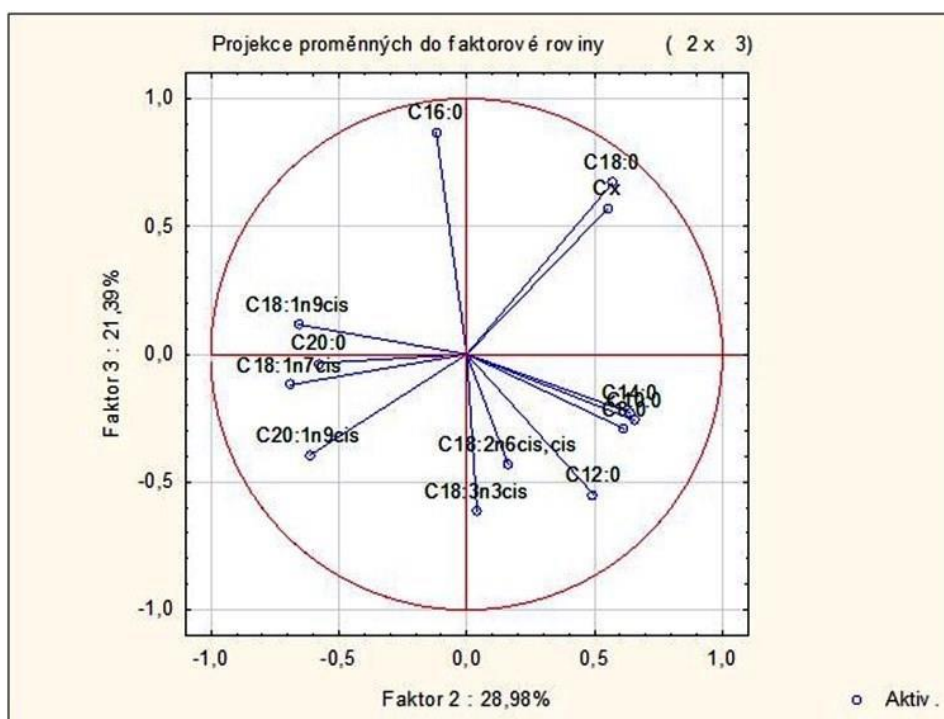
Graf 10: Projekce proměnných do faktorové roviny (Faktor 1 proti Faktoru 2).



Graf 11: Projekce proměnných do faktorové roviny (Faktor 1 proti Faktoru 3).

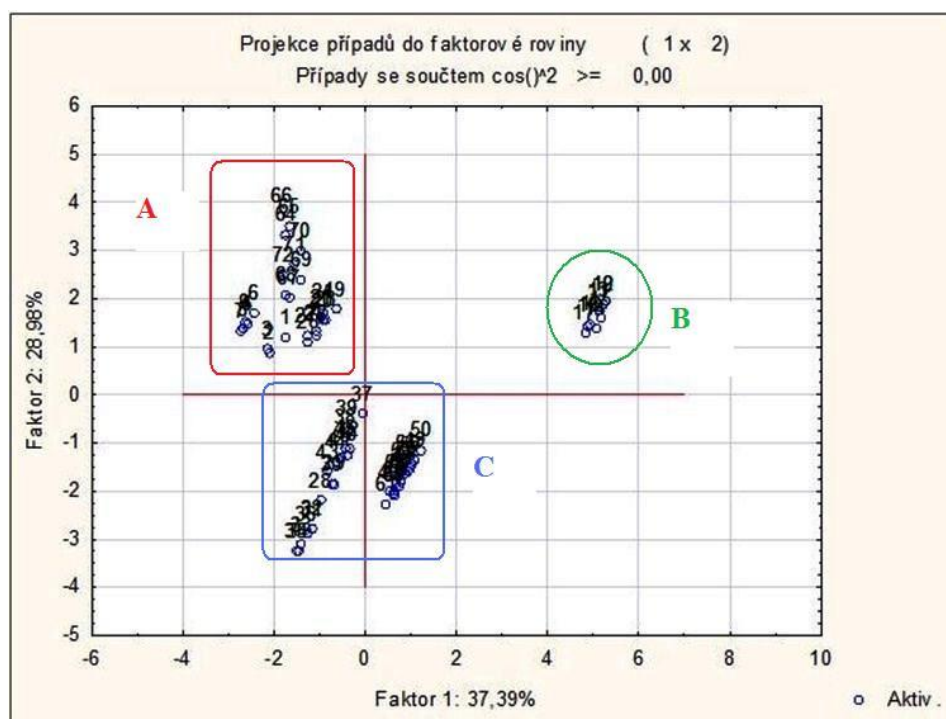


Graf 12: Projekce proměnných do faktorové roviny (Faktor 2 proti Faktoru 3).



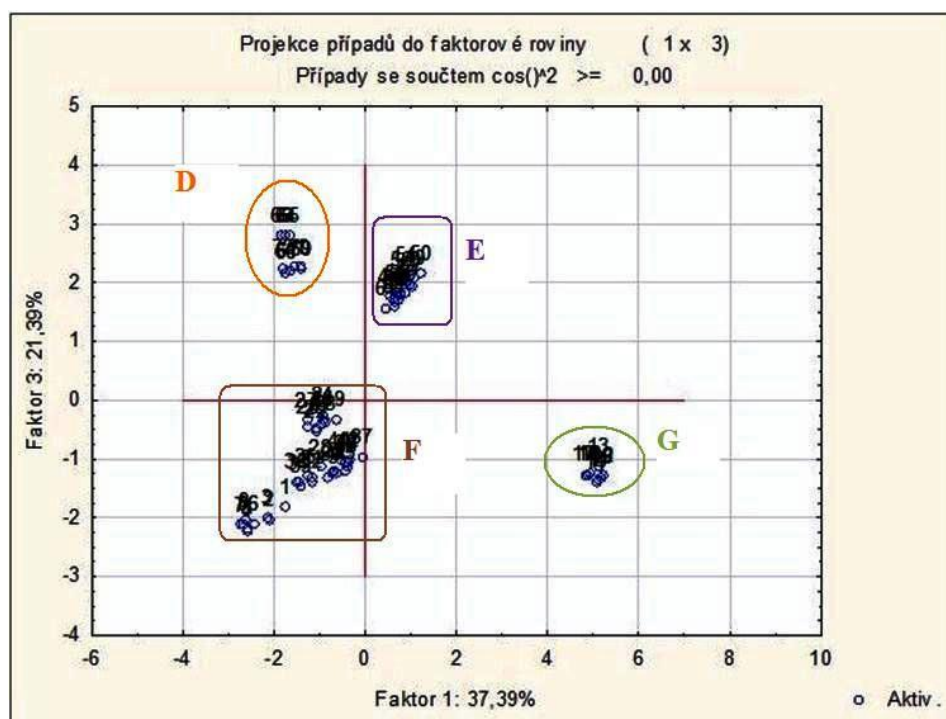
Z grafu 13 vyplývá, že skupiny případů (tedy vzorků) jsou rozděleny podle faktorů 1 a 2 a zastoupených kyselin. V jednotlivých skupinách případů jsou vzorky jen málo od sebe odlišné. Ve skupině A nacházíme vzorky Zlaté Hané, Alfý a Hery. Skupina B představuje vzorky z tuku Flora. Ve skupině C jsou zahrnuty vzorky tuků Rama máslová, Perla máslová, Sluna a Stela.

Graf 13: Projekce případů do faktorové roviny (Faktor 1 proti Faktoru 2).



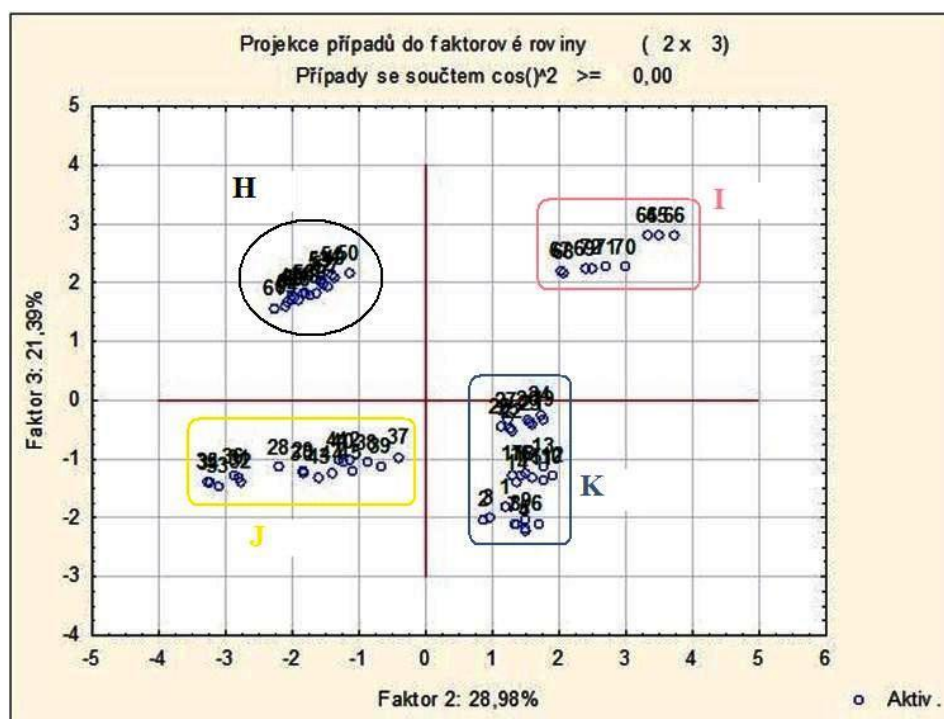
V grafu 14 jsou skupiny případů děleny podle faktorů 1 a 3. Skupina D představuje tuk Zlatá Haná. Skupina E tuky Sluna a Stela. Ve skupině F se nacházejí vzorky tuků Hera, Perla máslová, Alfa máslová a Rama máslová. Ve skupině G je samostatný tuk Flora.

Graf 14: Projekce případů do faktorové roviny (Faktor 1 proti Faktoru 3).



V grafu 15 jsou skupiny případů děleny podle faktorů 2 a 3. Skupina H představuje vzorky tuků Sluna a Stela. Skupina I Zlatou Hanou. Ve skupině J se nacházejí vzorky tuků Perla máslová a Rama máslová. A ve skupině K vzorky tuků Hera, Flora a Alfa máslová.

Graf 15: Projekce případů do faktorové roviny (Faktor 2 proti Faktoru 3).



Po provedení analýzy hlavních komponent můžeme konstatovat, že se nejvíce odlišuje tuk Zlatá Haná, kde nacházíme největší množství MK typických pro mléčný tuk, čímž se rozumí kyselina máselná a kapronová, TFA a kyseliny s lichým počtem uhlíků (C15 a C17). Dále potom tuk Flora, kde je naopak největší množství polynenasycených MK (kyselina linolová). Na výrobu tohoto tuku byl pravděpodobně použit řepkový či slunečnicový olej, protože oba tyto oleje mají velký obsah právě kyseliny linolové.⁽¹⁾ Dále můžeme říct, že tuky Stela a Sluna jsou si složením MK velmi podobné, převažují u nich kyselina olejová a palmitová. To samé platí i o tucích Perla máslová a Rama máslová, kde se navíc ve větší míře objevuje i kyselina linolová.

5 Závěr

Cílem této práce bylo seznámení se s metodou plynové chromatografie s použitím plamenově ionizačního a hmotnostně spektrometrického detektoru. Díky tomuto seznámení bylo provedeno stanovení mastných kyselin v osmi pokrmových tucích. Od každého pokrmového tuku byly provedeny tři odběry v časovém odstupu tří měsíců.

Převládající mastnou kyselinou ve všech tucích byla kyselina olejová. Další silně zastoupenou kyselinou ve všech tucích byla kyselina palmitová. Jedinou výjimku tvořil tuk Flora, kde měla největší procentuální zastoupení kyselina linolová. Kyseliny typické pro mléčný tuk (kyselina máselná a kapronová, TFA a kyseliny s lichým počtem uhlíků (C15 a C17)) byly nejvíce zastoupeny v tuku Zlatá Haná. U ostatních tuků se tyto MK vyskytují jen v malých množstvích.

Při porovnání jednotlivých odběrů bylo patrné, že se od sebe více či méně odlišují. Příčina vzniku rozdílů u jednotlivých měření je pravděpodobně v tom, že výrobky jsou tvořeny míšením tuků. Tudíž může docházet při výrobě k menším odchylkám ve složení.

Z analýzy hlavních komponent bylo zřejmé, že se tuk Zlatá Haná od ostatních tuků nejvíce odlišuje. Příčinou byly MK typické pro mléčný tuk, které se v tomto výrobku vyskytují v největším množství. Samostatnou skupinu tvořil i tuk Flora, kde bylo naopak největší množství polynenasycených MK (kyselina linolová). Tuky Stela a Sluna si byly složením MK velmi podobné, převažují u nich totiž kyseliny olejová a palmitová. To samé platí i o tucích Perla máslová a Rama máslová, kde se navíc ve větší míře objevila i kyselina linolová. Ovšem paradoxně, jak by se dalo soudit z názvu výrobků, se MK typické pro mléčný tuk v těchto výrobcích prakticky nevyskytují.

Předpokládanou hypotézu, zda se ve vybraných pokrmových tucích objeví alespoň malé množství mléčného tuku, můžeme potvrdit pouze z části. Z osmi výrobků pouze jeden (tuk Zlatá Haná) obsahoval MK typické pro mléčný tuk nad 1 %. V ostatních případech se objevil jen v minimálním množství. Předpokládanou hypotézu, že se jednotlivé odběry nebudou lišit procentuálním obsahem MK, nemůžeme potvrdit. Jak už bylo řečeno, příčina je pravděpodobně ve výrobě těchto pokrmových tuků.

6 Seznam informačních zdrojů

1. VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J., 2009. *Chemie potravin I.* 3. Vydání. Tábor, OSSIS, s. 87-146.
2. CHRISTIE W. W., ET AL., 1989. *Gaschromatography and lipids.* 3rd Edition. Bridgewater, OilyPress, 191 s.
3. ŠENKÝŘOVÁ, P., 2006. *Nenasycené mastné kyseliny ve výživě člověka.* [Bakalářská práce]. Brno, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, 33 s.
4. BOHÁČOVÁ, L., 2012. *Vliv vybraných společenstev pastevního porostu na množství mléka se zaměřením na spektrum mastných kyselin v tuku mléka.* [Disertační práce]. České Budějovice, Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, Katedra genetiky, šlechtění a výživy zvířat, 136 s.
5. SCHNEEDORFEROVÁ, I., 2009. *Analýza mastných kyselin v diglyceridech a triglyceridech tělních tekutin pomocí plynové chromatografie.* [Bakalářská práce]. České Budějovice, Jihočeská univerzita, Zdravotně sociální fakulta, Katedra laboratorních metod a zdravotnické techniky, 75 s.
6. BRUNCLÍK, Z., 2010. *Nenasycené mastné kyseliny.* [Bakalářská práce]. Brno, Masarykova univerzita, Fakulta sportovních studií, Katedra podpory zdraví, 45 s.
7. ZÝKA, J., A KOL., 1988. *Analytická příručka díl I.* Praha, SNTL, s. 203-252.
8. ŽABOKRTSKÁ, J., 2009. *Chromatografické metody pro stanovení metabolitů značených stabilními izotopy a jejich aplikace v klinickém výzkumu.* [Bakalářská práce]. České Budějovice, Jihočeská univerzita, Zdravotně sociální fakulta, katedra laboratorních metod a informačních systémů, 96 s.
9. MACHALÍČEK, M., 2010. *Plynová chromatografie organických sloučenin.* [Bakalářská práce]. Brno, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie, 29 s.

10. Dostupné z:
http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf,
staženo dne 3.9.2012.
11. ŠTULÍK, K., 2005. *Analytické separační metody*. 1. Vydání. Praha, Karolinum, s. 210-231.
12. Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/Prednasky/Zaklady_MS.pdf, staženo dne 3.9.2012.
13. Dostupné z:
http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/MS/ms.pdf,
staženo dne 3.9.2012.
14. SAMKOVÁ, E., PEŠEK, M., ŠPIČKA, J., 2008. *Mastné kyseliny mléčného tuku skotu a faktory ovlivňující jejich zastoupení*. Vědecká monografie. 1. Vydání. České Budějovice, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 90 s.
15. PLATZEROVÁ, N., 2009. *Jsou „margaríny“ zdravotním rizikem?* [Diplomová práce]. Brno, Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Ústav preventivního lékařství, 140 s.
16. Dostupné z: <http://www.vyzivaspol.cz/clanky-casopis/margariny-vcera-dnes-a-zitra.html>, staženo dne 3.9.2012.
17. HOLOMUCKÁ, G., 2009. *Výroba margarínu, novinky ve výrobních technologiích*. [Bakalářská práce]. Zlín, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav potravinářského inženýrství, 51 s.
18. Dostupné z: <http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Lipidy>, staženo dne 3.9.2012.
19. KOLÁŘ, K., KODÍČEK, M., POSPÍŠIL, J., 1997. *Chemie II*. 1. Vydání. Praha, SPN, s. 85-86.
20. HOLZBECHER, Z., CHURÁČEK, J., 1987. *Analytická chemie*. 1. Vydání. Praha, SNTL, s. 435-51.
21. Dostupné z: http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/gc/GC.pdf, staženo dne 4.9.2012.

22. CVRKOVÁ, J., 2010. *Stanovení lipidů a zastoupení mastných kyselin v obilce ječmene*. [Diplomová práce]. Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, 62 s.
23. ANDĚL, M., DLOUHÝ, P., 2006. Margaríny a ateroskleróza. *Vesmír*, 85(2006/11): str. 686-688.
24. JANEŠÍKOVÁ, K., 2012. *Stanovení spektra mastných kyselin ve vybraných ztužených tucích*. [Bakalářská práce]. České Budějovice, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, Katedra laboratorních metod a informačních systémů, 52 s.
25. VELÍŠEK, J., CEJPEK, K., 2008. *Biosynthesis of food components*. 1st Edition. Tábor, OSSIS, s. 105-108.
26. MURRAY, R. K., A KOL., 2002. *Harperova biochemie*. 3. Vydání. Praha, H & H, s. 223-230.
27. GARRETT, R. H., GRISHAM, C. M., 2010. *Biochemistry*. 4th Edition. Boston, Brooks/Cole, s. 276-281.
28. Dostupné z: <http://www.nasyceneskodi.cz/proc-nasycene-skodi/>, staženo 28.1.2013.
29. VOLŠICKÁ, J., 2011. *Spektrum mastných kyselin mléčného tuku skotu při změnách krmné dávky*. [Diplomová práce]. České Budějovice, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů, 33 s.
30. KADLEC, P., MELZUCH, K., VOLDŘICH, M., A KOL., 2009. *Technologie potravin, Co byste měli vědět o výrobě potravin?*. 1. Vydání. Ostrava, KEY Publishing s.r.o., s. 243-317.
31. MOTTL, R., 2012. Polynenasycené kyseliny skupiny n-3 – významná podpora terapie. *Lékařské listy*, 5: 13-14.
32. BAŠTOVÁ, D., 2009. *Pozitivní účinky konjugované linolové kyseliny na lidské zdraví*. [Bakalářská práce]. Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, 46 s.

33. BALLESTEROS-VÁSQUEZ M. N., VALENZUELA-CALVILLO L. S., ARTALEJO-OCHOA E., ROBLES-SARDIN A. E., 2012. Trans fatty acids: Consumption effect on human health and regulation challenges. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1): 54-64.
34. ENDO Y., OHTA A., KIDO H., KURIYAMA M., SAKAGUCHI Y., TAKEBAYASHI S., HIRAI H., MURAKAMI C., WADA S., 2011. Determination of triacylglycerol composition in vegetable oils using High-performance liquid chromatography: A collaborative study. *Journal of Oleo Science*, 60(9): 451-456.
35. BARISON A., PEREIRA DA SILVA C. W., CAMPOS F. R., SIMONELLI F., LENZ C. A., FERREIRA A. G., 2010. A Simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ¹H NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48(8): 642- 650.
36. SUNDARAM J., KANDALA C. V., HOLSER R. A., BUTTS C. L., WINDHAM W. R., 2010. Determination of in-shell peanut oil and fatty acid composition using Near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(10): 1103-1114.
37. CHURÁČEK, J., A KOL., 1990. *Analytická separace látek*. 1. Vydání. Praha, SNTL, s. 116-189, 287-298.
38. VAN PELT C. K., CARPENTER B. K., BRENNAN J. T., 1991. Studies of structure and mechanism in acetonitrile chemical ionization tandem Mass Spectrometry of polyunsaturated fatty acid methylesters. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10: 1253-1262.
39. MICHAUD A. L., DIAU G. Y., ABRIL R., BRENNAN J. T., 2002. Double bond localization in minor homoallylic fatty acid methylesters using acetonitrile chemical ionization tandem Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 307: 348-360.
40. KNOTEK, J., 2009. *Mléčný tuk*. [Bakalářská práce]. Zlín, Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, Ústav potravinářského inženýrství, 41s

41. HENDL, J., 2006. *Přehled statistických metod zpracování dat: Analýza a metaanalýza*. 2. Vydání. Praha, Portál, s.r.o., s. 421-473.