

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Disertační práce

Zastoupení biologicky účinných mastných kyselin v lipidech
vybraných druhů sladkovodních ryb

Mgr. Daniela Chvalová

Školitel: doc. Ing. Jiří Špička, CSc.

České Budějovice

2016

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Jiřímu Špičkovi, CSc., za odborné vedení, pomoc a trpělivost během celého doktorského studia.

Děkuji také prof. Ing. Pavlu Kalačovi, CSc. za podporu a cenné rady při přípravě rukopisu a Ing. Miloslavě Beránkové a Ing. Tamaře Pelikánové za ochotu a pomoc při práci v laboratoři.

Poděkování patří také všem pracovníkům katedry aplikované chemie za vytvoření příjemné a přátelské atmosféry na pracovišti.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

V Českých Budějovicích, dne 27.6.2016

.....

OBSAH

SOUHRN

SUMMARY

1. ÚVOD.....	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
2.1 OBECNÉ POJMY.....	10
2.1.1 Lipidy.....	10
2.1.2 Mastné kyseliny.....	12
2.1.3 Biologicky účinné mastné kyseliny a jejich význam v lidské výživě.....	12
2.2 ZASTOUPENÍ MASTNÝCH KYSELIN V LIPIDECH RYB.....	16
2.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ZASTOUPENÍ MASTNÝCH KYSELIN.....	21
2.4 METODY ANALÝZY LIPIDŮ.....	23
2.4.1 Extrakce lipidů.....	23
2.4.2 Separace jednotlivých lipidových frakcí.....	24
2.4.3 Analýza mastných kyselin.....	26
2.4.3.1 Derivatizace.....	26
2.4.3.2 Analýza plynovou chromatografií.....	27
2.4.3.3 Analýza kapalinovou chromatografií.....	31
2.4.3.4 Určení struktury molekuly.....	34
2.4.4 Analýza lipidů kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí.....	35
2.5. FURANOVÉ MASTNÉ KYSELINY.....	39
2.5.1 Struktura.....	39
2.5.2 Výskyt.....	39
2.5.3 Biosyntéza.....	40
2.5.4 Pozitivní biologické účinky.....	40
2.5.5 Analýza.....	41
3. CÍLE PRÁCE.....	44
4. MATERIÁL A METODY.....	45
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	45
4.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	45
4.3 VÝVOJ METODIKY.....	46
4.3.1 Extrakce celkových lipidů.....	46
4.3.2 Volba vnitřního standardu.....	47

4.3.3 Optimalizace chromatografie na tenké vrstvě.....	47
4.3.4 Finální postup separace celkových lipidů na tenké vrstvě.....	49
4.4 ANALÝZA MASTNÝCH KYSELIN.....	50
4.4.1 Příprava methylesterů mastných kyselin.....	50
4.4.2 Analýza methylesterů mastných kyselin na plynovém chromatografu.....	50
4.5 STABILITA	52
4.6 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	52
5. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	53
5.1 VÝVOJ METODIKY.....	53
5.1.1 Vliv extrakčního činidla na celkové lipidy.....	53
5.1.2 Vliv extrakčního činidla na lipidové frakce.....	54
5.1.3 Extrakce celkových lipidů petroletherem.....	56
5.1.4 Identifikace furanových mastných kyselin.....	59
5.2 SVALOVINA KAPRA OBECNÉHO.....	63
5.3 JIKRY KAPRA OBECNÉHO.....	67
5.4 MLÍČÍ KAPRA OBECNÉHO.....	71
6. ZÁVĚR.....	76
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	79
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	98
9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ.....	100
PŘÍLOHY	

SOUHRN

Předložená disertační práce se zabývá mastnými kyselinami ve svalovině, jikrách a mlíčí kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). Studuje jejich distribuci do lipidových frakcí celkových lipidů a věnuje se také identifikaci méně běžných furanových mastných kyselin.

Celkové lipidy byly z jednotlivých tkání extrahovány směsí chloroform – methanol, poté rozděleny na jednotlivé lipidové frakce chromatografií na tenké vrstvě a v každé frakci byl stanoven profil mastných kyselin pomocí plynové chromatografie. Pro identifikaci analytů byl použit hmotnostní detektor s elektronovou i chemickou ionizací, kvantitativní stanovení bylo provedeno pomocí plamenově ionizačního detektoru.

V celkových lipidech studovaných vzorků byly nalezeny čtyři lipidové frakce: polární lipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny (pouze u jiker a mlíčí) a triacylglyceroly. Zastoupení těchto frakcí se lišilo podle typu studované tkáně. Ve svalovině převažovaly nepolární triacylglyceroly (97 %), v jikrách a mlíčí dominovaly polární lipidy (59 a 68 %), následované triacylglyceroly (39 a 25 %). Diacylglyceroly a volné mastné kyseliny tvořily frakce minoritní.

V lipidových frakcích bylo stanoveno více než 40 mastných kyselin. V polárních lipidech všech studovaných tkání převažovaly polynenasycené mastné kyseliny (52 – 56 % celkových mastných kyselin). Mononenasycené mastné kyseliny byly nejvíce zastoupené v triacylglycerolech svaloviny a jiker (52 a 48 %), v triacylglycerolech mlíčí byly majoritní skupinou furanové mastné kyseliny (38 %).

V mlíčí bylo identifikováno celkem osm furanových mastných kyselin, z nichž nejvíce zastoupenou byla DiMe(11,5) (24,4 %), minoritní kyselina DiMe(11,4) (0,23 %) byla v mlíčí ryb popsána poprvé. Vedle triacylglycerolové frakce bylo významné množství těchto kyselin detekováno i v diacylglycerolech (9 %). Ve svalovině a jikrách se nacházely pouze jejich stopy (do 0,1 %).

Rozdíly mezi lipidovými frakcemi z hlediska zastoupení jednotlivých mastných kyselin byly vyhodnoceny metodou analýzy hlavních komponent. Polární lipidy svaloviny, jiker i mlíčí spolu korelovaly a charakteristická pro ně byla přítomnost polynenasycených mastných kyselin s delším řetězcem, především 20:4n-6 a 22:6n-3. Jistá podobnost byla nalezena i mezi triacylglyceroly svaloviny a jiker s charakteristickými mastnými kyselinami 16:1n-7, 18:1n-7, 18:1n-9 a 18:2n-6. Triacylglyceroly mlíčí se významně odlišovaly především vysokým zastoupením furanových mastných kyselin.

Klíčová slova: kapr obecný, svalovina, jikry, mlíčí, lipidy, lipidové frakce, mastné kyseliny, furanové mastné kyseliny, GC, MS

SUMMARY

Presented thesis is focused on fatty acids in muscle, roe and milt of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Their distribution in lipid fractions of total lipids was studied and less common furan fatty acids were also identified.

Total lipids were extracted from the tissues by the mixture of chloroform – methanol, then separated by thin layer chromatography into lipid fractions in which the fatty acids composition was determined using gas chromatography. Mass spectrometry with both, electron and chemical ionizations, was used for the identification of analytes, whereas flame ionization detector was used for their quantitation.

Four lipid fractions were found in total lipids of studied samples: polar lipids, diacylglycerols, free fatty acids (for roe and milt only) a triacylglycerols. Proportions of these fractions were dependent on the nature of tissue. Muscle lipids consisted primarily of triacylglycerols (97 %), polar lipids predominated in roe and milt (59 and 68 %, respectively), followed by triacylglycerols (39 and 25 %, respectively). Diacylglycerols and free fatty acids were minor fractions in all tissues.

More than 40 fatty acids were determined in the lipid fractions. Polyunsaturated fatty acids predominated in polar lipids of all tissues (52 – 56 % of total fatty acids). Monounsaturated fatty acids were the most abundant fatty acids in triacylglycerols of muscle and roe (52 and 48 %, respectively), whereas high proportion of furan fatty acids (38 %) was detected in triacylglycerols of milt.

Eight furan fatty acids were identified in milt tissue, including the most abundant DiMe(11,5) (24,4 %) and minor DiMe(11,4) (0,23 %) that has not been detected in fish milt yet. Besides triacylglycerols, an appreciable amount (9 %) of these acids was also detected in diacylglycerols of milt. Only traces of furan fatty acids were found in muscle and roe tissues (up to 0.1 %).

Differences between lipid fractions with respect to the fatty acid composition were analyzed by principal component analysis. Polar lipids of muscle, roe and milt were correlated and their characteristic common feature was the presence of long chain polyunsaturated fatty acids, mainly 20:4n-6 a 22:6n-3. Triacylglycerols of muscle and roe tissues were close to each other and were composed mainly of 16:1n-7, 18:1n-7, 18:1n-9 and 18:2n-6 fatty acids. On the other hand, triacylglycerols of milt differed considerably mainly because of the high proportion of furan fatty acids.

Key words: common carp, muscle, roe, milt, lipids, lipid fraction, fatty acids, furan fatty acids, GC, MS

1. ÚVOD

Lipidy představují velice heterogenní skupinu biogenních sloučenin. Obvykle se jedná o látky nepolární nebo středně polární, omezeně rozpustné ve vodných médiích a naopak dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Nejčastěji obsahují v molekule mastné kyseliny vázané na glycerol, cholesterol nebo sfingosin. Kromě mastných kyselin může být na základní skelet vázán také zbytek kyseliny fosforečné, organická báze, cukr a další složky. Pro živý organismus jsou lipidy nepostradatelné, představují zásobní formu energie, podílí se na stavbě buněčných membrán, mají funkci ochrannou a regulační, slouží jako rozpouštědlo lipofilních látek a jsou prekurzory vitaminů a hormonů.

Jako mastné kyseliny se nejčastěji označují alifatické monokarboxylové kyseliny lišící se délkou uhlíkového řetězce, stupněm nenasycenosti a polohou dvojných vazeb. V některých lipidech se však vyskytují i jejich deriváty obsahující další funkční skupiny či rozvětvený řetězec. Podle počtu dvojných vazeb se mastné kyseliny dělí na kyseliny nasycené, mononenasycené a polynenasycené, které se dále rozdělují do sérií (např. n-3 a n-6) podle polohy první dvojně vazby v řetězci počítáno od methylového konce.

Pro lidské zdraví jsou zvláště významné n-3 polynenasycené mastné kyseliny, především kyseliny eikosapentaenová a dokosahexaenová. Tyto kyseliny jsou součástí prevence chorob oběhového systému, mentálních, zraku i některých dalších (Kris-Etherton et al., 2002; Simopoulos, 2008; Saravan et al., 2010). Biosyntéza polynenasycených mastných kyselin probíhá v lidském organismu jen v omezené míře a proto je důležitý jejich příjem v potravě. Z hlediska výživy jsou doporučované především ryby mořské, ale i sladkovodní mohou být jejich důležitým zdrojem (Ackman, 2002).

Zastoupení mastných kyselin v lipidech ryb je ovlivněno řadou faktorů, které jsou vzájemně provázané (Kalač et al., 2006). Mezi nejčastěji zmiňované patří podmínky chovu, výživa, roční období, druh ryby, její pohlaví a stáří. Složení lipidů a jejich mastných kyselin se liší také v různých typech tkání. U tkání tučných převládají triacylglyceroly, které mají funkci zásobních lipidů a je pro ně charakteristický vysoký podíl mononenasycených mastných kyselin. Zastoupení mastných kyselin v těchto lipidech lze významně ovlivnit výživou. V polárních lipidech naopak převládají polynenasycené mastné kyseliny. Polární lipidy se podílejí na stavbě biologických membrán a jsou hojně zastoupeny např. v gonádách.

V lipidech ryb, ale i jiných živočichů a rostlin, mohou hrát významnou roli také minoritní složky. K těm zajímavým patří furanové mastné kyseliny. Tyto méně běžné mastné kyseliny jsou v živých organismech poměrně rozšířené, jejich funkce však dosud nebyla zcela objasněna. Vzhledem k jejich antioxidačním vlastnostem mohou významně působit v tkáních bohatých na polynenasycené mastné kyseliny (např. mlíčí ryb) a chránit je před oxidací (souhrnně Spiteller, 2005).

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 OBECNÉ POJMY

2.1.1 Lipidy

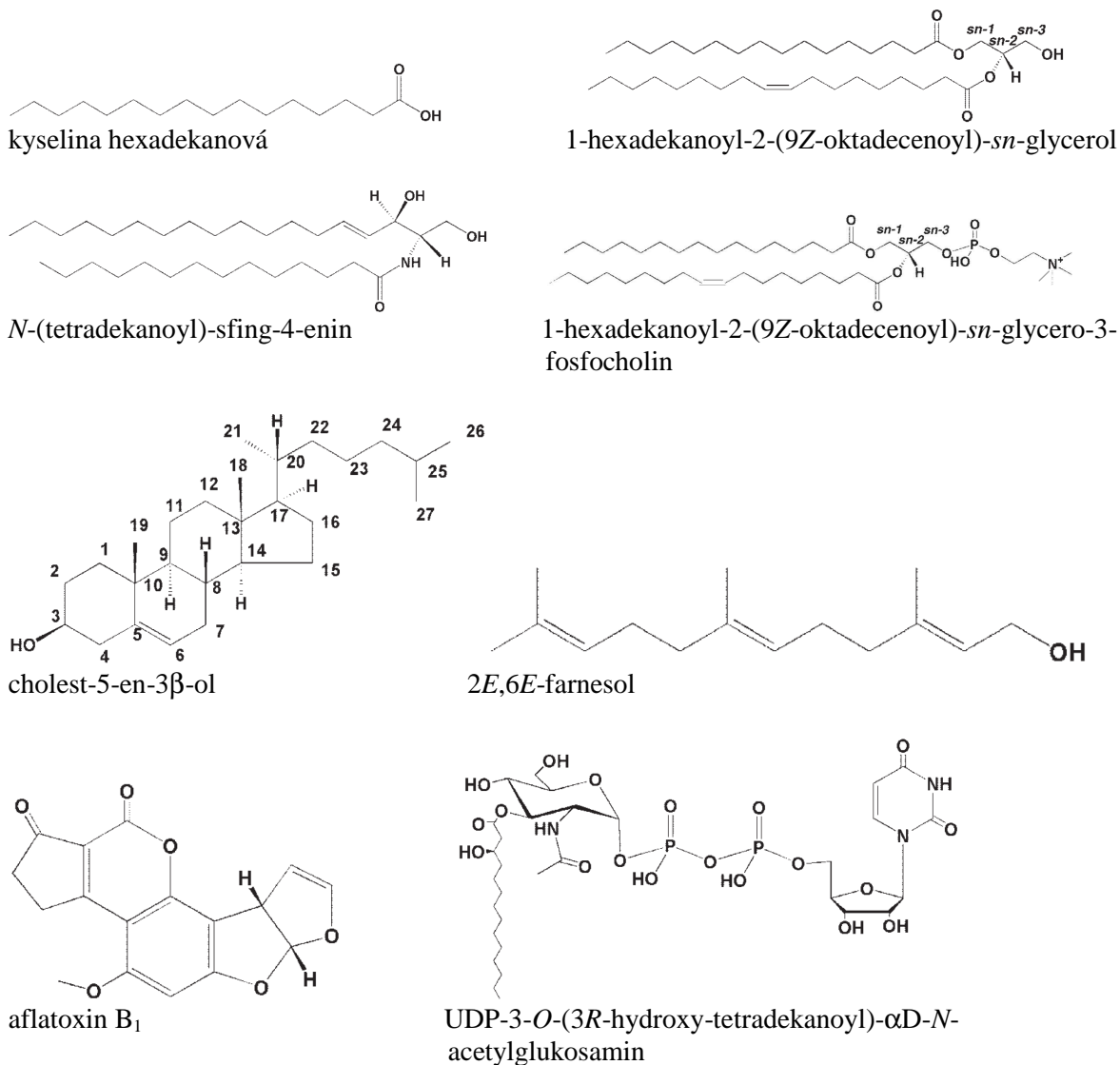
Lipidy představují velice heterogenní skupinu biogenních sloučenin. Zpravidla jsou to látky nepolární nebo středně polární, omezeně rozpustné ve vodných médiích a naopak dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Zcela obecně lze lipidy definovat jako mastné kyseliny a jejich deriváty a látky příbuzné biosynteticky nebo funkčně k těmto sloučeninám (Christie, 1989).

Na základě fyzikálně-chemických vlastností Fahy et al. (2005) rozdělili lipidy do 8 kategorií: mastné kyseliny, glycerolipidy, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, sacharolipidy, polyketidy, sterolové lipidy a prenolové lipidy (Tab. 1, Obr. 1).

Tab. 1 Rozdělení lipidů podle Fahy et al. (2005).

Kategorie	Příklad
Mastné kyseliny	kyselina dodekanová
Glycerolipidy	1-hexadekanoyl-2-(9Z-oktadecenoyl)- <i>sn</i> -glycerol
Glycerofosfolipidy	1-hexadekanoyl-2-(9Z-oktadecenoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
Sfingolipidy	<i>N</i> -(tetradekanoyl)-sfing-4-enin
Sterolové lipidy	cholest-5-en-3 β -ol
Prenolové lipidy	2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -farnesol
Sacharolipidy	UDP-3- <i>O</i> -(3 <i>R</i> -hydroxy-tetradekanoyl)- α D- <i>N</i> -acetylglukosamin
Polyketidy	aflatoxin B ₁

Nejběžnější kategorie lipidů obsahují v molekule mastné kyseliny vázané esterovou vazbou na glycerol nebo jiný alkohol (cholesterol) nebo amidovou vazbou na aminoalkohol (sfingosin), případně na jiné aminy. Kromě mastných kyselin může být na základní skelet vázán také zbytek kyseliny fosforečné, organická báze, cukr a mnoho dalších složek. Lipidy, které při hydrolýze uvolní nejvýše dvě složky se nazývají jednoduché (např. mastné kyseliny, steroly, acylglyceroly), lipidy, které uvolní tři a více složek se nazývají komplexní (např. fosfolipidy, glykolipidy).



Obr. 1 Struktury zástupců jednotlivých kategorií lipidů podle Fahy et al. (2005).

Lipidy představují zásobní formu energie živočišných organismů a mnohých rostlinných semen. Dále mají v organismu funkci strukturní (jsou součástí buněčných membrán), ochrannou (tepelně a mechanicky izolující tuková tkáň) a regulační (steroidní hormony, eikosanoidy, vitaminy A, D, E a K aj.). Slouží také jako rozpouštědlo a nosič lipofilních látek (např. vitaminů, xenobiotik), jako prekursory vitaminů a hormonů.

2.1.2 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou alifatické monokarboxylové kyseliny lišící se délkou uhlíkového řetězce, stupněm nenasycenosti a polohou dvojných vazeb. MK rostlin, živočichů a mikroorganismů obsahují převážně sudý počet uhlíkových atomů vázaných v přímém (nerozvětveném) řetězci s *cis* uspořádáním na dvojných vazbách. Běžné MK v živočišných tkáních mají 14 – 22 uhlíkových atomů (mohou se však vyskytovat MK s 2 – 36 uhlíkovými atomy) a 0 – 6 dvojných vazeb.

MK se dělí na nasycené (SFA) neobsahující žádnou dvojnou vazbu, mononenasycené (MUFA) s jednou dvojnou vazbou a polynenasycené (PUFA) s dvěma a více dvojnými vazbami. PUFA se dále dělí do sérií, např. n-3 a n-6, podle polohy první dvojně vazby. Ta je lokalizována buď na 3. nebo 6. uhlíkovém atomu počítáno od methylového konce molekuly

Některé živočišné tkáně syntetizují také hydroxy MK (složky sfingolipidů), pokud jsou přítomny MK s jinými funkčními skupinami, obvykle pocházejí z potravinového řetězce. Naopak u rostlin a mikroorganismů jsou zastoupeny MK obsahující ve své struktuře hydroxy, epoxy, keto a etherovou skupinu nebo tříčlenný a pětičlenný cyklus. U živočichů byla také nalezena menší množství MK s lichým počtem uhlíků, které jsou běžné u mikroorganismů. MK s rozvětveným řetězcem jsou v přírodě rozšířené spíše jako minoritní složky (u přežvýkavců). MUFA s *trans* konfigurací dvojně vazby se v přírodě také nacházejí, např. kyselina vakcenová v batoru přežvýkavců (Christie, 1989).

Dvě PUFA jsou pro živočichy (a tedy i člověka) esenciální – kyselina linolová a kyselina linolenová. Linolová kyselina (LA, 18:2n-6), slouží jako prekursor pro sérii MK n-6. Z nich je zvláště významná kyselina arachidonová (AA, 20:4n-6) jako základní složka membránových fosfolipidů a prekursor eikosanoidů. Kyselina α -linolenová (ALA, 18:3n-3) je prekursor série MK n-3. Vzhledem k vysokému stupni nenasycenosti jsou tyto sloučeniny náchylné k oxidativní degradaci nebo autooxidaci (Ruiz-Rodriguez et al., 2010)

2.1.3 Biologicky účinné mastné kyseliny a jejich význam v lidské výživě

Mezi biologicky aktivní mastné kyseliny patří PUFA n-3 série, především kyseliny eikosapentaenová (EPA, 20:5n-3) a dokosahexaenová (DHA, 22:6n-3). Řada studií potvrzuje jejich pozitivní účinek na lidské zdraví člověka. Prokázáno je jejich preventivní působení u nemocí oběhového systému (na rozdíl od SFA a PUFA n-6 série). Přitom se uplatňují různé mechanismy, které byly podrobně studovány (Narayan et al., 2006; Sidhu et al., 2003; Wang et al., 2006; Harris et al., 2008). EPA a DHA snižují krevní tlak, mají

antiarytmický (Leaf et al., 2003), antitrombotický a protizánětlivý účinek. Dále snižují hladinu cholesterolu, VLDL (lipoproteinu s velmi nízkou hustotou), LDL (lipoproteinu s nízkou hustotou), triglyceridů a mírně zvyšují hladinu HDL (lipoproteinu s vysokou hustotou) v krevní plasmě. Působí tak proti rozvoji aterosklerózy. DHA je důležitou součástí membránových fosfolipidů v mozku a oční sítnici a její dostatečné množství má velký význam pro správný vývoj mozku a zraku. EPA i DHA mají také význam při léčení psychických poruch, zvláště deprese, schizofrenie a demence. U pacientů trpících depresemi byla nalezena snížená hladina n-3 PUFA ve fosfolipidech krevního séra (Adams et al., 1996). Další práce se zabývají otázkou, jak n-3 PUFA působí při léčení jiných závažných chorob, např. astmatu, Alzheimerovy choroby, roztroušené sklerózy a rakoviny (Gogus et al., 2010; Terry et al., 2002). Zvýšený příjem EPA a DHA může mít i nežádoucí vedlejší účinky. Například vzhledem k snadné oxidovatelnosti PUFA se bez přítomnosti antioxidantu mohou v organismu hromadit nežádoucí peroxidy a aldehydy, pozitivní účinky n-3 PUFA však převládají (Kris-Etherton et al., 2002; Narayan et al., 2006; Sahena et al., 2009).

Prekursorem pro biosyntézu EPA a DHA je kyselina α -linolenová, která je esenciální a člověk ji přijímá v potravě. Je přítomna v listové zelenině jako složka lipidů chloroplastů, z rostlinných olejů je nejbohatší lněný. Její přeměna na EPA a dále DHA je v lidském organismu nedostatečná. Uvádí se, že pouze 8 % ALA je transformováno na EPA a méně než 0,1 % na DHA u dospělých (Williams et al., 2006). Přitom minimální doporučená denní dávka pro ALA je 0,3 – 0,4 g, pro EPA 0,1 – 0,2 g a pro DHA 0,3 – 0,4 g (Steffens, 2007). Je tedy žádoucí doplňovat tyto kyseliny z potravy, především konzumací rybích produktů. Významem rybích olejů ve výživě člověka se podrobně zabývá Sargent (Sargent 1997), na sladkovodní ryby se zaměřuje (Steffens 1997).

Za velmi významný ukazatel kvality ryb z hlediska lidské výživy je pokládán poměr PUFA sérií n-3 a n-6. Jeho optimální hodnota je předmětem diskuzí, obvykle se uvádí poměr 4:1, záleží však na konkrétní studované chorobě (Sargent, 1997; Sinopoulos, 2002). PUFA n-6 série nemají tak významně příznivé účinky na lidské zdraví jako PUFA n-3 série, naopak působí vasokonstrikčně, zvyšují agregaci krevních destiček a mají prozánětlivé účinky.

Mnoho studií poukazuje na nevyváženost lidské výživy, která obsahuje značné množství LA z rostlinných olejů a málo ALA, EPA a DHA. Vzhledem k tomu, že biosyntéza kyseliny arachidonové z LA a biosyntéza EPA z ALA sdílí stejný enzym, má nadbytek LA v krevní plasmě za následek potlačení biokonverze ALA na EPA a DHA.

Relativní nadbytek AA pak vede k nadprodukcí eikosanoidů (Sargent, 1997). Tyto aktivní metabolity kyseliny arachidonové, k nimž se řadí prostaglandiny, prostacykliny, thromboxany, leukotrieny a lipoxiny, vykazují řadu farmakologických a fyziologických účinků. Jsou produkovány příslušnými buňkami ve velmi nízkých koncentracích, mají krátkou dobu života a působí lokálně jako hormony (Van Dias et al., 1995) Jsou nezbytné pro řádný průběh mnoha fyziologických pochodů, jejich nadměrná tvorba je však nežádoucí. PUFA n-3 série (zvláště EPA a DHA) mohou kompetitivní inhibicí enzymového systému potlačovat jejich nadprodukcí a působit tak preventivně v řadě zdravotních problémů (Steffens, 1997).

Pro zvýšení denního příjmu n-3 PUFA jsou na trhu nabízeny výživové doplňky s upraveným rybím olejem ve formě kapslí. Vzrůstá také nabídka běžných potravin (pečivo, vejce, mléčné výrobky) obohacených rybím olejem. Tyto výrobky však musí být, vzhledem k citlivosti PUFA vůči oxidaci, skladovány za omezeného přístupu vzduchu (Kolanowski et al., 2006).

Konzumace ryb a rybích výrobků je významná nejen jako zdroj n-3 PUFA, proteiny ryb mají také vysokou nutriční hodnotu a ryby jsou důležitým zdrojem minerálů a vitamínů. Řada autorů však v této souvislosti upozorňuje na případná rizika vyplývající ze znečištění vodního prostředí. Některé druhy ryb mohou obsahovat i značné hladiny methylrtuti, polychlorovaných bifenyly, dioxinů a dalších kontaminantů. Tyto látky se biokonzentrují ve vodním potravním řetězci a jejich koncentrace vzrůstají především v rybách starších, větších, dravých a v mořských savcích (Kris-Etherton et al., 2002; Sidhu et al., 2003). Vyšší obsah polychlorovaných bifenyly, polybromovaných difenyletherů a organochlorovaných pesticidů byl nalezen u lososa pocházejícího z chovu na rozdíl od volně žijícího. I když koncentrace nepřekročily limity stanovené pro bezpečnou konzumaci (Easton et al., 2002), nedoporučuje se vysoký příjem, zvláště u dětí (Jacobs et al., 2002). Výhody a rizika konzumace ryb z hlediska přítomných chemických kontaminantů přehledně zpracovává Domingo (2007a,b).

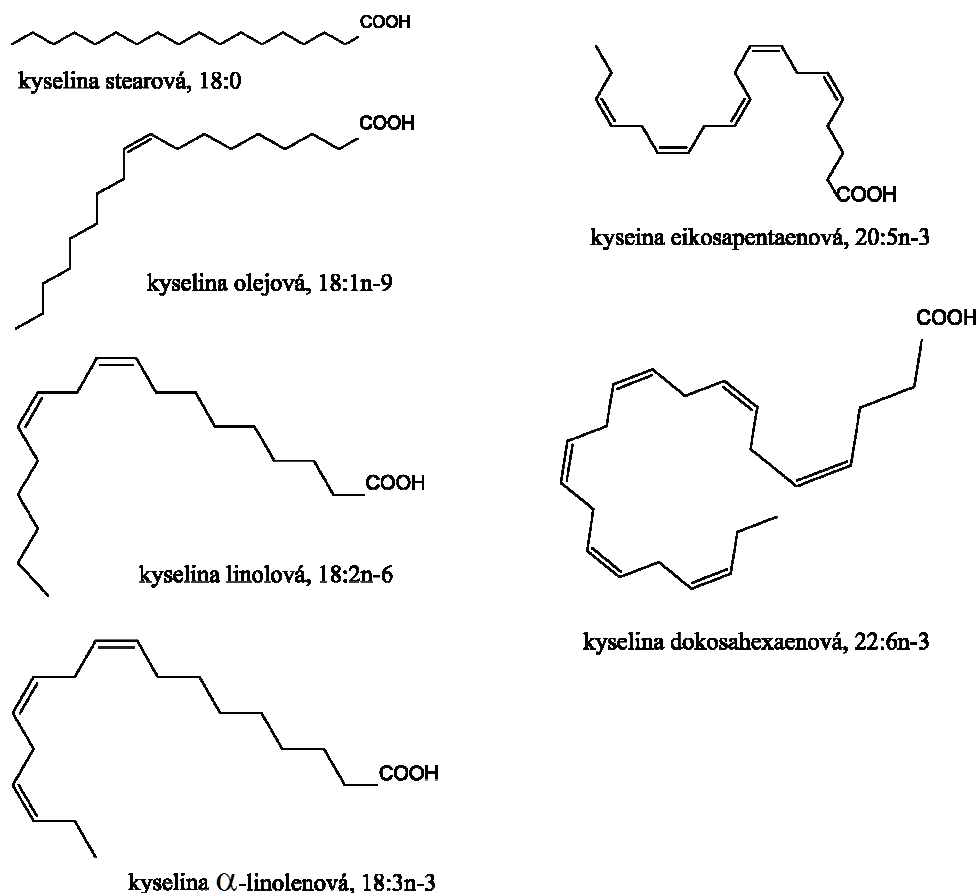
Pozitivní biologický účinek je připisován také furanovým mastným kyselinám (kapitola 2.5). Tyto kyseliny mají schopnost zhaset volné radikály a tak podporují kardioprotektivní účinky rybích olejů. V rybách jsou přítomny pouze v nízkých hladinách, vázány především v triacylglycerolech a jako estery s cholesterolem. Předpokládá se, že rostliny, řasy a mikroorganismy jsou hlavním zdrojem těchto kyselin u živočichů a ryb (Spiteller, 2005).

Mastné kyseliny s *trans* konfigurací na dvojně vazbě se u ryb vyskytují v mnohem menší míře a údaje o jejich obsahu nejsou v literatuře časté (Kalač et al., 2006). Vznikají však při smažení (některé *cis* MK obsažené v olejích přecházejí na *trans* izomery), částečnou hydrogenací rostlinných olejů a jsou přidávány do potravin jako aditiva pro zvýšení jejich trvanlivosti. Zvyšují hladinu LDL v krevní plasmě a tím i riziko kardiovaskulárních chorob a pravděpodobně i diabetu (Ascherio et al., 1997; Mozaffarian et al., 2006). Výjimkou mezi *trans* MK je konjugovaná kyselina linolová (CLA). Jedná se o směs několika geometrických izomerů, z nichž nejvíce zastoupeny bývají *cis*-9, *trans*-11 a *trans*-10, *cis*-12. Tyto látky mají pozitivní účinky na lidské zdraví, vykazují celou řadu biologických aktivit, od aktivity antikarcinogenní až po vliv na snížení hmotnosti (Christie et al., 2007; Park, 2009). Jejich výskyt je charakteristický pro tuky přežvýkavců, u nichž dochází k izomerizaci části *cis* kyselin přijímaných v píci působením bachorové mikroflóry (Kalač et al., 2006).

2.2 ZASTOUPENÍ MASTNÝCH KYSELIN V LIPIDECH RYB

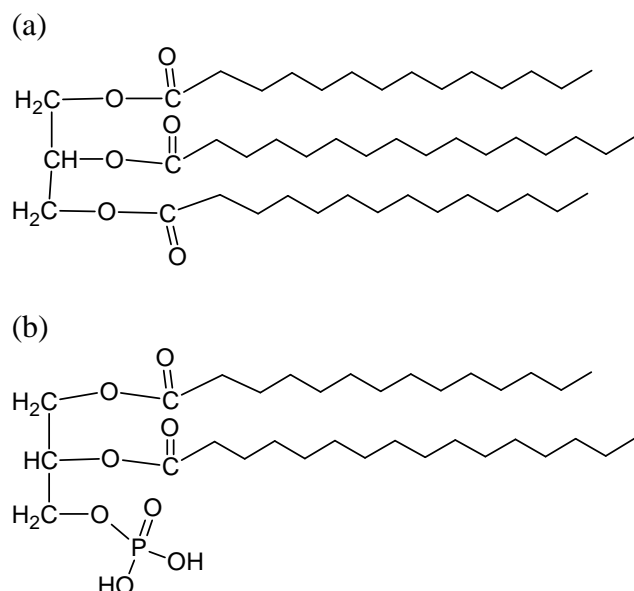
Mastné kyseliny mají v rybách tři základní úlohy – působí jako zdroj energie, jsou stavebními složkami membrán a prekursory eikosanoidů (McKenzie, 2001). Téma metabolismu a funkce lipidů v rybách podrobně zpracoval Tocher (2003) ve svém literárním přehledu. Popisuje biochemické pochody především u mořských ryb, ale zmiňuje i ryby sladkovodní.

Hlavní nasycené mastné kyseliny vázané v lipidech ryb jsou kyseliny palmitová (16:0) a stearová (18:0). Z mononenasycených MK převažuje ve většině lipidů olejová (18:1n-9) a palmitolejová (16:1n-7), sfingolipidy jsou bohaté na kyselinu nervonovou (24:1n-9). V mnoha druzích jsou zastoupeny také kyseliny gadolejová (20:1n-9) a cetolejová (22:1n-11). Hlavními PUFA v rybách jsou kyseliny arachidonová (20:4n-6), její prekursor kyselina linolová (18:2n-6), kyseliny EPA (20:5n-3), DHA (22:6n-3) a jejich prekursor kyselina α -linolenová (18:3n-3). Chemické struktury některých MK jsou znázorněny na Obr. 2.

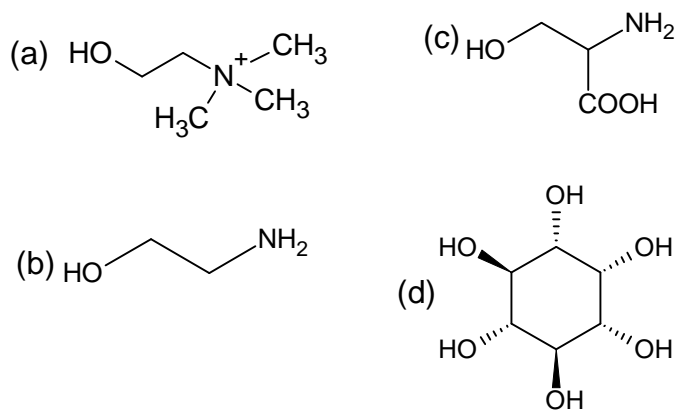


Obr. 2 Chemické struktury některých mastných kyselin identifikovaných u ryb.

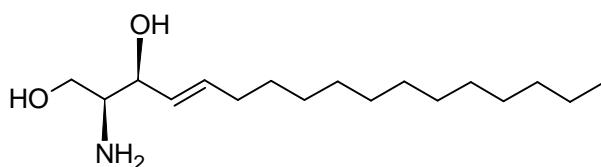
V molekulách triacylglycerolů (Obr. 3a) jsou nasycená a mononenasyčená MK vázány v polohách *sn1* a *sn3* glycerolu, zatímco polynenasycená MK se přednostně váže do polohy *sn2*. V molekulách fosfoglyceridů se na fosfatidovou kyselinu (Obr. 3b) váže do polohy *sn1* nasycená nebo mononenasyčená MK, polynenasycená MK se váže preferenčně do polohy *sn2*. Fosfatidová kyselina je pak vázána na cholin (Obr. 4a), ethanolamin (Obr. 4b), serin (Obr. 4c) nebo inositol (Obr. 4d) a tvoří tak hlavní fosfoglyceridy živočichů – fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin a fosfatidylinositol. Ve sfingolipidech je na aminoskupinu sfingosinu (Obr. 5) často vázána kyselina nervonová (24:1n-9). Nejdůležitější živočišný sterol, cholesterol, je v rybách také přítomný, a to buď jako složka buněčných membrán anebo vázaný esterovou vazbou na MK.



Obr. 3 Chemická struktura (a) triacylglycerolu, (b) fosfatidové kyseliny.



Obr. 4 Dusíkaté složky fosfolipidů (a) cholin, (b) ethanolamin, (c) serin, (d) inositol.



Obr. 5 Sfingosin.

Podle místa uložení tukových zásob lze rozlišit dva typy mořských ryb. Ryby tučné (např. sledě, makrely, kapelíni, sardinky, ančovičky) své zásoby hromadí především ve svalovině a ryby netučné (např. tresky) hromadí své zásoby v játrech. Složení lipidů na místě jejich uložení nezávisí a v obou případech jsou rybí oleje bohatým zdrojem DHA a EPA. Složení lipidů ryb je však výrazně ovlivněno složením mořského fyto- a zooplanktonu. Rozsivky obsahují především 20:5n-3, ale pouze malé množství 22:6n-3, bičíkovci naopak velké množství 22:6n-3 a také 18:4n-3 a 18:5n-3. Složení fytoplanktonu se také mění v závislosti na lokalitě a ročním období. Mořský zooplankton pak MK z fytoplanktonu zabudovává do fosfolipidů buněčných membrán nebo je ukládá ve formě triacylglycerolů nebo vosků jako své tukové zásoby. Mořský zooplankton může navíc produkovat další MK, např. kyselinu gadolejovou a cetolejovou (Sargent, 1997).

Předpokládá se, že prakticky všechny lipidy mořských ryb pocházejí ze zkonsumovaného fyto- a zooplanktonu. Tyto ryby nejsou schopny přeměňovat osmnáctiuhlíkové PUFA na jejich homology s 20 a 22 uhlíky, jejich výživa musí být bohatá na MK n-3 série. Lipogeneze je u nich omezená, probíhají pouze přeměny přijatých

MK, prodlužování a desaturace uhlíkového řetězce. Situace je odlišná u ryb sladkovodních. Přirozená potrava bohatá na lipidy je daleko méně běžná než v mořích a lipogeneze je u těchto ryb velmi významná. Četné sladkovodní ryby snadno přeměňují osmnáctiuhlíkové PUFA na PUFA s 20 a 22 uhlíky. U dravých ryb tomu však být nemusí, např. štika obecná zřejmě potřebuje přijímat kyselinu arachidonovou a EPA v potravě (Sargent, 1997; Kalač et al., 2005; Morais et al., 2009).

Problematiku mastných kyselin u sladkovodních ryb podrobně zpracovávají Kalač et al. (2006). Publikace se zabývá složením lipidů sladkovodních ryb, jejich významem v lidské výživě a pro zdraví člověka. Dále popisuje jaké je zastoupení MK v různých částech ryb (svalovina, tělní tuky, jikry a mlíčí) a jak je ovlivněno různými faktory (výživa ryb, teplota, roční období, aj.). Součástí publikace je řada přehledných tabulek srovnávajících obsah lipidů a MK v mnoha druzích sladkovodních ryb včetně odkazů na původní práce. U ryb sladkovodních jsou nejvíce zastoupeny kyseliny olejová, palmitová, palmitolejová, linolová, EPA a DHA. Výživově sledovaný poměr n-3/n-6 PUFA se u sladkovodních ryb pohybuje v rozmezí 0,5 – 4, zatímco u ryb mořských je příznivější a činí obvykle 5 – 10. U sladkovodních ryb je vysoký podíl n-6 kyselin, zejména kyseliny linolové. Zde se projevuje přirozená potrava ryb, sladkovodní řasy, korýši a larvy hmyzu mají obecně značné zastoupení kyseliny linolové.

Mezi sladkovodními druhy ryb můžeme rozlišit druhy velmi tučné (nad 10 % tuku), např. úhoř říční, tolstolobik bílý nebo tolstolobec pestrý, dále středně tučné (2 – 10 % tuku), např. kapr obecný, pstruh duhový, lín obecný a málo tučné (do 2 % tuku), např. candát obecný nebo okoun říční (Zajíc et al., 2011). Množství tuku v rámci jednotlivých druhů ovlivňuje složení mastných kyselin. Při vysokém obsahu tuku je jeho podstatná část uložena ve formě zásobních lipidů (triacylglycerolů), které zpravidla obsahují vyšší procentický podíl MUFA (např. kyselina olejová) a podíl PUFA je relativně nižší. U málo tučných ryb je hladina zásobního tuku nižší a tělní tuk je uložen ve formě stavebních lipidů (fosfolipidů). Ty obvykle obsahují MK s delším uhlíkatým řetězcem a větším počtem dvojných vazeb (EPA, DHA) než MK uložené ve formě triacylglycerolů.

V literatuře lze nalézt i údaje o obsahu lipidů a o zastoupení mastných kyselin v lipidech jiker a mlíčí. Kmínková et al. (2001) uvádějí obsah celkových lipidů v jikrách kapra obecného 0,4 – 1,1 % hmotn., přičemž nejnižší hodnoty byly zjištěny v zimě a nejvyšší na podzim. Nejvíce zastoupeny byly kyselina olejová, palmitová, DHA, palmitolejová a stearová. Podíl DHA a EPA však výrazně klesl během podzimu. Podstatně vyšší obsah celkových lipidů (6,3 %) byl stanoven v jikrách kapra obecného v Australii

(De Silva et al., 2001). Poměr n-3/n-6 PUFA se v obou pracích ohyboval v rozmezí 1,0 – 2,0. Obsah lipidů v mlíči kapra obecného byl vyšší než v jikrách a v průběhu roku kolísal mezi 0,5 % v zimě a 3,1 % v létě. Pořadí MK bylo podobné jako u jiker. Poměr n-3/n-6 PUFA kolísal ještě ve větší míře než u jiker, od 0,92 na podzim po 2,41 na jaře (Kmínková et al., 2011). Czesny et al. (2000) zjistili, že profil MK v jikrách dvou druhů jeseterů může sloužit jako ukazatel pro rozlišení volně žijících a chovaných populací jako zdrojů kaviáru. Kyselina stearová byla zastoupena v tucích jiker volně žijících ryb ve statisticky významně menším množství než u ryb z akvakultury, zatímco u kyseliny olejové tomu bylo opačně.

2.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ZASTOUPENÍ MASTNÝCH KYSELIN

Mezidruhové i vnitrodruhové kolísání v zastoupení mastných kyselin v lipidech ryb je způsobeno četnými faktory, které jsou vzájemně provázané. Mezi nejvýznamnější vnější faktory patří typ vodního prostředí, podmínky chovu, výživa, roční období, způsob zpracování a kuchyňská úprava, hlavními vnitřními faktory jsou druh, pohlaví, věk ryby a typ tkáně.

Jak již bylo naznačeno výše, potrava ryb je hlavních faktor určující zastoupení mastných kyselin v jejich lipidech (Sargent, 1995). Toto zjištění má velký význam pro rozvoj akvakultury, vzhledem k tomu, že v současné době téměř polovina konzumovaných ryb pochází z rybích farem. Řada publikovaných prací se zabývá výživou ryb a jejím optimálním složením z hlediska výživové hodnoty pro člověka. Je ověřováno mnoho alternativních zdrojů MK, které by nahradily tradiční oleje mořských ryb, jejichž zásoby jsou omezené. Výzkumy však ukazují významný pokles obsahu EPA a DHA u ryb krměných rostlinnými oleji, zatímco obsah ALA a LA odpovídá množství těchto kyselin v krmivu. Tento vliv je méně výrazný u ryb netučných, kde většina svaloviny je tvořena fosfolipidy, které jsou stabilnější a méně ovlivnitelné výživou než zásobní tuky u ryb tučných. Práce srovnávající obsah PUFA v rybách žijících volně a v zajetí potvrzují vyšší obsah n-3 vs. n-6 u ryb žijících volně. Tento poměr lze však ovlivnit výživou chovaných ryb (Young, 2009; Rodriguez et al., 2004). Zatím nejnadějnější se jeví používání rostlinných olejů, doplněné v závěru krmného režimu o oleje rybí (Picková et al., 2007). Tento způsob výživy vedl ke zvýšení obsahu n-3 MK např. u kapra a lína (Steffens, 2007). Originální receptura krmné směsi pro kapra obecného umožnila vypracování technologie chovu kapra se zvýšeným obsahem n-3 MK (Mráz et al., 2012).

Profil mastných kyselin se mění v závislosti na ročním období a teplotě prostředí. Obecně platí, že druhy ryb, které žijí v chladné vodě (pstruh duhový), mají v přirozených podmínkách vyšší zastoupení MK s dlouhým uhlíkovým řetězcem než druhy ryb žijící v teplé vodě (karp obecný). To je dáno samotnou podstatou fungování MK v buněčných membránách. Při nízké teplotě v nich převažují MK, které mají delší řetězec a větší počet násobných vazeb a ovlivňují tak tekutost membrány. Jejich bod tuhnutí je podstatně nižší než MK s kratším řetězcem (Zajíc et al., 2011). V mírném klimatickém pásu se během roku mění teplota prostředí a s ní související potravní nabídka. Nejvíce tuků u kapra bývá koncem léta a na začátku podzimu. Během zimy tukové zásoby klesají a na jaře jsou na nejnižší úrovni. Obsah lipidů ve svalovině kapra obecného se pohyboval mezi 5,9 až 5,0 %

od léta do zimy, na jaře byl jen 2,01 %. Změny byly zjištěny i u jednotlivých skupin MK (Kmínková et al., 2001). U lipana sibiřského během reprodukčního období obsah PUFA ve svalovině klesl, v jikrách byl 3 – 4 krát větší (Sushchik et al., 2007). Podobný trend byl pozorován také ve svalovině candáta obecného (Guler et al., 2007).

Složení mastných kyselin může být odlišné v různých částech ryby (Mráz et al., 2009). Nejnižší obsah tuku byl zjištěn v bílé svalovině (0,95 %), dále v červené svalovině (16,7 %) a nejvíce v břišní části těla (až 30 %) kapra obecného. Svalovina obsahovala více n-3 PUFA, poměr n-3/n-6 byl 1,1 u fosfolipidů, v břišní dutině převažovaly MUFA, poměr n-3/n-6 byl pouze 0,5. Na lipidy jsou velmi bohatá játra, respektive hepatopankreas a také gonády. Jednotlivé části mohou vykazovat značné rozdíly v obsahu tuku a tedy i ve složení MK. U ryb platí, že čím větší množství tuku daná tkáň obsahuje, tím vyšší je zde zastoupení SFA a MUFA, PUFA se nacházejí hlavně v méně tučných částech těla ryb. PUFA jsou v hlavní míře obsaženy ve fosfolipidech biologických membrán, naproti tomu SFA a MUFA v triacylglycerolech zásobního tuku (Zajíc et al., 2011).

Vliv pohlaví na zastoupení mastných kyselin u kapra obecného byl také studován (Fajmonová et al., 2003; Buchtová et al., 2007), ale průkazné rozdíly zjištěny nebyly.

Kuchyňské úpravy významně ovlivňují výsledné složení mastných kyselin v konzumovaných rybách (Bhourri et al., 2010). EPA a DHA jsou po určitou dobu poměrně stabilní vůči vysokým teplotám, k mírnému poklesu n-3 PUFA dochází během smažení (Gladyshev et al., 2006; Gladyshev et al., 2007; Unusan, 2007). Kvalitu pokrmu lze významně ovlivnit přidáním jiného tuku. Změny složení MK ve filetech kapra obecného při použití různých olejů na smažení sledovala Sampels et al. (2014), z hlediska zachování nutričních hodnot se nejlépe osvědčil olej řepkový.

PUFA jsou náchylné k oxidaci. Oleje izolované z jater rejnoků byly skladovány při teplotě 25°C v dobré kvalitě 52 a 66 dní. Stabilnější byl vzorek s nižším obsahem DHA a vyšším obsahem tokoferolů (Garcia et al., 2010). U pstruha byly studovány změny v obsahu n-3 PUFA po přidání antioxidantů do krmení. Zvýšený obsah α -tokoferolu vedl k vyšší stabilitě n-3 PUFA při skladování (Chen et al., 2007). Také při úpravě (dezodorizaci) rybích olejů může docházet k degradaci termolabilních PUFA. Polymerizace, izomerizace nebo intramolekulární cyklizace vedou ke vzniku řady produktů. Mezi produkty degradace EPA a DHA převažovaly cyklohexylizomery (Bordeau et al., 2007).

2.4 METODY ANALÝZY LIPIDŮ

Lipidy představují heterogenní skupinu biogenních sloučenin zahrnující látky nepolární (acylglyceroly a steroly) i látky polárnějšího charakteru (volné mastné kyseliny, fosfolipidy a sfingolipidy), které mohou být dále vázány na cukry nebo bílkoviny. Vzhledem k velké rozmanitosti lipidových struktur (Tab. 1, Obr. 1) je obtížné nalézt jednoduchou metodu umožňující jejich současné stanovení v jediné analýze. Pracovní schéma obvykle zahrnuje několik kroků: extrakce lipidů z biologického materiálu, rozdělení lipidů do jednotlivých lipidových frakcí, derivatizace mastných kyselin a jejich chromatografické stanovení (Manirakiza et al., 2001; Ruiz-Rodriguez et al. 2010). Pro zvolení vhodné metodiky analýzy lipidů je důležité přesně vymezit cíl zkoumání a charakter požadované informace.

2.4.1 Extrakce lipidů

Rozpouštědlo pro extrakci lipidů by mělo dobře rozpouštět všechny látky lipidového charakteru a zároveň být dostatečně polární pro uvolnění lipidů z jejich vazebných míst v buněčných membránách, lipoproteinech a glykolipidech. Je obtížné předpovědět vhodnost daného rozpouštědla pro extrakci lipidů vzhledem k tomu, že např. i polární složené lipidy mohou přejít v přítomnosti nadbytku triacylglycerolů do rozpouštědla nepolárního, v němž obvykle rozpustné nejsou (Christie, 1993).

Nejčastěji se k extrakci lipidů z biologického materiálu používají vícesložkové směsi rozpouštědel. Zejména směs chloroform – methanol 2:1 (Folch et al., 1957) nebo chloroform – methanol – voda (Bligh et al., 1959). Úpravou pH extrakčního média lze ovlivnit selektivitu extrakce pro určité lipidové frakce (např. polyfosfoinositidy vázané na buněčné biopolymery iontovou vazbou). Vzhledem k toxicitě chloroformu jsou testovány a používány další rozpouštědlové směsi, např. dichlormethan – methanol (Cequier-Sánchez et al., 2008) nebo hexan – isopropylalkohol 3:2 (Hara et al., 1978; Undeland et al., 1998; Liu et al., 1999), hexan – aceton (Honezcutt et al., 1995). Výhodou použití čistých rozpouštědel (např. diethylether, chloroform, hexan, petrolether) při extrakci nepolárních lipidů z tukové tkáně nebo rostlinných olejů, je minimum nelipidových příměsí v extraktu. Při použití polárních rozpouštědel přechází do extraktu středně polární nelipidové složky, které musí být odstraněny, nejčastěji vytřepáním do zředěného vodného roztoku soli. Při odpařování rozpouštědla z lipidového extraktu by neměla být používána teplota vyšší než 40 °C (Christie, 1993).

Mezi techniky tradičně používané pro extrakci lipidů z pevného materiálu patří extrakce pomocí Soxhletova extraktoru a různé modifikace této metody (Manirakiza et al., 2001; Ruiz-Rodriguez et al., 2010). Srovnatelný výtěžek nabízejí i novější metody jako např. superkritická fluidní extrakce (Perretti et al., 2006) nebo zařízení pro automatickou hydrolýzu a extrakci (Robinson et al., 2008).

Lipidy by neměly být ponechány v suchém stavu. Extrahované lipidy je vhodné skladovat při nízké teplotě, rozpuštěné v apolárním rozpouštědle (např. hexanu) a za přítomnosti antioxidantu. PUFA jsou velmi citlivé k oxidaci, i když přirozené tkáňové antioxidanty (tokoferoly) představují jistou ochranu, je vhodné přidat např. 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-kresol v koncentraci 25 mg/l. Přítomnost velkého množství volných mastných kyselin, diacylglycerolů, fosfatidové kyseliny nebo lysofosfolipidů v lipidovém extraktu indikuje špatné skladovací podmínky vzorku, extraktu nebo nevhodné extrakční podmínky (Christie, 1993).

2.4.2 Separace jednotlivých lipidových frakcí

Extrakcí biologického materiálu se získá pestrá směs neutrálních a polárních lipidů, kterou je zpravidla nutno dále zpracovat některou ze separačních technik. Vedle tradiční chromatografie na tenké vrstvě (TLC) se uplatňuje především extrakce tuhým sorbetem (SPE) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a jejich vzájemné kombinace.

Tradiční metoda pro analýzu lipidů, chromatografie na tenké vrstvě, má řadu výhod. Je to metoda jednoduchá, instrumentálně nenáročná a komerčně dostupné desky umožňují vysokou reprodukovatelnost separací. Vzorek není třeba pro analýzu nijak zvlášť upravovat a je možné analyzovat několik vzorků současně. TLC je možné použít v analytickém i preparativním uspořádání. Silikagel je nejčastěji používanou stacionární fází, složení mobilní fáze se mění podle požadavků analýzy. Mobilní fáze používaná pro základní separaci lipidů z biologického vzorku do lipidových frakcí obsahuje hexan – diethylether – kyselinu mravenčí nebo octovou. Detekce se provádí např. parami jodu, činidly na bázi fluoresceinu nebo síranu měďnatého v roztoku kyseliny fosforité. Kvantitativní vyhodnocení se obvykle provádí denzitometricky. Lipidy je možné z jednotlivých frakcí extrahovat a podrobit další analýze. Běžná je také TLC ve vysokoúčinném uspořádání, využívající vysoce kvalitní tříděné sorbety o menší velikosti částic silikagelu (Webster et al., 2006; Cequier-Sanchez et al., 2008). Účinnost TLC separace lze zvýšit dvourozměrným uspořádáním (významné při separaci fosfolipidů) nebo jednorozměrným s opakovaným násobným vyvíjením různými systémy rozpouštědel

(Aubourg et al., 1996). Použití silikagelu impregnovaného kyselinou boritou, která tvoří komplexy s hydroxyskupinami, umožňuje např. efektivně oddělit fosfatidylserin a fosfatidylinositol od ostatních fosfolipidů. TLC na deskách impregnovaných dusičnanem stříbrným se používá k separaci mastných kyselin podle počtu, polohy a konfigurace jejich dvojných vazeb (Fournier et al., 2006; Czaplicki et al., 2009). Dvojně vazby v alkylových řetězcích MK tvoří reverzibilní polární komplexy se stříbrným iontem, retence lipidů roste s rostoucím počtem násobných vazeb.

Modernější metody frakcionace lipidů jsou založeny na extrakci tuhým sorbetem (SPE). Tato jednoduchá a rychlá metoda se používá k separaci složek vzorku podle rostoucí polariry nebo izolaci či zakoncentrování minoritních komponent. Principy této metody a příklady použití podrobně popisují Ruiz-Gutiérrez et al. (2000) v přehledném článku. I když je na trhu dostupná celá řada SPE kolonek s různými druhy sorbentů, pro separaci lipidů jsou nejčastěji používané kolonky obsahující silikagel nebo chemicky vázaný aminopropyl. Méně polární aminofáze je výhodnější z hlediska návratnosti polárních lipidů než silikagel. Publikované metody (Bondia-Pons et al., 2006; Pernet et al., 2006; Ruiz et al., 2004) obvykle vychází z práce Kaluzneho et al. (1985). SPE kolonky plněné *p*-propylbenzensulfonovou kyselinou s vázanými stříbrnými ionty představují rychlou alternativu k TLC na deskách impregnovaných dusičnanem stříbrným.

K separaci lipidů se také ve stále větší míře používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) na různých typech stacionárních fází. Normální fáze, tvořené silikagelem či vázanými polárními skupinami (diolové, kyanidové, aminofáze) se používají pro separaci jednotlivých lipidových frakcí, velmi dobře se na nich dělí fosfolipidy. Na stacionární fázi modifikované dusičnanem stříbrným je možné separovat triacylglyceroly podle stupně nenasycenosti, dokonce s rozlišením izomerů. Hlavním omezením HPLC techniky je dostupnost vhodného detektoru (Christie, 1989). Původně bylo pro detekci glycerolipidů, mastných kyselin a methylesterů využíváno UV detekce kolem 200 nm a měření indexu lomu. Detekce je však omezena výběrem vhodného rozpouštědla, vyhovují např. hexan, methanol, acetonitril, voda. Pro zvýšení UV absorpce je možné lipidy nebo jejich složky převést na vhodné deriváty. Detektor rozptylu záření měří záření rozptýlené na částicích rozpustných látek vzniklých po rozprášení a odpaření mobilní fáze. Jeho hlavní nevýhodou je však nelineární odezva a omezený dynamický rozsah (Webster et al., 2006). V oblasti analýzy lipidů má v současnosti stále větší význam spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem jako detektorem (kapitola 2.4.4).

2.4.3 Analýza mastných kyselin

Pro analýzu mastných kyselin může být použita řada analytických technik: chromatografie na tenké vrstvě, elektroforéza, plynová chromatografie (GC) či kapalinová chromatografie (LC) ve spojení s různými detektory, např. plamenově ionizačním (FID), spektrofotometrickým, hmotnostním (MS) či detektorem pracujícím na principu nukleární magnetické rezonance. Nejrozšířenější metodou pro stanovení MK v různých vzorcích pocházejících z biologického materiálu, životního prostředí nebo potravin je plynová chromatografie ve spojení s detektorem plamenově ionizačním nebo hmotnostním. Avšak vzhledem k náročnější přípravě vzorků pro GC se stále častěji uplatňují jednoduché a rychlé techniky využívající spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem (HPLC/MS) (Wei et al., 2011).

2.4.3.1 Derivatizace

Separace karboxylových sloučenin pomocí plynové chromatografie je komplikována jejich relativně vysokou polaritou a s tím souvisejícími problémy převedení do plynné fáze. Před vlastní analýzou je tedy třeba připravit nepolární deriváty mastných kyselin. Derivatizace je běžný krok používaný nejen ke zvýšení těkavosti MK, ale také detekční citlivosti, zlepšení chromatografického rozlišení a redukci chvostování píků, především pro MK s dlouhým řetězcem. Eder (1995) and Brondz (2002) podávají ve svých souhrnných člancích vyčerpávající přehled nejrůznějších přístupů k derivatizaci MK.

Nejpoužívanější metodou je transesterifikace mastných kyselin na jejich methylestery (FAME). Tvorba FAME může být provedena za kyselých nebo bazických podmínek na izolovaném lipidu nebo mastných kyselinách, ale také přímo v jedнокrokové proceduře kombinující extrakci lipidu s transesterifikací (Ruiz-Rodriguez et al., 2010; Xiao et al., 2012). Aby se zamezilo možné oxidaci polynenasycených kyselin, bývá předúprava vzorků prováděna v dusíkové atmosféře. Kyselou katalyzovanou esterifikací lze připravit methylestery jak vázaných, tak volných MK. Deriváty jsou obvykle připravovány reakcí v nadbytku bezvodého methanolu za přítomnosti katalyzátoru BF_3 , použití HCl nebo H_2SO_4 v methanolu bylo také popsáno (Antolín et al., 2008). Reakce s BF_3 se vyznačuje vysokou účinností methylace, krátkou dobou reakce, ale některé práce uvádějí, že činidlo může vést k poškození GC kolony (Brondz, 2002). Kyselou katalyzovanou esterifikací je výhodná pro analýzu vzorků, které obsahují významná množství volných mastných kyselin. Jako antioxidant se přidává 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-kresol. Bazicky katalyzovaná transesterifikace probíhá za laboratorní teploty, rychleji a s menším nebezpečím degradace

dvojných vazeb, není nutné přidávat antioxidant. Estery mastných kyselin za podmínek reakce vytvoří aniontový meziprodukt, který je transformován nadbytkem alkoholu na nový ester. Volné mastné kyseliny nejsou citlivé na nukleofilní atak alkoholu nebo báze a za podmínek bazické katalýzy esterifikovány nejsou. Mezi běžně užívaná činidla patří methanolát sodný, KOH nebo NaOH (Ruiz-Rodriguez et al., 2010).

K přímé transesterifikaci lipidů a methylaci volných mastných kyselin byly testovány také silné organické báze, jako jsou kvartérní amoniové soli a trimethylsulfoniové hydroxidy. Po smíchání činidla se vzorkem a nástřiku do GC proběhne za vysoké teploty pyrolýza vzniklých kvartérních amoniových solí a tvorba žádoucích methylesterů. Hlavní předností těchto metod je jednokroková (on-line) derivatizace (Ruiz-Rodriguez et al., 2010).

Pikolinylestery MK jsou považovány za univerzální deriváty k určení polohy a druhu dvojně vazby, typu izomerů (*iso*, *anteiso*, *cis*, *trans*), celkové struktury vyšších nenasycených MK a kyselin s jinými vázanými funkčními skupinami pomocí GC/MS a ionizací nárazem elektronů (EI). Mezi estery užívané pro určení polohy dvojných vazeb patří také dimethyloxazolinové estery nebo dimethylamidy MK (Christie, 1989; Rosenfeld, 2002).

Přídavek vnitřního standardu (IS) k frakcím získaným pomocí TLC před vlastní transesterifikací a GC analýzou umožňuje vzájemně porovnávat zastoupení jednotlivých MK ve frakcích lipidů.

Použití derivatizace při analýze mastných kyselin však přináší i některé nevýhody. Jedná se o krok navíc v přípravě vzorku. Často je problém dosáhnout kompletní transesterifikace MK a extrakce vzniklých esterů či zabránit rozkladu, izomerizaci nebo oxidaci některých nenasycených MK během reakce. Při odpařování rozpouštědla může docházet ke ztrátám vysoce těkavých MK s krátkým řetězcem. Nebezpečí je také ve vzniku vedlejších produktů, které mohou komplikovat následnou kvalitativní a kvantitativní analýzu MK. Navíc FAME neposkytují informace o poloze a konfiguraci dvojných vazeb a je tedy třeba provést další derivatizaci na výše zmíněné estery umožňující analýzu dvojných vazeb (Wei et al., 2011).

2.4.3.2 Analýza plynovou chromatografií

Analýzu methylesterů mastných kyselin (FAME) pomocí plynové chromatografie podrobně zpracovává Eder ve svém přehledném článku (1995). Celý proces analýzy FAME zahrnuje několik kroků: esterifikaci, nástřik, separaci, identifikaci a kvantifikaci.

Pro získání přesných a správných výsledků by každý z těchto kroků by měl být pečlivě optimalizován. Optimální kvalitativní a kvantitativní GC analýza složitých směsí vyžaduje dobré rozlišení, tedy ostré a symetrické píky, vysokou opakovatelnost a reprodukovatelnost retenčních časů, vysokou přesnost a správnost kvantifikace založené na měření plochy píku a tedy nulovou diskriminaci složek analyzované směsi (Seppänen-Laakso et al., 2002).

Nástřík

Technika dávkování vzorku na chromatografickou kolonu je nejkritičtější krokem v GC analýze a hlavním zdrojem chyb v kvantitativní GC analýze. Požadavek minimální diskriminace analytů v důsledku rozdílné těkavosti, polarity nebo koncentrace je často obtížné splnit. Přirozeně se vyskytující MK s délkou řetězce mezi 4 a 24 uhlíky mají velké rozmezí bodů varu, což vede k diskriminačním efektům uvnitř injektoru.

Nejběžnější způsob dávkování je dávkování se splitem (děličem toku) do vyhřátého injektoru. Pro analýzu FAME se hodnoty splitu pohybují v rozmezí 1:10 až 1:200 a typická teplota injektoru bývá v rozmezí 250 – 300 °C.

Nejspolehlivějšími metodami pro zavedení vzorku na vstup kapilární kolony jsou dávkování na kolonu za chladu nebo využití dávkování s programově vyhříváním injektorem. Přesnost a správnost stanovení MK těmito technikami jsou vyšší především pro minoritní mastné kyseliny a proto by měly být upřednostňovány. Obecně by variační koeficient reprodukovatelnosti normalizovaných ploch píků v kapilární GC měl být nižší než 1 %, v případě minoritních mastných kyselin (zastoupených méně než 0,5 % z celkových MK) v rozmezí 10 – 20 % (Seppänen-Laakso et al., 2002)

Studie Schreiner (2005) potvrdila, že při analýze PUFA, dává systém dávkování „na kolonu“ nejpřesnější výsledky. Odezva plamenově ionizačního detektoru je prakticky stejná pro mastné kyseliny s 16 až 18 uhlíky, rozdílné odezvy u MK s delším řetězcem a polynenasycených MK jsou důsledkem jejich selektivního vypařování v běžně používaných dávkovacích zařízeních. Problémy s diskriminací mnozí autoři řeší použitím vnitřního standardu. Kyselina 23:0 je nejčastěji používaná jako vnitřní standard pro analýzu n-3 PUFA s dlouhým řetězcem, protože se eluuje bez interference s jinými složkami. Schreiner zjistil, že výběr vhodného vnitřního standardu zlepšuje jak přesnost, tak i správnost výsledků analýzy PUFA. Doporučuje kyselinu 19:0 pro FAME nenasycených MK s dvaceti uhlíkovými atomy a kyselinu 21:0 pro FAME nenasycených MK s 22 uhlíkovými atomy.

Kolony

Kapilární GC je tradičně používaná technika pro analýzu FAME v různých oblastech výzkumu. FAME analýza vyžaduje vysoké chromatografické rozlišení, zvláště pokud jde o analýzy polohových a geometrických izomerů nenasycených MK ve složitých směsích (Ruiz-Rodriguez et al., 2010). V kapilární GC je rozlišení ovlivněno především polaritou stacionární fáze, délkou kolony, vnitřním průměrem a tloušťkou filmu. Na trhu jsou dostupné nejrůznější kolony. Moderní kapilární kolony mají délku 50 a více metrů a dosahují 10^5 a více teoretických pater (Seppänen-Laakso et al., 2002).

Separace FAME může být provedena na třech základních typech kapilárních kolon lišících se polaritou stacionární fáze, která ovlivňuje retenční časy FAME, zvláště PUFA. Nejčastěji se používají velmi polární kolony, jejichž stacionární fázi tvoří kyanoalkylpolysiloxany (kyanoethylsilikonový, kyanopropylsilikonový olej nebo směs biskyanopropyl a dimethylsiloxan). Výhodou polárních fází je jejich vysoká rozlišovací schopnost methylesterů nenasycených MK. Při konstantní délce uhlíkového řetězce každá další dvojná vazba zvyšuje retenční čas. Některé methylestry PUFA se eluují až po následující nasycené FAME s více uhlíky (př. 18:3n-3 po 20:0 apod.). Nevýhodou těchto fází je jejich nízká termální stabilita a dlouhé retenční časy, zejména pro PUFA.

Naopak nepolární stacionární fáze se vyznačují vysokou termální stabilitou, ale horší selektivitou. Jsou tvořeny methylsilikony, dimethyl-diphenylpolysiloxany či dimethylpolysiloxany. Princip separace je jiný než na polárních kolonách. Methylestery MK se eluují podle jejich teploty varu, tedy nenasycené před nasycenými. Hlavní nevýhodou je částečný překryv některých důležitých nenasycených FAME. Např. 18:2n-6 není dobře rozlišená od 18:1n-9, 18:2n-6 a 18:3n-3 se překrývají zcela a podobný problém je i u FAME s 20 a 22 uhlíky. Výhodou naopak je vysoký teplotní limit (340 °C a více), což umožňuje analýzu mastných kyselin s vyšší molekulovou hmotností (Wei et al., 2011). Eder ve svém přehledu (1995) doporučuje středně polární fáze jako kompromis mezi termální stabilitou a dobrou separací.

V biologických vzorcích jsou kromě FAME s přímým řetězcem přítomny také isomery s rozvětveným řetězcem a isomery na dvojně vazbě. Rozvětvené a nerozvětvené FAME lze dobře rozlišit na polárních i nepolárních kolonách, geometrické se dobře dělí na velmi polárních. Zvláště analýza *trans* MK v potravinách má velký význam, protože podle posledních studií (Schröder et al., 2013) mají tyto minoritní kyseliny významný vliv na lidské zdraví.

Nosný plyn

Na citlivost GC analýzy má významný vliv také volba nosného plynu a nastavení jeho průtoku. Jako nosný plyn se používá dusík, helium nebo vodík. Vodík je výhodný z hlediska rychlosti analýzy, ale v současné době se většinou dává přednost heliu, které umožňuje spojení GC s hmotnostním detektorem (Seppänen-Laakso, 2002).

Detekce

Nejčastěji používaným detektorem v plynové chromatografii je detektor plamenově ionizační (Eder, 1995; Seppänen-Laakso, 2002). Při spalování látek v kyslíkovodíkovém plameni jsou produkovány ionty, velikost signálu je úměrná počtu aktivních uhlíků (tj. vázaných na vodík), přítomnost atomu kyslíku v molekule signál detektoru snižuje. FID je velmi citlivý (pikogramy FAME), jeho odezva je rychlá a lineární v širokém rozmezí koncentrací. Je výhodný zejména při stanovení profilu MK, protože poskytuje pro většinu běžných MK (s výjimkou MK s méně než 14 uhlíky) prakticky stejnou odezvu, na rozdíl od např. detektoru hmotnostního.

Detektor elektronového záchytu je vhodný pro detekci halogenovaných derivátů MK a pro strukturní studie. Detekční systémy využívající infračervenou spektroskopii a nukleární magnetickou rezonanci jsou vhodné pro strukturní studie, analýzy enantiomerů MK a určování větvení řetězců (Brondz, 2002).

Velice významným detektorem používaným ve spojení s GC je hmotnostní detektor, který poskytuje informace o struktuře analyzovaných látek a umožňuje jejich identifikaci. Tvrdé ionizační techniky (elektronová ionizace, EI) poskytují EI spektra, která je možné porovnávat se spektry v databázích, což představuje cenný nástroj pro vyjasnění neznámých struktur. Metody chemické ionizace (CI) umožňují analýzu dvojných vazeb v nenasycených MK. GC/MS analýza volných mastných kyselin je však problematická a i zde je třeba zařadit derivatizační krok. Nejčastěji jsou analyzovány methylestery, dále pikolinylové a dimethyloxazolinové estery. GC/MS je méně vhodná pro analýzu sloučenin s vysokým bodem varu, kdy dochází k chvostování píků, prodlužují se retenční časy a zvyšuje se limit detekce (Carrasco-Pancorbo et al., 2009; Wei et al., 2011).

Identifikace a kvantifikace methylesterů mastných kyselin

Identifikace FAME se provádí na základě srovnávání retenčních časů analytů a standardů. Jelikož všechny standardy MK nejsou komerčně dostupné, doporučuje se kombinovat GC se spektrometrickými technikami, především s hmotnostní spektrometrií

(Carrasco-Pancorbo et al., 2009). Užitečné informace také nabízejí hodnoty „relativních retenčních časů“, tj. poměru mezi retenčními časy FAME a referenční FAME (nejčastěji kyseliny 16:0 nebo 18:0) nebo tzv. „ekvivalentní počet uhlíkových atomů“ vycházející z Kovatsových retenčních indexů. Použití těchto hodnot je však pouze informativní a konečná identifikace musí být opět provedena pomocí MS (Eder, 1995). MS se doporučuje i pro identifikaci polohových a geometrických izomerů FAME (kapitola 2.4.3.4).

Pro kvantifikaci se nejčastěji používá plamenově ionizační detektor vzhledem k jeho výše zmíněným vlastnostem. FAME jsou kvantifikovány na základě ploch píků a s využitím korekčních faktorů teoretických nebo experimentálních. Absolutní koncentrace mohou být stanoveny přidáním vnitřního standardu zvoleného podle typu analyzovaného vzorku, nejčastěji MK 19:0, 21:0 a 23:0 (Eder, 1995).

2.4.3.3 Analýza kapalinovou chromatografií

Ačkoliv historicky je plynová chromatografie ve spojení s FID nebo MS detekcí nejvíce používanou technikou pro analýzu mastných kyselin, v posledních letech velmi vzrostl význam vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro stanovení MK. Tato metoda umožňuje na rozdíl od GC také analýzu mastných kyselin bez předchozí derivatizace (Lacaze et al., 2007).

Metoda HPLC je používána v různém uspořádání, na normální i reverzní fázi, v izokratické i gradientové eluci a ve spojení s různými detektory. Sajiki et al. (2002) prezentují přehled různých metod pro měření volných PUFA v biologických vzorcích pomocí HPLC s MS detekcí. Metoda HPLC je vhodná i pro analýzu methylesterů MK (Vrkoslav et al., 2012).

Separace vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Eluční pořadí mastných kyselin a jejich derivátů při HPLC separaci není závislé pouze na délce uhlíkového řetězce jako při GC separaci. Délka řetězce zvyšuje hodnotu retenčního času, ale významně se uplatňuje také stupeň nenasycenosti a poloha terminální dvojné vazby (Chen et al., 2002).

Chromatografie na reverzní fázi je vhodná pro analýzu volných mastných kyselin nebo jejich methylesterů a také pro identifikaci geometrických izomerů. Separace zde závisí jak na délce řetězce, tak i na stupni nenasycenosti (Carrasco-Pancorbo et al., 2009). Nejčastěji používanou reverzní fází je kolona C18 (oktadecylsilyl) umožňující dobře separovat volné mastné kyseliny i jejich deriváty v izokratickém nebo gradientovém

elučním modu. Mobilní fáze bývá složena z organického rozpouštědla (methanol, acetonitril) a vody. V případě separace volných mastných kyselin je nutný přídavek např. ledové kyseliny octové k potlačení disociace karboxylové skupiny MK. Retenční časy pro jednotlivé analyty mohou být určeny semiempiricky. Jelikož se jedná především o disperzní interakce uhlíkového řetězce s C18 stacionární fází, závislost mezi logaritmem kapacitního faktoru nasycených MK a počtem uhlíkových atomů je lineární. Na základě lineárních závislostí mohou být vypočítány hodnoty „ekvivalentního počtu uhlíkových atomů“ pro *cis* i *trans* nenasycené MK. Obecně platí, že první dvojná vazba snižuje efektivní délku uhlíkového řetězce o méně než dvě jednotky (18:1 se eluuje před 16:0). Druhá a další dvojná vazby mají na retenci menší efekt (Chen et al., 2002).

Argentacní chromatografie je používána pro separaci či izolaci geometrických a polohových izomerů MK, methylesterů MK i intaktních triacylglycerolů. Stříbrné ionty jsou buď přidány do mobilní fáze nebo vázány na stacionární fázi. Stříbrné ionty interagují reverzibilně s dvojnými vazbami v nenasycených sloučeninách za tvorby polárních komplexů a výsledkem je selektivní retardace odpovídajícího analytu. Mastné kyseliny jsou separovány podle počtu a *cis/trans* konfigurace jejich dvojných vazeb (Chen et al., 2002).

Chromatografie iontových párů byla použita pro separaci nederivatizovaných volných mastných kyselin. Nepracuje se při nízkém pH jako v chromatografii na reverzní fázi, ale iontopárové činidlo (např. tetrabutylammonium) potlačující náboj volných mastných kyselin je přidáno přímo do mobilní fáze (Tsuyama et al., 1992).

V případě komplexních matic se používají vícerozměrné chromatografické systémy tvořené např. spojením GC x GC, LC x LC, LC x GC a umožňující výrazné zvýšení počtu látek separovaných v jednom experimentu. Další možnost zvýšení rozlišovací schopnosti je zavedení eluentu z kolony přímo do iontového zdroje hmotnostního spektrometru (Carrasco-Pancorbo et al., 2009).

Detekce

Pro detekci mastných kyselin rozdělených pomocí HPLC byla v minulosti používána řada detektorů, např. spektrofotometrický, fluorescenční, chemiluminiscenční, refraktometrický, elektrochemický nebo detektor rozptylu záření. V současné době se však díky rozvoji měkkých ionizačních technik stále více prosazuje detekce hmotnostním spektrometrem. Hlavním nedostatkem dříve používaných detektorů byla nízká citlivost. Pro zvýšení citlivosti a selektivity detekce je nutné analyty upravit pre nebo post

kolonovou derivatizací. Toyo'oka (1995) podává podrobný přehled o technikách derivatizace a činidlech vhodných pro derivatizaci MK pro detektory používané ve spojení s HPLC. Další informace lze nalézt v přehledných článcích autorů Brondz (2002) nebo Chen et al. (2002). Pro UV detekci autoři doporučují např. benzyl, p-nitrobenzyl, fenacyl, p-bromofenacyl, p-methylthiobenzyl, 1-naphtylamin aj. deriváty. Pro detekci fluorescenčním detektorem se doporučují činidla kumarinového, diazomethanového, benzofurazanového aj. typu. Autoři však zmiňují i nevýhody spojené s derivatizací, především pracnost a časovou náročnost, nebezpečí oxidace či izomerizace některých MK během derivatizační reakce. Proto jsou stále více používány metody, které náročnou přípravu vzorku nevyžadují.

Měkké ionizační techniky umožnily spojení HPLC s hmotnostně spektrometrickým detektorem. Mezi tyto techniky patří především ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku. Technika HPLC/MS poskytuje vysokou selektivitu a citlivost analýzy bez předchozí derivatizace, navíc umožňuje identifikaci částečně rozlišených nebo koeluujících píků podle hmoty a stanovení struktury a množství mastných kyselin v biologickém vzorku (Lacaze et al., 2007). HPLC/MS byla úspěšně aplikována na analýzu mastných kyselin i jejich methylesterů, největší význam má však pro analýzu profilu komplexních lipidových směsí.

Přehled metod pro měření volných polynenasycených MK v biologických vzorcích pomocí HPLC/MS shrnuje práce Sajiki et al. (2002). Analýza těchto mastných kyselin byla provedena na reverzní fázi s MS detekcí využívající ESI i APCI ionizace a různé způsoby monitorování vzniklých iontů. Pro stanovení těchto mastných kyselin pomocí pozitivní ESI a tandemové hmotnostní spektrometrie byly použity jejich trimethylaminoethylestery.

Vrkoslav et al. (2012) použil pro detekci methylesterů mastných kyselin techniku APCI. APCI hmotnostní spektra jsou relativně jednoduchá a obvykle obsahují protonovanou molekulu, adukty a několik fragmentů, které umožňují určit počet uhlíkových atomů a dvojných vazeb, identifikovat polohové izomery, ale jejich použití pro lokalizaci dvojných vazeb je omezené. Pro analýzu dvojných vazeb autoři využili tvorbu aduktů FAME s acetonitrilem a jejich následnou fragmentaci (kapitola 2.4.3.4).

Fotoionizace za atmosférického tlaku je novější ionizační technika, která je v některých případech schopna ionizovat estery mastných kyselin, monoacyl-, diacyl- a triacylglycerolů s vyšší účinností než techniky ESI či APCI (Marchi et al., 2009).

Při srovnání metod HPLC/MS a GC/MS se vzhledem k jednodušší přípravě vzorků a rychlejší analýze zdá být výhodnější metoda HPLC/MS. Limitující je však cena a celkově náročnější údržba přístroje.

2.4.3.4 Určení struktury molekuly

Poloha dvojně vazby v nenasycených mastných kyselinách ovlivňuje jejich biochemické vlastnosti. Data získaná z GC/MS analýzy FAME, retenční časy a MS spektra jsou používána pro charakterizaci struktury mastných kyselin, ale informace o poloze dvojně vazby přímo neposkytují.

Dříve používané metody stanovení polohy dvojně vazby ve FAME oxidací ozonem nebo manganistanem draselným s následnou identifikací produktů byly nahrazeny MS technikami. Hmotnostní spektra získaná elektronovou ionizací FAME však nedávají specifické ionty vhodné pro určení polohy dvojně vazby. Možné řešení nabízí jejich převedení na deriváty obsahující dusík, např. dimethyloxazolinové nebo pikolinylové estery. Některé studie však upozorňují na nevýhody derivatizačního kroku, jako je časová náročnost, možná kontaminace vzorku, vznik vedlejších produktů či v případě nekompletní reakce snížení citlivosti (Michaud et al., 2002).

Úspěšný postup k lokalizaci dvojně vazby nabízí chemická ionizace (CI) acetonitrilem (Van Pelt et al., 1999; Michaud et al., 2002). Za podmínek CI acetonitril poskytne ion m/z 54 identifikovaný jako (1-methylenimino)-1-ethenylium. Tento ion rychle reaguje s dvojnými vazbami FAME za vzniku iontu $[M+54]^+$, jehož následná fragmentace poskytne charakteristické diagnostické ionty k určení polohy dvojně vazby ve FAME.

Vrkoslav et al. (2011, 2012) využili acetonitril pro charakterizaci dvojných vazeb ve FAME metodou HPLC s APCI detekcí. Kapalinová chromatografie nabízí alternativu ke GC a navíc není omezena požadavkem tepelné stability a dostatečné těkavosti analytů, což je problém hlavně v případě GC analýzy polynenasycených MK s dlouhým řetězcem. Reakcí nenasycených FAME s acetonitrilem v plynné fázi APCI zdroje vznikají adukty $[M+C_3H_5N]^+$, jejichž fragmentace poskytuje diagnostické ionty umožňující jednoznačnou lokalizaci dvojných vazeb. Metoda byla použita k identifikaci přírodních směsí vosků z jojobového oleje, včelího vosku a směsi mastných kyselin získaných z oleje semen černého rybízu.

2.4.4 Analýza lipidů kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí

Větší molekuly, jako jsou triacylglyceroly a fosfolipidy, jsou netěkavé a z tohoto důvodu byly donedávna analyzovány přes jejich komponenty, mastné kyseliny, pomocí plynové chromatografie. Pro analýzu intaktních TAG se používala vysokoteplotní plynová chromatografie, chromatografie na reverzní fázi a argentační iontová chromatografie (Christie, 1993). Vývoj moderních ionizačních technik umožnil jednodušší a rychlejší přímou analýzu lipidů. Pro identifikaci polárních lipidů se nejvíce používají ionizační techniky ESI a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI), pro nepolární lipidy je preferována APCI.

Biosyntéza a metabolismus TAG jsou stereo- a regiospecifické reakce a přírodní TAG existují v podobě velkého množství různých molekul, tzv. molekulárních druhů. Chemické, fyzikální, ale i nutriční a technologické vlastnosti komerčně důležitých tuků a olejů jsou dány polohovou distribucí mastných kyselin v molekule, tj. jejich vazbou v polohách *sn-1*, *sn-2*, *sn-3* glycerolu, vliv mají také délky acylových řetězců mastných kyselin a počet, poloha a konfigurace dvojných vazeb. Velké lipidy mohou být rozštěpeny na malé, těkavé podjednotky, obvykle kyselce nebo bazicky katalyzovanou transesterifikací, tím se však ztratí důležité strukturní informace. Proto je v současné době nejvýhodnější tyto látky analyzovat technikou HPLC/MS, která umožňuje zachování struktury celé molekuly a poskytuje informace jak o složení molekulárních druhů, tak i o regiospecifické distribuci mastných kyselin v TAG molekulách (Rezanka et al., 2007; Lísa et al., 2011).

Separace lipidů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Jedna z nejpoužívanějších technik pro separaci triacylglycerolů ve složitých přírodních směsích je vysokoúčinná kapalinová chromatografie v nejrůznějším uspořádání (Buchgraber et al., 2004; Carrasco-Pancorbo et al. 2009).

Chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC) využívá různé typy C18 a C8 kolon, mobilní fáze obsahuje obvykle methanol, acetonitril, propan-2-ol a vodu v různých kombinacích a poměrech. Retence TAG v RP-HPLC se zvyšuje s přírůstkem tzv. „ekvivalentního počtu uhlíkových atomů“. Retenční čas TAG je závislý na celkovém počtu atomů uhlíku ve třech acylech, s každou dvojnou vazbou se snižuje efektivní řetězec o dva atomy uhlíku. Ve skutečnosti je však v účinných moderních systémech toto číslo menší než dvě a závisí na poloze dvojných vazeb. Dvojná vazba v dienech má jiný efekt než dvě dvojně vazby ve dvou monoenech (Lísa et al., 2005).

Nevodná RP-HPLC na C18 kolonách používá jako mobilní fázi směs acetonitrilu a vhodného modifikátoru, např. aceton, propan-2-ol, hexan, dichlormethan, který zvyšuje rozpustnost TAG v mobilní fázi, což má vliv na selektivitu a účinnost separace. Kvalitu separace také významně ovlivňuje teplota kolony, je však nutné volit kompromis, při nižší teplotě je separace lepší, ale některé nasycené TAG se mohou vysrážet. Při vyšší teplotě se zhoršuje dělení a u labilních TAG (s vysokým počtem dvojných vazeb) může docházet k degradaci (Lísa et al., 2011b).

Argentační chromatografie je založena na tvoření slabých reverzibilních komplexů stříbrných iontů s π elektrony dvojných vazeb nenasycených TAG. Stříbrné ionty jsou impregnované na silikagelu nebo vázané ke stacionární fázi na bázi iontoměniče. Typickou mobilní fází je směs hexanu s acetonitrilem, často s přidavkem propan-2-olu pro zlepšení jejich mísitelnosti a tím reprodukovatelnosti separace. Chlorované mobilní fáze jsou také často používané, obvykle dichlormethan nebo dichlorethan s přidavkem polárního modifikátoru (acetonitrilu, acetonu nebo methanolu) v nízké koncentraci. Separace TAG je řízena především počtem dvojných vazeb a umožňuje rozdělení polohových a geometrických izomerů a regioizomerů (Lísa et al., 2011b).

V hydrofilní interakční chromatografii (HILIC) se jednotlivé lipidové frakce separují podle jejich polaritě na kolonách silikagelových nebo s chemicky vázanými diolovými skupinami. Mobilní fáze obsahují nejčastěji kombinaci chloroform – methanol – voda a hexan – propan-2-ol – voda s přidavkem různých aditiv, např. kyselina mravenčí, octan amonný, hydroxid amonný, amoniak nebo triethylamin (Gama et al., 2012).

Analýza lipidů v biologických tkáních a tělních tekutinách je velmi náročná. Jedná se o složité matrice obsahující také polární lipidy, kde více zastoupené částice mohou maskovat ty minoritní. Proto zde mají využití vícerozměrné HPLC techniky umožňují výrazné zvýšení počtu látek separovaných v jednom experimentu. Lísa et al. (2011a) popisuje novou metodu charakterizace složení lipidů v různých tkáních za použití off-line dvoudimenzionálního spojení HILIC a RP-HPLC připojené k ESI a APCI/MS. V prvním rozměru HILIC byly celkové lipidové extrakty rozděleny na individuální lipidové frakce, které byly pomocí RP-HPLC rozlišeny na jednotlivé molekulární druhy. Jejich ESI nebo APCI spektra pak poskytla informace o složení mastných kyselin a o jejich vazbě na glycerolový skelet.

Stejní autoři (Lísa et al., 2011b) použili techniky nevodné RP-HPLC a argentační HPLC zakončené APCI/MS detekcí k analýze triacylglycerolů v komplexních vzorcích živočišných tuků (z daňka, jelena, ovce aj). V modu nevodné RP-HPLC byly jednotlivé

TAG separovány podle délky a počtu dvojných vazeb vázaných mastných kyselin, včetně separace *trans*- a rozvětvených. Argentační chromatografií byly rozděleny TAG regioizomery a složení vzorku bylo určeno GC/FID analýzou methyl esterů mastných kyselin.

Carrasco-Pancorbo et al. (2009) upozorňují na možnost použití kapilární elektroforézy jako alternativní separační metody k HPLC v analýze fosfolipidů.

Detekce lipidů hmotnostní spektrometrií

Hmotnostní spektrometrie je technika, která poskytuje řadu informací, např. o molekulové hmotnosti, počtu uhlíkových atomů, stupni nenasycenosti a poloze acylů na glycerolovém skeletu, což umožňuje kompletní charakterizaci triacylglycerolové struktury. Často je však nezbytná chromatografická separace TAG před MS analýzou, protože TAG obsahující různé izomery mastných kyselin (geometrické a polohové) nemohou být rozlišeny pouze pomocí MS. V současné době jsou používány různé ionizační techniky, např. elektronová ionizace (EI), chemická ionizace (CI), ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI), bombardování urychlenými atomy (FAB), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a ionizace elektrosprejem (ESI), z nichž poslední dvě jsou nejpopulárnější (Byrdwell, 2001; Zehethofer et al., 2008; Holčapek et al., 2012).

Technika FAB-MS je používána ke studiu struktury velkých, intaktních lipidů. Nevýhodou je omezená citlivost především pro nízké molekulové hmoty.

Technika MALDI-MS je používána hlavně pro analýzu velkých proteinů, ale je vhodná i pro analýzu polárních a nepolárních lipidů z nejrůznějších zdrojů. Hlavní výhodou metody je rychlost analýzy, kdy během jedné minuty je získána požadovaná informace s dobrou reprodukovatelností a minimální přípravou vzorku. Tato technika využívá citlivý, jednoduchý a rychle skenující průletový hmotnostní analyzátor a obvykle se nezapojuje on-line se separační technikou.

Techniky ESI a APCI, vhodné pro analýzu mastných kyselin i jejich methylesterů (kapitola 2.4.3.3), se dobře hodí také pro identifikaci a kvantifikaci lipidů. Mohou být použity samostatně s přímým nástřikem do MS nebo ve spojení s kapalinovou chromatografií. Poskytují informace o molekulárních druzích včetně regiospecifického, nemohou však být použity pro analýzu stereospecifického rozdělení mastných kyselin v *sn*-triacylglycerolech. ESI je zvláště užitečná v analýze polárních lipidů (fosfolipidů a sfingolipidů), jsou však publikovány práce využívající ESI i pro analýzu nepolárních lipidů. Spektra je možné snímat v pozitivním i negativním modu. Pozitivní spektra

poskytují informace o molekulové hmotnosti a o přítomnosti jednotlivých polárních skupin, ionty v negativním spektru odpovídají jednotlivým mastným kyselinám vázaným na glycerolový skelet (Lísa et al., 2011a). ESI spektra obsahují pouze kvazimolekulární ionty bez fragmentace, pro získání dalších informací se využívá tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). ESI-MS/MS spektra mohou být získána přímo ze surového extraktu lipidu bez nutnosti předchozí separace, saponifikace nebo derivatizace a MS/MS většiny hlavních lipidových frakcí jasně identifikují délku uhlíkového řetězce a stupeň nenasyčenosti mastných kyselin vázaných k mateřské molekule. ESI-MS/MS spektra obsahují diacylglycerolové (DAG) fragmenty příslušného prekursoru TAG. Na základě relativních intenzit DAG fragmentů je možné rozlišit mezi jednotlivými acyly MK vázanými v polohách *sn-1*, 2, 3 a získat tak informace pro strukturní charakterizaci TAG.

APCI je zvláště vhodná pro analýzu nepolárních lipidů (TAG, sterolů a esterů MK) (Zehethofer et al., 2008). Spektra obsahují protonované molekulové ionty a DAG fragmenty, jejichž zastoupení je také závislé na poloze MK v molekule glycerolu. Metodu HPLC s APCI detekcí v negativním modu s amoniakem jako zmlžujícím plynem použili Leskinen et al. (2010) k rozlišení regioisomerů TAG v různých rostlinných olejích.

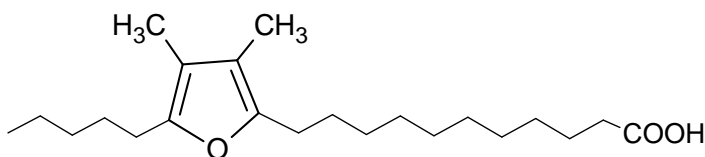
Další slibnou technikou pro přímou analýzu lipidů je metoda nukleární magnetické rezonance (NMR). Měření ^1H , ^{13}C a ^{31}P NMR spekter umožňuje určení struktury lipidů, kvalitativní i kvantitativní analýzu jednotlivých molekul i komplexních směsí. Je to nedestruktivní metoda, která nevyžaduje specifické standardy pro kvantifikaci. Ve srovnání s MS má však nižší citlivost (Falch et al., 2006).

2.5 FURANOVÉ MASTNÉ KYSELINY

2.5.1 Struktura

Furanové mastné kyseliny (F-kyseliny) jsou minoritní heterocyklické složky lipidů s charakteristickou strukturou. Furanový cyklus je substituovaný v jedné α poloze karboxyalkylovým řetězcem se 7, 9, 11 nebo 13 uhlíkovými atomy, v druhé α poloze je pak vázán propyl nebo pentyl. Polohy beta jsou obsazeny jedním (v β poloze přilehlé k postrannímu řetězci mastné kyseliny) nebo dvěma methyly.

Chemické názvy F-kyselin jsou poměrně komplikované, proto se používají různá zkrácená označení, např. F s indexem odpovídajícím eluci z GC kolony (Glass et al., 1974; Spiteller, 2005), systém podle Rahna (Rahn et al., 1981) nebo jeho modifikace (Vetter et al., 2012). Systém je založený na označení délky řetězců vázaných v α polohách a použití předpony Me nebo DiMe podle počtu methylů vázaných v β polohách. Nejběžnější F-kyselina, 12,15-epoxy-13,14-dimethyleikosa-12,14-dienová, je pak označována jako F₆, DiMeF(11,5) nebo 11D5 (Obr. 6).



Obr. 6 12,15-epoxy-13,14-dimethyleikosa-12,14-dienová kyselina

2.5.2 Výskyt

F-kyseliny jsou produkovány rostlinami (Hannemann et al., 1989), řasami (Batna et al., 1993) a mořskými bakteriemi (Shirasaka et al., 1995, 1997), ostatní organismy je získávají v potravě (Spiteller, 2005). Poprvé byly detegovány v roce 1974 ve šticce (*Esox lucius*) (Glass et al., 1974) a od té doby v řadě dalších organismů. F-kyseliny jsou distribuovány v nízké koncentraci téměř ve všech živých organismech, např. rostliny, ryby, obojživelníci, plazy a savci včetně člověka (Hannemann et al., 1989; Wahl et al., 1995; Dembitsky et al., 1996; Spiteller, 2005; Pacetti et al., 2010; Angioni et al., 2014; Yu et al., 2015; Mawlong et al., 2016). Izolovány byly také z běžných potravin jako rostlinné a rybí oleje či máslo (Vetter et al., 2013, 2014) a detekovány v rybích gonádách (Glass et al.,

1975, 1977; Gunstone et al., 1978; Pacetti et al., 2013), játrech (Hammann et al., 2015; Wendlinger et al., 2016) a šupinách (Grahl-Nielsen et al., 2010).

F-kyseliny se, stejně jako ostatní mastné kyseliny, vyskytují vázané ve formě esterů. V rostlinách jsou zastoupeny hlavně ve fosfolipidové frakci, v lipidech savců a ryb v různých lipidových frakcích podle místa výskytu. V rybích játrech jsou vázány na cholesterol, v masě ryb se nacházejí ve fosfolipidové frakci (PL), především ve fosfatidylcholinu. V gonádách se vyskytují výlučně v triacylglycerolové frakci (TAG). V játrech savců jsou F-kyseliny esterifikovány cholesterolem, ale nalezeny byly i v TAG frakci. V krevní plasmě savců i lidské jsou vázány hlavně v PL, především ve fosfatidylcholinu a fosfatidylethanolaminu (Spiteller, 2005). V mořské bakterii, *Shewanella putrefaciens*, žijící v trávicím traktu ryb, Shirasaka et al. (1997) našli většinu F-kyselin ve formě fosfolipidů, především fosfatidylethanolaminu a fosfatidylglycerolu, vždy v poloze *sn-1*. Byly také popsány olefinické F-kyseliny, např. v olivovém oleji (Boselli et al., 2000), dvojná vazba byla nalezena jak v karboxyalkylovém, tak i alkylovém postranním řetězci. Práce Vetter et al. (2012, 2013) potvrdily, že F-kyseliny jsou rozšířené i v potravinách, jejich koncentrace jsou však ovlivněny řadou faktorů. Skladování potravin a jejich zpracování mohou zapříčinit ztrátu F-kyselin, což může dále vést ke snížení nutriční hodnoty potraviny. Pacetti et al. (2010, 2013) identifikovali několik F-kyselin v rybách z Jaderského moře, popsali změny F-kyselin během roku a pravděpodobnou souvislost mezi jejich hromaděním v gonádách a fertilizačním procesem.

2.5.3 Biosyntéza

Rostliny a řasy syntetizují základní skelet F-kyselin z acetátu, methyl v poloze beta furanového jádra pochází z methioninu a furanový kyslík ze vzduchu. Kyselina linolová je prekursorem uhlíkové kostry F-kyselin nesoucích pentylový postranní řetězec, zatímco F-kyseliny s propylovým postranním řetězcem pocházejí z 9,12-hexadekadienové kyseliny (Batna et al., 1993). Prvním krokem v biosyntéze F-kyselin v enterických mořských bakteriích je zavedení methylové skupiny do *cis*-vakcenové kyseliny (Shirasaka et al., 1997).

2.5.4 Pozitivní biologické účinky

Furanové mastné kyseliny byly nalezeny v řadě potravin (máslo, žampiony, rostlinné oleje), ale jejich nejbohatším zdrojem jsou ryby. Uváděny jsou koncentrace v rozmezí 0,2 – 0,9 g/100 g oleje s převahou dimethyl F-kyselin (Vetter et al., 2013). Zvláště vysoký

obsah byl zjištěn v rybích játrech během tření a hladovění (Glass et al., 1975). Kapsle s rybím olejem, prodávané jako potravinový doplněk, F-kyseliny neobsahovaly, zřejmě byly odstraněny během rafinace rybího oleje (Vetter et al., 2013).

Pozitivní účinky ryb na lidské zdraví jsou připisovány především n-3 PUFA (kapitola 2.1.3). Tyto látky však snadno podléhají oxidačním reakcím a minoritní složky, jako např. F-kyseliny, zde mohou mít významný fyziologický efekt. Jakákoliv změna ve struktuře buněčné membrány aktivuje lipoxygenasy, které transformují PUFA na hydroperoxydy. Tyto děje mohou přejít až do neenzymově řízené peroxidace lipidů produkující radikály, které pak oxidují všechny biomolekuly (lipidy, sacharidy a proteiny). Chemické reakce indukované radikály jsou zřejmě zodpovědné za stárnutí a vznik chronických chorob. F-kyseliny jsou vynikajícími antioxidanty a lapači volných radikálů (Okada et al., 1990, 1996), reakcí s radikály se snadno oxidují za vzniku dioxoenů. Tyto oxidační meziproducty stabilizované rezonanční strukturou s dlouhou dobou života mohou reakcí s dalším radikálem řetězovou reakci přerušit. F-kyseliny nesoucí dva methyly na furanovém jádře jsou mnohem lepší lapače volných radikálů než F-kyseliny s jednou methylovou skupinou. F-kyseliny jsou zabudovávány do fosfolipidů krevní plasmy a stejně jako PUFA se nacházejí především ve fosfolipidech nízkohustotního lipoproteinu, tedy tam kde mohou oxidaci lipidů bránit nejúčinněji, na rozdíl od jiných antioxidantů, např. tokoferolů (Spiteller, 2005, 2007).

Teixeira et al. (2013) potvrdili, že F-kyseliny snižují riziko nemocí vyvolaných oxidativním stresem. Lemke et al. (2014) se zabývali interakcí F-kyselin přítomných v buněčné stěně fotosyntetické bakterie *Rhodobacter sphaeroides* s reaktivními formami kyslíku. Wakimoto et al. (2011) studovali in vivo aktivity F-kyselin přítomných v mušli *Perna canaliculus* a potvrdili, že tyto minoritní mastné kyseliny vykazují vyšší protizánětlivé účinky než kyselina eikosapentaenová. Pacetti et al. (2013) našli pozitivní korelaci mezi obsahem celkových F-kyselin a EPA ve filetech šesti druhů ryb z Jaderského moře.

2.5.5 Analýza

Analytické stanovení F-kyselin je náročné z několika důvodů. Tyto látky se vyskytují v biologických vzorcích jen v nízkých koncentracích, jsou náchylné k oxidaci a jejich standardy jsou obtížně dostupné. Identifikace a stanovení F-kyselin vyžaduje techniku GC/MS.

Analýza F-kyselin začíná, podobně jako u ostatních mastných kyselin, extrakcí lipidů z biologického materiálu s následným převedením v lipidech vázaných mastných kyselin na jejich methylestery. Plynová chromatografie FAME je obvykle prováděna na polárních stacionárních fázích s vázanými kyanopropylovými skupinami pro usnadnění separace *cis/trans* izomerů a sloučenin se stejně dlouhým řetězcem, ale různým počtem dvojných vazeb. Struktura F-kyselin – nejčastěji 19 – 22 uhlíkových atomů, dvojně vazby a kyslík ve furanovém cyklu jsou příčinou jejich relativně vysokých retenčních časů.

Nízké hladiny F-kyselin ve vzorcích často vyžadují jejich předseparaci od jiných mastných kyselin (zvláště PUFA), které jsou vzhledem k F-kyselinám v nadbytku a často překrývají jejich GC retenční interval. Po převedení mastných kyselin na jejich methylestery se pro účely obohacení využívají komplexy s močovinou, argentační chromatografie nebo hydrogenace. Komplexy s močovinou tvoří jen nasycené nerozvětvené mastné kyseliny s více než deseti uhlíky, které je tak možné oddělit od nenasycených a rozvětvených mastných kyselin včetně F-kyselin. Argentační chromatografie (např. na tenké vrstvě) umožňuje frakcionaci FAME na nasycené a nenasycené s různým počtem dvojných vazeb. F-kyseliny, u nichž se na tvorbě komplexů se stříbrným iontem podílejí dvě vazby, se eluují mezi nenasycenými FAME s jednou a dvěma dvojnými vazbami. Také hydrogenace za pečlivě zvolených podmínek, které minimalizují vedlejší reakce, může být použita k získání obohacené frakce F-kyselin. Hydrogenace zanechává F-kyseliny, stejně jako nasycené MK, nezměněné a umožňuje jejich separaci od PUFA (Wahl et al., 1995; Vetter et al., 2013). Přímou metodu pro analýzu F-kyselin pomocí GC/MS, tedy bez předseparace od ostatních MK, použili Pacetti et al. (2010) v analýze ryb z Jaderského moře.

Další komplikací analytického stanovení F-kyselin je nedostupnost referenčních standardů vhodných jako interní a externí standardy pro kvantitativní analýzu. V současné době je komerčně dostupných pouze několik standardů F-kyselin, řada laboratoří si je syntetizuje nebo izoluje sama (Gorstallman et al., 1988; Vetter et al., 2012; Knight et al., 2015).

Dalším problémem je stabilita F-kyselin. Bylo popsáno, že F-kyseliny se rozkládají během homogenizace vzorku ve vodném roztoku a mohou tak uniknout detekci v biologickém materiálu (Wakimoto et al., 2011). Jsou citlivé na světlo, přičemž F-kyseliny se dvěma methyly na furanovém cyklu jsou k degradaci náchylnější než F-kyseliny s jedním methylem. Volné F-kyseliny se rozkládají i během skladování při -20°C, relativně stabilní jsou ve formě methylesterů (Vetter et al., 2012).

Identifikace F-kyselin vyžaduje použití hmotnostního spektrometru jako detektoru. F-kyseliny a nenasycené MK s několika dvojnými vazbami mají stejné retenční indexy a k jejich vzájemnému rozlišení je třeba použít spektra získaná elektronovou ionizací. Orientace pouze podle retenčních indexů může být příčinou, proč mnoho autorů přítomnost F-kyselin v analyzovaných vzorcích neuvádí (Spiteller, 2005). EI spektra methylesterů F-kyselin dávají kompletní strukturní informaci. Obvykle obsahují tři charakteristické ionty – molekulární ion, základní ion a ion vytvořený ze základního McLaffertyho přesmykem (Glass et al., 1975). Základní ion vzniká α -štěpením v karboxyalkylovém řetězci na α , β -vazbě přilehlé k furan cyklu a jeho nejčastější m/z hodnoty jsou 137, 151, 165 a 179 podle počtu methylů v β polohách a délky alkylu v α poloze. Molekulární ion spolu se základním iontem umožňují identifikaci nejdůležitějších F-kyselin. Pro získání dostatečné citlivosti při kvantifikaci F-kyselin se doporučuje metoda monitorování vybraného iontu (Pacetti et al., 2010; Vetter et al., 2012).

3. CÍLE PRÁCE

Cílem disertační práce bylo studium mastných kyselin v lipidech vybraných druhů sladkovodních ryb. S ohledem na předběžné výsledky a dostupnost materiálu se pozornost soustředila zejména na kapra obecného. Vzorky různých tkání kapra se ukázaly natolik zajímavé, že se další práce zaměřila na jejich podrobné prostudování.

V první fázi byla vypracována metodika pro extrakci celkových lipidů z biologického materiálu, jejich rozdělení do lipidových frakcí a stanovení profilu mastných kyselin v těchto frakcích.

Dále byla zpracovaná metodika aplikována na různé rybí tkáně s cílem určit zastoupení lipidových frakcí a profil mastných kyselin v těchto tkáních.

Získaná data byla zpracována zejména využitím statistické metody analýzy hlavních komponent.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

Pro analýzu celkových lipidů, lipidových frakcí a mastných kyselin byly kromě běžných chemikálií a rozpouštědel (v analytické čistotě), laboratorního skla, pomůcek a vybavení, použity následující:

- Standardy lipidů
L- α -phosphatidylcholin, 1-monopalmitoyl-rac-glycerol, dipalmitin, tristearin, triolein (vše Supelco, USA)
- Standardy methylesterů mastných kyselin
Methyl-heneikosanoát, methyl-trikosanoát (oba Sigma-Aldrich, USA), FAME Mix C4 – C24 (Supelco, USA)
- Zařízení pro analýzu na tenké vrstvě
TLC desky, Silica gel G, 20 x 20 cm, 0,5 a 1 mm (Analtech, USA)
Skleněná vyvíjecí komora, 30 x 28 cm (General Glassblowing, USA)
Detekční činidlo 2',7'-dichlorofluorescein (Fluka, Německo)
- Plynový chromatograf s detektory FID a MS Varian 3800GC/4000MS (Palo Alto, USA)

4.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Jako základní biologický materiál byl vybrán kapr obecný (*Cyprinus carpio*), který je běžně dostupný v maloobchodní síti. V metodické části předložené práce (kapitoly 4.3 a 5.1), byl použit i pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*).

Čerstvé ryby, u kapra také filety, jikry a mlíčí byly kupovány v prodejně Lesy a rybníky města Českých Budějovic s. r. o. v letech 2011-2013. Zakoupený materiál byl co nejrychleji přepraven do laboratoře, očištěn, naporcován a zvážen. U vzorků kapra obecného byla odebrána svalovina z hřbetní části bez kůže, u vzorků pstruha duhového byla použita svalovina z celé ryby bez kůže. Vzorky byly ošetřeny lyofilizací (-60 °C, 0,025 mbar, 24 hodin) a uchovány při -20 °C.

Pro metodickou část práce (kapitoly 4.3 a 5.1) týkající se volby extrakčního činidla pro extrakci celkových lipidů byly zpracovány vzorky svaloviny kapra (zakoupený v listopadu 2011), svaloviny pstruha (zakoupený v lednu 2011), mlíčí a jiker kapra (zakoupené v září 2011). Pro každé testované extrakční činidlo byly z každého vzorku provedeny tři paralelní stanovení zahrnující extrakci celkových lipidů, jejich rozdělení do frakcí a stanovení mastných kyselin ve frakcích. Pro studium lipidových frakcí a mastných kyselin ve svalovině, jikrách a mlíčí kapra obecného (kapitoly 5.2 – 5.4) byly vybrány vzorky zakoupené v měsících listopad a prosinec, kdy je konzumace kapra největší. U těchto vzorků byla extrakce celkových lipidů a následná stanovení provedena jednou.

4.3 VÝVOJ METODIKY

4.3.1 Extrakce celkových lipidů

Pro extrakci celkových lipidů z biologického materiálu byla testována čtyři různá extrakční činidla: petrolether, chloroform, směs chloroform – methanol 2:1 (v/v) (Sushchik et al., 2007) a extrakce dle Folcha (Folch et al., 1957) s modifikací pro lyofilizované vzorky (Chuang et al., 2012).

Při extrakci petroletherem, chloroformem a směsí chloroform – methanol 2:1 byly 2 g lyofilizovaného vzorku extrahovány 15 ml příslušného extrakčního činidla při teplotě 4 °C po dobu 24 hodin. Poté byl extrakt filtrován přes filtrační zařízení Supelco napojené na vodní vývěvu a sediment ještě dvakrát promyt 10 ml příslušného extrakčního činidla. Spojené extrakty byly odpařeny proudem dusíku při 40 °C do konstantní hmotnosti.

Pro vzorky extrahované modifikovaným postupem dle Folcha byly 2 g lyofilizovaného vzorku nejprve zvlhčeny 4 ml destilované vody, vzorek byl ponechán 30 minut při laboratorní teplotě a poté byl extrahován 20 ml směsí chloroform – methanol 2:1 (4 °C, 24 hodin). Extrakt získaný po filtraci byl ještě vytřepán 4 ml 0,9 % roztoku NaCl, organická fáze pak byla odpařena proudem dusíku při 40 °C do konstantní hmotnosti.

Získané extrakty celkových lipidů byly před dalším zpracováním uchovány při -20 °C.

Jako optimální extrakční činidlo pro extrakci celkových lipidů z tkání kapra obecného byla vyhodnocena směs chloroform – methanol 2:1 (kapitoly 5.1.1 a 5.1.2). Za určitých podmínek lze také použít extrakci petroletherem (kapitola 5.1.3)

4.3.2 Volba vnitřního standardu

Testovány byly dva dostupné vnitřní standardy, methyl-heneikosanoát a methyl-trikosanoát. Jejich zásobní roztoky byly připraveny v isooktanu v koncentraci 10 mg/ml a dále naředěny na pracovní koncentrace 1 mg/ml a 0,1 mg/ml.

Pro testování možné koeluce s analyty přítomnými v biologických vzorcích bylo 40 µl roztoku vnitřního standardu o koncentraci 1 mg/ml přidáno k 5 mg celkových lipidů vyextrahovaných z tkání kapra obecného a pstruha duhového a rozpuštěných v 500 µl směsi petrolether – dichlormethan 4:1 (v/v). Vzorky byly poté převedeny na methylestery a analyzovány GC/FID (kapitola 4.4).

Jako optimální vnitřní standard byl vyhodnocen methyl-heneikosanoát. Kyselina heneikosanová se v analyzovaných vzorcích nevyskytovala a její methylester nekolidoval při GC analýze s žádnou jinou mastnou kyselinou. U vzorků mlíčí se sice eluoval v blízkosti furanové mastné kyseliny MonoMe(9,5), ale oba píky bylo možné při integraci oddělit. Methyl-trikosanoát u vzorků mlíčí kolidoval s furanovou mastnou kyselinou MonoMe(11,5).

4.3.3 Optimalizace chromatografie na tenké vrstvě

Pro optimalizaci stacionární a mobilní fáze byla použita směs standardů obsahující fosfatidylcholin, 1-monopalmitoyl-rac-glycerol, dipalmitin, kyselinu palmitovou a tristearin (rozpuštěné v chloroformu, každý v koncentraci 2 mg/ml). 100 µl této směsi bylo nanášeno na tenkou vrstvu a vyvíjeno a detekováno finálním postupem uvedeným níže.

Testovány byly desky o rozměrech 20 x 20 cm s tloušťkou silikagelu 0,5 a 1 mm. Jako optimální byly vyhodnoceny desky 0,5 mm. Jejich kapacita je sice nižší, ale analýza je rychlejší a množství silikagelu, ze kterého jsou pak jednotlivé frakce extrahovány, menší. Na zvolené desky bylo možné, v souladu s literaturou (Christie, 1989), dávkovat maximálně 20 mg celkových lipidů, při vyšším množství byla již deska přetížená, jednotlivé frakce tvořily široké a křivé zóny. Množství 20 mg celkových lipidů bylo dostačující pro další analýzy. Ukázalo se také, že je vhodné desky před použitím promýt směsí chloroform – methanol 1:1, jinak se ve slepém vzorku objevovaly nečistoty.

Poměr jednotlivých složek mobilní fáze byl optimalizován s ohledem na dobré oddělení jednotlivých lipidových frakcí a dobu analýzy. Optimální mobilní fáze obsahovala složky hexan – diethylether – kyselina mravenčí v poměru 60:40:2 (v/v).

K optimalizaci extrakce lipidových frakcí z tenké vrstvy byly použity standardy tristearinu, trioleinu a fosfatidylcholinu. Jejich zásobní roztoky byly připraveny

v koncentraci 20 mg/ml v chloroformu. Byla testována dvě různá množství těchto standardů (2 a 5 mg), která byla nanášena na tenkou vrstvu jako zóny široké přibližně 2 cm. Desky se standardy byly vyvíjeny a detekovány finálním postupem uvedeným níže. Poté byla zóna příslušného standardu z tenké vrstvy vyškrabána a přenesena do plastové zkumavky. K ní bylo přidáno 100 µg vnitřního standardu a 6 ml jednoho z testovaných extrakčních činidel: chloroform nebo směs chloroform – methanol v poměru 1:1 nebo 1:2 (v/v). Extrakce byla zopakována ještě dvakrát, pro fosfatidylcholin až pětkrát. Pro oddělení extrakčního činidla obsahujícího lipidy od silikagelu byla testována centrifugace a filtrace na zařízení Supelco napojeném na vodní vývěvu. Spojené extrakty pak byly odpařeny dosucha a rozpuštěny v 500 µl petroletheru, v případě fosfatidylcholinu v 500 µl směsi petrolether – dichlormethan 4:1 (v/v). Vzorky byly dále převedeny na methylestery a analyzovány GC/FID (kapitola 4.4). Pro optimalizaci extrakce lipidových frakcí z tenké vrstvy byla sledována výtěžnost standardů z tenké vrstvy. Výtěžnost byla vypočítána jako podíl poměrů ploch příslušného standardu a vnitřního standardu vzorku vyvíjeného na TLC a vzorku analyzovaného přímo plynovou chromatografií bez předchozí TLC.

Přídavek methanolu k extrakčnímu činidlu se ukázal významný u frakce polárních lipidů, pro triacylglyceroly vyhovovala extrakce chloroformem. K oddělení organické fáze obsahující lipidy od silikagelu se lépe osvědčila filtrace, díky níž došlo k zvýšení výtěžnosti pro standardy tristearinu a trioleinu na 92 a 98 %, pro fosfatidylcholin na 62 %. Více fosfatidylcholinu se neuvolnilo ani při zvýšeném přídávku methanolu do extrakčního činidla ani několikrát opakovanou extrakcí. Bylo otestováno, že během filtrace a následujících operací už k žádným ztrátám nedochází, použití kyselého místo alkalicky katalyzované přípravy methylesterů také výtěžnost nezvýšilo. Fosfatidylcholin se pravděpodobně silně a nevratně váže na silanolové skupiny silikagelu. Dochází tedy k určitému podhodnocení této lipidové frakce. Výtěžnost by mohla být zvýšena extrakcí za vyšší teploty, kde je však riziko degradace polynenasycených mastných kyselin. Nižší výtěžek polárních lipidů byl reprodukovatelný a vzhledem k tomu, že v předložené práci šlo především o izolaci dané frakce a profil v ní obsažených mastných kyselin, tento krok již dále optimalizován nebyl.

Vývoj metodiky vedl k níže popsanému finálnímu postupu pro separaci celkových lipidů na jednotlivé lipidové frakce. Frakce byly na tenké vrstvě dobře oddělené a jejich vzdálenost od startu rostla v tomto pořadí: polární lipidy, monoacylglyceroly, 1,2-diacylglyceroly, 1,3-diacylglyceroly, volné mastné kyseliny a triacylglyceroly. Vzhledem k citlivosti některých mastných kyselin, zejména polynenasycených a furanových, byl celý

postup prováděn co nejrychleji, vyvíjecí komora i zkumavky byly chráněny před denním světlem alobalem a analyty byly ponechány na silikagelu jen nezbytně dlouhou dobu.

4.3.4 Finální postup separace celkových lipidů na tenké vrstvě

20 mg celkových lipidů bylo rozpuštěno v 300 μ l chloroformu a nanášeno na skleněnou desku pokrytou silikagelem téměř po celé její šířce. Pouze do levé části desky byla nanášena asi 1 cm zóna 50 μ l směsi standardů sloužících k identifikaci jednotlivých lipidových frakcí. Tato směs obsahovala fosfatidylcholin, 1-monostearoylglycerol, distearin, kyselinu stearovou a tristearin rozpuštěné v chloroformu, každý v koncentraci 2 mg/ml.

Po nanesení a zaschnutí vzorku byla deska vyvíjena v mobilní fázi o složení hexan – diethylether – kyselina mravenčí 60:40:2 (v/v) ve vyvíjecí komoře, která byla předem sycena parami mobilní fáze alespoň 1 hodinu. Vyvíjení desky bylo dokončeno, když čelo rozpouštědla dosáhlo vzdálenosti asi 1 cm od horního okraje desky. Deska byla usušena na vzduchu a postříkána detekčním činidlem (0,1 % roztok dichlorofluoresceinu v 95% methanolu). Jednotlivé lipidové frakce byly vizualizovány při vlnových délkách 254 a 365 nm a jejich retenční faktory byly porovnány se současně analyzovanou směsí standardů.

Silikagel s příslušnou frakcí byl vyškrabán do plastové zkumavky a ke každé frakci byl přidán roztok vnitřního standardu, methyl-heneikosanoátu rozpuštěného v isooktanu, v množství uvedeném v Tabulce 2.

Tab. 2 Množství (μ g) vnitřního standardu přidaného k lipidovým frakcím.

Lipidová frakce	Svalovina kapra obecného a pstruha duhového	Jikry a mlíčí kapra obecného
Polární lipidy	2	40
Diacylglyceroly	40	40
Volné mastné kyseliny	2	2
Triacylglyceroly	400	40

Jednotlivé lipidové frakce byly ze silikagelu uvolněny extrakcí chloroformem (2 x 10 ml), v případě polárních lipidů byla místo chloroformu použita směs chloroform – methanol 1:1 (v/v). K oddělení supernatantu s lipidy od silikagelu bylo použito filtrační zařízení Supelco, které bylo mezi jednotlivými frakcemi promýváno dichlormethanem. Po

odpaření rozpouštědla byly jednotlivé lipidové frakce rozpuštěny v 500 μ l petroletheru, s výjimkou polárních lipidů, které byly rozpuštěny v 500 μ l směsi petrolether – dichlormethan 4:1 (v/v). Takto připravené lipidové frakce byly dále převedeny na methylestery a analyzovány plynovou chromatografií (kapitola 4.4).

4.4 ANALÝZA MASTNÝCH KYSELIN

4.4.1 Příprava methylesterů mastných kyselin

Pro přípravu methylesterů mastných kyselin vázaných v lipidových frakcích polárních lipidů, monoacyl-, diacyl- a triacylglycerolů byla použita alkalicky katalyzovaná reesterifikace. Ke vzorku bylo přidáno 200 μ l KOH v methanolu ($c = 2$ mol/l), reakční směs byla inkubována 2 minuty při 60 °C, ochlazena, neutralizována 400 μ l HCl v methanolu ($c = 1$ mol/l) a naředěna 500 μ l petroletheru.

Pro přípravu methylesterů volných mastných kyselin byla použita kyselá katalyzovaná esterifikace. Ke vzorku byl přidán 1 ml HCl v methanolu ($c = 3$ mol/l), reakční směs byla inkubována 15 minut při 70 °C, ochlazena a naředěna 500 μ l petroletheru. Petroletherová vrstva byla odebrána a neutralizována přídatkem Na_2CO_3 .

Pro přípravu methylesterů mastných kyselin ze vzorku celkových lipidů bylo 5 mg lipidů rozpuštěno v 500 μ l směsi petrolether – dichlormethan 4:1 (v/v), přidáno 40 μ g vnitřního standardu a podrobena alkalicky katalyzované reesterifikaci.

U některých vzorků bylo třeba připravené methylestery upravit na koncentraci vhodnou pro následující analýzu plynovou chromatografií. Triacylglycerolová frakce pocházející ze svaloviny byla naředěna desetkrát, frakce polárních lipidů ze svaloviny a všechny frakce volných mastných kyselin byly částečně odpařeny při 40 °C pod dusíkem.

4.4.2 Analýza methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií

Připravené methylestery mastných kyselin byly analyzovány na plynovém chromatografu vybaveném plamenově ionizačním detektorem i hmotnostním spektrometrem. Na kapilární kolonu Varian CP 7419 (Select FAME 50m 0,25mm 0,25 μ m) byl dávkován 1 μ l vzorku methylesterů mastných kyselin rozpuštěných v petroletheru se splitem 10. Teplotní program byl následující: 6 minut při 170 °C, poté nárůst na 190 °C rychlostí 2 °C/min, poté zvýšení teploty na 210 °C rychlostí 25 °C/min a konstantní teplota 250 °C po dobu 15 minut. Jako nosný plyn bylo použito helium, jehož

průtok byl nastaven na 1,8 ml/min. Teplota injektoru a plamenově ionizačního detektoru byla nastavena na 250 °C. Za těchto podmínek bylo možné rozdělit více než čtyřicet methylesterů mastných kyselin během 30 minutové analýzy (Obr. 8 v kapitole 5.1.4). Jejich retenční čas vzrůstal s rostoucím počtem atomů uhlíků v molekule a bylo možné rozlišit i polohové a geometrické izomery.

Pro GC/MS analýzy byly zachovány výše uvedené podmínky GC separace, u hmotnostního detektoru bylo použito doporučené nastavení výrobce a spektra byla snímána kontinuálně v rozsahu 70 – 450 amu. Byla zaznamenána spektra získaná chemickou ionizací s acetonitrilem i spektra získaná elektronovou ionizací.

Jednotlivé mastné kyseliny byly identifikovány na základě retenčních časů (porovnáním s komerčně dostupnými standardy) a hmotnostních spekter. Spektra získaná chemickou ionizací s acetonitrilem obsahovala kromě molekulového iontu MH^+ diagnosticky významné adukty $[M+54]^+$ a další charakteristické ionty $[M-32]^+$ a $[M-18-13]^+$ vhodné pro identifikaci (Michaud et al., 2002). U skupiny furanových mastných kyselin měla větší význam spektra získaná elektronovou ionizací, která byla porovnána s daty v NIST knihovně spekter a s literaturou (Pacetti et al., 2010; Vetter et al., 2012).

Pro kvantitativní stanovení methylesterů mastných kyselin byl použit plamenově ionizační detektor. Kvantitativní zastoupení mastných kyselin ve vzorku bylo vypočítáno na základě ploch píků v GC/FID chromatogramu, relativní odezva detektoru byla považována za konstantní. Zastoupení jednotlivých mastných kyselin bylo vyjádřeno v procentech celkových mastných kyselin identifikovaných ve vzorku.

Zastoupení jednotlivých lipidových frakcí v celkových lipidech bylo vypočítáno pomocí mastných kyselin. Lipidové frakce byly vyjádřeny jako hmotnostní procenta v nich vázaných mastných kyselin vztažená k mastným kyselinám vázaným ve všech frakcích. Hmotnost mastných kyselin v dané frakci byla vypočítána na základě celkové plochy všech mastných kyselin a známého množství přidaného vnitřního standardu.

V analyzovaných vzorcích bylo sledováno více než 40 mastných kyselin se zastoupením v rozmezí 0,01 % až 30 % celkových mastných kyselin v jedné analýze. Jako mez detekce z hlediska daného chromatogramu byly vyhodnoceny píky, jejichž zastoupení v celkových mastných kyselinách bylo 0,01 %. U těchto minoritních mastných kyselin variační koeficient pro tři opakování dosahoval hodnot 50 i více %. Jako mez stanovitelnosti byly vyhodnoceny píky se zastoupením 0,05 %, kde se variační koeficient pohyboval kolem 20 %. Na základě údajů o dávkování vzorku do GC a pomocí vnitřního

standardu bylo vypočítáno množství methylestrů mastných kyselin odpovídající mezi detekce 0,04 ng a mezi stanovitelnosti 0,2 ng.

Záznam a zpracování dat získaných při GC/FID a GC/MS analýzách bylo provedeno pomocí software MS Workstation 6.9.

4.5 STABILITA

Celkové lipidy vyextrahované ze studovaných vzorků, odpařené dosucha a uchovávané při -20 °C, byly stabilní minimálně dva roky. Při opakovaném stanovení zastoupení mastných kyselin byly variační koeficienty nižší než 5 %, pro některé minoritní mastné kyseliny dosahovaly nejvýše 10 %.

Vzorky methylesterů mastných kyselin rozpuštěné v petroletheru byly uchovávány při 4 °C a byly také stabilní minimálně dva roky. Hodnoty variačních koeficientů vycházely do 5 % i pro minoritní mastné kyseliny.

Podobná stabilita byla potvrzena i u roztoku vnitřních standardů, methyl-heneikosanoátu a methyl-trikosanoátu, rozpuštěných v isooktanu.

4.6 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Pro statistické zpracování výsledků byl použit program Microsoft Excel 2010 a program Statistica 12 (StatSoft, ČR).

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 VÝVOJ METODIKY

5.1.1 Vliv extrakčního činidla na celkové lipidy

Pro extrakci celkových lipidů ze vzorků ryb byla testována čtyři různá extrakční činidla lišící se svou polaritou: petrolether, chloroform, směs chloroform – methanol (Sushchik et al., 2007) a postup dle Folcha upravený pro lyofilizované vzorky (Folch et al., 1956; Chuang et al., 2012). Postup dle Folcha je pro extrakci lipidů z biologických vzorků používán nejčastěji a zde při vývoji metodiky sloužil jako postup srovnávací.

Množství celkových lipidů získané jednotlivými extrakčními postupy je uvedeno v Tabulce 3 a je vyjádřeno v procentech lyofilizované sušiny. Mezi jednotlivými rozpouštědly se projeví rozdíly způsobené především rozdílným charakterem biologického vzorku.

Tab. 3 Množství celkových lipidů (% lyofilizované sušiny) získané z tkání ryb různými extrakčními činidly.

Tkáň	Extrakční činidlo			
	Petrolether	CHCl ₃	CHCl ₃ -CH ₃ OH	Dle Folcha
Svalovina				
kapra obecného	27,0 ± 3,65	25,0 ± 1,86	26,3 ± 4,67	25,6 ± 2,10
Svalovina				
pstruha duhového	7,34 ± 0,28	15,2 ± 0,86	18,1 ± 0,91	11,3 ± 0,49
Mlčí				
kapra obecného	6,99 ± 0,70	10,1 ± 1,12	10,6 ± 1,01	8,12 ± 0,51
Jikry				
kapra obecného	3,29 ± 0,95	7,85 ± 0,64	13,6 ± 2,01	11,5 ± 1,14

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka, n = 3.

Nejvíce celkových lipidů (v průměru 26,0 %) bylo získáno ze svaloviny kapra obecného a vliv extrakčního činidla se zde příliš neprojevil. Ve svalovině kapra obecného převažují triacylglyceroly (Tab. 4 a diskuse níže) a pro jejich uvolnění z matrice dostatečně vyhovuje nepolární petrolether.

U vzorků svaloviny pstruha duhového a především jiker a mlíčí kapra obecného, se již přídavek methanolu do extrakčního činidla projevil. Nejnižší výtěžek celkových lipidů byl získán při extrakci petroletherem, u vzorků svaloviny pstruha 7,3 %, mlíčí 7,0 % a jiker 3,3 %, naopak nejvyšší při extrakci směsí chloroform – methanol, u svaloviny pstruha 18,1 %, mlíčí 10,6 a jiker 13,6 %. U těchto vzorků roste zastoupení polárních lipidů (Tab. 4), pro jejichž extrakci je přídavek polárního rozpouštědla významný. Methanol v extrakčním činidle má však za následek, že se ve větší míře extrahují také středně polární nelipidové příměsi (Meier et al., 2006; Xiao et al., 2012; Fiorini et al., 2013). Proto postup dle Folcha zahrnuje ještě vytřepání extraktu získaného směsí chloroform – methanol do vodného roztoku soli, což se projeví mírným poklesem celkových lipidů, u svaloviny pstruha na 11,5 %, mlíčí 8,1 % a jiker 11,5 %.

5.1.2 Vliv extrakčního činidla na lipidové frakce

Použité extrakční činidlo mělo vliv také na zastoupení jednotlivých lipidových frakcí v celkových lipidech získaných z různých tkání ryb (Tab. 4). Lipidové frakce jsou zde vyjádřené jako váhová % v nich vázaných mastných kyselin vztažená k mastným kyselinám ve všech frakcích.

Triacylglyceroly (TAG), diacylglyceroly (DAG) a polární lipidy (PL) jsou zastoupené ve všech typech analyzovaných vzorků. Ve svalovině pstruha duhového a v jikrách a mlíčí kapra obecného bylo navíc detekováno malé množství volných mastných kyselin (FFA), které může svědčit o jistém stupni hydrolýzy lipidů (Xiao et al., 2012), u jiker a mlíčí může také souviset s vyšším zastoupením polárních lipidů.

Svaloviny kapra obecného a pstruha duhového představují matrice s převahou triacylglycerolů, které v nich tvořily více než 97 % (kapr) a 88 % (pstruh) celkových lipidů pro všechna testovaná extrakční činidla. Naopak jikry a mlíčí kapra obecného jsou matrice s vysokým obsahem polárních lipidů, které tvořily až 73 % celkových lipidů u vzorků mlíčí a 56 % u vzorků jiker při použití extrakčního postupu dle Folcha. U tohoto typu vzorků je nutná extrakce činidlem obsahujícím methanol, použití petroletheru, ale i samotného chloroformu vede k podhodnocení frakce polárních lipidů.

Rozdíly v zastoupení jednotlivých lipidových frakcí v závislosti na použitém extrakčním činidle byly vyhodnoceny t-testem, který prokázal statisticky významný rozdíl ($\alpha = 0,05$) pro metodu extrakce s přídavkem a bez přídavku methanolu. Rozdíl byl prokázán pro lipidové frakce TAG a PL u všech vzorků kapra obecného (svalovina, jikry, mlíčí) a pro frakci PL u svaloviny pstruha duhového.

Tab. 4 Zastoupení mastných kyselin v lipidových frakcích (%)^{*} celkových lipidů získaných různými extrakčními činidly.

Tkáň	Lipidová frakce	Extrakční činidlo			
		Petrolether	CHCl ₃	CHCl ₃ -CH ₃ OH	Dle Folcha
Svalovina kapa obecného	PL	0,71 ± 0,17	1,18 ± 0,29	2,58 ± 0,88	1,83 ± 0,56
	DAG	0,62 ± 0,16	0,69 ± 0,13	0,67 ± 0,10	0,71 ± 0,02
	TAG	98,7 ± 0,33	98,1 ± 0,26	96,7 ± 1,18	97,5 ± 0,66
Svalovina pstruha duhového	PL	2,27 ± 0,54	2,06 ± 0,63	4,08 ± 0,18	3,84 ± 0,91
	DAG	3,63 ± 0,81	2,97 ± 0,63	3,64 ± 0,65	3,15 ± 0,79
	FFA	4,14 ± 1,15	4,80 ± 0,79	4,17 ± 0,13	4,43 ± 0,32
	TAG	90,0 ± 2,53	90,2 ± 2,42	88,1 ± 1,60	88,6 ± 2,02
Mlčí kapa obecného	PL	46,7 ± 5,64	64,6 ± 4,15	72,7 ± 7,91	73,4 ± 2,03
	DAG	4,16 ± 0,85	4,05 ± 1,22	3,51 ± 0,63	4,27 ± 0,28
	FFA	nd	1,70 ± 0,55	1,23 ± 0,52	1,81 ± 1,50
	TAG	49,2 ± 4,79	29,7 ± 6,69	22,6 ± 9,01	20,5 ± 3,83
Jikry kapa obecného	PL	19,8 ± 1,43	33,8 ± 2,16	55,3 ± 2,78	55,8 ± 3,52
	DAG	5,15 ± 0,77	1,66 ± 0,42	2,24 ± 0,51	1,48 ± 0,27
	FFA	nd	1,02 ± 0,12	1,16 ± 0,46	1,38 ± 0,35
	TAG	75,0 ± 5,48	63,5 ± 6,13	41,4 ± 3,81	41,3 ± 4,01

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka, n = 3.

^{*}Váhová % MK v jednotlivých frakcích vztažená k celkovým MK ve všech frakcích.

MK mastné kyseliny, PL polární lipidy, DAG diacylglyceroly, FFA volné mastné kyseliny, TAG triacylglyceroly; nd nebylo detekováno.

5.1.3 Extrakce celkových lipidů petroletherem

Při vývoji metodiky bylo ještě podrobně prostudováno spektrum mastných kyselin ve svalovině kapra obecného a pstruha duhového a příspěvek polárních lipidů a triacylglycerolů k celkovému spektru mastných kyselin. U tohoto typu tkání (převaha nepolárních lipidů) literatura uvádí možnost extrakce i čistými rozpouštědly (např. diethylether, chloroform, hexan, petrolether), která mají pro rutinní extrakce velkého počtu vzorků řadu výhod (rychlost, šetrnost k labilním mastným kyselinám, minimum nelipidových příměsí). Navíc i polární složené lipidy mohou přejít v přítomnosti nadbytku triacylglycerolů do rozpouštědla nepolárního, v němž obvykle rozpustné nejsou (Christie, 1993).

U vzorků svaloviny kapra (Tab. 5A) a pstruha (Tab. 5B) bylo porovnáno zastoupení mastných kyselin v triacylglycerolových frakcích získaných extrakcí jednotlivými extrakčními činidly. Z hodnot zastoupení bylo pro každou mastnou kyselinu určeno variační rozpětí a vypočítána maximální odchylka od celkového průměru. Ta činila nejvýše 5 % pro mastné kyseliny se zastoupením větším než 1 % celkových MK a nejvýše 10 % pro mastné kyseliny se zastoupením menším. Je tedy možné konstatovat, že vzhledem k běžné chybě analytického stanovení, která se pohybuje v jednotkách procent, se jednotlivé triacylglycerolové frakce od sebe neliší.

Dále bylo zastoupení mastných kyselin v triacylglycerolech (celkový průměr) porovnáno s jejich zastoupením v petroletherovém extraktu celkových lipidů. Zastoupení mastných kyselin v petroletherovém extraktu nevybočovalo z hodnot variačního rozpětí stanoveného pro jednotlivé mastné kyseliny. Celkové spektrum mastných kyselin je tedy rozhodujícím způsobem dáno triacylglycerolovou frakcí. Příspěvek kyselin z ostatních minoritních frakcí (polární lipidy, diacylglyceroly a volné mastné kyseliny) je menší než je běžná chyba analytického stanovení a tyto mastné kyseliny se v celkovém spektru MK neprojeví.

Tento dílčí výsledek získaný při vývoji metodiky potvrzuje, že petrolether lze použít jako extrakční činidlo pro studium mastných kyselin. Je však vhodný pouze v případech, kdy se jedná o biologické vzorky s převahou neutrálních lipidů a cílem práce je celkové spektrum mastných kyselin. Potom tento rychlý, levný a k analytům šetrný postup poskytne výsledky srovnatelné se složitějšími a časově náročnějšími postupy.

Tab. 5A Svalovina kapra obecného. Zastoupení mastných kyselin (% celkových MK) v triacylglycerolových frakcích získaných různými extrakčními činidly a v petrol-etherovém extraktu celkových lipidů.

Mastná kyselina	Triacylglyceroly						PE extrakt celkových lipidů
	Petrol- ether	CHCl ₃	CHCl ₃ - CH ₃ OH	Dle Folcha	Celkový průměr	Variační rozpětí	
14:0	0,90	0,90	0,93	0,90	0,91	0,10	0,95
16:0	19,7	19,9	19,8	20,0	19,9	1,22	20,2
16:1n-7	10,6	10,5	10,9	10,6	10,6	1,09	10,9
18:0	5,53	5,83	5,55	5,82	5,68	0,54	5,50
18:1n-9	45,6	45,5	45,2	45,5	45,4	1,21	45,0
18:1n-7	3,29	3,33	3,30	3,28	3,30	0,16	3,25
18:2n-6	5,53	5,65	5,66	5,55	5,60	0,40	5,46
18:3n-3	0,80	0,76	0,77	0,76	0,77	0,10	0,77
20:1n-11	0,68	0,65	0,64	0,64	0,65	0,10	0,63
20:1n-9	2,06	2,04	1,99	2,03	2,03	0,17	1,97
20:3	0,50	0,49	0,49	0,48	0,49	0,08	0,50
20:4 n-6	0,42	0,40	0,42	0,39	0,41	0,09	0,46
20:5n-3	0,37	0,35	0,37	0,35	0,36	0,10	0,37
22:6n-3	0,31	0,28	0,32	0,27	0,30	0,10	0,36

Hodnoty jsou uvedené jako průměr, n = 3, pro celkový průměr n = 12; variační rozpětí je určeno ze 12 hodnot; uvažovány jsou pouze MK > 0,3 % celkových MK.

MK mastné kyseliny, PE petrolether.

Tab. 5B Svalovina pstruha duhového. Zastoupení mastných kyselin (% celkových MK) v triacylglycerolových frakcích získaných různými extrakčními činidly a v petrol-etherovém extraktu celkových lipidů.

Mastná kyselina	Triacylglyceroly						PE extrakt celkových lipidů
	Petrol-ether	CHCl ₃	CHCl ₃ -CH ₃ OH	Dle Folcha	Celkový průměr	Variační rozpětí	
14:0	3,03	3,02	2,98	2,89	2,98	0,22	3,10
16:0	12,7	12,5	12,5	12,4	12,5	0,84	13,0
16:1n-7	4,12	4,13	4,27	4,23	4,19	0,32	4,36
18:0	2,75	2,79	2,71	2,89	2,79	0,30	2,76
18:1n-9	37,1	36,9	37,0	37,0	37,0	1,28	36,1
18:1n-7	3,47	3,46	3,45	3,46	3,46	0,20	3,32
18:2n-6	11,8	12,0	11,7	11,6	11,8	0,80	11,3
18:3n-3	3,21	3,27	3,19	3,13	3,20	0,21	3,13
18:4	0,98	1,00	1,03	1,02	1,01	0,12	0,98
20:1n-9	3,92	3,94	4,01	3,97	3,96	0,18	3,85
20:2n-6	0,63	0,62	0,67	0,69	0,65	0,13	0,61
22:1n-9	2,89	2,91	3,11	3,12	3,01	0,32	2,96
22:1n-7	0,44	0,44	0,51	0,55	0,49	0,13	0,45
20:5n-3	1,96	2,08	1,99	2,00	2,00	0,39	2,05
22:4n-1	0,36	0,35	0,39	0,41	0,38	0,08	0,39
22:5n-3	0,73	0,75	0,77	0,76	0,75	0,05	0,78
22:6n-3	4,87	4,91	5,05	5,00	4,96	0,49	5,31

Hodnoty jsou uvedené jako průměr, n = 3, pro celkový průměr n = 12; variační rozpětí je určeno ze 12 hodnot; uvažovány jsou pouze MK > 0,3 % celkových MK.

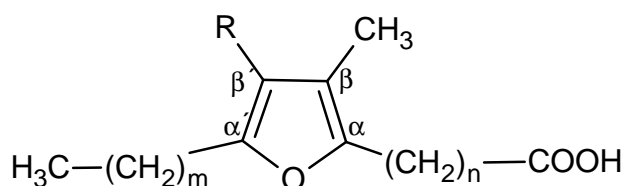
MK mastné kyseliny, PE petrolether.

Vzhledem k tomu, že předložená práce je zaměřena na studium mastných kyselin nejen ve svalovině, ale i v jikrách a mlíčí, které jsou bohaté na polární lipidy, byla pro extrakci celkových lipidů zvolena směs chloroform – methanol. Zastoupení lipidových frakcí v celkovém lipidu získaném tímto činidlem se neliší (na hladině $\alpha = 0,5$) od zastoupení získaného postupem dle Folcha (Tab. 4).

5.1.4 Identifikace furanových mastných kyselin

Při analýze vzorků mlíčí kapra obecného plynovou chromatografií byly detekovány výrazné píky, které neodpovídaly standardům běžných mastných kyselin. Nezvykle vysoké množství těchto analytů vedlo ke snaze o jejich identifikaci a o podrobné prostudování jejich distribuce v lipidových frakcích tkání kapra obecného.

Analyty byly identifikovány jako furanové mastné kyseliny (F-kyseliny). Jedná se o skupinu látek s charakteristickou strukturou, jejímž základem je furanové jádro substituované v poloze α karboxyalkylovým řetězcem (obvykle se 7, 9, 11 nebo 13 uhlíky) a v poloze α' alkylovým řetězcem (obvykle se 3 nebo 5 uhlíky). Polohy beta jsou obsazeny jedním nebo dvěma methyly (Obr. 7).



Obr. 7 Obecná struktura furanových mastných kyselin.

Furanové mastné kyseliny (kapitola 2.5) jsou v živých organismech poměrně rozšířené, ale vzhledem k jejich nestabilitě a také nízkým koncentracím se většina prací zaměřených na mastné kyseliny jimi nezabývá. U kapra obecného byly tyto látky naposledy popsány v 90. letech minulého století (Ishii et al., 1988a). Jejich význam a působení v živých organismech jsou stále předmětem výzkumu. Díky svým antioxidačním vlastnostem mohou mít tyto látky význam při ochraně nestabilních polynenasycených mastných kyselin, zejména n-3 PUFA (kapitola 2.5.4).

V mlíčí kapra obecného bylo identifikováno celkem osm různých furanových mastných kyselin (Tab. 6 a kapitola 5.4). Některé z nich pak byly detekovány i v lipidových frakcích vzorků svaloviny a jiker kapra obecného, ale v mnohem menším zastoupení.

Tab. 6

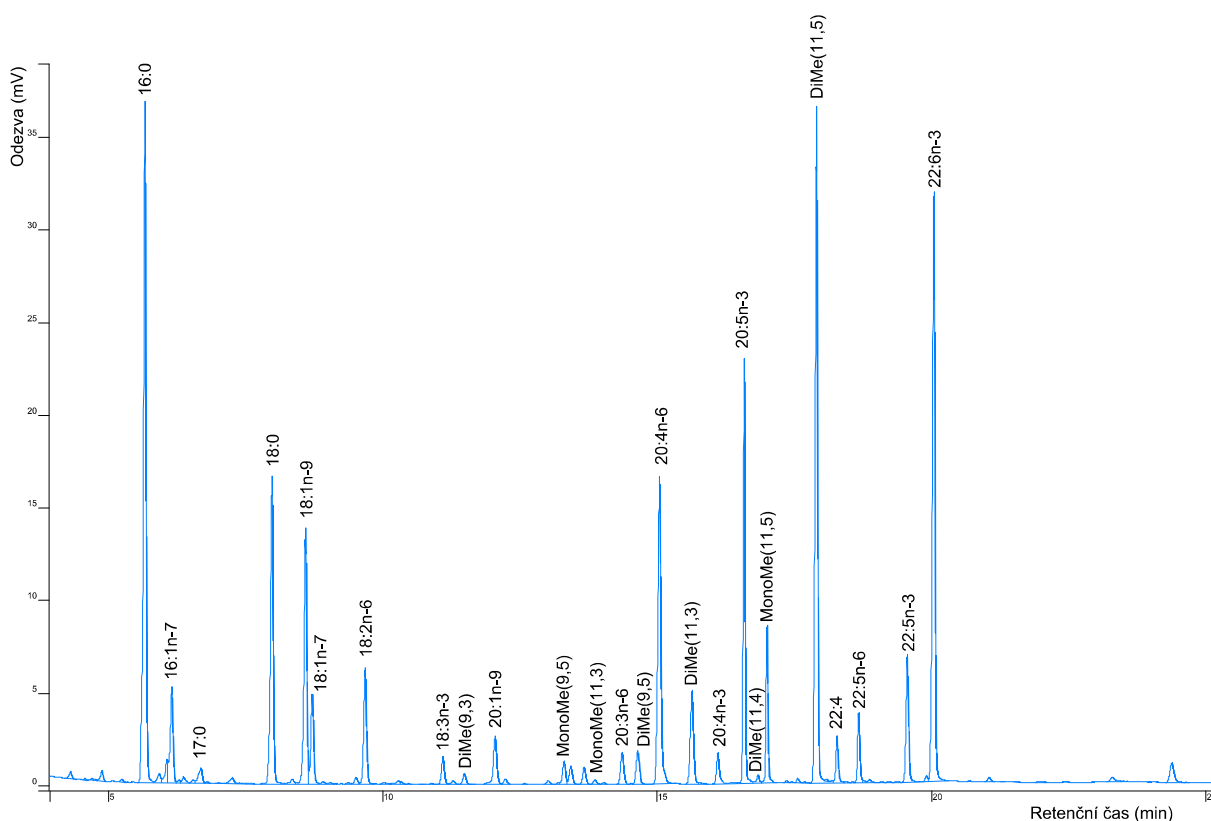
Furanové mastné kyseliny identifikované v lipidech mlíčí kapra obecného a GC/MS charakteristiky jejich methylesterů.

Označení	Název F-kyseliny	m	n	R	CI	EI	
F-kyseliny					[M+H] ⁺	M ⁺	Charakteristické ionty
DiMe(9,3)	10,13-epoxy-11,12-dimethylhexadeka-10,12-dienová	2	8	CH ₃	309	308	123, 151, 279
MonoMe(9,5)	10,13-epoxy-11-methyloktadeka-10,12-dienová	4	8	H	323	322	109, 165, 265
MonoMe(11,3)	12,15-epoxy-13-methyloktadeka-12,14-dienová	2	10	H	323	322	109, 137, 293
DiMe(9,5)	10,13-epoxy-11,12-dimethyloktadeka-10,12-dienová	4	8	CH ₃	337	336	123, 179, 279
DiMe(11,3)	12,15-epoxy-13,14-dimethyloktadeka-12,14-dienová	2	10	CH ₃	337	336	123, 151, 307
DiMe(11,4)	12,15-epoxy-13,14-dimethylnonadeka-12,14-dienová	3	10	CH ₃	351	350	123, 165, 307
MonoMe(11,5)	12,15-epoxy-13-methyleikosa-12,14-dienová	4	10	H	351	350	109, 165, 293
DiMe(11,5)	12,15-epoxy-13,14-dimethyleikosa-12,14-dienová	4	10	CH ₃	365	364	123, 179, 307

Obecná struktura F-kyselin (Obr. 6): m = počet uhlíků v alkylovém řetězci, n = počet uhlíků v karboxyalkylovém řetězci, R = substituent β poloze; CI chemická ionizace, EI elektronová ionizace; [M+H]⁺ protonovaná molekula, M⁺ molekulární ion.

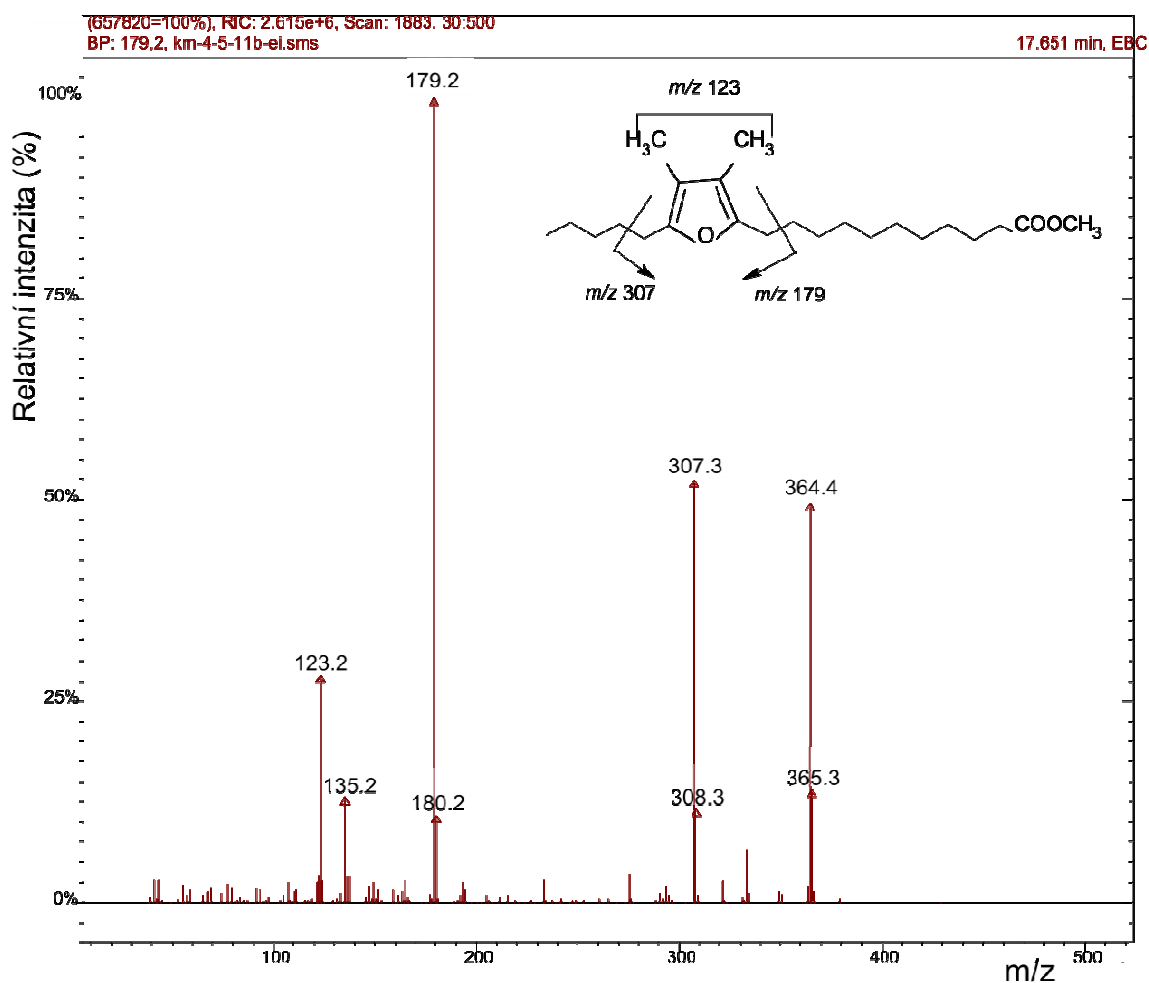
Díky rozdělení celkových lipidů na jednotlivé lipidové frakce a poměrně vysokému zastoupení F-kyselin v mlíčí, byla možná jejich přímá identifikace bez předchozí úpravy vzorků, která je jinak v literatuře často zmiňovaná (Glass et al., 1977; Ishii et al., 1988a, b; Vetter et al., 2012 a kapitola 2.5.5). Také práce s lyofilizovaným vzorkem, kdy je enzymatická aktivita minimální, a extrakce pouze organickými rozpouštědly přispěly k jejich detekci. F-kyseliny jsou velice náchylné k oxidaci a ve vodných extrakčních mediích, ale i na silikagelu se snadno rozkládají (Wakimoto et al., 2011).

Při analýze plynovou chromatografií byly methylestery F-kyselin dobře oddělené od ostatních analytů, jejich eluce závisela především na počtu uhlíkových atomů, retenční čas se zvyšoval s jejich rostoucí molekulovou hmotností (Obr. 8).



Obr. 8 GC/FID chromatogram methylesterů mastných kyselin ve vzorku celkových lipidů mlíčí kapra obecného. Vyznačeny jsou nejvýznamnější mastné kyseliny včetně všech furanových.

K identifikaci F-kyselin byla použita hmotnostní spektra jejich methylestrů. Zatímco spektra získaná chemickou ionizací s acetonitrilem mnoho strukturálních informací nepřinesla, neboť ve spektru převládá pouze jeden ion $[M+H]^+$, spektra získaná elektronovou ionizací obsahovala tři charakteristické iony (Obr. 9): základní ion vzniklý odštěpením alkylesterového řetězce a dva fragmentové ionty vzniklé odštěpením pouze alkylu nebo alkylu i alkylesterového řetězce. Získaná spektra byla porovnána s NIST knihovnou spekter a s údaji v literatuře (Pacetti et al., 2010, Vetter et al., 2012).



Obr. 9 EI-MS spektrum methylesteru kyseliny 12,15-epoxy-13,14-dimethyleikosa-12,14-dienové, DiMe(11,5).

5.2 SVALOVINA KAPRA OBECNÉHO

Pro studium mastných kyselin v lipidech svaloviny kapra obecného bylo zpracováno 13 jedinců. Celkové lipidy byly ze svaloviny vyextrahovány směsí chloroform – methanol (kapitola 4.3.1), poté byly rozděleny finálním postupem pro separaci na tenké vrstvě na jednotlivé lipidové frakce (kapitola 4.3.4), ve kterých byl profil mastných kyselin stanoven plynovou chromatografií (kapitola 4.4).

Obsah celkových lipidů ve studovaných vzorcích svaloviny kapra obecného se pohyboval v rozmezí 5 – 6 % (vztaženo na čerstvou hmotnost vzorku). Přestože předložená práce byla zaměřena na studium lipidových frakcí a mastných kyselin a postup extrakce byl spíše semikvantitativní, nalezený obsah lipidů je v dobrém souladu s literaturou. Kapr patří mezi ryby středně tučné s obsahem celkových lipidů v rozmezí 5 až 10 % (Li et al., 2011; Zajíc et al., 2011). Pro celkové lipidy kapra obecného pocházejícího z podzimního nebo zimního období byly v literatuře nalezeny následující hodnoty: 5,71 % (Kmínková et al., 2001), 7,02 % (Buchtová et al., 2008), 5,35 % pro kapra obecného chovaného v Číně (Li et al., 2011) a 2,98 – 3,78 % pro kapra obecného z Kaspického moře (Yeganeh et al., 2009). Poměrně široké rozmezí obsahu lipidů ve filetech kapra obecného zakoupených v prosinci, 6,3 – 15 %, uvádí ve své práci Ljubojević et al. (2013). Při porovnání literárních údajů je však třeba vzít v úvahu, že obsah lipidů i mastných kyselin ovlivňuje řada faktorů, z nichž k nejvýznamnějším patří typ vodního prostředí, podmínky chovu, výživa, roční období, stáří jedinců a typ tkáně (kapitola 2.3).

V Tabulce 7 jsou uvedeny lipidové frakce získané z celkových lipidů svaloviny a zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin v těchto frakcích. V celkových lipidech svaloviny převažovaly triacylglyceroly (96,7 %), následované polárními lipidy (2,4 %) a diacylglyceroly (0,7 %). Triacylglyceroly byly majoritní lipidovou frakcí také ve filetech kapra obecného (Mráz et al., 2009; Zajíc et al., 2013) a pstruha duhového (Kiessling et al., 2001). Triacylglyceroly tvoří zásobní lipidy a je pro ně typické vysoké zastoupení mononenasyčených mastných kyselin. Ve studovaných vzorcích tvořily mononenasyčené (MUFA) 51,8 %, nasycené (SFA) 29,3 % a polynenasycené (PUFA) 19,0 % celkových MK. Vyšší zastoupení PUFA (53,4 %) bylo nalezeno v polárních lipidech, zastoupení SFA (27,7 %) zde bylo podobné jako v triacylglycerolech, ale zastoupení MUFA (18,9 %) výrazně nižší. Polynenasycené mastné kyseliny jsou významnou součástí polárních lipidů, především fosfolipidů, které se podílejí na stavbě biologických membrán (Tocher, 2010).

V diacylglycerolové frakci převažovaly MUFA (38,9 %), následované SFA (32,9 %) a PUFA (28,1 %).

Tab. 7 Svalovina kapra obecného. Zastoupení mastných kyselin v lipidových frakcích (%)^{*} celkových lipidů a zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin (% celkových MK) v těchto frakcích.

Lipidové frakce [*]	SFA	MUFA	PUFA	F-kyseliny
Polární lipidy	27,7 ± 7,15	18,9 ± 6,36	53,4 ± 13,4	< 0,05
	2,41 ± 0,48			
Diacylglyceroly	32,9 ± 3,53	38,9 ± 8,07	28,1 ± 11,0	< 0,05
	0,68 ± 0,03			
Triacylglyceroly	29,3 ± 1,65	51,8 ± 7,95	19,0 ± 7,54	< 0,05
	96,9 ± 0,58			

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka, n = 13.

^{*}Váhová % MK v jednotlivých frakcích vztažená k celkovým MK ve všech frakcích.

MK mastné kyseliny, SFA nasycené MK, MUFA mononenasycené MK, PUFA polynenasycené MK, F-kyseliny furanové MK.

Velmi podobné poměry jednotlivých skupin mastných kyselin uvádí ve své práci Mráz et al. (2009) a to jak pro polární lipidy, tak i pro triacylglyceroly. Také Zajíc et al. (2013) uvádí podobné složení triacylglycerolů, v polárních lipidech však stanovili více SFA a MUFA a méně PUFA ve srovnání s našimi vzorky, zřejmě proto, že studovali filety kapra i s kůží.

I když většina prací uvádí zastoupení mastných kyselin přímo v celkových lipidech, je možné tyto hodnoty srovnat s triacylglyceroly, které ve svalovině kapra obecného převažují. V celkových lipidech svaloviny či filetů kapra obecného pocházejícího z podzimního nebo zimního období byly ve shodě s našimi výsledky nejvíce zastoupené MUFA (42 – 52 %), následované SFA (21 – 36 %) a PUFA (15 – 23 %) (De Castro et al., 2007; Pirestani et al., 2010; Li et al., 2011; Ljubojević et al., 2013). Filety kapra obecného pocházejícího z tureckých jezer (Özparlak, 2013) a kapra obecného z chovu v Iránu (Yeganeh et al., 2012) měly vyšší zastoupení PUFA (více než 30 % celkových MK).

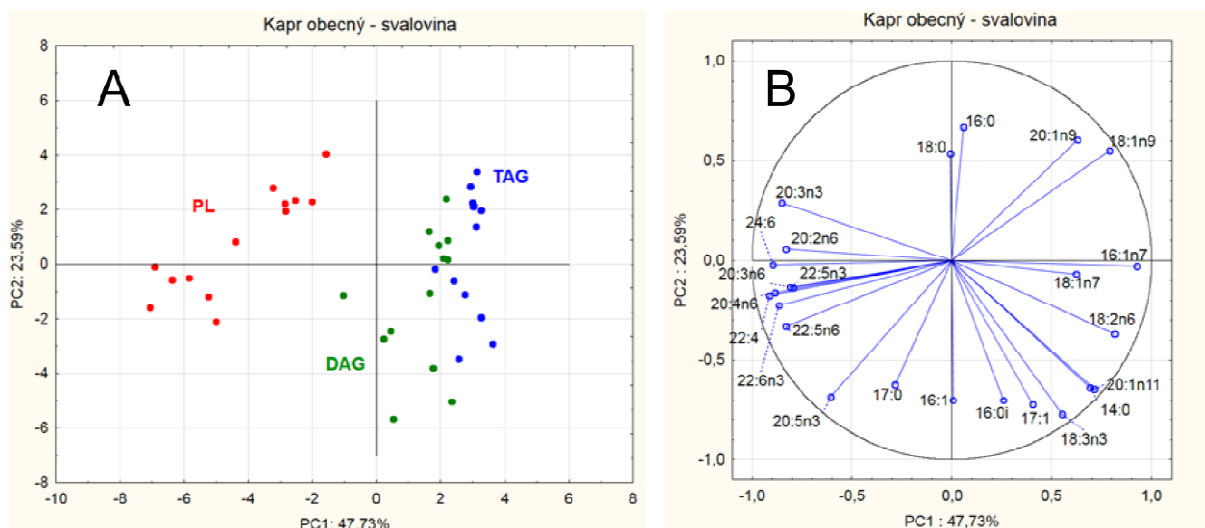
Celkem bylo ve svalovině kapra obecného stanoveno 44 mastných kyselin, které jsou uvedeny v Příloze 1. Z nasycených mastných kyselin byly nejvíce zastoupeny kyselina palmitová, 16:0, tvořící 18,8 % celkových MK stanovených v triacylglycerolové

frakci (TAG) a 18,6 % v polárních lipidech (PL) a kyselina stearová, 18:0 (6,1 % v TAG a 6,5 % v PL). Z mononenasyčených mastných kyselin převažovaly kyseliny olejová, 18:1n-9 (32,2 % v TAG a 10,6 % v PL), palmitolejová, 16:1n-7 (10,0 % v TAG a 3,3 % v PL) a 18:1n-7 (4,1 % v TAG a 2,4 % v PL). Z polynenasyčených mastných kyselin byly nejvýznamnější kyseliny linolová, 18:2n-6 (7,3 % v TAG a 4,7 % v PL), α -linolenová, 18:3n-3 (3,8 % v TAG a 1,0 % v PL), arachidonová, 20:4n-6 (méně než 0,5 % v TAG a 9,6 % v PL), eikosapentaenová, 20:5n-3 (2,7 % v TAG a 6,5 % v PL), dokosahexaenová, 22:6n-3 (1,6 % v TAG a 13,5 % v PL) a pouze v polárních lipidech pak kyseliny 22:5n-6 (3,0 %), 22:5n-3 (5,4 %) a 24:6 (2,5 %).

Podobné spektrum mastných kyselin včetně hodnot zastoupení v polárních lipidech a triacylglycerolech uvádí práce Mráz et al. (2009). Při porovnání zastoupení mastných kyselin v triacylglycerolech našich vzorků s údaji pro celkové lipidy z literatury lze konstatovat dobrou shodu s pracemi Li et al. (2011) a Ljubojević et al. (2013). Podobné zastoupení pro SFA a MUFA uvádí také Özparlak (2013) a Pirestani et al. (2010), PUFA, zejména 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3 a 22:6n-3 však jejich vzorky obsahovaly více. I zde je třeba vzít v úvahu faktory, které obsah lipidů a mastných kyselin ovlivňují (viz výše).

K vyhodnocení rozdílů v zastoupení mastných kyselin v jednotlivých lipidových frakcích byla použita metoda analýzy hlavních komponent (PCA). Tato metoda patří mezi multidimenzionální statistické postupy a je využívána v situacích, kdy výchozí počet proměnných u zkoumaných jevů je značný a pro interpretaci nepřehledný. Jejím cílem je transformace dat z původních proměnných do menšího počtu latentních proměnných, které jsou lineární kombinací původních proměnných a jsou nazývány hlavními komponentami. Tyto nové proměnné vystihují téměř celou proměnlivost původních proměnných, je jich však výrazně méně, jsou vzájemně nezávislé a umožňují tak analýzu původně složitého systému (Wojtowicz et al., 2013).

Jako vstupní data pro PCA byly vybrány mastné kyseliny, jejichž zastoupení bylo vyšší než 0,5 % celkových MK. U vzorků svaloviny to bylo 24 mastných kyselin, které dohromady tvořily více než 95 % celkových mastných kyselin. PCA pro svalovinu kapra obecného je znázorněna na Obr. 9. První dvě hlavní komponenty objasňují 72 % z celkového rozptylu dat. Při projekci lipidových frakcí do komponentní roviny (Obr. 9A) vyplynuly jejich vzájemné korelace.



Obr. 9 Analýza hlavních komponent pro svalovinu kapra obecného. (A) Projekce lipidových frakcí do komponentní roviny. (B) Projekce komponentních vah mastných kyselin. PL polární lipidy, DAG diacylglyceroly, TAG triacylglyceroly.

Polární lipidy jsou umístěny v levé části grafu daleko od diacyl- a triacylglycerolů, od kterých se významně odlišují. Naopak diacylglyceroly a triacylglyceroly se od sebe významně neliší a tvoří shluky v pravé části grafu. K rozlišení lipidových frakcí dochází především podél první hlavní komponenty (PC1), která vystihuje variabilitu vzorků z 48 % a je tvořena převážně kyselinami mono- a polynenasycenými. Druhá hlavní komponenta (PC 2) vystihuje variabilitu vzorků z 24 % a zahrnuje prakticky všechny nasycené mastné kyseliny.

Porovnáním polohy jednotlivých lipidových frakcí s komponentními vahami původních proměnných (Obr. 9B) je vidět, které mastné kyseliny jsou pro jednotlivé lipidové frakce charakteristické a odlišují je od ostatních. Pro polární lipidy jsou to mastné kyseliny 20:4n-6, 22:5n-3, 22:5n-6, 22:6n-3 a 24:6, ostatní PUFA uvedené v levé části grafu komponentních vah patří spíše mezi minoritní. Kyselina 20:5n-3 významně přispívá do polárních lipidů i do diacylglycerolů. Nasycené mastné kyseliny, 16:0 a 18:0 jsou přítomné ve všech frakcích a způsobují posun vzorků v kladném směru PC 2. Pro triacylglyceroly je charakteristická kombinace především mononenasycených 16:1n-7, 18:1n-7 a 18:1n-9 a polynenasycených mastných kyselin 18:2n-6 a 18:3n-3, další MK korelující s triacylglyceroly patří mezi minoritní. Z PCA grafu vyplývá určitá podobnost mezi diacylglyceroly a triacylglyceroly a to především díky kyselinám 14:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6 a 18:3n-3. V diacylglycerolech navíc hrají jistou roli mastné kyseliny s kratším uhlíkovým řetězcem (*iso*16:0, 16:1, 17:0 a 17:1).

5.3 JIKRY KAPRA OBECNÉHO

Pro studium mastných kyselin v lipidech jiker kapra obecného bylo zpracováno 18 vzorků jiker. Celkové lipidy byly z jiker vyextrahovány a zpracovány postupem uvedeným u vzorků svaloviny (kapitola 5.2)

Průměrný obsah celkových lipidů v jikrách byl o něco nižší než ve svalovině a pohyboval se v rozmezí 3 – 4 % čerstvé váhy vzorku. Buchtová et al. (2008) stanovili v jikrách kapra na konci vegetačního období 1,21 % lipidů, Kmínková et al. (2001) studovali změny v lipidech kapra obecného během celého roku, na podzim zjistili obsah lipidů 1,08 % a v zimě 0,42 %. Vyšší obsah lipidů v našich vzorcích může být způsoben různými faktory (kapitola 2.3), především zřejmě odběrem vzorku. Při nakupování jiker v maloobchodní síti je tento krok hůře ovlivnitelný. Vyšší obsah lipidů v jikrách kapra obecného, 3,2 %, uvádí také Intarasirisawat et al. (2011) a 6,3 % De Silva et al. (2001), ale bez bližšího určení charakteru vzorku.

V Tabulce 8 jsou uvedeny lipidové frakce získané z celkových lipidů jiker a zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin v těchto frakcích. V celkových lipidech jiker převažovaly polární lipidy (58,6 %) následované triacylglyceroly (38,5 %). Diacylglyceroly (1,9 %) a volné mastné kyseliny (1,1 %) tvořily frakce minoritní. Polární lipidy tvoří významnou část celkových lipidů v jikrách ryb mořských i sladkovodních (Wiegand, 1996). Tocher et al. (1984) uvádí zastoupení polárních lipidů v jikrách různých mořských ryb v rozmezí 62 – 77 % celkových lipidů. Mukhopadhyay et al. (2003) stanovili v jikrách kapra obecného 63,4 % polárních lipidů a 30,4 % triacylglycerolů, Mahmoud et al. (2008) našli vysoké zastoupení polárních lipidů (61,0 %) v jikrách pstruha duhového. Polární lipidy tvořily majoritní lipidovou frakci (51,2 – 54,9 % celkových lipidů) také v jikrách tří druhů tuňáka (Intarasirisawat et al., 2011) i v jikrách tresky obecné (79,0 %) (Falch et al., 2006).

Pro polární lipidy je charakteristický vysoký obsah polynenasycených mastných kyselin. V polárních lipidech studovaných vzorků jiker tvořily polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) 55,8 %, nasycené mastné kyseliny (SFA) 27,9 % a mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) 16,2 % celkových mastných kyselin. V triacylglycerolech převažovaly MUFA (47,8 %), následované SFA (33,8 %) a PUFA (18,4 %). Zastoupení SFA, MUFA a PUFA v diacylglycerolech a volných mastných kyselinách bylo poměrně vyrovnané a pohybovalo se okolo 30 % pro každou skupinu mastných kyselin. Zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin, SFA, MUFA a PUFA, v lipidových frakcích

celkových lipidů jiker je blízké hodnotám nalezeným u vzorků svaloviny (Tab. 7). V jikrách však byly, na rozdíl od svaloviny, stanoveny také furanové mastné kyseliny a to v polárních lipidech a diacylglycerolech. Vzhledem k jejich zastoupení, 0,11 %, patří tyto kyseliny pouze k minoritním složkám celkových mastných kyselin v těchto frakcích.

Tab. 8 Jikry kapra obecného. Zastoupení mastných kyselin v lipidových frakcích (%)* celkových lipidů a zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin (% celkových MK) v těchto frakcích.

Lipidové frakce*	SFA	MUFA	PUFA	F-kyseliny
Polární lipidy	27,9 ± 4,17	16,2 ± 6,22	55,8 ± 10,1	0,11 ± 0,13
58,6 ± 1,26				
Diacylglyceroly	35,7 ± 2,96	34,7 ± 6,84	29,4 ± 4,82	0,11 ± 0,16
1,86 ± 0,08				
Volné MK	35,4 ± 3,16	30,0 ± 6,49	34,6 ± 5,62	nd
1,07 ± 0,44				
Triacylglyceroly	33,8 ± 3,60	47,8 ± 5,55	18,4 ± 2,46	< 0,05
38,5 ± 1,14				

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka, n = 18.

*Váhová % MK v jednotlivých frakcích vztažená k celkovým MK ve všech frakcích.

MK mastné kyseliny, SFA nasycené MK, MUFA mononenasyčené MK, PUFA polynenasycené MK, F-kyseliny furanové MK, nd nedetekováno.

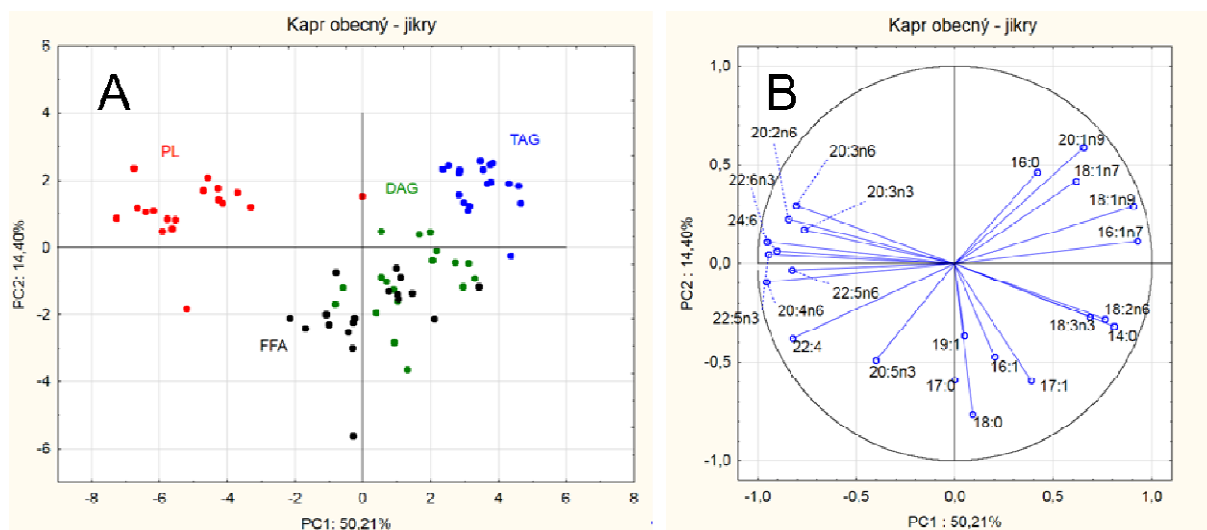
Celkem bylo v jikrách kapra obecného stanoveno 43 mastných kyselin, které jsou uvedeny v Příloze 2. Z nasycených mastných kyselin byly v lipidových frakcích jiker nejvíce zastoupeny kyselina palmitová, 16:0, která tvoří 19,7 % celkových MK stanovených v polárních lipidech (PL) a 23,7 % v triacylglycerolech (TAG) a kyselina stearová, 18:0 (6,6 % v PL a 7,1 % v TAG). Z mononenasyčených mastných kyselin převažovaly kyseliny olejová, 18:1n-9 (9,2 % v PL a 30,3 % v TAG), palmitolejová, 16:1n-7 (2,5 % v PL a 8,5 % v TAG) a kyselina 18:1n-7 (2,2 % v PL a 4,8 % v PL). Více než 2 % byla v triacylglycerolech zastoupena také kyselina 20:1n-9. Z polynenasycených mastných kyselin byly nejvýznamnější kyseliny linolová, 18:2n-6 (2,5 % v PL a 5,8 % v TAG), α -linolenová, 18:3n-3 (méně než 0,5 % v PL a 1,6 % v TAG), arachidonová, 20:4n-6 (15,0 % v PL a 2,7 % v TAG), eikosapentaenová, 20:5n-3 (3,1 % v PL a 2,1 %

v TAG), dokosaheptaenová, 22:6n-3 (22,8 % v PL a 3,2 % v TAG) a více než 2 % byly pak v polárních lipidech zastoupeny také kyseliny 20:3n-3 a 22:5n-3.

Uvedené spektrum mastných kyselin je podobné jako v lipidech svaloviny (Příloha 1), rozdíly byly zjištěny pouze u polynenasycených mastných kyselin. Lipidy jiker obsahovaly v polárních lipidech i v triacylglycerolech více kyseliny 20:4n-6 (15,0 % v PL a 2,7 % v TAG) a kyseliny 22:6n-3 (22,8 % v PL a 3,2 % v TAG) a méně kyseliny 18:2n-6 (2,5 % v PL a 5,8 % v TAG) a kyseliny 18:3n-3 (0,3 % v PL a 1,6 % v TAG) než lipidy svaloviny. U svaloviny bylo zastoupení uvedených kyselin následující: 20:4n-6 (9,6 % v PL a 0,4 % v TAG), 22:6n-3 (13,5 % v PL a 1,6 % v TAG), 18:2n-6 (4,7 % v PL a 7,3 % v TAG), 18:3n-3 (1,0 % v PL a 3,8 % v TAG). Pouze v polárních lipidech se jirky od svaloviny lišily v kyselinách 20:5n-3 (3,1 %), 22:5n-3 (3,3 %) a 22:5n-6 (1,4 %), kterých bylo o něco více ve svalovině (6,5 %, 5,4 % a 3,0 %)

Zastoupení jednotlivých mastných kyselin v polárních lipidech a triacylglycerolech v jikrách kapra obecného studované Mukhopadhyay et al. (2011) jsou v dobré shodě s našimi výsledky.

K vyhodnocení rozdílů mezi jednotlivými lipidovými frakcemi z hlediska zastoupení mastných kyselin byla použita metoda analýzy hlavních komponent (PCA). Jako vstupní data pro PCA bylo vybráno 23 mastných kyselin, jejichž zastoupení v celkových MK bylo větší než 0,5 %. Tyto mastné kyseliny reprezentovaly více než 95 % celkových mastných kyselin. PCA pro jirky kapra obecného je znázorněna na Obr. 10.



Obr. 10 Analýza hlavních komponent pro jirky kapra obecného. (A) Projekce lipidových frakcí do komponentní roviny. (B) Projekce komponentních vah mastných kyselin. PL polární lipidy, DAG diacylglyceroly, FFA volné masté kyseliny, TAG triacylglyceroly.

První dvě hlavní komponenty vysvětlují 64 % celkové rozptylu dat. Na Obr. 10A, který představuje průmět jednotlivých frakcí do roviny prvních dvou hlavních komponent lze nalézt několik shluků. Shluk v levé horní části grafu patří polárním lipidům, které jsou vzdálené od ostatních lipidových frakcí a významně se od nich liší. Další shluk umístěný v pravé horní části grafu patří triacylglycerolům. Na rozlišení těchto frakcí se podílí především první hlavní komponenta. Diacylglyceroly a volné mastné kyseliny tvoří v podstatě jeden volnější shluk.

Graf komponentních vah (Obr. 10B) ukazuje, jakou měrou přispívají jednotlivé původní proměnné do prvních dvou hlavních komponent. V první hlavní komponentě (PC 1) se z významnějších složek uplatňují polynenasycené mastné kyseliny delším řetězcem, v druhé hlavní komponentě (PC 2) především nasycená kyselina stearová (18:0). Některé mastné kyseliny (16:0, 18:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6) se významněji uplatňují v obou komponentách.

Porovnáním obou grafů (Obr. 10A, 10B) je možné vysvětlit rozmístění jednotlivých lipidových frakcí. Polární lipidy jsou negativně korelovány s PC 1 a jsou v interakci s následujícími mastnými kyselinami, 20:4n-6, 22:5n-3 a 22:6n-3, ostatní mastné kyseliny v této části grafu mají menší komponentní váhu a patří spíše k minoritním složkám spektra mastných kyselin. Triacylglyceroly jsou pozitivně korelovány s PC 1 i PC 2 a charakteristická je pro ně kombinace mastných kyselin 16:1n-7, 18:1n-7 a 18:1n-9 a částečně i 18:2n-6. U diacylglycerolů a volných mastných kyselin se uplatňuje především PC 2 a její nejvýznamnější složka 18:0, u diacylglycerolů je také významná interakce s kyselinou 18:2n6.

5.4 MLÍČÍ KAPRA OBECNÉHO

Pro studium mastných kyselin v lipidech mlíčí kapra obecného bylo zpracováno 19 vzorků mlíčí. Celkové lipidy byly z mlíčí vyextrahovány a zpracovány postupem uvedeným u vzorků svaloviny (kapitola 5.2). Průměrný obsah celkových lipidů v mlíčí se pohyboval v rozmezí 2 – 3 % čerstvé váhy vzorku.

V Tabulce 9 jsou uvedeny lipidové frakce získané z celkových lipidů mlíčí a zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin v těchto frakcích. V celkových lipidech mlíčí převažovaly polární lipidy (67,6 %), následované triacylglyceroly (25,3 %), diacylglyceroly (4,2 %) a volnými mastnými kyselinami (2,9 %). Volné mastné kyseliny byly detekované také v celkových lipidech jiker, ne však ve svalovině. Jejich přítomnost tak může mít souvislost s charakterem biologického vzorku, jikry i mlíčí mají vysoký obsah polárních membránových lipidů.

Tab. 9 Mlíčí kapra obecného. Zastoupení mastných kyselin v lipidových frakcích (%)* celkových lipidů a zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin (% celkových MK) v těchto frakcích.

Lipidové frakce*	SFA	MUFA	PUFA	F-kyseliny
Polární lipidy 67,6 ± 3,55	31,1 ± 2,81	16,4 ± 5,12	52,2 ± 6,72	0,29 ± 0,15
Diacylglyceroly 4,17 ± 0,36	26,2 ± 2,61	25,0 ± 7,55	39,6 ± 5,62	9,19 ± 3,57
Volné MK 2,90 ± 1,00	30,5 ± 3,17	27,8 ± 6,98	40,3 ± 4,62	1,47 ± 0,75
Triacylglyceroly 25,3 ± 3,19	14,2 ± 2,79	22,6 ± 8,99	25,0 ± 4,28	38,2 ± 10,2

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka, n = 19.

*Váhová % MK v jednotlivých frakcích vztažená k celkovým MK ve všech frakcích.

MK mastné kyseliny, SFA nasycené MK, MUFA mononenasycené MK, PUFA polynenasycené MK, F-kyseliny furanové MK.

Zatímco zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin v polárních lipidech mlíčí bylo podobné jako u svaloviny a jiker a dominovaly v nich polynenasycené mastné kyseliny (52,2 % celkových MK), následované nasycenými (31,1 %) a mononenasycenými

(16,4 %) mastnými kyselinami, zastoupení v triacylglycerolech bylo zcela odlišné. V této frakci bylo nalezeno vysoké množství furanových mastných kyselin (38,2 %), polynenasycené mastné kyseliny tvořily 25,0 %, mononenasycené 22,6 % a nasycené 14,2 % celkových mastných kyselin.

Celkem bylo v lipidech mlčí identifikováno osm furanových mastných kyselin (F-kyselin) (kapitola 5.1.4). Všechny byly přítomné v triacylglycerolové frakci, významné množství bylo nalezeno také v diacylglycerolech. V polárních lipidech a volných mastných kyselinách byly detekovány pouze některé F-kyseliny a to v minoritním zastoupení (Tab. 10).

Tab. 10 Mlčí kapra obecného. Zastoupení furanových mastných kyselin (% celkových MK) v lipidových frakcích.

Furanové MK	PL	DAG	FFA	TAG
DiMe(9,3)	nd	nd	nd	0,69 ± 0,38
MonoMe(9,5)	nd	nd	< 0,05	0,90 ± 0,50
MonoMe(11,3)	nd	nd	nd	0,30 ± 0,11
DiMe(9,5)	nd	0,38 ± 0,34	< 0,05	2,17 ± 1,12
DiMe(11,3)	< 0,05	0,95 ± 0,48	0,13 ± 0,06	5,14 ± 1,86
DiMe(11,4)	nd	0,30 ± 0,28	0,18 ± 0,21	0,23 ± 0,10
MonoMe(11,5)	< 0,05	1,61 ± 0,75	0,39 ± 0,22	4,42 ± 1,33
DiMe(11,5)	0,22 ± 0,13	5,95 ± 2,95	0,70 ± 0,47	24,4 ± 7,00

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka, n = 19.

MK mastné kyseliny, PL polární lipidy, DAG diacylglyceroly, FFA volné mastné kyseliny, TAG triacylglyceroly, nd nedetekováno.

Názvy furanových MK – viz Tab. 6 (kapitola 5.1.4)

V triacylglycerolech byly nejvíce zastoupeny následující furanové mastné kyseliny: DiMe(11,5) (24,4 % celkových MK), DiMe(11,3) (5,14 %), MonoMe(11,5) (4,4 %) a DiMe(9,5) (2,2 %). Tyto kyseliny patří k nejběžnějším F-kyselinám, byly detekovány např. v mořských rybách, rybím oleji, v másle či olivovém oleji (Boselli et al., 2000; Pacetti et al., 2010; Vetter et al., 2012). Další čtyři identifikované F-kyseliny, MonoMe(9,5), DiMe(9,3), MonoMe(11,3) a DiMe(11,4), měly v triacylglycerolech výrazně nižší zastoupení, 0,2 – 0,9 % celkových mastných kyselin. V diacylglycerolech byla významně zastoupena kyselina DiMe(11,5) (5,9 %), následovaná kyselinou MonoMe(11,5) (1,6 %).

Mezi identifikovanými F-kyselinami byla zvláště zajímavá kyselina DiMe(11,4), která dosud v mlíčí ryb popsána nebyla. Tato kyselina má na furanové jádro vázaný postranní řetězec se čtyřmi uhlíky, zatímco nejčastěji se vyskytující F-kyseliny mají vázaný propyl nebo pentyl. F-kyseliny se sudým počtem uhlíkových atomů či dvojnou vazbou v postranních řetězcích jsou méně běžné a byly identifikovány jako minoritní složky např. v olivovém oleji (Boselli et al., 2000) a jikrách lososa (Ishii et al., 1988b).

F-kyseliny v různých částech sladkovodních ryb studovali Glass et al. (1977) a Ishii et al. (1988a). Oba shodně uvádí jako nejvíce zastoupené F-kyseliny v triacylglycerolech mlíčí kapra obecného kyseliny DiMe(11,5), DiMe(11,3) a MonoMe(11,5), které patřily k majoritním také v našich vzorcích. Autoři detekovali i další minoritní F-kyseliny, kyselinu DiMe(11,4) však nezmiňují.

Celkem bylo v mlíčí kapra obecného stanoveno 46 mastných kyselin (Příloha 3). V lipidových frakcích mlíčí byly nejvíce zastoupeny následující nasycené mastné kyseliny: kyselina palmitová, 16:0, která tvořila 18,2 % celkových MK stanovených v polárních lipidech (PL) a 9,5 % v triacylglycerolech (TAG) a kyselina stearová, 18:0 (11,3 % v PL a 3,0 % v TAG). Z mononenasyčených mastných kyselin převažovaly kyseliny olejová, 18:1n-9 (8,0 % v PL a 14,2 % v TAG), palmitolejová, 16:1n-7 (2,0 % v PL a 4,0 % v TAG), kyselina 18:1n-7 (3,0 % v PL a 1,8 % v PL) a kyselina 20:1n-9 (1,8 % v PL a 1,4 % v TAG). Z polynenasycených mastných kyselin byly nejvýznamnější kyseliny linolová, 18:2n-6 (3,3 % v PL a 4,3 % v TAG), α -linolenová, 18:3n-3 (0,7 % v PL a 1,8 % v TAG), arachidonová, 20:4n-6 (13,8 % v PL a 2,1 % v TAG), eikosapentaenová, 20:5n-3 (9,8 % v PL a 1,8 % v TAG), dokosaheptaenová, 22:6n-3 (15,3 % v PL a 8,2 % v TAG) a dokosapentaenová, 22:5n-3 (2,6 % v PL a 2,2 % v TAG).

Celkově lze konstatovat, že zastoupení mastných kyselin v polárních lipidech mlíčí bylo blízké jejich zastoupení v polárních lipidech jiker a svaloviny, pouze v mlíčí bylo přítomno více kyseliny 20:5n-3 (9,8 %) a méně kyseliny 22:6n-3 (15,3 %) než v jikrách (3,1 % 20:5n-3 a 22,8 % 22:6n-3). Profil mastných kyselin v triacylglycerolech mlíčí byl významně ovlivněn přítomností furanových mastných kyselin. Zastoupení nasycených a mononenasyčených mastných kyselin zde bylo nižší ve srovnání s triacylglyceroly svaloviny a jiker. Zastoupení polynenasycených mastných kyselin v triacylglycerolech mlíčí a jiker bylo přibližně stejné, kromě kyselin 22:5n-3 a 22:6n-3, jejichž obsah byl v mlíčí vyšší. Kyselina 22:5n-3 byla v mlíčí zastoupena 2,2 %, v jikrách 0,8 % a kyselina 22:6n-3 byla v mlíčí zastoupena 8,2 %, v jikrách 3,1 %.

Umístění jednotlivých lipidových frakcí v komponentní rovině (Obr. 10A) lze vysvětlit pomocí grafu komponentních vah. Triacylglyceroly jsou podle očekávání v korelaci s furanovými mastnými kyselinami. Polární lipidy jsou v interakci především s kyselinami 20:4n-6 a 22:6n-3. Vzhledem k negativní korelaci s PC 1 se v nich uplatňují také kyseliny 16:0, 18:0 a 20:5n-3. Ostatní mastné kyseliny v této části grafu mají malou váhu nebo je jejich zastoupení v polárních lipidech minoritní. Volné mastné kyseliny a diacylglyceroly jsou korelovány hlavně s PC 2, z jejichž původních proměnných se uplatní především 16:1n-7, 18:1n-7 a 18:2n-6. Jistý vliv má i PC1 a její kyseliny 16:0 a 18:0, u diacylglycerolů pak i kyselina 22:6n-3.

6. ZÁVĚR

Předložená disertační práce byla zaměřena na studium lipidových frakcí a mastných kyselin v celkových lipidech svaloviny, jiker a mlíčí kapra obecného.

Důležitou součástí práce byla optimalizace extrakčního postupu pro získání celkových lipidů ze studovaných vzorků a dále jejich separace na jednotlivé lipidové frakce. Při testování různých extrakčních činidel se ukázalo, že záleží především na charakteru biologického vzorku a také na tom, co je cílem práce. Pro vzorky obsahující vysoké zastoupení polárních lipidů je třeba použít extrakční činidlo obsahující methanol, aby nedocházelo k podhodnocení této lipidové frakce a mastných kyselin v ní obsažených. Podobné extrakční činidlo je třeba zvolit, pokud se jedná o studium lipidových frakcí.

Při vývoji metodiky bylo ověřeno, že pro biologické vzorky s převahou nepolárních lipidů lze použít zjednodušený extrakční postup s vhodným nepolárním rozpouštědlem. Konkrétně se jednalo o stanovení spektra mastných kyselin v celkových lipidech extrahovaných ze svaloviny kapra obecného a pstruha duhového petroletherem. U tohoto typu vzorků bylo celkové spektrum mastných kyselin dáno především triacylglycerolovou frakcí, příspěvek mastných kyselin z minoritních frakcí se v celkovém spektru neprojevil. Zjednodušený postup extrakce petroletherem má řadu praktických výhod, je to postup rychlý, levný, k analytům šetrný, vhodný pro rutinní zpracování velkého počtu vzorků.

V některých studovaných vzorcích byly přítomny furanové mastné kyseliny. V mlíčí kapra obecného bylo identifikováno celkem osm těchto kyselin, některé z nich byly detekovány i u vzorků svaloviny a jiker, ale v mnohem menším zastoupení. DiMe(11,5) byla nejvíce zastoupenou furanovou mastnou kyselinou a tvořila 24,4 % celkových mastných kyselin v triacylglycerolové frakci mlíčí. K minoritním patřila kyselina DiMe(11,4) (0,2 %), která dosud v mlíčí ryb popsána nebyla.

V celkových lipidech svaloviny, jiker a mlíčí bylo stanoveno zastoupení lipidových frakcí a v každé frakci profil mastných kyselin. Ve svalovině převažovaly triacylglyceroly (97 %), v jikrách a mlíčí polární lipidy (59 a 68 %), následované triacylglyceroly (39 % a 25 %). Diacylglyceroly a volné mastné kyseliny tvořily frakce minoritní.

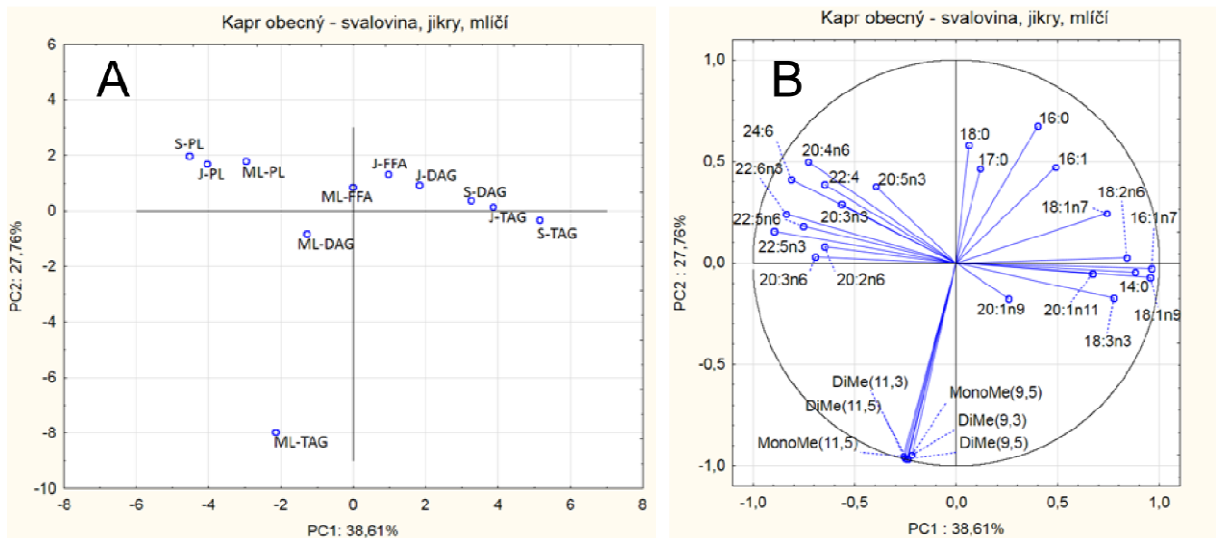
Polární lipidy svaloviny, jiker a mlíčí si byly z hlediska zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin velmi blízké. Polynenasycené mastné kyseliny v nich tvořily 52 – 56 % celkových mastných kyselin, nasycené 28 – 31 % a mononenasycené 16 – 19 %. Jistou podobnost vykazovaly také diacylglyceroly a triacylglyceroly svaloviny a jiker. V triacylglycerolech se zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin pohybovalo

v rozmezí 29 – 34 % pro nasycené, 48 – 52 % pro mononenasyčené a 18 – 19 % pro polynenasycené mastné kyseliny. Triacylglyceroly mlíčí se od svaloviny a jiker odlišovaly díky významnému zastoupení furanových mastných kyselin (38 %) a také o něco vyššímu obsahu polynenasycených mastných kyselin (25 %).

Při porovnání zastoupení jednotlivých mastných kyselin v různých tkáních byly zjištěny následující rozdíly: polární lipidy a triacylglyceroly svaloviny obsahovaly více kyselin 18:2n-6 a 18:3n-3 než jikry a mlíčí, u nichž bylo naopak o něco více kyseliny 20:4n-6. Zastoupení kyseliny 18:2n-6 ve svalovině dosahovalo hodnot 4,7 % (polární lipidy) a 7,2 % (triacylglyceroly), v jikrách 2,5 % a 5,8 %, v mlíčí 3,3 % a 4,3 %. Zastoupení kyseliny 18:3n-3 v triacylglycerolech svaloviny činilo 3,8 % a v polárních lipidech 1,0 %, zatímco v triacylglycerolech jiker a mlíčí bylo této kyseliny méně než 1,8 % a v polárních lipidech méně než 0,7 %. Kyselina 20:4n-6 byla v polárních lipidech jiker zastoupena 15,0 % a v triacylglycerolech 2,7 %, u mlíčí bylo zastoupení této kyseliny 13,8 % a 2,1 %, u svaloviny 9,6 % a 0,3 %. Dále bylo v polárních lipidech svaloviny nalezeno vyšší zastoupení kyselin 22:5n-6 (3,0 %) a 22:5n-3 (5,4 %) než u jiker a mlíčí, kde byl obsah těchto kyselin menší než 1 %. V polárních lipidech jiker bylo významně více kyseliny 22:6n-3 (22,8 %) než u svaloviny (13,5 %) a mlíčí (15,3 %). Triacylglyceroly mlíčí se od svaloviny a jiker lišily především vysokým zastoupením furanových mastných kyselin a také vyšším obsahem kyselin 22:5n-3 (2,2 %) a 22:6n-3 (8,2 %).

Vztahy mezi lipidovými frakcemi a mastnými kyselinami v nich obsaženými byly vyhodnoceny metodou analýzy hlavních komponent. Výsledky získané pro jednotlivé tkáně potvrdila i souhrnná analýza hlavních komponent provedená pro všechny analyzované vzorky (Obr. 12). Významná je především korelace polárních lipidů svaloviny, jiker a mlíčí, které jsou si blízké bez ohledu na to, z jaké tkáně byly získány. Jedná se zejména o membránové lipidy, kde se vliv výživy a jiných faktorů příliš neuplatňuje (Boselli et al., 2012). Pro polární lipidy je charakteristická přítomnost polynenasycených mastných kyselin s delším řetězcem, především 20:4n-6 a 22:6n-3. Triacylglyceroly mlíčí jsou odlehlé a významně se liší od ostatních frakcí díky zejména vysokému obsahu furanových mastných kyselin. Vliv těchto kyselin je výrazný i v diacylglycerolové frakci mlíčí. Jistou podobnost lze najít mezi triacylglyceroly svaloviny a jiker, pro které je charakteristická přítomnost mastných kyselin 16:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6 a částečně také 18:1n-7. Diacylglyceroly svaloviny a jiker jsou v interakci s kyselinami 16:1n-7, 18:1n-7 a 18:2n-6, diacylglyceroly svaloviny také se kyselinou 18:1n-9 a jiker s

kyselinou 16:0. U volných mastných kyselin se uplatňuje více druhá hlavní komponenta a její nasycené mastné kyseliny 16:0 a 18:0.



Obr. 12 Souhrnná analýza hlavních komponent. (A) Projekce lipidových frakcí do komponentní roviny. (B) Projekce komponentních vah mastných kyselin.

Jako proměnné byly použity průměrné hodnoty mastných kyselin: svalovina (n=13), jikry (n=18), mlíčí (n=19)

S svalovina, J jikry, ML mlíčí, PL polární lipidy, DAG diacylglyceroly, FFA volné mastné kyseliny, TAG triacylglyceroly.

Předložená disertační práce přináší přehled zastoupení mastných kyselin v lipidových frakcích celkových lipidů svaloviny, jiker a mlíčí kapra obecného. Přispívá k tématu mastných kyselin ve sladkovodních rybách, protože většina prací se distribucí mastných kyselin v lipidových frakcích nezabývá. Jikry a především mlíčí nepatří k často studovaným tkáním, přestože vysoký obsah polynenasycených a u mlíčí také furanových mastných kyselin může být, zejména v našich podmínkách, zajímavý i z hlediska nutričního.

Pro další výzkum by mohla být přínosná následující témata: aplikace získaných poznatků na další druhy sladkovodních ryb, studium časových změn v zastoupení furanových mastných kyselin v souvislosti s reprodukčním cyklem a také studium vlivu kuchyňských úprav na tyto kyseliny.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ackman, R. G. (2002). Freshwater fish – An overlooked source of beneficial longchain n-3 fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 252–253.

Adams, P. B., Lawson, S., Sanigorski, A., Sinclair, A. J. (1996). Arachidonic acid to eicosapentaenoic acid ratio in blood correlates positively with clinical symptoms of depression. *Lipids*, 31, S157-S161.

Angioni, A., Addis, P. (2014). Characterization of the lipid fraction of wild sea urchin from the Sardinian Sea (Western Mediterranean). *Journal of Food Science*, 79, 155-162.

Antolín, E. M., Delange, D. M., Canavaciolo, V. G. (2008). Evaluation of five methods for derivatization and GC determination of a mixture of very long chain fatty acids (C24:0–C36:0). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 194-199.

Ascherio, A., Willet, W. C. (1997). Health effects of *trans* fatty acids. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66, 1006–1010.

Aubourg, S. P., Medina, I., Pérez-Martin, R. (1996). Polyunsaturated fatty acids in tuna phospholipids: Distribution in the *sn*-2 location and changes during cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 585-589.

Batna, A., Scheinkonig, J., Spiteller, G. (1993). The occurrence of furan fatty-acids in *Isochrysis* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1166, 171-176.

Berdeaux, O., Fournier, V., Lambelet, P., Dionisi, F., Sébédio, J. L., Destailats, F. (2007). Isolation and structural analysis of the cyclic fatty acid monomers formed from eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids during fish oil deodorization. *Journal of Chromatography A*, 1138, 216-224.

Bhourri, A. M., Harzallah, H. J., Dhibi, M., Bouhlel, I., Hammami, M., Chaouch, A. (2010). Nutritional fatty acid duality of raw and cooked farmed and wild sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 507-512.

Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.

Bondia-Pons, I., Morera-Pons, S., Castellote, A. I., Lopez-Sabater, M. C. (2006). Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by solid-phase extraction and fast gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1116, 204-208.

Boselli, E., Grob, K., Lercker, G. (2000). Determination of furan fatty acids in extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2868-2873.

Boselli, E., Pacetti, D., Lucci, P., Frega, N. G. (2012). Characterization of phospholipid molecular species in the edible parts of bony fish and shellfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3234-3245.

Brondz, I. (2002). Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta* 465, 1-37.

Buchgraber, M., Ulberth, F., Emons, H., Anklam, E. (2004). Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106, 621-648.

Buchtová, H., Svobodová, Z., Kocour, M., Velíšek, J. (2008). Chemical composition of edible parts of three-year-old experimental scaly crossbreds of common carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758). *Acta Alimentaria*, 37, 311-322.

Buchtová, H., Svobodová, Z., Křížek, M., Vácha, F., Kocour, M., Velíšek, J. (2007). Fatty acid composition in intramuscular lipids of experimental scaly crossbreds in 3-year-old common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*, 76, S73-S81.

- Byrdwell, W. C. (2001). Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids*, 36, 327-346.
- Carrasco-Pancorbo, A., Navas-Iglesias, N., Cuadros-Rodriguez, L. (2009). From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 263-278.
- Chen, S. H., Chuang, Y. J. (2002). Analysis of fatty acids by column liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta* 465, 145-155.
- Chen, Y. C., Nguyen, J., Semmens, K., Beamer, S., Jaczynski, J. (2007). Physicochemical changes in ω -3-enhanced farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 104, 1143-1152.
- Chuang, L. C. T., Bülbül, U., Wen, P. C., Glew, R. H., Ayaz, F. A. (2012). Fatty acid composition of 12 fish species from the Black Sea. *Journal of Food Science*, 77, 512-518.
- Christie, W. W. (1989). Gas chromatography and lipids: A practical guide (1st ed.). Bridgewater, UK: The Oily Press.
- Christie, W. W. (1993). Advances in Lipid Methodology – Two. Dundee, Scotland: The Oily Press.
- Christie, W. W. (1998). Gas chromatography mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids*, 33, 343-353.
- Christie, W. W., Dobson, G., Adlof, R. O. (2007). A practical guide to isolation, analysis and identification of conjugated linoleic acid. *Lipids*, 42, 1073-1084.
- Czaplicki, S., Zadernowski, R., Ogrodowska, D. (2009). Triacylglycerols from viperbugloss (*Echium vulgare* L.). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111, 1266-1269.

- Czesny, S., Dabrowski, K., Christensen, J. E., Van Eenennaam, J., Doroshov, S. (2000). Discrimination of wild and domestic origin of sturgeon ova based on lipids and fatty acid analysis. *Aquaculture*, 189, 145-153.
- De Castro, F. A. F., Sant'Ana, H. M. P., Campos, F. M., Costa, N. M. B., Silva, M. T. C., Salaro, A. L., Franceschini, S. C. C. (2007). Fatty acid composition of three freshwater fishes under different storage and cooking processes. *Food Chemistry*, 103, 180-190.
- Dembitsky, V. M., Rezanka, T. (1996). Furan fatty acids of some brackish invertebrates from the Caspian Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114, 317-320.
- De Silva, S. S., Gunasekera, R. M., Ingram, B. A., Dobson, J. L. (2001). Weaning of Australian shortfin glass eels (*Anguilla australis*): a comparison on the effectiveness of four types of fish roe. *Aquaculture*, 195, 133-148.
- Domingo, J. L. (2007a). Omega-3 fatty acids and the benefits of fish consumption: Is all that glitters gold? *Environment International*, 33, 993-998.
- Domingo, J. L., Bocio, A., Falcó, G., Llobet, J. M. (2007b). Benefits and risks of fish consumption Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology*, 230, 219-226.
- Easton, M. D., Lusznjak, D., Von Der, G. E. (2002). Preliminary examination of contaminant loadings in farmed salmon, wild salmon and commercial salmon feed. *Chemosphere*, 46, 1053-1074.
- Eder, K. (1995). Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B*, 671, 113-131.
- El-Badry, A. M., Graf, R., Clavien, P. A. (2007): Omega 3 – Omega 6: What is right for the liver? *Journal of Hepatology*, 47, 718-725.
- Fahy, E., Brown, H. A., Glass C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., Van Meer, G.,

- VanNieuwenhze M. S., White, S. H., Witztum, J. L., Dennis, E. A. (2005): A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 46, 839-861.
- Fajmonová, E., Zelenka, J., Komprda, T., Kladroba, D., Šarmanová, I. (2003). Effect of sex, growth intensity and heat treatment on fatty acid composition of common carp (*Cyprinus carpio*) fillets. *Czech Journal of Animal Science*, 18, 85-92.
- Falch, E., Storseth, T. R., Aursand, M. (2006). Multi-component analysis of marine lipids in fish gonads with emphasis on phospholipids using high resolution NMR spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 144, 4-16.
- Fiorini, D., Gagliardi, R., Petrini, A., Pacetti, D., Zambuchini, B., Barboni, L., Marcantoni, E., Ballini, R. (2013). Comparison of eleven methods for quantitative evaluation of total lipids and fatty acids in the clam *Anadara inaequalis* (Bruguière). *Journal of Shellfish Research*, 32, 285-290.
- Folch, J., Lees M., Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Fournier, V., Juanéda, P., Destailats, F., Dionisi, F., Lambelet, P., Sébédio, J. L., Berdaux, O. (2006). Analysis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid geometrical isomers formed during fish oil deodorization. *Journal of Chromatography A*, 1129, 21-28.
- Gama, M. R., Silva, R. G.D., Collins, C. H., Bottoli, C. B. G. (2012). Hydrophilic interaction chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 37, 48-60.
- Gladyshev, M. I., Sushchik, N. N., Ubanenko, G. A., Demirchieva, S. M., Kalachova, G. S. (2006). Effect of way of cooking on content of essential polyunsaturated fatty acids in muscle tissue of humpback salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Food Chemistry*, 96, 446-451.

- Gladyshev, M. I., Sushchik, N. N., Ubanenko, G. A., Demirchieva, S. M., Kalachova, G. S. (2007). Effect of boiling and frying on the content of essential polyunsaturated fatty acids in muscle tissue of four fish species. *Food Chemistry*, *101*, 1694-1700.
- Glass, R. L., Krick, T. P., Eckhardt, A. E. (1974). New series of fatty acids in northern pike (*Esox Lucius*). *Lipids*, *9*, 1004-1008.
- Glass, R. L., Krick, T. P., Olson, D. L., Thorson, R. L. (1977). The occurrence and distribution of furan fatty acids in spawning male freshwater fish. *Lipids*, *12*, 826-836.
- Glass, R. L., Krick, T. P., Sand, D. M., Rahn, C. H., Schlenk, H. (1975). Furanoid fatty acids from fish lipids. *Lipids*, *10*, 695-702.
- Gogus, U., Smith, C. (2010). n-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *International Journal of Food Science and Technology*, *45*, 417-436.
- Gorstallman, C. P., Puchta, V., Spiteller, G. (1988). Investigation of the origin of the furan fatty acids (F-acids). *Lipids*, *23*, 1032-1036.
- Grahl-Nielsen, O., Glover, K. A. (2010). Fatty acids in fish scales. *Marine Biology*, *157*, 1567-1576.
- Guler, G. O., Aktumsek, A., Citil, O. B., Arslan, A., Torlak, E. (2007). Seasonal variation on total fatty acid composition of fillets of zander (*Sander lucioperca*) in Beysehir Lake (Turkey). *Food Chemistry*, *103*, 1241-1246.
- Gunstone, F. D., Wijesundera, R. C., Scrimgeour, C. M. (1978). Component acids of lipids from marine and freshwater species with special reference to furan containing acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *29*, 539-550.
- Guth, H., Grosch, W. (1991). Detection of furanoid fatty-acids in soybean oil – cause for the light-induced off-flavor. *Fett Wissenschaft Technologie – Fat Science Technology*, *93*, 249-255.

- Hammann, S., Wendlinger, C., Vetter, W. (2015). Analysis of intact cholesterol esters of furan fatty acids in cod liver. *Lipids*, 50, 611-620.
- Hannemann, K., Puchta, V., Simon, E., Ziegler, H., Ziegler, G., Spiteller, G. (1989). The common occurrence of furan fatty acids in plants. *Lipids*, 24, 296-298.
- Hara, A., Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, 90, 420-426.
- Harris, W. S., Miller, M., Tighe, A. P., Davidson, M. H., Schaefer, E. J. (2008). Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: Clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis*, 197, 12-24.
- Holčapek, M., Jirásko, R., Lísa, M. (2012). Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*, 1256, 3-15.
- Honeycutt, M. E., McFarland, V. A., McCant, D. D. (1995). Comparison of Three Lipid Extraction Methods for Fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 55, 469-472.
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W. (2011). Chemical compositions of the roe from skipjack, tongol and bonito. *Food Chemistry*, 124, 1328-1334.
- Ishii, K., Okajima, H., Koyamatsu, T., Okada, Y., Watanabe, H. (1988a). The composition of furan fatty acids in the crayfish. *Lipids*, 23, 694-700.
- Ishii, K., Okajima, H., Okada, Y., Watanabe, H. (1988b). Studies on furan fatty acids of salmon roe phospholipids. *Journal of Biochemistry*, 103, 836-839.
- Iverson, S. J., Lang, S. L. C., Cooper, M. H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, 36, 1283-1287.

Jacobs, M., Ferrario, J., Byrne, C. (2002). Investigation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzo-p-furans and selected coplanar biphenyls in Scottish farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Chemosphere*, 47, 183-191.

Kalač, P., Špička, J. (2006). Složení lipidů sladkovodních ryb a jejich význam v lidské výživě. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 57 s. (ISBN 80-7040-901-0)

Kaluzny, M. A., Duncan, L. A., Merritt, M. V., Epps, D. E. (1985). Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research*, 26, 135-140.

Katikou, P., Robb, D. H. F. (2001). Evaluation and comparison of the CEM rapid extraction method with official standard methods for the determination of lipid content in fillets of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 194, 99-105.

Kiessling, A., Pickova, J., Johansson, L., Åsgård, T., Storebakken, T., Kiessling, K. H. (2001). Changes in fatty acid composition in muscle and adipose tissue of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. *Food Chemistry*, 73, 271-284.

Kmínková, M., Winterová, R., Kučera, J. (2001). Fatty acids in lipids of carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Czech Journal of Food Sciences*, 19, 177-181.

Knight, D. W., Smith, A. W. T. (2015). Optimised total syntheses of the F-furan fatty acids F₅ and F₆ and some deuterated derivatives. *Tetrahedron*, 71, 7436-7444.

Kolanowski, W., Laufenberg, G. (2006). Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. *European Food Research and Technology*, 222, 472-477.

Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., Appel, L. J. (2002). Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation*, 106, 2747-2757.

Lacaze, J. P. C. L., Stobo, L. A., Turrell, E. A., Quilliam, M. A. (2007). Solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of free fatty acids in shellfish. *Journal of Chromatography A*, 1145, 51-57.

Leaf, A., Kang, J. X., Xiao, Y. F., Billman, G. E. (2003). Clinical Prevention of Sudden Cardiac death by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Mechanism of Prevention of Arrhythmias by n-3 Fish Oils. *Circulation*, 107, 2646-2652.

Lemke, R. A. S., Peterson, A. C., Ziegelhoffer, E. C., Westphall, M. S., Tjellström, H., Coon, J. J., Donohue, T. J. (2014). Synthesis and scavenging role of furan fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, E3450-E3457.

Leskinen, H. M., Suomela, J. P., Kalilo, H. P. (2010). Quantification of triacylglycerol regioisomers by ultra-high-performance liquid chromatography and ammonia negative ion atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2, 1-5.

Li, G., Sinclair, A. J., Li, D. (2011). Comparison of lipid content and fatty acid composition in the edible meat of wild and cultured freshwater and marine fish and shrimps from China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1871-1881.

Lísa, M., Cífková, E., Holčapek, M. (2011a). Lipidomic profilig of biological tissues using off-line two dimensional high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 5146-5156.

Lísa, M., Holčapek, M. (2005). Analýza přírodních směsí triacylglycerolů technikou HPLC/MS. *Chemické Listy*, 99, 195-199.

Lísa, M., Netušilová, K., Franěk, L., Dvořáková, H., Brkoslav, V., Holčapek, M. (2011b). Characterization of fatty acid and triacylglycerol composition in animal fats using silver-ion and non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 1218, 7499-7510.

- Liu, Q. T., Kinderlerer, J. L. (1999). Preparative thin-layer chromatographic separation and subsequent gas chromatographic-mass spectrometric analysis of monoacylglycerols derived from butter oil by fungal degradation. *Journal of Chromatography A*, 855, 617-624.
- Ljubojević, D., Ćirković, M., Dorđević, V., Puvača, N., Trbović, D., Vukadinov, J., Plavša, N. (2013). Fat quality of marketable fresh water fish species in the Republic of Serbia. *Czech Journal of Food Sciences*, 31, 445-450.
- Magalhães, B. S., Fiamoncini, J., Deschamps, F. C, Curi, R., Silva, L. P. (2010). Comparison of fatty acid composition in nine organs of the sympatric Antarctic teleost fish species *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii* (Perciformes: Nototheniidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 155, 132-137.
- Mahmoud, K. A., Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M. (2008). Characterisation of the lipid fractions obtained by proteolytic and chemical extractions from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) roe. *Process Biochemistry*, 43, 376-383.
- Manirakiza, P., Covaci, A., Schepens, P. (2001). Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 93-100.
- Marchi, I., Rudaz, S., Veuthey, J. L. (2009). Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: A review. *Talanta*, 78, 1-18.
- Mawlong, I., Sujith Kumar, M. S., Singh, D. (2016). Furan fatty acids: their role in plant systems. *Phytochemistry Review*, 15, 121-127.
- McKenzie, D. J. (2001). Effects of dietary fatty acids on the respiratory and cardiovascular physiology of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology*, 128, 607-621.

Meier, S., Mjøs, S. A., Joensen, H., Grahl-Nielsen, O. (2006). Validation of one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues. *Journal of Chromatography A*, 1104, 291-298.

Michaud, A. L., Diau, G. Y., Abril, R., Brenna, J. T. (2002). Double bond localization in minor homoallylic fatty acid methyl esters using acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 307, 348-360.

Morais, S., Conceicao, L. E. C. (2009). A new method for the study of essential fatty acid requirements in fish larvae. *British Journal of Nutrition*, 101, 1564–1568.

Mozaffarian, D. (2006): Trans fatty acids - Effects on systemic inflammation and endothelial function. *Atherosclerosis Supplements*, 7, 29–32.

Mráz, J., Picková, J. (2009). Differences between lipid content and composition of different parts of fillets from crossbred farmed carp (*Caprinus caprio*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, 615-623.

Mráz, J., Zajíc, T., Wagner, L., Kozák, P., Zrostlík, J., Picková, J. (2012). Praktické ověření technologie chovu kapra obecného se zvýšeným obsahem omega-3 mastných kyselin. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 42 s. (ISBN 978-80-87437-64-3)

Mukhopadhyay, T., Ghosh, S. (2003). Lipid profile and fatty acid composition in eggs of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Oleo Science*, 52, 439-442.

Narayan, B., Miyashita, K., Hosakawa, M. (2006). Physiological effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) – a review. *Food Reviews International*, 22, 291-307.

Navarro-García, G., Ramírez-Suárez, J. C., Cota-Quinones, E., Márquea-Ferías, F., Bringas-Alvarado, L. (2010). Storage stability of liver oil from two ray (*Rhinoptera bonasus* and *Aetobatus narinari*) species from the Gulf of Mexico. *Food Chemistry*, 119, 1578-1583.

- Okada, Y., Kaneko, M., Okajima, H. (1996). Hydroxyl radical scavenging activity of naturally occurring furan fatty acids. *Biological & Pharmaceutical bulletin*, 19, 1607-1610.
- Okada, Y., Okajima, H., Konishi, H., Terauchi, M., Ishii, K., Liu, I., Watanabe, H. (1990). Antioxidant effect of naturally occurring furan fatty acids on oxidation of linoleic acid in aqueous dispersion. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 67, 858-862.
- Özparlak, H. (2013). Effect of seasons on fatty acid composition and n-3/n-6 ratios of muscle lipids of some fish species in Apa Dam Lake, Turkey. *Pakistan Journal of Zoology*, 45, 1027-1033.
- Pacetti, D., Alberti, F., Boselli, E., Frega, N. G. (2010). Characterisation of furan fatty acids in Adriatic fish. *Food Chemistry* 122, 209-215.
- Pacetti, D., Balzano, M., Colella, S., Santojanni, A., Frega, N. G. (2013). Effect of spawning on furan fatty acid profile of edible muscle and organ tissues from sardine (*Sardina pilchardus*) and anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3969-3977.
- Park, Y. (2009). Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad *trans* fat? *Journal of Food Composition and Analysis*, 22S, S4-S12.
- Pernet, F., Pelletier, C., Milley, J. (2006). Comparison of three solid-phase extraction methods for fatty acid analysis of lipid fractions in tissues of marine bivalves. *Journal of Chromatography A*, 1137, 127-137.
- Perretti, G., Montanari, L., Fantozzi, P. (2006). Lipid extraction from *Olea europaea* L., by supercritical carbon dioxide for analytical use. *International Journal of Food Engineering*, 2, 1-12.
- Pickova, J., Mørkøre, T. (2007). Alternace oils in fish feeds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 256-263.

Pirestani, S., Sahari, M. A., Barzegar, M., Nikoopour, H. (2010). Lipid, cholesterol and fatty acid profile of some commercially important fish species from south Caspian Sea. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 886–895.

Rahn, C. H., Sand, D. M., Krick, T. P., Glass, R. L., Schlenk, H. (1981). Synthesis of radioactive furan fatty acids. *Lipids*, 16, 360-364.

Rezanka, T., Sigler, K. (2007). The use of atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with high performance liquid chromatography and other separation techniques for identification of triacylglycerols. *Current Analytical Chemistry*, 3, 252-271.

Robinson, J. E., Singh, R., Kays, S. E. (2008). Evaluation of an automated hydrolysis and extraction method for quantification of total fat, lipid classes and trans fat in cereal products. *Food Chemistry*, 107, 1144-1150.

Rodríguez, C., Acosta, C., Badía, P., Cejas, J. R., Santamaría, F. J., Lorenzo, A. (2004). Assessment of lipid and essential fatty acids requirements of black seabream (*Spondyliosoma cantharus*) by comparison of lipid composition in muscle and liver of wild and captive adult fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 139, 619-629.

Rosenfeld, J. M. (2002). Application of analytical derivatizations to the quantitative and qualitative determination of fatty acids. *Analytica Chimica Acta*, 465, 93-100.

Ruiz, J., Antequera, T., Andres, A. I., Petron, M. J., Muriel, E. (2004). Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. *Analytica Chimica Acta*, 520, 201-205.

Ruiz-Gutiérrez, V., Pérez-Camino, M. C. (2000). Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *Journal of Chromatography A*, 885, 321-341.

Ruiz-Rodríguez, A., Reglero, G., Ibanez, E. (2010). Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 305-326.

- Ruxton, C. H. X, Reed, S. C., Simpson, M. J. A., Millington, K. J. (2007). The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition Diet*, 20, 275-285.
- Sahena, F., Zaidul, I. S. M., Jinap, S., Saari, N., Jahurul, H. A., Abbas, K. A., Norulaini, N. A. (2009). PUFAs in fish: extraction, fractionation, importance in health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 59-74.
- Sajiki, J., Yonekubo, J. (2002). Determination of free polyunsaturated fatty acids and their oxidative metabolites by high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS). *Analytica Chimica Acta*, 465, 417-426.
- Sampels, S., Zajíc, T., Mráz, J. (2014). Effects of frying fat and preparation on carp (*Cyprinus carpio*) filler lipid composition and oxidation. *Czech Journal of Food Sciences*, 32, 493-502.
- Saravanan, P., Davidson, N. C., Schmidt, E. B., Calder, P. C. (2010). Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. *Lancet*, 376, 540–550.
- Sargent, J. R. (1995). (n-3) Polyunsaturated fatty acids and farmed fish. In *Fish Oil Technology, Nutrition and Marketing* (1st ed.). Bridgewater, UK: The Oily Press.
- Sargent, J. R. (1997). Fish oils and human diet. *British Journal of Nutrition*, 78, S5-S13.
- Schreiner, M. (2005). Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography – Evaluation of factors affecting accuracy. *Journal of Chromatography A*, 1095, 126-130.
- Schröder, M., Vetter, W. (2013). Detection of 430 fatty acid methylesters from a transesterified butter sample. *Journal of American Oil Chemical Society*, 90, 771-790.
- Seppänen-Laakso, T., Laakso, I., Hiltunen, R. (2002). Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, 465, 39-62.

- Shirasaka, N., Nishi, K., Shimizu, S. (1997). Biosynthesis of furan fatty acids (F-acids) by marine bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1346, 253-260.
- Sidhu, K. S. (2003). Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38, 336-444.
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 56, 365-379.
- Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 674-688.
- Spiteller, G. (2005). Furan fatty acids: occurrence, synthesis, and reactions. Are furan fatty acids responsible for the cardioprotective effects of a fish diet? *Lipids*, 40, 755-771.
- Spiteller, G. (2007). The important role of lipid peroxidation processes in aging and age dependent diseases. *Molecular Biotechnology*, 37, 5-12.
- Steffens, W. (1997). Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans. *Aquaculture*, 151, 97-119.
- Steffens, W., Wirth, M. (2007). Influence of nutrition on the lipid quality of pond fish: common carp (*Caprinus caprio*) and tench (*Tinca tinca*). *Aquaculture International*, 15, 313-319.
- Sushchik, N. N., Gladyshev, M. I., Kalachova, G. S. (2007). Seasonal dynamics of fatty acid content of a common food fish from Yenisei river, Siberian grayling, *Thymallus arcticus*. *Food Chemistry*, 104, 1353-1358.
- Teixeira, A., Cox, R. C., Egmond, M. R. (2013). Furan fatty acids efficiently rescue brain cells from cell death induced by oxidative stress. *Food and Function*, 4, 1209-1215.

Terry, P. D., Rohan, T. E., Wolk, A. (2003). Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 532-543.

Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11, 107-184.

Tocher, D. R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41, 717-723.

Tocher, D. R., Sargent, J. R. (1984). Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes of some Northwest European marine fish. *Lipids*, 19, 492-499.

Toy'oka, T. (1995). Use of derivatization to improve the chromatographic properties and detection selectivity of physiologically important carboxylic acids. *Journal of Chromatography B*, 671, 91-112.

Tsuyama, Y., Uchida, T., Goto, T. (1992). Analysis of underivatized C₁₂ – C₁₈ fatty acids by reversed-phase ion-pair high-performance liquid-chromatography with conductivity detection. *Journal of Chromatography*, 596, 181-184.

Undeland, I., Härröd, M., Lingnert, H. (1998). Comparison between methods using low-toxicity solvents for the extraction of lipids from herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry*, 61, 355-365.

Unusan, N. (2007). Change in proximate, amino acid and fatty acid contents in muscle tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after cooking. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1087-1093.

Van Pelt, C. K., Carpenter, B. K., Brenna, J. T. (1999). Studies of structure and mechanism in acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10, 1253-1262.

Vas Dias, F. W. (1995). Eicosanoids – a brief overview. In *Fish Oil Technology, Nutrition and marketing* (1st ed.). Bridgewater, UK: The Oily Press.

Vetter, W., Laure, S., Wendlinger, C., Mattes, A., Smith, A. W. T., Knight, D. W. (2012). Determination of furan fatty acids in food samples. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 89, 1501-1508.

Vetter, W., Wendlinger, C. (2013). Furan fatty acids – valuable minor fatty acids in food. *Lipid Technology*, 25, 7-10.

Vrkoslav, V., Cvačka, J. (2012). Identification of double-bond position in fatty acid methyl esters by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1259, 244-250.

Vrkoslav, V., Háková, M., Pecková, K., Urbanová, K., Cvačka, J. (2011). Localization of double bonds in wax esters by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry utilizing the fragmentation of acetonitrile-related adducts. *Analytical Chemistry*, 83, 2978-2986.

Wahl, H. G., Chrzanowski, A., Müller, C., Liebich, H. M., Hoffmann, A. (1995). Identification of furan fatty acids in human blood cells and plasma by multi-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 697, 453-459.

Wakimoto, T., Kondo, H., Nii, H., Kimura, K., Egami, Y., Oka, Y., Yoshida, M., Kida, E., Ye, Y., Akahoshi, S., Asakawa, T., Matsumura, K., Ishida, H., Nukaya, H., Tsuji, K., Kan, T., Abe, I. (2011). Furan fatty acids as an anti-inflammatory component from the green-lipped mussel *Perna canaliculus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 17533-17537.

Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2010). Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Reviews*, 68, 280-289.

Wang, C., Harris, W. S., Chang, M., Lichtenstein, A. H., Balk, E. M., Kupelnick, B.,

Jordan, H. S., Lau, J. (2006). n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 5-17.

Webster, L., Walsham, P., Ahmed, Y., Richards, S., Hay, S., Heath, M., Moffat, C. F. (2006). Development and application of an analytical method for the determination of storage lipids, fatty acids and fatty alcohols in *Calanus finmarchicus*. *Journal of Separation Sciences*, 29, 1205-1216.

Wei, G., Zeng, E. Y. (2011). Gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in quantifying fatty acids. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 1429-1436.

Wendlinger, C., Hammann, S., Vetter, W. (2016). Detailed study of furan fatty acids in total lipids and the cholesterol ester fraction of fish liver. *Food Analytical Methods*, 9, 459-468.

Wendlinger, C., Vetter, W. (2014). High concentration of furan fatty acids in organic butter samples from the German market. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 8740-8744.

Wiegand, M. D. (1996) Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 6, 259-286.

Wojtowicz, P., Janečková, H., Friedecký, D., Adam, T. (2013). Techniky metabolomiky v biomedicíně. *Chemické Listy*, 107, 3-11.

Xiao, L., Mjøs, S. A., Haugsgjerd, B. O. (2012). Efficiency of three common lipid extraction methods evaluated by calculating mass balances of the fatty acids. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25, 198-207.

Yeganeh, S., Shabanpour, B., Hosseiny, H., Imanpouri, M. R., Shabany, A. (2009). An investigation of spawning effect on rancidity development of lipid and fatty acid profile in

wild common carp (*Cyprinus carpio*) fillet during storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2547–2553.

Yeganeh, S., Shabanpour, B., Hosseiny, H., Imanpouri, M. R., Shabany, A. (2012). Comparison of farmed and wild common carp (*Cyprinus carpio*): Seasonal variations in chemical composition and fatty acid profile. *Czech Journal of Food Sciences*, 30, 503-511.

Young, K. (2009). Omega-6 (n-6) and omega-3 (n-3) fatty acids in tilapia and human health: review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60, 203-211.

Yu, J. Y., Yan, P. S. (2015). Fatty acid composition evaluation of edible parts of *Eriocheir sinensis* in intensive ponds of Gucheng waters. *Genetics and Molecular Research*, 14, 5334-5345.

Zajíc, T., Mráz, J., Kozák, P., Picková, J. (2011). Možnosti produkce sladkovodních ryb s vysokým obsahem omega-3 mastných kyselin. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 34 s. (ISBN 978-80-87437-27-8)

Zajic, T., Mraz, J., Sampels, S., Pickova, J. (2013). Fillet quality changes as a result of purging of common cap (*Cyprinus carpio* L.) with special regard to weight loss and lipid profile. *Aquaculture*, 400-401, 111-119.

Zehethofer, N., Pinto, D. M. (2008). Recent developments in tandem mass spektrometry for lipidomic analysis. *Analytica Chimica Acta*, 627, 62-70.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	arachidonová kyselina
ALA	α -linolenová kyselina
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
CI	chemická ionizace
CLA	konjugovaná linolová kyselina
DAG	diacylglyceroly
DHA	dokosaheptaenová kyselina
DiMe(9,3)	10,13-epoxy-11,12-dimethylhexadeka-10,12-dienová kyselina
DiMe(9,5)	10,13-epoxy-11,12-dimethyloktadeka-10,12-dienová kyselina
DiMe(11,3)	12,15-epoxy-13,14-dimethyloktadeka-12,14-dienová kyselina
DiMe(11,4)	12,15-epoxy-13,14-dimethylnonadeka-12,14-dienová kyselina
DiMe(11,5)	12,15-epoxy-13,14-dimethyleikosa-12,14-dienová kyselina
EI	ionizace nárazem elektronů
EPA	eikosapentaenová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
F-kyseliny	furanové mastné kyseliny
FAB	bombardování urychlenými atomy
FAME	methylestery mastných kyselin
FFA	volné mastné kyseliny
FID	plamenově ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IS	vnitřní standard
LA	linolová kyselina
LC	kapalinová chromatografie
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
MAG	monoacylglyceroly
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MK	mastné kyseliny

MonoMe(9,5)	10,13-epoxy-11-methyloktadeka-10,12-dienová kyselina
MonoMe(11,3)	12,15-epoxy-13-methyloktadeka-12,14-dienová kyselina
MonoMe(11,5)	12,15-epoxy-13-methyleikosa-12,14-dienová kyselina
MS	hmotnostní spektrometr
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
NIST	Národní institut standardů a technologie USA
PE	petrolether
PL	polární lipidy
PC	hlavní komponenta
PCA	analýza hlavních komponent
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích
SFA	nasycené mastné kyseliny
SPE	extrakce tuhým sorbentem
TAG	triacylglyceroly
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou hustotou

Pro mastné kyseliny je použit obecný zápis jejich vzorce $X:Yn-Z$,

kde X = počet uhlíků v řetězci, Y = počet dvojných vazeb, Z = poloha první dvojně vazby od methylového konce

9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Publikační výstupy během doktorského studia

Články k tématu práce

Chvalová, D., Špička, J. (2016). Identification of furan fatty acids in the lipids of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Food Chemistry*, 200, 183-188.

Články ostatní

Chvalová, D., Zdechovanová, L., Vaněčková, H., Hodková, M. (2014). Brain norepinephrine identified by mass spectrometry is associated with reproductive status of females of the linden bug *Pyrrhocoris apterus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 168, 70-75.

Chval, Z., Chvalová, D., Leclerc, F. (2011). Modeling the RNA 2'OH activation: possible roles of metal ion and nucleobase as catalysts in self-cleaving ribozymes. *Journal of Physical Chemistry B*, 115, 10943-10956.

Příspěvek ve sborníku

Chvalová, D., Špička, J.: Jednoduchý extrakční postup pro stanovení spektra mastných kyselin ve svalovém tuku.

In: Cejpek K., Špicner J., Eds., *Sborník příspěvků z XLIII. Symposia o nových směrech výroby a hodnocení potravin*, Skalský Dvůr, 27.-29. 5. 2013, pp 167-170, ISBN 978-80-7080-866-5.

Příloha 1

Zastoupení mastných kyselin (% z celkových MK) v lipidových frakcích svaloviny kapra obecného.

MK	PL	DAG	TAG
14:0	0.56 ± 0.09	2.41 ± 0.56	1.85 ± 0.54
<i>anteiso</i> 15:0	0.05 ± 0.04	0.56 ± 0.73	0.44 ± 0.32
15:0	0.51 ± 0.28	0.74 ± 0.45	0.42 ± 0.23
<i>iso</i> 16:0	0.09 ± 0.08	0.52 ± 0.50	0.22 ± 0.16
16:0	18.6 ± 5.50	18.8 ± 3.37	18.8 ± 1.67
<i>iso</i> 17:0	0.33 ± 0.13	0.47 ± 0.22	0.40 ± 0.22
17:0	0.74 ± 0.26	0.60 ± 0.26	0.73 ± 0.39
18:0	6.48 ± 2.40	8.25 ± 2.61	6.05 ± 1.29
19:0	0.25 ± 0.08	0.14 ± 0.13	0.15 ± 0.05
20:0	0.07 ± 0.01	0.42 ± 0.17	0.19 ± 0.07
Celkové SFA	27.7 ± 7.15	32.9 ± 3.53	29.3 ± 1.65
14:1*	0.03 ± 0.02	0.37 ± 0.21	0.31 ± 0.26
16:1*	0.90 ± 0.38	1.15 ± 0.43	1.01 ± 0.38
16:1 <i>n-7</i>	3.33 ± 1.01	7.36 ± 1.33	9.97 ± 1.27
17:1*	0.26 ± 0.07	1.26 ± 0.39	0.54 ± 0.27
18:1 <i>trans</i>	0.24 ± 0.08	0.24 ± 0.14	0.30 ± 0.06
18:1 <i>n-9</i>	10.6 ± 5.32	23.2 ± 8.57	32.2 ± 9.43
18:1 <i>n-7</i>	2.35 ± 0.34	2.68 ± 0.42	4.07 ± 0.52
18:1*	0.14 ± 0.07	nd	0.15 ± 0.04
19:1*	0.02 ± 0.02	0.32 ± 0.45	0.06 ± 0.07
20:1 <i>n-11</i>	0.26 ± 0.08	1.60 ± 0.55	1.51 ± 0.61
20:1 <i>n-9</i>	0.65 ± 0.26	0.79 ± 0.24	1.52 ± 0.35
20:1*	0.09 ± 0.02	nd	0.11 ± 0.03
Celkové MUFA	18.9 ± 6.36	38.9 ± 8.07	51.8 ± 7.95
16:3*	nd	nd	0.17 ± 0.16
18:2*	0.17 ± 0.11	0.23 ± 0.15	0.20 ± 0.12
18:2 <i>n-6</i>	4.67 ± 0.81	7.85 ± 1.28	7.25 ± 1.23
18:3 <i>n-6</i>	0.24 ± 0.07	0.26 ± 0.18	0.18 ± 0.09
18:3 <i>n-3</i>	1.01 ± 0.41	4.09 ± 2.43	3.79 ± 2.43

Příloha 1 - pokračování

MK	PL	DAG	TAG
20:2*	0.26 ± 0.11	0.24 ± 0.12	0.28 ± 0.09
20:2 <i>n</i> -6	1.82 ± 0.33	0.46 ± 0.19	0.36 ± 0.19
20:3 <i>n</i> -3	1.70 ± 0.71	nd	nd
20:3 <i>n</i> -6	0.70 ± 0.25	0.31 ± 0.12	0.04 ± 0.15
20:4 <i>n</i> -6	9.56 ± 5.20	3.19 ± 2.63	0.35 ± 0.50
20:4 <i>n</i> -3	0.40 ± 0.14	0.40 ± 0.48	0.51 ± 0.30
20:5 <i>n</i> -3	6.49 ± 1.76	3.42 ± 1.89	2.73 ± 1.70
22:3*	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.07	0.13 ± 0.11
22:4*	1.76 ± 0.52	0.96 ± 0.44	0.18 ± 0.12
22:5 <i>n</i> -6	3.01 ± 2.33	1.17 ± 1.16	0.16 ± 0.18
22:5 <i>n</i> -3	5.37 ± 3.17	1.10 ± 0.75	0.88 ± 0.68
22:6 <i>n</i> -3	13.5 ± 8.02	4.05 ± 3.64	1.59 ± 1.50
24:5*	0.18 ± 0.14	nd	0.05 ± 0.06
24:6*	2.51 ± 1.00	0.34 ± 0.20	0.10 ± 0.08
Celkové PUFA	53.4 ± 13.4	28.1 ± 11.0	19.0 ± 7.54
MonoMe(11,5)	nd	nd	0.02 ± 0.04
DiMe(9,3)	0.01 ± 0.01	nd	nd
DiMe(11,5)	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.02	nd
Celkové F-kyseliny	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.04

* blíže neurčený izomer

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka, n = 13.

PL polární lipidy, DAG diacylglyceroly, TAG triacylglyceroly, SFA nasycené MK, MUFA mononenasycené MK, PUFA polynenasycené MK, F-kyseliny, furanové MK, nd nedetekováno.

Příloha 2

Zastoupení mastných kyselin (% z celkových MK) v lipidových frakcích jiker kapra obecného.

MK	PL	DAG	FFA	TAG
14:0	0.35 ± 0.13	1.75 ± 0.42	1.30 ± 0.32	1.41 ± 0.29
<i>anteiso</i> 15:0	0.02 ± 0.03	0.08 ± 0.10	0.18 ± 0.17	0.10 ± 0.11
15:0	0.30 ± 0.06	0.54 ± 0.11	0.53 ± 0.11	0.32 ± 0.10
<i>iso</i> 16:0	0.05 ± 0.05	0.33 ± 0.37	0.29 ± 0.30	0.11 ± 0.08
16:0	19.7 ± 3.49	22.6 ± 1.89	17.0 ± 1.47	23.7 ± 2.72
<i>iso</i> 17:0	0.33 ± 0.17	0.50 ± 0.24	0.44 ± 0.28	0.39 ± 0.18
17:0	0.40 ± 0.20	0.37 ± 0.17	0.58 ± 0.31	0.41 ± 0.19
18:0	6.61 ± 1.03	9.13 ± 2.08	14.5 ± 2.56	7.09 ± 1.03
19:0	0.10 ± 0.06	0.09 ± 0.08	0.28 ± 0.19	0.09 ± 0.05
20:0	0.04 ± 0.02	0.30 ± 0.11	0.33 ± 0.13	0.14 ± 0.05
Celkové SFA	27.9 ± 4.17	35.7 ± 2.96	35.4 ± 3.16	33.8 ± 3.60
14:1 [*]	nd	0.04 ± 0.09	nd	0.04 ± 0.08
16:1 [*]	0.97 ± 0.19	1.40 ± 0.29	1.19 ± 0.30	1.13 ± 0.27
16:1 <i>n</i> -7	2.54 ± 2.54	5.98 ± 1.20	6.17 ± 1.27	8.47 ± 0.99
17:1 [*]	0.16 ± 0.06	0.82 ± 0.30	0.50 ± 0.18	0.38 ± 0.17
18:1 <i>trans</i>	0.13 ± 0.09	0.15 ± 0.07	0.28 ± 0.11	0.18 ± 0.06
18:1 <i>n</i> -9	9.24 ± 4.75	20.9 ± 6.39	17.8 ± 5.67	30.3 ± 5.91
18:1 <i>n</i> -7	2.20 ± 0.33	2.94 ± 0.38	2.55 ± 0.32	4.75 ± 0.93
18:1 [*]	0.05 ± 0.06	nd	0.04 ± 0.05	0.07 ± 0.06
19:1 [*]	0.07 ± 0.09	1.20 ± 1.99	0.52 ± 0.86	0.12 ± 0.14
20:1 <i>n</i> -11	0.05 ± 0.08	0.28 ± 0.48	0.18 ± 0.33	0.25 ± 0.41
20:1 <i>n</i> -9	0.72 ± 0.21	1.02 ± 0.24	0.78 ± 0.18	2.02 ± 0.43
20:1 [*]	0.03 ± 0.03	nd	0.03 ± 0.05	0.03 ± 0.04
Celkové MUFA	16.2 ± 6.22	34.7 ± 6.84	30.0 ± 6.49	47.8 ± 5.55
16:3 [*]	nd	nd	0.67 ± 1.94	0.02 ± 0.04
18:2 [*]	0.06 ± 0.08	0.11 ± 0.1	0.10 ± 0.10	0.08 ± 0.07
18:2 <i>n</i> -6	2.54 ± 1.15	6.18 ± 1.67	7.14 ± 1.85	5.82 ± 1.22
18:3 <i>n</i> -6	0.05 ± 0.05	0.11 ± 0.13	0.15 ± 0.14	0.06 ± 0.05
18:3 <i>n</i> -3	0.27 ± 0.19	1.72 ± 0.96	1.58 ± 0.91	1.55 ± 0.86

Příloha 2 – pokračování

MK	PL	DAG	FFA	TAG
20:2 [*]	0.14 ± 0.07	0.22 ± 0.09	0.17 ± 0.06	0.22 ± 0.08
20:2 <i>n</i> -6	0.61 ± 0.11	0.27 ± 0.07	0.32 ± 0.08	0.24 ± 0.09
20:3 <i>n</i> -3	2.27 ± 1.07	nd	1.02 ± 0.85	nd
20:3 <i>n</i> -6	1.01 ± 0.29	0.54 ± 0.21	0.53 ± 0.21	0.46 ± 0.18
20:4 <i>n</i> -6	15.0 ± 4.35	5.84 ± 2.30	8.57 ± 3.38	2.74 ± 1.02
20:4 <i>n</i> -3	0.19 ± 0.06	0.43 ± 0.26	0.36 ± 0.19	0.38 ± 0.18
20:5 <i>n</i> -3	3.07 ± 1.12	2.50 ± 0.95	2.94 ± 1.23	2.08 ± 0.88
22:3 [*]	0.05 ± 0.05	0.25 ± 0.28	0.13 ± 0.15	0.47 ± 0.61
22:4 [*]	1.82 ± 0.58	1.27 ± 0.54	1.35 ± 0.56	0.22 ± 0.13
22:5 <i>n</i> -6	1.42 ± 0.57	0.62 ± 0.33	0.59 ± 0.27	0.08 ± 0.05
22:5 <i>n</i> -3	3.29 ± 0.90	1.08 ± 0.56	1.47 ± 0.54	0.79 ± 0.41
22:6 <i>n</i> -3	22.8 ± 5.87	8.08 ± 2.72	6.94 ± 2.39	3.15 ± 1.33
24:5 [*]	nd	nd	0.05 ± 0.19	nd
24:6 [*]	1.17 ± 0.41	0.22 ± 0.12	0.48 ± 0.20	0.07 ± 0.04
Celkové PUFA	55.8 ± 10.1	29.4 ± 4.82	34.6 ± 5.62	18.4 ± 2.46
MonoMe(11,5)	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02	nd	0.05 ± 0.06
DiMe(11,5)	0.10 ± 0.12	0.09 ± 0.16	nd	nd
Celkové F-kyseliny	0.11 ± 0.13	0.11 ± 0.16	nd	0.05 ± 0.06

^{*} blíže neurčený izomer

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka, n = 18.

PL polární lipidy, DAG diacylglyceroly, TAG triacylglyceroly, SFA nasycené MK, MUFA mononenasycené MK, PUFA polynenasycené MK, F-kyseliny, furanové MK, nd nedetekováno.

Příloha 3

Zastoupení mastných kyselin (% z celkových MK) v lipidových frakcích mlíčí kapra obecného.

MK	PL	DAG	FFA	TAG
14:0	0.13 ± 0.12	0.91 ± 0.85	0.89 ± 0.79	0.83 ± 0.65
<i>anteiso</i> 15:0	nd	nd	0.06 ± 0.15	0.16 ± 0.27
15:0	0.26 ± 0.14	0.20 ± 0.13	0.47 ± 0.26	0.20 ± 0.12
<i>iso</i> 16:0	0.02 ± 0.03	0.38 ± 0.68	0.57 ± 0.96	0.04 ± 0.07
16:0	18.2 ± 3.12	14.8 ± 1.90	14.3 ± 2.81	9.53 ± 1.79
<i>iso</i> 17:0	0.12 ± 0.14	nd	0.31 ± 0.34	0.13 ± 0.12
17:0	0.74 ± 0.62	nd	0.76 ± 0.58	0.26 ± 0.22
18:0	11.3 ± 1.24	9.90 ± 1.81	12.4 ± 2.22	2.97 ± 0.90
19:0	0.23 ± 0.14	nd	0.26 ± 0.19	0.03 ± 0.02
20:0	0.15 ± 0.09	nd	0.48 ± 0.28	0.08 ± 0.05
Celkové SFA	31.1 ± 2.81	26.2 ± 2.61	30.5 ± 3.17	14.2 ± 2.79
16:1*	0.86 ± 0.25	0.74 ± 0.30	1.19 ± 0.46	0.59 ± 0.21
16:1 <i>n</i> -7	2.02 ± 0.94	4.58 ± 1.80	5.81 ± 1.73	4.04 ± 1.34
17:1*	0.21 ± 0.30	0.07 ± 0.09	0.25 ± 0.34	0.19 ± 0.23
18:1 <i>trans</i>	0.14 ± 0.10	nd	0.26 ± 0.19	0.07 ± 0.05
18:1 <i>n</i> -9	8.03 ± 3.99	15.2 ± 6.80	15.0 ± 5.68	14.2 ± 6.82
18:1 <i>n</i> -7	3.00 ± 0.83	2.23 ± 0.51	2.55 ± 0.46	1.78 ± 0.44
18:1*	0.04 ± 0.04	nd	0.02 ± 0.04	0.03 ± 0.04
19:1*	0.02 ± 0.04	0.17 ± 0.32	0.05 ± 0.10	0.02 ± 0.04
20:1 <i>n</i> -11	0.07 ± 0.22	0.37 ± 1.03	0.23 ± 0.66	0.25 ± 0.57
20:1 <i>n</i> -9	1.77 ± 0.50	1.70 ± 0.53	2.14 ± 0.59	1.36 ± 0.54
20:1*	0.23 ± 0.06	nd	0.29 ± 0.08	0.07 ± 0.03
Celkové MUFA	16.4 ± 5.12	25.0 ± 7.55	27.8 ± 6.98	22.6 ± 8.99
18:2 <i>n</i> -6	3.31 ± 1.55	5.23 ± 2.02	7.51 ± 2.75	4.26 ± 1.71
18:3 <i>n</i> -6	nd	nd	0.03 ± 0.05	0.06 ± 0.08
18:3 <i>n</i> -3	0.68 ± 0.56	1.52 ± 1.36	2.78 ± 2.35	1.79 ± 1.38
20:2*	0.13 ± 0.12	0.20 ± 0.17	0.26 ± 0.28	0.11 ± 0.08
20:2 <i>n</i> -6	0.35 ± 0.06	0.64 ± 0.15	0.71 ± 0.19	0.51 ± 0.16
20:3 <i>n</i> -3	1.22 ± 1.33	0.80 ± 0.69	0.60 ± 0.68	0.23 ± 0.25

Příloha 3 - pokračování

MK	PL	DAG	FFA	TAG
20:3 <i>n</i> -6	1.06 ± 0.41	1.17 ± 0.50	1.26 ± 0.49	0.76 ± 0.32
20:4 <i>n</i> -6	13.8 ± 3.79	9.46 ± 3.23	6.34 ± 2.51	2.08 ± 0.66
20:4 <i>n</i> -3	0.59 ± 0.26	0.50 ± 0.25	0.77 ± 0.34	0.55 ± 0.23
20:5 <i>n</i> -3	9.84 ± 3.26	4.68 ± 2.16	4.95 ± 1.99	1.85 ± 0.75
22:3*	0.07 ± 0.09	0.16 ± 0.23	0.16 ± 0.19	0.25 ± 0.13
22:4*	0.83 ± 0.30	0.78 ± 0.32	0.93 ± 0.41	0.71 ± 0.31
22:5 <i>n</i> -6	0.98 ± 0.38	0.90 ± 0.38	0.71 ± 0.32	0.95 ± 0.50
22:5 <i>n</i> -3	2.56 ± 0.70	2.32 ± 0.73	2.90 ± 1.08	2.24 ± 0.75
22:6 <i>n</i> -3	15.3 ± 3.61	10.7 ± 3.08	9.42 ± 2.94	8.22 ± 2.14
24:5*	0.12 ± 0.09	nd	0.39 ± 0.34	0.12 ± 0.11
24:6*	1.36 ± 0.65	0.52 ± 0.32	0.58 ± 0.29	0.27 ± 0.19
Celkové PUFA	52.2 ± 6.72	39.6 ± 5.62	40.3 ± 4.62	25.0 ± 4.28
MonoMe(9,5)	nd	nd	0.02 ± 0.01	0.90 ± 0.50
MonoMe(11,3)	nd	nd	nd	0.30 ± 0.11
MonoMe(11,5)	0.05 ± 0.03	1.61 ± 0.75	0.39 ± 0.22	4.42 ± 1.33
DiMe(9,3)	nd	nd	nd	0.69 ± 0.38
DiMe(9,5)	nd	0.38 ± 0.34	0.05 ± 0.06	2.17 ± 1.12
DiMe(11,3)	0.02 ± 0.02	0.95 ± 0.48	0.13 ± 0.06	5.14 ± 1.86
DiMe(11,4)	nd	0.30 ± 0.28	0.18 ± 0.21	0.23 ± 0.10
DiMe(11,5)	0.22 ± 0.13	5.95 ± 2.95	0.70 ± 0.47	24.4 ± 7.00
Celkové F-kyseliny	0.29 ± 0.15	9.19 ± 3.57	1.47 ± 0.75	38.2 ± 10.2

* blíže neurčený izomer

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka, n = 19.

PL polární lipidy, DAG diacylglyceroly, TAG triacylglyceroly, SFA nasycené MK, MUFA mononenasycené MK, PUFA polynenasycené MK, F-kyseliny, furanové MK, nd nedetekováno.