



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**POUŽITÍ TENKOVRSŤVÉ CHROMATOGRFIE PRO
FRAKCIÓNACI LIPIDŮ V SÝROVÉ MATRICI**

THE USE OF THIN LAYER CHROMATOGRAPHY FOR FRACTIONATION OF LIPIDS IN CHEESE MATRIX

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Zdeněk Pop

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK1030/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Zdeněk Pop	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	Ing. Eva Vítová, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Martina Mahdalová	

Název bakalářské práce:

Použití tenkovrstvé chromatografie pro frakcionaci lipidů v sýrové matrici

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - mléčný tuk – charakteristika, složení, vlastnosti; lipidy v sýrech
 - mastné kyseliny v sýrech
 - stanovení mastných kyselin a lipidů v sýrech
 - tenkovrstvá chromatografie (TLC) - princip, popis, instrumentace
2. Ověřte možnost využití TLC pro frakcionaci lipidů v sýrech (postup, optimální podmínky)
3. Diskutujte výhody a nevýhody zvolené a ověřené metody

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

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

Zdeněk Pop
Student(ka)

Ing. Eva Vítová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá použitím tenkovrstvé chromatografie pro frakcionaci lipidů v sýrové matrici.

V teoretické části je charakterizován mléčný tuk, lipidy, mastné kyseliny, možnosti stanovení lipidických látek, tenkovrstvá chromatografie a plynová chromatografie.

V experimentální části byly optimalizovány podmínky pro frakcionaci lipidů při použití tenkovrstvé chromatografie, vyhodnoceny vybrané validační parametry, ověřeny frakce lipidů získané z extrakce pevnou fází a stanoveno množství mastných kyselin v daných lipidických frakcích ve vzorku taveného sýra. Pro extrakci lipidů ze vzorků sýra byla použita metoda podle ČSN EN ISO 1735. Frakcionace lipidů probíhala na komerčně dostupných destičkách pro tenkovrstvou chromatografii. Pro esterifikaci mastných kyselin byla použita metoda podle ČSN EN ISO 5509 s použitím metanolického roztoku bortrifluoridu jako katalyzátoru. Vzniklé methylestery mastných kyselin byly stanoveny pomocí plynové chromatografie s FID detekcí.

ABSTRACT

This bachelors thesis is focused on the use of thin layer chromatography for fractionation of lipids in the cheese matrix.

Milk fat, lipids, fatty acids, the possibility of determination of lipid compounds, thin-layer chromatography and gas chromatography are characterized in theoretical part.

In the experimental part the conditions for the fractionation of lipids using thin layer chromatography were optimized, selected validation parameters were evaluated, lipid fractions obtained from the solid-phase extraction were verified and fatty acids in lipid fractions in the sample of processed cheese were quantified. The method according to ISO 1735 was chosen for extraction of lipids from the samples. Lipids fractionation was performed on commercially available plates for thin-layer chromatography. The method according to ISO 5509 using methanol solution of boron trifluoride as catalyst was chosen for the esterification of fatty acids. The resulting methyl esters were determined by gas chromatography with FID detection.

KLÍČOVÁ SLOVA

Sýry, mastné kyseliny, plynová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie

KEY WORDS

Cheese, fatty acids, gas chromatography, thin layer chromatography

POP, Z. *Použití tenkovrstvé chromatografie pro frakcionaci lipidů v sýrové matrici*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 45 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval své vedoucí bakalářské práce Ing. Evě Vítové, Ph.D. a konzultantce Ing. Martině Mahdalové za odborné vedení, přátelský přístup a cenné rady během vypracování této bakalářské práce. Dále děkuji svým rodičům za umožnění studia na vysoké škole.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Mléko	8
2.2	Mléčný tuk	8
2.3	Lipidy.....	9
2.3.1	Homolipidy.....	9
2.3.2	Heterolipidy.....	10
2.3.3	Komplexní lipidy.....	10
2.4	Mastné kyseliny	10
2.4.1	Nasycené kyseliny	11
2.4.2	Nenasycené kyseliny s jednou dvojnou vazbou	11
2.4.3	Nenasycené kyseliny s dvěma a více dvojnými vazbami	11
2.5	Mastné kyseliny v sýrech	12
2.6	Stanovení mastných kyselin a lipidů v sýrech.....	12
2.7	Tenkovrstvá chromatografie	13
2.7.1	Instrumentace TLC.....	14
2.7.1.1	Stacionární fáze	14
2.7.1.2	Mobilní fáze	14
2.7.1.3	Vyvíjecí nádoba.....	15
2.7.1.4	TLC destičky	15
2.7.2	Princip TLC.....	15
2.7.3	Dávkování vzorku a vyvíjení chromatogramu	16
2.7.4	Vyhodnocení chromatogramu	17
2.8	Plynová chromatografie.....	17
2.8.1	Princip GC.....	18
2.8.2	Instrumentace GC.....	18
2.8.2.1	Zdroj nosného plynu.....	18
2.8.2.2	Čistící zařízení.....	18
2.8.2.3	Regulační systém.....	18
2.8.2.4	Dávkovač (injektor).....	18
2.8.2.5	Kolony	19
2.8.2.6	Detektory	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Chemikálie a laboratorní vybavení.....	21
3.1.1	Chemikálie.....	21
3.1.2	Plyny.....	21
3.1.3	Přístroje	21

3.1.4	Pomůcky	21
3.2	Analyzované vzorky	22
3.3	Pracovní postupy	22
3.3.1	Extrakce lipidů podle ČSN EN ISO 1735	22
3.3.2	Frakcionace lipidů pomocí TLC	22
3.3.2.1	Aktivace TLC desky	22
3.3.2.2	Nanesení vzorku na TLC desku	22
3.3.2.3	Vyvíjení TLC desky	22
3.3.2.4	Vizualizace	23
3.3.2.5	Vyškrabání separované zóny	24
3.3.3	Příprava methylesterů mastných kyselin	24
3.3.3.1	Metoda podle ČSN EN ISO 5509 využívající bortrifluorid jako katalyzátor	24
3.3.4	Podmínky stanovení mastných kyselin metodou GC-FID	25
3.3.5	Identifikace a kvantifikace mastných kyselin	25
3.3.6	Statistické zpracování výsledků	25
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	26
4.1	Složení mléčného tuku	26
4.2	Frakcionace lipidů pomocí TLC	27
4.3	Optimalizace experimentálních podmínek	28
4.3.1	Volba separačního systému	28
4.3.2	Doba vyvíjení	28
4.3.3	Množství (objem) nadávkovaného vzorku	29
4.3.4	Koncentrace nadávkovaného vzorku	30
4.3.5	Výsledné optimální podmínky TLC	31
4.4	Zhodnocení použitelnosti TLC metody pro frakcionaci lipidů	31
4.5	Ověření složení frakcí vzorku oleje	32
4.6	Ověření vybraných validačních parametrů	33
4.6.1	Opakovatelnost měření	33
4.7	Analýza vzorku taveného sýru	34
5	ZÁVĚR	38
6	LITERATURA	39
7	SEZNAM ZKRATEK	42
8	PŘÍLOHY	43

1 ÚVOD

Sýry jsou mléčné výrobky, kde jsou zakonzentrovány všechny významné složky mléka včetně tuků. Tuky tvoří v sýrech významný podíl, ovlivňují texturu, jsou nositelem chuti a vůně, patří mezi energeticky nejbohatší složky potravin. Důležitou částí tuků jsou mastné kyseliny, mající velký význam při senzorických změnách sýrů během zrání. V průběhu zrání dochází k lipolýze tuků, během které se uvolňují volné mastné kyseliny, přispívající k sýrovému aroma a jsou důležitými prekurzory dalších aromatických sloučenin, jako jsou alkany, estery, sekundární alkoholy, methylketony a laktony. Tyto látky pak dohromady vytváří výslednou chuť a vůni příslušného typu sýra.

Cílem této práce bylo optimalizovat podmínky tenkovrstvé chromatografie pro frakcionaci lipidů v sýrové matrici. Tenkovrstvá chromatografie představuje stále rozšířenou, rychlou, nenáročnou a snadnou metodu pro separaci směsi látek. Přestože jsou v dnešní době známy metody přesnější, pro daný účel je tato metoda dostačující. Pro extrakci lipidů ze vzorku byla použita metoda podle ČSN EN ISO 1735. Frakcionace lipidů byla provedena na komerčně dostupných deskách pro tenkovrstvou chromatografii se stacionární fází silikagelem. Pro esterifikaci mastných kyselin byla použita metoda podle ČSN EN ISO 5509 s použitím methanolického roztoku bortrifluoridu jako katalyzátoru. Methylestery mastných kyselin byly stanoveny plynovou chromatografií s FID detekcí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mléko

Mléko je mnohasložková směs a současně polydisperzní systém tří fází — emulzní (tukové), koloidní (bílkovinné) a molekulové (laktosa, minerální soli). Bílo-krémový vzhled mléka způsobuje mléčný tuk, kasein a částečně nerozpustný fosforečnan vápenatý. Čerstvé mléko je téměř neutrální, hodnota pH je v rozmezí 6,5 až 6,7. Hlavními složkami mléka jsou voda, mléčný tuk, bílkoviny, mléčné soli a laktosa [1]. Voda je nezbytnou složkou mléka a nositelem celého systému. Průměrný obsah vody je asi 87,5 % [2]. K sušině patří všechny ostatní složky mléka, největší zastoupení představuje tuk, bílkoviny a laktosa. V nepatrných množstvích jsou zastoupeny dusíkaté látky nebílkovinné, organické kyseliny, enzymy, vitamíny a soli. Mléčný tuk se skládá z triacylglycerolů mastných kyselin. V mléku je rozptýlený v podobě kuliček, které jsou obklopené lipoproteinovou membránou, a je charakteristický vysokým obsahem nižších mastných kyselin. Chemické složení mléka je uvedeno v tabulce č. 1 [1,2].

Tabulka č. 1: Chemické složení syrového mléka [1]

Mléko (100 g)	Kravské	Kozí	Ovčí
Energie (kJ)	273	318	457
Voda (g)	87,6	85,9	80,9
Sušina (g)	12,4	14,1	19,1
Bílkoviny celkové (g)	3,25	3,71	5,97
Lipidy celkové (g)	3,73	4,52	7,31
Lipidy — kys. linolová (g)	0,09	0,14	0,24
Sacharidy celkové (g)	4,7	5,2	4,9
Popel (g)	0,70	0,74	0,88
Ca (mg)	121,6	158,9	199,5
Fe (mg)	0,07	0,08	0,18
Na (mg)	61	38	50
Mg (mg)	10	13	19
P (mg)	92	129	154
Cl (mg)	118	150	76
K (mg)	144	177	160
Zn (mg)	0,48	0,33	0,59

2.2 Mléčný tuk

Mléčný tuk je dispergován v mléčném séru ve formě tukových kuliček. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 0,1 – 15 μm a jejich počet v mléce činí 1,5 – 4 miliardy v 1 ml mléka [2]. Obsah tuku v mléku se mění v důsledku mnoha faktorů, jako typ chovů, diety a fáze laktace. Typický je však v rozmezí 3,5 až 4,7 %. Triacylglyceroly tvoří 98–99% lipidů v tukových kuličkách a jsou tak nejdůležitější součástí mléčného tuku. Jsou tvořeny glycerolem a mastnými kyselinami, kterých bylo v mléčném tuku identifikováno více jak 400. Z nich se však ve větším množství vyskytuje pouze asi 13 mastných kyselin, které mají zastoupení více jak 1 %. Ostatní mají zastoupení méně než 0,1 %.

[10,22] Dále jsou v tukových kuličkách obsaženy di- a monoacylglyceroly, steroly, volné mastné kyseliny a lipofilní látky karotenoidy a vitaminy A,D,E a K. Membrána tukových kuliček je tvořena fosfolipidy a proteinovými molekulami, a ty jsou tak stabilizovány. Malý podíl tuku je přítomný v koloidní disperzi v mléčném séru [2,3].

Mléčný tuk obsahuje přibližně 60–70 % nasycených mastných kyselin, 25–35 % mononenasycených mastných kyselin a méně než 5% polynenasycených kyselin. Nejvyšší podíl nasycených mastných kyselin tvoří kyseliny palmitová, stearová a myristová a z nenasycených kyselina olejová [4]. Mléčný tuk má ze všech přirozených tuků nejrozměnitější složení. Pro mléčný tuk je typické, že obsahuje poměrně vysoké množství mastných kyselin s krátkým řetězcem, na rozdíl od jiných olejů a tuků, kde se obvykle vyskytují jen ve stopách [2].

2.3 Lipidy

Lipidy patří k významným složkám potravin a ve výživě člověka tvoří jednu z hlavních živin nezbytnou pro zdraví a vývoj organismu. Jsou zdrojem energie, tvoří biomembrány, jsou prekurzorem mnoha dalších sloučenin a jsou transportním prostředkem pro vitamíny A, D, E a K. Přesto nepředstavují jednotně definovanou skupinu sloučenin, protože hlavním kritériem zařazení sloučenin do této skupiny bývá jejich hydrofobnost a ne chemické vlastnosti. Potíže nastávají se zařazením volných mastných kyselin, protože neobsahují alkoholový zbytek. Přesto se všeobecně považují za lipidy a měly by tvořit jejich samostatnou skupinu [5,6]. Mohou být extrahovány z tkání a pletiv do organických rozpouštědel, jako jsou chloroform, ether, benzen, horký ethanol [23].

Podle chemického složení se lipidy třídí do hlavních skupin. Rozeznávají se:

- homolipidy
- heterolipidy
- komplexní lipidy

2.3.1 Homolipidy

Homolipidy jsou sloučeniny mastných kyselin a alkoholů. Dělí se dále podle struktury vázaného alkoholu. Tím je v přírodních lipidech většinou glycerol, méně často ethery glycerolu, nebo hemiacetaly vyšších alifatických alkoholů, glykoly, ale také vyšší jednosytné alifatické alkoholy, alifatické a alicyklické terpenoidní sloučeniny, jako např. xanthofyly nebo různé steroidní sloučeniny. Nejpočetnější skupinou jsou acylglyceroly, tj. mono-, di- a hlavně triacylglyceroly [5,23]. Potravinářsky nejvýznamnější lipidy jsou estery glycerolu. Podle skupenství se označují názvy tuky s vyšším obsahem nasycených mastných kyselin, nebo oleje kde převažují nenasycené mastné kyseliny. Triacylglyceroly představují největší část lipidů, 96–98 % [5,9,10]. Acylglyceroly jsou hlavními složkami rezervního tuku, tvoří až 90 % tukových zásob živočichů i rostlin. Jde o směs esterů různých mastných kyselin a jsou doprovázeny rozličnými hydrofobními látkami, jako jsou fosfolipidy, steroly, karotenoidy, triterpeny a tokoferoly. Živočišné tuky jsou uloženy v podkožní tkáni a v oblasti ledvin. Rostlinné tuky jsou uloženy v semenech a některých plodech [23].

Estery mastných kyselin s monohydroxylovými alkoholy s dlouhým lineárním alifatickým řetězcem nebo steroly se označují triviálním názvem vosky. Jsou ve vodě nerozpustné. V živočišných voscích převažují alkoholy se 14 až 18 uhlíkovými atomy, v rostlinných voscích pak alkoholy s 26 až 30

atomy uhlíku. Mastné kyseliny esterově vázané ve voscích jsou většinou nasycené a s vyšším počtem atomů uhlíků [5,23].

2.3.2 Heterolipidy

Heterolipidy obsahují na rozdíl od homolipidů nejen vázané mastné kyseliny a alkoholy, ale také další složky, podle kterých se dělí na fosfolipidy, glykolipidy a sulfolipidy [5]. Nejvýznamnější skupinou fosfolipidů jsou glycerofosfolipidy, které obsahují esterově vázanou kyselinu fosforečnou, ve formě esteru nebo diesteru. Jsou nejhojněji zastoupenou skupinou polárních lipidů. Jsou základními stavebními prvky všech biomembrán a některé se účastní přenosu vzruchu v nervové tkáni. Fosfolipidy jsou v každé buňce, hojně jsou zastoupeny v mozku, v obalech nervových buněk, v semenech a vejcích [23]. Další důležitou skupinou jsou sfingofosfolipidy, které neobsahují glycerol, ale *N*-analogy glycerolu zvané obecně sfingosiny. Mezi významné fosfolipidy patří fosfatidylcholin a sfingomyelin [5,10].

2.3.3 Komplexní lipidy

Komplexní lipidy jsou makromolekulární látky, jejichž lipidová složka je na nelipidový podíl vázána vodíkovými můstky, hydrofobními interakcemi a jinými fyzikálními vazbami, ale částečně se mohou uplatnit kovalentní vazby. Nelipidovým podílem bývá nejčastěji protein, ale také polysacharid, jeho směs s proteinem. Lipoproteiny jsou nejdůležitějšími a nejlépe prozkoumanými komplexními lipidy. Jsou složeny z bílkovin a lipidů, přičemž lipidy tvoří jádro makromolekuly a hydratované proteiny jeho obal. Proto se lipoproteiny rozpouštějí, nebo alespoň dispergují ve vodě a slouží k transportu lipidů. Lipidové části lipoproteinů tvoří především triacylglyceroly, jsou v nich však přítomny i fosfolipidy (hlavně lecithiny a sfingomyeliny) a volný a esterifikovaný cholesterol [5,23].

2.4 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou nejdůležitější složkou lipidů. Podle názvosloví používaného v organické chemii se jako mastné kyseliny označují karboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem. Tato definice se však úplně nekryje s mastnými kyselinami přítomnými v lipidech [5]. Až na výjimky jsou tvořeny dlouhým nerozvětveným řetězcem. V přírodě bylo nalezeno více jak 50 různých mastných kyselin. Jsou vesměs tvořeny sudým počtem atomů uhlíku a mohou být nasycené nebo nenasycené [23]. Mezi nejrozšířenější mastné kyseliny patří 16- a 18- uhlíkaté mastné kyseliny, známé jako palmitová a stearová kyselina [6].

V přírodě, a tedy také v potravinách, se vyskytují v lipidech tyto skupiny mastných kyselin:

- nasycené mastné kyseliny
- nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (monoenové)
- nenasycené mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami (polyenové)
- mastné kyseliny s trojnými vazbami a s různými substituenty

Podle počtu atomů uhlíku (délky řetězce) se rozeznávají (nasycené i nenasycené):

- nižší mastné kyseliny (C4 a C6)
- mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (C8–C12)
- mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (C14–C18)

- mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (C20–C26)
- mastné kyseliny s ultra dlouhým řetězcem (C28–C38) [5]

2.4.1 Nasycené kyseliny

Nasycené mastné kyseliny jsou běžnou složkou přírodních lipidů. Běžně obsahují 4 až 38 atomů uhlíků, které mají zpravidla lineární, nerozvětvený řetězec, nejčastěji o sudém počtu uhlíků. Ve většině přírodních lipidů tvoří 10–40 % z celkových mastných kyselin a bývají tuhé [5,23]. V potravinách se z nasycených mastných kyselin nejčastěji vyskytují kyseliny palmitová a stearová [7]. Přehled nejčastějších nasycených mastných kyselin je uveden v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Nasycené mastné kyseliny vyskytující se v lipidech [5]

Mastná kyselina	Počet atomů uhlíku	Triviální název
butanová	4	máselná
hexanová	6	kapronová
oktanová	8	kaprylová
dekanová	10	kaprinová
dodekanová	12	laurová
tetradekanová	14	myristová
hexadekanová	16	palmitová
oktadekanová	18	stearová
eikosanová	20	arachová

2.4.2 Nenasycené kyseliny s jednou dvojnou vazbou

Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (stručněji nazývané monoenové) se liší navzájem počtem atomů uhlíků, polohou dvojné vazby a její prostorovou konfigurací [5]. V tabulce č. 3 jsou uvedeny některé nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou.

Tabulka č. 3: Hlavní monoenové mastné kyseliny vyskytující se v lipidech [5]

Mastná kyselina	Počet atomů uhlíku	Triviální název
decenová	10	kaprolejová
dodecenová	12	laurolejová
tetradecenová	14	myristolejová
hexadecenová	16	palmitolejová
oktadecenová	18	olejová
dokosenová	22	eruková

2.4.3 Nenasycené kyseliny s dvěma a více dvojnými vazbami

Mastné kyseliny s dvěma izolovanými dvojnými vazbami (dienové) jsou velmi důležité ve výživě. V přírodních lipidech se jich vyskytuje v podstatném množství jen několik. Nejvýznamnější je

kyselina linolová. Dvojně vazby jsou vždy v konfiguraci cis, čímž vzniká rigidní ohyb v alifatickém řetězci [5,23]. Zástupci nenasyčených mastných kyselin s více dvojnými vazbami jsou uvedeni v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Dienové, trienové a polyenové mastné kyseliny [5]

Mastná kyselina	Počet atomů uhlíku	Poloha dvojných vazeb	Triviální název
oktadekadienová	18	9,12	linolová
oktadekatrienová	18	6,9,12	γ -linolenová
eikosatetraenová	20	5,8,11,14	arachidonová

2.5 Mastné kyseliny v sýrech

Všeobecně nejběžnější nasycená kyselina je palmitová, která se vyskytuje prakticky ve všech živočišných lipidech. Pro mléčné tuky jsou typické nasycené mastné kyseliny s kratším řetězcem, např. kyselina máselná a skupina kyselin s 6–10 uhlíky v molekule. Kyselina máselná tvoří 4–8 %, kapronová 1–3 % hmotnosti veškerých mastných kyselin tuku kravského mléka. Mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem jsou přítomny obvykle jako minoritní složky. Nejrozšířenější nenasyčenou mastnou kyselinou je kyselina olejová. Z polyenových mastných kyselin je nejběžnější linolová kyselina. Zastoupení mastných kyselin v sýru eidam (50% tvs) je uvedeno v tabulce č. 5 [5,2].

Tabulka č. 5: Přehled mastných kyselin v sýru eidam (50% tvs) na 100g jedlého podílu [8]

Nasycené mastné kyseliny	Podíl na 100 g (g)
C 4:0	1,03
C 6:0	0,67
C 8:0	0,42
C 10:0	0,94
C 12:0	1,18
C 14:0	3,33
C 16:0	8,97
C 18:0	3,06
Mononenasycené mastné kyseliny	Podíl na 100 g (g)
C 14:1	0,42
C 16:1	0,67
C 18:1, n-9	6,73
C 20:1, n-11	0,36
Polynenasycené mastné kyseliny	Podíl na 100 g (g)
C 18:2, n-6	0,64
C 18:3, n-3	0,24

2.6 Stanovení mastných kyselin a lipidů v sýrech

V dnešní době je známo velké množství instrumentálních metod pro analýzu lipidů. Níže je uveden přehled těch nejdůležitějších, jejich výhody a nevýhody [19]. Vzhledem k zaměření experimentální části této práce, největší pozornost je věnována tenkovrstvé a plynové chromatografii.

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je založena na separaci na stacionární fázi na základě různé polaritativy analyzovaných složek. TLC je poměrně levná a rychlá metoda. Různé variace mobilní fáze umožňují separaci i složité směsi. Nevýhodou může být oxidace nenasycených mastných kyselin v případě delší expozice TLC desky na vzdušném kyslíku.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je založena na separaci na stacionární fázi, pod vysokým tlakem s použitím různých rozpouštědel jako mobilní fáze. Je dosahováno účinné separace, s možností propojení HPLC s hmotnostní spektrometrií.

Plynová chromatografie (GC) je metoda využívaná k separaci těkavých sloučenin. Detekce je často uskutečňována hmotnostní spektrometrií.

Měkká ionizační hmotnostní spektrometrie, typy MALDI (ke zplynění, degradaci a ionizaci molekul ve vzorku je použit dusíkový laser při 337 nm) a ESI MS (tzv. elektrosprejová ionizace) umožňují analýzu lipidů bez větších fragmentací analytu. Obě metody jsou velmi citlivé a umožňují přímou detekci analytu [13,19].

Spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR) je fyzikálně-chemická metoda využívající interakce atomových jader s magnetickým polem. NMR spektroskopii lze určit složení a strukturu molekul zkoumané látky i jejich množství. Téměř všechny lipidy jsou zjištělné touto metodou [19,20].

2.7 Tenkovrstvá chromatografie

Princip tenkovrstvé chromatografie (TLC) je znám více než sto let, avšak její analytické využití nastalo až v roce 1988 zásluhou E. Stahla. Od té doby se stala jednou z nejpoužívanějších chromatografických metod. Klasická TLC je jednoduchá, laciná metoda, která vyžaduje minimální instrumentaci, malé množství vzorku a málo rozpouštědel. Ve světě je široce používána pro analýzu potravin a kontrolu kvality, v medicínské chemii, v oblasti kontroly životního prostředí. Je používána pro separaci jednoduchých směsí a identifikaci či semikvantitativní vizuální analýzu vzorků. Moderní varianta TLC, vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC) využívá účinné stacionární fáze o malé a jednotné velikosti částic a příslušnou instrumentaci pro automatické dávkování, vyvíjení a detekce [11,12]. Přesnost a správnost kvantitativního vyhodnocení v HPTLC je srovnatelná s GC či HPLC. V mnoha případech TLC i předčí ostatní chromatografické techniky. Při použití TLC je výhodou velké množství druhů stacionární a mobilní fáze, které mohou být použity k oddělení složek směsí, patřící do různých skupin látek s různou selektivitou. Další výhodou je, že každá deska je použita pouze jednou a není tak důvod k obavě z deaktivace adsorbentu při opakované analýze. TLC umožňuje separaci surového extraktu bez předchozího čištění a odpadá tak složitý postup izolace frakce, o kterou se zajímáme. Na jedné desce může být analyzováno více vzorků najednou [21]. TLC je uplatňována v potravinářství při stanovení složek potravin, např. stanovení proteinů (kvalita proteinů), tuků (kvalita a falšování tuků), cukrů (kvalita nápojů), vitaminů a organických kyselin (konzervantů) [14].

2.7.1 Instrumentace TLC

2.7.1.1 Stacionární fáze

Stacionární fáze je umístěna v ploše, nanesená na vhodné desce. Chromatografie se provádí na tenké vrstvě (250–2000 μg) nejčastěji silikagelu, mikrocelulose, polyamidu nebo oxidu hlinitého o vhodném zrnění 60–70 μg . Volba stacionární fáze závisí na charakteru separovaných látek (zda jsou povahy hydrofilní či hydrofobní). Pokud jsou látky ve vodě rozpustné a mají iontovou povahu, je důležité, zda vykazují bazické či kyselé vlastnosti. Pro lipofilní látky se používají adsorbenty oxid hlinitý, silikagel, polyamid nebo acetylová celulóza. Pro hydrofilní látky se doporučují celulóza, měniče iontů, křemelina, polyamidy a chemicky vázané reverzní fáze. Přílnavost stacionární fáze na desku se zvyšuje přidávkou pojiva, např. škrob nebo bezvodý síran vápenatý. Vrstva sorpčního materiálu se nanáší ve formě kaše na skleněnou desku nanášecím zařízením. Vrstvy silikagelu se aktivují sušením při 110 °C a ekvilibrují na vzduchu. Často se používají komerčně nalévané vrstvy silikagelu, celulózy, nebo oxidu hlinitého na hliníkové fólii [11,13].

Typy stacionární fáze:

- Silikagel

Je nejrozšířenější stacionární fází v TLC. Je připravován srážením roztoku křemičitanu kyselinou, nebo hydrolyzou křemičitých derivátů. Je silně polární, slabě kyselý adsorbent s velkým měrným povrchem. Změnou pH při výrobě je možné připravit silikagel s měrným povrchem 200 až 500 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, objem pórů činí asi 0,75 $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$ a velikost částic 5–17 μg [11,24].

- Oxid hlinitý (Alumina)

Oxid hlinitý je méně používaný než Silikagel. Hlavním důvodem je to, že je nutné kontrolovat obsah vody, protože molekuly vody se ochotně na aluminu sorbují a konkurují tak adsorpci polárních solutů. Měrný povrch mezi 100 až 250 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, velikost pórů 2–9 nm. Používá se kyselá, bazická a neutrální alumina. Uplatňuje se při separaci bazických látek [11,24].

- Polyamid

Polyamid je vhodnou stacionární fází pro separace fenolů a příbuzných látek [11].

- Celulóza [11]

2.7.1.2 Mobilní fáze

Výběr mobilní fáze má důležitou roli pro správný výsledek separace. Mobilní fáze se skládají většinou ze směsi rozpouštědel, někdy s přidávkou kyselin, bází nebo tlumivých roztoků. Jejich složení závisí na struktuře analyzovaných látek a rovněž na použité stacionární fázi, např. pro separaci polynenasycených mastných kyselin použil Wilson a Sargent [25] směs toluen-acetonitril (97:3), Schwertner a Mosser [25] použili při studiu lipidů souvisejících s nemocí srdce směs hexan-diethylether-kyselina octová-butyldihydroxytoluen (95:5:1:0,1). Pro polární látky je používána vysoce polární mobilní fáze, pro méně polární látky je vhodná málo polární mobilní fáze [11,24]. Mezi často používané složky mobilní fáze patří hexan, dichlormethan, toluen, diethylether, ethylacetát, aceton, methanol [11,15].

2.7.1.3 *Vyvíjecí nádoba*

Jako vyvíjecí nádoby se používají komory nebo nádrže o vhodné velikosti. Nejčastěji používané jsou skleněné vyvíjecí komory, které jsou dostupné v různých velikostech, obdélníkové či kruhové [24].

2.7.1.4 *TLC destičky*

Sorpční materiál se nanáší na skleněné destičky ručně nebo pomocí nanášecího zařízení. V dnešní době se využívá především komerčně dostupných nalévaných vrstev sorbentu na hliníkové fólii (silufol, lucefol) [13].

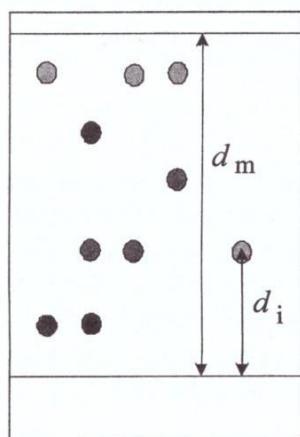
2.7.2 **Princip TLC**

Vzorek se nanese blízko okraje ve formě skvrny nebo pásu na označený start. Tento okraj desky se ponoří do mobilní fáze, která se nechá vzlínat póry stacionární fáze. Deska je umístěna v komoře sycené mobilní fází. Mobilní fáze unáší analyty, které jsou po různou dobu zadržovány stacionární fází. Hnací silou pohybu mobilní fáze jsou kapilární síly. Ty jsou větší v úzkých mezičásticových kanálcích, a proto je v nich rychlost mobilní fáze vyšší. Naopak širší póry se plní pomaleji a vytváří se v nich silnější vrstva mobilní fáze. Průtok mobilní fáze tedy není konstantní a nelze ho kontrolovat. To způsobuje špatnou reprodukovatelnost hodnot R_f . Dříve, než dosáhne čelo mobilní fáze konce desky, ukončí se analýza, deska se vyjme z komory, vysuší se a označí se čelo mobilní fáze a polohy skvrn. V některých případech, kdy látky migrují velmi pomalu, se používá i technika přetečení mobilní fáze. K detekci skvrn se použije buď jejich přirozeného zbarvení, nebo se skvrny zviditelní reakcí s vhodným činidlem [11].

V průběhu separace převládá adsorpční mechanismus. K diferencované adsorpci dochází vlivem interakcí mezi povrchem pevné fáze a uspořádané v tenké vrstvě a komponentami ve směsi roztoku. Tyto dvě fáze jsou navíc v kontaktu s třetí fází, tvořenou parami mobilní fáze. Adsorpce látek může být výsledkem fyzikálních sil na mezifázi pevná látka-roztok nebo plyn, nebo chemických, tj. na povrchu tenké vrstvy adsorbentu vznikající chemické vazby [11,13]. Uplatňují se i intramolekulární síly, indukční síly, vodíkové vazby, změna náboje a kovalentní vazby. Míra interakce mezi analytem a mobilní fází a analytem se stacionární fází určuje míru rozdělení analytu. Pokud analyt interaguje více s mobilní fází, bude se v ní více zdržovat a separace bude neúčinná. Naopak pokud bude více interagovat se sorbentem, separace bude účinnější [24].

Základní veličina, která charakterizuje polohu separovaných zón, se nazývá retenční faktor R_f , definovaný jako poměr vzdáleností, které urazily složky vzorku d_i a čelo mobilní fáze d_m (viz obrázek 1). Hodnota R_f je definována vztahem:

$$R_f = \frac{d_i}{d_m} \quad (1)$$



Obr. 1 Chromatogram TLC [11]

d_i ... vzdálenost složek vzorku od startu
 d_m ... vzdálenost čela mobilní fáze od startu

Hodnota R_f se pohybuje v mezích $<0, 1>$. Pokud je $R_f = 0$, látka nemigruje. Pokud je rovno 1, pak látka není zadržována stacionární fází a migruje s čelem rozpouštědla. Reprodukovatelnost hodnot R_f závisí na složení rozpouštědlové soustavy, druhu adsorbentu, koncentraci separované složky a přítomnosti další látky. Retenční faktor je kvalitativní charakteristikou látky v dané rozpouštědlové soustavě a za daných podmínek. Proto se při identifikaci látek pomocí hodnot R_f používají standardy, nebo se hodnoty přepočítávají na hodnoty R_M [11,13]. Hodnota R_M je definována vztahem:

$$R_m = \log \left[\left(\frac{1}{R_f} \right) - 1 \right] \quad (2)$$

2.7.3 Dávkování vzorku a vyvíjení chromatogramu

Vzorky se obvykle nanášejí ve formě pásu pomocí mikrostříkačky, jako jsou ty, které vyrábí Hamilton. Jsou obvykle používány pro objemy 5 až 10 μl . Nanášení takto malého vzorku vyžaduje praxi a je nutné vymývat stříkačku během jednotlivých nanášení. Alternativou k mikrostříkačkám jsou kapiláry, jejich výhodou je jednorázové použití a nehrozí tak kontaminace vzorků. Množství vzorku naneseného na destičku se odvíjí od typu vzorku a použité stacionární a mobilní fáze. Nejčastěji se pohybuje v rozmezí 2 až 10 μl . Po aplikaci vzorku je nutné nechat rozpouštědlo odpařit. Tento krok je nezbytný k bezchybnému vývinu TLC destičky [24]. Nejběžnější je vyvíjení vzestupné, kdy je komora sycena parami rozpouštědel. Obvykle se provádí jednoduché vyvíjení, které slouží k prvotnímu odhadnutí přítomných látek [19].

Pokud nedojde k dostatečné separaci, je možné využít vícenásobné vyvíjení. Při dvojrozměrném vyvíjení se postupuje tak, že po vyvíjení v jednom směru se deska vysuší, otočí se o 90° a vyvíjí se znovu jinou soustavou rozpouštědel [11,21]. Slouží ke stanovení komplexní směsi látek, např. lipidů z mozkových mitochondrií, jak uvádí ve své přehledné práci Fuchs a kol. [19]. Další možností je kruhové neboli radiální vyvíjení, kdy se eluent přivádí do středu desky a složky migrují k jejímu obvodu. Při vícenásobném vyvíjení se na danou desku postupně aplikují různé mobilní fáze. Kdykoliv

čelo následující mobilní fáze přijde do styku se zónami složek vzorku, dochází k jejich zakoncentrování. Tím se zóny refokussují a zvýší se účinnost separace i citlivost detekce. Lze tak vytvořit období gradientové eluce u vysokoúčinné kapalinové chromatografie [11,19].

2.7.4 Vyhodnocení chromatogramu

V případě, že jsou separované látky přirozeně zbarvené, jsou na chromatogramu viditelné. Pokud nejsou, je nutné skvrny vizualizovat. Využívá se postřiku činidlem či ponoření do vhodných činidel, pozorování v UV záření, přirozené fluorescence, zhášení fluorescence či zahřátím. Časté je použití univerzálních činidel jako je např. jód, nebo páry kyseliny sírové, které umožňují detekci téměř všech tříd organických sloučenin [11,21]. Selektivní činidla mohou být použita pro individuální nebo skupinové identifikace analytů [21]. Je známo mnoho metod pro látky, které nemohou být identifikovány na denním světle nebo v UV světle, např. metoda pro identifikaci neutrálních živočišných lipidů podle Sherma [12], kdy jsou použita 2 různá činidla (octan mědnatý, kyselina sírová a zahřívání při 100°C). Některá činidla pro zviditelnění skvrn jsou uvedena v tabulce č. 6 [11,12].

Kvantitativní vyhodnocování je buď přímé, nebo nepřímé. Při nepřímé semikvantitativní metodě se skvrna vyškabe z tenké vrstvy a potom extrahuje vhodným rozpouštědlem. Koncentrace látky v extraktu se pak určí jinou instrumentální metodou, například plynovou chromatografií. Mezi přímé metody patří měření plochy skvrny (logaritmus plochy skvrny je úměrný koncentraci), radiochemické metody (jde-li o radioaktivně značené látky) a denzitometrie [11]. Použití skenovacích fotodenzitometrů je nejrozšířenější a poskytuje nejpřesnější výsledky. Převádějí intenzitu zabarvení skvrn na chromatogram s píky, jejichž plocha je úměrná množství analytů ve skvrnách a porovnává se se standardy měřenými za stejných podmínek [11,21].

Tabulka č. 6: Některá činidla používaná pro zviditelnění skvrn v TLC [11]

Činidlo	Typy látek
páry jódu	nespecifické činidlo pro téměř všechny organické látky
KMnO ₄ /kyselina sírová	nespecifické činidlo pro organické látky
kyselina sírová	nespecifické činidlo pro některé organické látky
fluorescamin	primární a sekundární aminy, peptidy, sulfoamidy
anisaldehyd	cukry
SbCl ₃	některé lipidy, steroidy, glykosidy
SbCl ₅	terpeny

2.8 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) nese své označení podle skupenství mobilní fáze, kterou je plyn. Je to separační metoda, při které se oddělují, separují složky obsažené ve vzorku. Používá se pro kvantitativní i kvalitativní analýzu vzorku. GC je vhodná pro analýzu těkavých látek, jež je možno převést do plynného stavu s bodem varu menším než cca 400°C. GC je nejrozšířenější technikou pro stanovení profilu mastných kyselin [13,16,17].

2.8.1 Princip GC

Vzorek se nanáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá, nazývá se nosný plyn. Ten unáší analyt kolonou. Aby mohl být vzorek transportován, musí se ihned přeměnit na plyn. Pro separaci se využívá rozdělení koncentrace analytu mezi stacionární a mobilní fázi na základě adsorpce nebo rozpouštění a je postupně eluován inertním nosným plynem. Složky opouštějící kolonu jsou indikovány detektorem. Signál detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek [11,13,17].

2.8.2 Instrumentace GC

Zařízení pro plynovou chromatografii se skládá ze zdroje nosného plynu, čistícího zařízení, dávkovače (injektoru), chromatografické kolony umístěné v termostatu, detektoru a vyhodnocovacího zařízení [13,17].

2.8.2.1 Zdroj nosného plynu

Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev, obsahující podle zvoleného způsobu detekce separovaných složek vodík, dusík, helium nebo argon. Lahve jsou plněny maximálně na tlak 20 MPa a jsou označeny nezaměnitelnými barvami podle plynu. Čistota plynu se označuje dvojčíslem XZ, kde X je počet devítek a Z je následující významná číslice v procentuálním udání čistoty. Dalším možným zdrojem nosného plynu může být generátor, pracující na principu molekulových sít. Volba nosného plynu má vliv na separační účinnost v důsledku rozdílných difúzních koeficientů složek v různých plynech. Při volbě plynu hraje také roli potřeba netoxicity, bezpečnosti práce a nižší ceny [11,13,17].

2.8.2.2 Čistící zařízení

Zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu. Zbavuje nosný plyn nežádoucích stop ostatních plynů [17].

2.8.2.3 Regulační systém

Regulační systém zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu. Rozlišují se mechanické a elektronické regulátory a regulátory podle konstantního tlaku nebo konstantního průtoku. Elektronickou regulací lze docílit stanoveného průtoku i při změnách teploty během separace [11,17].

2.8.2.4 Dávkovač (injektor)

Dávkovač slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu a převedení do plynného stavu. Provádí se mikrostříkačkou přes těsnění uzavírající vnitřní prostor dávkovače. Objem vzorku, který je možno přivést do separační kolony je velmi malý (0,01–0,1 μl), proto je většinou nutno v dávkovači oddělit definovaný podíl vzorku mimo kolonu (pomocí děliče toku). Pro plynné vzorky se používají plynotěsné injekční stříkačky, nebo obtokové dávkovací kohouty různých konstrukcí [17,18].

Dávkování vzorku lze provádět dvojím způsobem, nad ústí kolony a přímo na kolonu. První způsob je využíván pro náplňové kolony, druhý způsob se uplatňuje u kapilárních kolon. Dávkování přímo na

kolonu se provádí různými způsoby: dávkování přímo do kolony (*on column*), pomocí děliče toku (*split injection*), bez děliče toku (*splitless injection*) [13,17].

2.8.2.5 Kolony

V plynové chromatografii se používají náplňové nebo kapilární kolony. Náplňové kolony jsou kovové nebo skleněné trubice o vnitřním průměru 2–6 mm a délce 1–5 m. Plní se adsorbenty na bázi silikagelu, aktivního uhlí nebo aluminy. Nosičem kapalné fáze pro rozdělovací chromatografii je např. křemelina. Jako molekulová síta se používají hlinitokřemičitany [13,17,18].

Jako zakotvené fáze se používají netěkavé, při použité teplotě chemicky inertní kapaliny, které se zakotvují na povrch inertních nosičů. Používají se stacionární fáze různé polaritry na bázi siloxanů a polyethylen glykolů, esterů, uhlovodíků, silikonových olejů a dalších [13].

Kapilární kolony jsou skleněné, křemenné, plastové (polyamidy, polyestery, teflon) nebo kovové. Jejich vnitřní stěny jsou povlečené stacionární fází nebo jsou kapiláry naplněné stacionární fází v celém objemu [13]. Kapilární kolony dosahují velmi vysokých separačních účinností několika set tisíc pater, při celkové délce až 100 m. Jsou však zatížitelné pouze malým množstvím dávkovaného vzorku [18]. Konstruují se také kovové kolony s vnitřní křemennou stěnou, nebo křemenné kapiláry potažené polyimidem. Polyimid dává křehkému materiálu kolony pružnost a chrání ho před zlomením [13,17]. Podle uložení stacionární fáze rozlišujeme tři typy kapilárních kolon:

- WCOT (kapalná stacionární fáze tvoří tenký film na vnitřní stěně kapiláry)
- SCOT (kapalná stacionární fáze je zakotvená na povrchu pevného nosiče na stěně kapiláry)
- PLOT (na vnitřní stěně je tenká vrstva pórovitého materiálu, např. alumina) [13,17].

2.8.2.6 Detektory

Detektory jsou zařízení, ve kterých je fyzikálně chemická vlastnost analytu převáděna na měřitelný, zpravidla elektrický signál. Nosný plyn z kolony protéká detektorem, který zaznamenává přítomnost analytu a vysílá signál v závislosti na čase. Detektory umožňují registraci jednotlivých zón separovaných složek, jejich identifikaci a kvantifikaci [11,13,17]. Ideální detektor pro GC by měl mít: vysokou citlivost, dobrou stabilitu a reprodukovatelnost signálu, nízký šum, rychlou odezvu, lineární dynamickou odezvu, teplotní rozsah min. do 400 °C, obdobnou odezvu pro všechny analyty [13]. Detektory je možno rozdělit na univerzální a selektivní [18].

Tepelně vodivostní detektor (TCD) je univerzální a nedestruktivní detektor, který sleduje změnu tepelné vodivosti nosného plynu vycházejícího z kolony, vyvolanou přítomností separovaných složek. V průtokové cele jsou vyhřívané nejčastěji platinové spirálky obtékané nosným plynem s tepelnou vodivostí podstatně vyšší než separované látky. Přítomnost analytu změní tepelnou vodivost kolem spirálky a tím její teplotu a elektrický odpor. Nevýhodou je relativně nízká citlivost [13,17,18].

Plamenový ionizační detektor (FID) je univerzální detektor pro organické sloučeniny. Je tvořen hořákem, ve kterém je spalována směs vodíku a vzduchu a do něhož je přiveden i výstup z chromatografické kolony. Jedna elektroda (anoda) je kovová část těla hořáku, druhá (katoda) je kovová síťka umístěná těsně nad plamenem. Mezi elektrodami je potenciálový spád cca 500 V.

Molekuly organických sloučenin poskytují v plameni radikály, které přechází na ionty. Ty zvyšují elektrickou vodivost plamene a detektorem probíhá proud úměrný koncentraci [13,17,18].

Detektor elektronového záchytu (ECD) je zástupcem selektivního detektoru. Využívá schopnosti eluovaných látek vytvořit negativní ion zachycením nízkoeenergetického elektronu. Analyt prochází kolem β -zářiče, který emituje rychlé elektrony. Ty způsobují ionizaci nosného plynu a dochází k emisi elektronů o nízké energii. Pohyblivost těchto nových částic je nižší, proto se sráží s rovněž přítomnými kladnými částicemi a eliminují se. Tím se snižuje ionizační proud. Detektor je velmi citlivý na halogenované sloučeniny, dále také na sloučeniny obsahující fosfor, kyslík, síru, olovo, nitrosloučeniny a areny [11,13,17,18].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a laboratorní vybavení

3.1.1 Chemikálie

- Diethylether p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Petrolether p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Hexan p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Ethylalkohol 96 %, Lach-Ner, Neratovice
- Hydroxid draselný p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Isooktan p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Kyselina chlorovodíková p.a., PENTA, Chrudim
- Kyselina octová
- BF_3 (14 % roztok v metanolu), p. a., SIGMA-ALDRICH, Německo
- Směsný standard methylesterů mastných kyselin – FAME mix 37, SIGMA-ALDRICH, Německo
- Jod

3.1.2 Plyny

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

3.1.3 Přístroje

- Plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest S.p.A., Itálie) s plamenově ionizačním detektorem, split/splitless injektorem a kapilární kolonou DB-23 s výstupem na PC
- Počítač PC, Intel Pentium Procesor
- Analytické digitální váhy HELAGO, GR-202-EC, Itálie
- Vakuová rotační odparka
- Chladnička s mrazničkou
- Sušárna

3.1.4 Pomůcky

- TLC destičky Silikagel 60, 20 x 20 cm, MERCK, Německo
- Vytvájecí komora
- Mikrostříkačka Hamilton 100 μl
- Běžné laboratorní sklo
- Mikropipety BIOHIT 1000, 200, 100 μl
- Vialky s kaučuk-teflonovými septy a šroubovacími uzávěry, plastové Eppendorfovy mikrozkušavky

3.2 Analyzované vzorky

Jako testovací vzorky byly použity: slunečnicový olej zakoupený v běžné tržní síti a modelový tavený sýr vyrobený na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně standardním technologickým postupem. Vzorky byly uchovávány v chladničce při teplotě do 6 °C. Pro analýzu bylo potřebné množství oleje naváženo s přesností na čtyři desetinná místa a rozpuštěno v 1 ml hexanu. Tavený sýr byl promíchán a pomocí špachtle bylo odebráno a naváženo množství potřebné k extrakci lipidů s přesností na čtyři desetinná místa.

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Extrakce lipidů podle ČSN EN ISO 1735

K připravenému vzorku bylo přidáno 5 ml HCl. Směs se nechala zahřívát ve vodní lázni při 80 °C až do úplného rozpuštění sýru (cca 15 min), následně byla směs ochlazená tekoucí vodou. Poté bylo přidáno 5 ml ethanolu a směs byla kvantitativně převedena do dělicí nálevky. Ke směsi bylo postupně přidáno 8,4 ml diethyletheru a 8,4 ml petroletheru a po každém přidavku byla směs mírně promíchána a třepána po dobu 1 min. Směs se nechala 30 min odstát pro oddělení fází (při laboratorní teplotě cca 22 °C) – první extrakce. Po této době byla horní fáze přesunuta do předem zvážené baňky. Následně byla provedena druhá a třetí extrakce, vždy s přidavkem 4,2 ml diethyletheru a 4,2 ml petroletheru a odstáním směsi po dobu 30 min do oddělení fází. Všechny tři extrakty byly spojeny a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce při teplotě do 40 °C. Množství vyextrahovaného tuku bylo zjištěno gravimetricky – zvážením na analytických vahách s přesností na 0,000 1 g a odečtením váhy čisté extrakční baňky [27].

3.3.2 Frakcionace lipidů pomocí TLC

Při veškeré práci, při které bylo pracováno s TLC deskami, byly použity ochranné rukavice, z důvodu omezení kontaminace desky MK z povrchu kůže.

3.3.2.1 Aktivace TLC desky

TLC deska byla aktivována v sušárně při 100 °C po dobu 30 minut. Zabalena byla ve filtračním papíru.

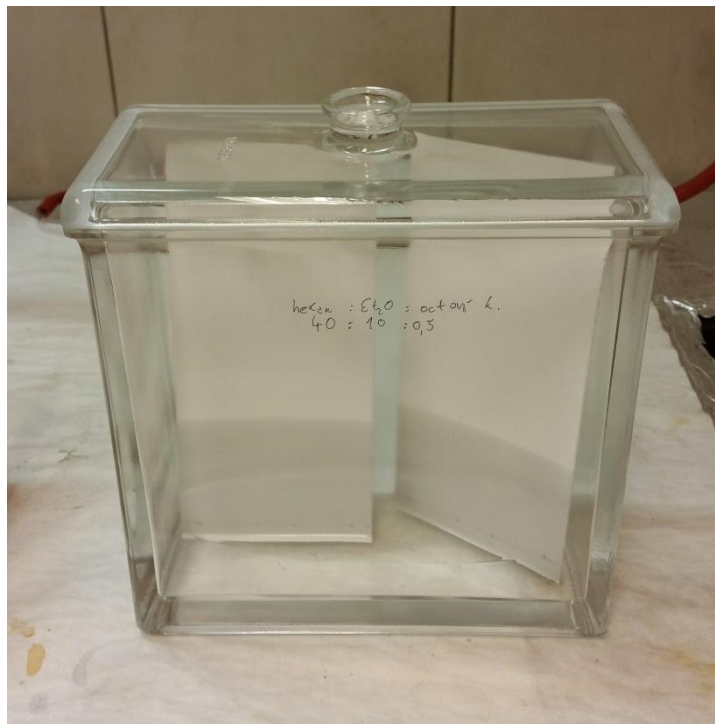
3.3.2.2 Nanesení vzorku na TLC desku

Vzorek byl nanášen na TLC desku pomocí mikrostříkačky Hamilton 100 µl. Na desce byl vyznačen obyčejnou tužkou rovný úsek o délce 3 cm (start). Na něj bylo rovnoměrně nanášeno vhodné množství vzorku. Deska byla ponechána, dokud skvrna nezaschla.

3.3.2.3 Vyvíjení TLC desky

Vyvíjení probíhalo ve skleněné komoře se směsí rozpouštědel (hexan : diethylether : kyselina octová 80 : 20 : 1 v/v/v), ve které byla postavena TLC destička s naneseným vzorkem tak, aby vzorek byl nad hladinou rozpouštědel. Vyvíjecí směs byla připravena tak, že potřebné množství rozpouštědel bylo odměřeno odměrným válcem, případně pipetou a smícháno v kádince. Tato směs byla následně přelita do vyvíjecí komory. Při každém novém vyvíjení byla připravena nová směs, z důvodu značné

těkavosti diethyletheru. Vytvářející komora je vidět na obrázku č. 2. Po dosažení čela (cca 1,5 hod.) byla deska vyjmuta, ponechána v digestoři oschnout a přemístěna do komory pro vizualizaci.



Obr. 2 Vytvářející komora

3.3.2.4 Vizualizace

Vizualizace probíhala ve skleněné komoře s párami jódu. TLC deska byla do této komory umístěna po dobu 15 minut. Komora s párami jódu je zobrazena na obrázku č. 3.



Obr. 3 Komora s párami jódu (vizualizace chromatogramu)

3.3.2.5 Vyškrabání separované zóny

Příslušné zóny (frakce lipidů) byly označeny tužkou a vyškrabány pomocí špachtle. Takto vyškrabaný silikagel obsahující jednotlivé frakce byl pokud možno kvantitativně převeden do destilačních baněk (50 ml) [25,28]. Jednotlivé frakce byly následně esterifikovány a analyzovány na GC.

3.3.3 Příprava methylesterů mastných kyselin

3.3.3.1 Metoda podle ČSN EN ISO 5509 využívající bortrifluorid jako katalyzátor

Tuk (resp. příslušná lipidická frakce) se kvantitativně převede pomocí 1 ml hexanu do 50 ml destilační baňky. Přidají se 4 ml methanolického roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$) a varný kamínek. K baňce se připojí zpětný chladič. Obsah baňky se vaří pod zpětným chladičem do vymizení kapiček tuku, každých 30 s se krouží jemně baňkou, aby nedošlo k tvorbě pevného kroužku hydroxidu sodného na stěně baňky. Trvá to obvykle 5 – 10 minut, potom se přidá 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu přes horní konec chladiče a vaří se 3 minuty. Do vroucí směsi se přidají se 3 ml isooktanu přes horní konec chladiče. Přeruší se zahřívání, odstraní se chladič a ihned, bez jakéhokoli chlazení, se přidá 20 ml nasyceného roztoku chloridu sodného. Baňka se uzavře a pořádně protřepe asi 15 s. Přidá se větší množství nasyceného roztoku chloridu sodného tak, aby se hladina kapaliny dostala do hrdla baňky. Nechají se oddělit dvě fáze; 1 – 2 ml horní isooktanové vrstvy se přenesou do 4 ml vialky a přidá se malé množství bezvodého síranu sodného, aby se odstranily stopy vlhkosti. Takto připravený extrakt se dává do plynového chromatografu [29,30]. Pro stanovení VMK zmýdelnění hydroxidem sodným není nutné a je možné frakci přímo esterifikovat reakcí s bortrifluoridem. Další postup je stejný [29,30].

Veškeré extrakty byly uschovány v lednici při cca 4 °C max. do druhého dne, do GC injektoru byl autosamplerem dávkován vždy 1 µl extraktu. Methanolický roztok hydroxidu sodného je nutné rovněž uchovávat v lednici při cca 4 °C (příprava viz výpočet 1, rovnice 3).

Výpočet 1: množství NaOH, potřebné k přípravě methanolického roztoku NaOH, s cílovou koncentrací $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$

$$m = c \cdot V \cdot M_r \quad (3)$$

Kde:

m hmotnost NaOH [g]

c cílová koncentrace NaOH [mol.l^{-1}]

V objem methanolu [l]

M_r molární hmotnost NaOH [g.mol^{-1}]

3.3.4 Podmínky stanovení mastných kyselin metodou GC-FID

- Plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest S.p.A., Itálie)
- Plamenově ionizační detektor (FID), 250 °C, průtok vodíku 35 ml.min⁻¹, průtok vzduchu 350 ml.min⁻¹, make-up dusíku 30 ml.min⁻¹
- Dávkování: autosampler bez děliče toku (1 µl), ventil uzavřen po dobu 5 min
- Teplota injektoru: 250 °C
- Nosný plyn: dusík s průtokem 0,5 ml.min⁻¹
- Kapilární kolona: DB-23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
- Teplotním program: 60 °C, 10 min, vzestupný gradient 12 °C/min do 200 °C s výdrží 10 min, vzestupný gradient 5 °C/min do 220 °C s výdrží 15 min, vzestupný gradient 10 °C/min do 240 °C s výdrží 7 min
- Celková doba analýzy: 60 minut

3.3.5 Identifikace a kvantifikace mastných kyselin

Mastné kyseliny byly stanoveny po převedení na methylestery (MeMK) (viz kap. 3.3.3). Identifikace jednotlivých MEMK v testovaných frakcích byla provedena na základě srovnání retenčních časů identických standardů. Semikvantitativní zastoupení vybraných mastných kyselin je vyjádřeno jako plocha příslušných píků na chromatogramu.

3.3.6 Statistické zpracování výsledků

Data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu MS Excel 2010. Pro naměřená data bylo v rámci statistického vyhodnocení použito následujících statistických parametrů: aritmetický průměr, směrodatná odchylka (SD) a relativní směrodatná odchylka (RSD).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je součástí projektu řešeného v rámci našeho ústavu, který se zabývá problematikou lipidů v přírodních, resp. tavených sýrech a jejich změnami během výroby, zrání a skladování.

Tuk v sýrech významně ovlivňuje texturu, ale je nezbytný i pro vývoj správné chuti a vůně. Následkem lipolýzy během zrání sýrů se uvolňují VMK, které jednak přímo přispívají k sýrovému aroma a jednak jsou důležitými prekurzory dalších aromatických sloučenin, jako jsou alkany, estery, sekundární alkoholy, methyloketony a laktony [31, 32].

Na našem ústavu byla metoda stanovení MK ověřena a zavedena v rámci diplomové práce Pruknerové [26]. Metoda používá extrakci lipidů ze vzorků modifikovanou metodou podle Folche (směsí chloroform - methanol), esterifikaci s použitím methanolového roztoku KOH a stanovení pomocí GC-FID [26]. Vzhledem k výše zmíněné důležitosti VMK v chuti a vůni sýrů bude tato metoda modifikována za účelem možnosti stanovení VMK. Publikací na toto téma je málo, zvláště aplikací na sýry příp. mléčné výrobky; používají se různé metody, jejich podstatou je většinou separace jednotlivých lipidových frakcí, které je potom možné analyzovat odděleně. Pro tento předseparační krok lze využít různé metody, dříve se často používala TLC, kolonová chromatografie nebo později HPLC, dnes je nejčastěji aplikována extrakce pevnou fází (SPE) [33].

Cílem této práce bylo nalézt optimální podmínky a ověřit vybrané validační parametry metody vhodné pro stanovení VMK s využitím rozdělení frakcí pomocí TLC. Metoda byla vypracována tak, aby byla použitelná především pro analýzu různých typů přírodních a tavených sýrů, resp. z nich vyextrahovaného tuku, lze ji však aplikovat obecně na jakýkoli typ tuku (oleje).

První experimenty byly pro zjednodušení prováděny na vzorcích slunečnicového oleje (odpadá zdlouhavý krok extrakce), později byla metoda aplikována na tuk vyextrahovaný ze vzorků modelových tavených sýrů. Pro extrakci lipidů ze vzorků sýrů byla použita směs diethyletheru a petroletheru dle příslušné normy [27]. Pro frakcionaci lipidů byla použita TLC, jejíž optimalizace je hlavní náplní této práce. Pro esterifikaci MK ze získaných frakcí byla použita normovaná metoda využívající metanolický roztok bortrifluoridu [29,30]. Pro stanovení MK ve všech získaných frakcích byla použita plynová chromatografie s FID detekcí.

4.1 Složení mléčného tuku

Vzhledem k tématu této práce, která je zaměřena na lipidickou složku sýrů, v tabulce č. 7 je uveden přehled lipidických frakcí mléčného tuku a jejich procentuální zastoupení. Jak již bylo zmíněno, TAG tvoří 98–99 % a jsou tak nejdůležitější součástí mléčného tuku [2,3]. Z našeho hlediska lze považovat za nejdůležitější frakci VMK, přestože jejich kvantitativní zastoupení je malé (0,1%) [34]. V další části práce byly tedy pro zjednodušení po frakcionaci brány v úvahu frakce VMK, TAG (jsou zastoupeny v největší míře) a mono- a diacylglyceroly (jako vázané MK). Vzhledem k minimálnímu množství byly ostatní frakce zanedbány.

Tabulka č. 7: Podíl lipidických složek v mléku [34]

Třída lipidů	Množství [%]
Triacylglyceroly	98,3
Diacylglyceroly	0,3
Monoacylglyceroly	0,03
Volné MK	0,1
Fosfolipidy	0,8
Steroly	0,3
Karotenoidy	stopy
Vitaminy rozp. v tucích	stopy
Aromatické látky	stopy

4.2 Frakcionace lipidů pomocí TLC

Hlavní náplní práce bylo ověřit možnost použití TLC pro frakcionaci lipidů získaných ze vzorků modelových tavených sýrů. TLC je sice stará, ale dosud často používaná metoda, v řadě případů byla použita i na frakcionaci lipidů, o čemž svědčí např. práce Fuchs a kol. [19] a Touchstone [25].

Postup TLC byl převzat z prací Touchstone [25] a Čertíka a kol. [28] a v naší laboratoři poprvé vyzkoušen v diplomové práci Hornákové [33]. Metoda zde byla vyzkoušena na frakcionaci lipidů v modelových vzorcích tavených sýrů a přírodních sýrů typu Gouda. Zároveň bylo provedeno předběžné porovnání s metodou SPE.

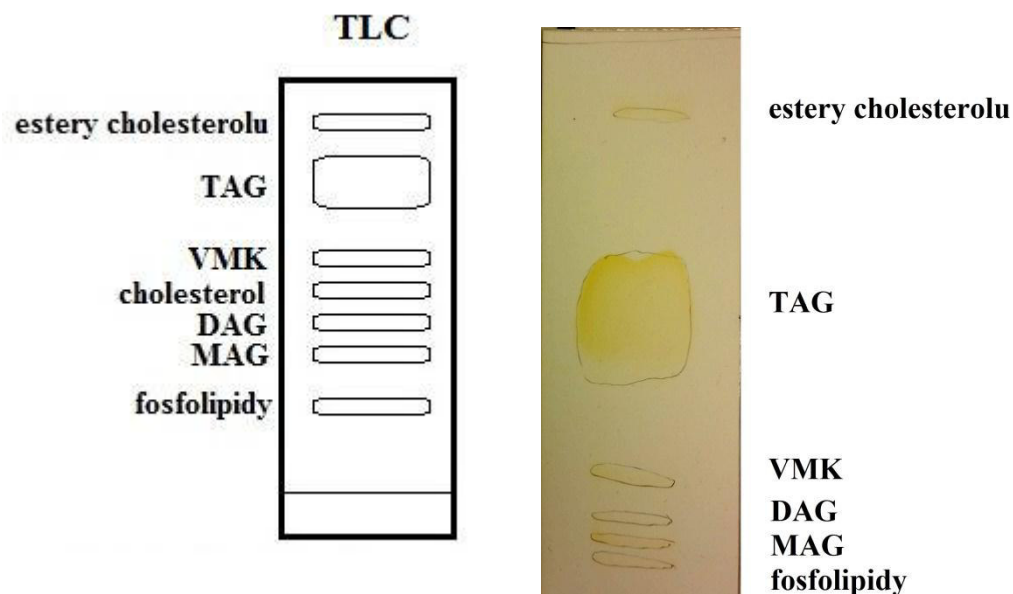
V rámci této navazující práce byly optimalizovány vybrané parametry TLC a ověřeny vybrané validační parametry, celá metoda TLC-GC-FID pak byla aplikována na vzorek taveného sýra.

Veškeré experimenty byly provedeny následujícím schematickým postupem:

Z komerčně vyráběných TLC destiček byl vystřižen obdélník o rozměrech 10 x 20 cm, skutečná vyvíjecí dráha byla cca 18 cm. Po aktivaci TLC desky (100 °C 30 min.) byl na start nanesen vzorek oleje (resp. vyextrahovaného tuku), (proužek o délce 3 cm) rozpuštěný v hexanu (množství bylo optimalizováno). Vyvíjení probíhalo se směsí rozpouštědel (hexan : dietyléther : kyselina octová 80 : 20 : 1 v/v/v) cca 1,5 hod (bylo optimalizováno). Vizualizace probíhala v komoře s párami jódu cca po dobu 15 minut do objevení žlutých skvrn. Skvrny (frakce lipidů) byly označeny tužkou, po vymizení jódu vyškrabány a samostatně analyzovány.

Obecné eluční schéma lipidických frakcí na TLC bylo získáno aplikací vzorku oleje a je znázorněno na obrázku č. 8.

Identifikace skvrn se běžně provádí pomocí retenčních faktorů R_f a srovnáním se standardy [11,13], což v našem případě nebylo nutné, protože frakce byly snadno identifikovány vizuálně podle polohy a pořadí na chromatogramu na základě práce Kalužného (viz obrázek č. 4) [35]. Pro naše účely byla tato identifikace dostačující.



Obr. 4 Eluční schéma lipidických frakcí na TLC; schematicky (vlevo) [33,35], skutečné (vpravo)

4.3 Optimalizace experimentálních podmínek

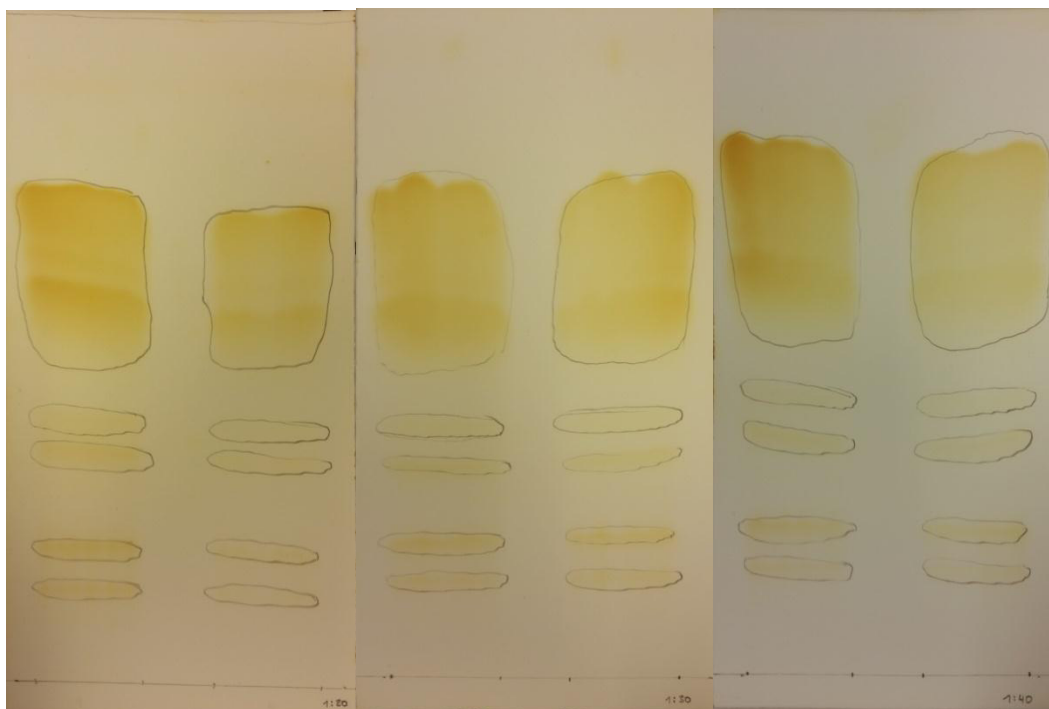
Tato práce je především zaměřena na optimalizaci podmínek TLC, přičemž byly optimalizovány následující parametry: typ stacionární fáze, doba a způsob vyvíjení, množství dávkovaného vzorku a složení vyvíjecí směsi rozpouštědel. Parametry byly optimalizovány za účelem dosažení co nejlepší separace a viditelnosti jednotlivých skvrn.

4.3.1 Volba separačního systému

V případě TLC je pro ovlivnění rozlišení nejdůležitější selektivita systému, která je dána volbou stacionární a mobilní fáze. Účinnost nelze ovlivnit změnou rychlosti toku mobilní fáze, výběr mobilní a stacionární fáze proto rozhoduje o kvalitě rozdělení látek na chromatogramu [11, 17]. Vrstva stacionární fáze se volí podle povahy separovaných látek, čímž se také určuje mechanismus separace. Je vhodné zvolit takový adsorbent, který neváže jednotlivé složky dělené směsi ani příliš pevně, ani příliš málo. V prvním případě směs zůstává na startu, v druhém případě směs látek bez rozdělení postupuje s rozpouštědlem. Na základě práce Čertíka a kol. [28] byly vybrány komerčně dostupné TLC destičky se silikagelem jako stacionární fází. Také složení vyvíjecí směsi bylo převzato z práce Čertíka a kol. [28], byla použita směs hexan : diethylether : kyselina octová v poměru 80 : 20 : 1 (v/v/v). Také podle Touchstone [25] je tato mobilní fáze vhodná pro náš účel, zaručuje dobrou separaci TAG, DAG a MAG a získá frakce VMK.

4.3.2 Doba vyvíjení

Vyvíjení chromatogramu trvá cca 1,5 hod., než dosáhne mobilní fáze čela [33]. Pro lepší separaci složek byly vyzkoušeny různé doby vyvíjení. Na tři desky bylo naneseno 15 μl roztoku tuku v hexanu vždy dvakrát, koncentrace roztoku byla 370 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro tento účel byl použit tuk vyextrahovaný z taveného sýru. Desky byly vyvíjeny po dobu 1:20, 1:30 a 1:40 hodiny. Výsledek po vizualizaci v parách jódu je vidět na obrázku č. 5.



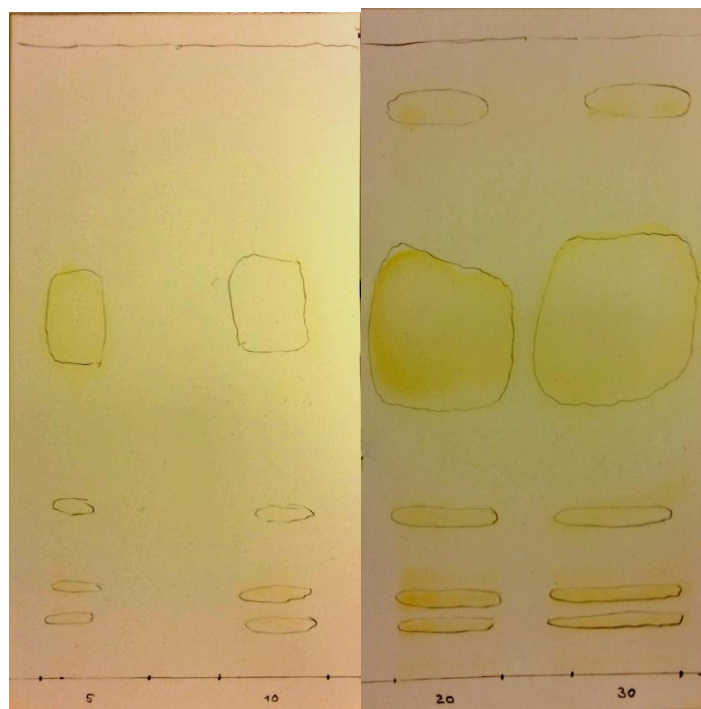
Obr. 5 Chromatogramy TLC, doba vyvíjení 1:20 (vlevo), 1:30 (uprostřed), 1:40 hod. (vpravo)

Jak již bylo zmíněno, účinnost separace nelze ovlivnit změnou rychlosti toku mobilní fáze [11, 17] a delší doba vyvíjení tedy neměla požadovaný účinek, skvrny byly rozděleny prakticky stejně (viz obrázek č. 5). Jako optimální doba vyvíjení TLC desky byla zvolena doba 1:20 hodiny, především z hlediska kratší doby analýzy. Výsledná separace jednotlivých frakcí za těchto podmínek je uspokojivá.

4.3.3 Množství (objem) nadávkovaného vzorku

Pro úspěšné provedení TLC je potřeba určit množství vzorku, jež bude naneseno. Nejčastěji se pohybuje v rozmezí 2 až 10 μl a závisí také na koncentraci. Při dávkování příliš vysoké koncentrace vzorku nebude mobilní fáze schopná analyty rozpustit a zhorší se separace skvrn [24].

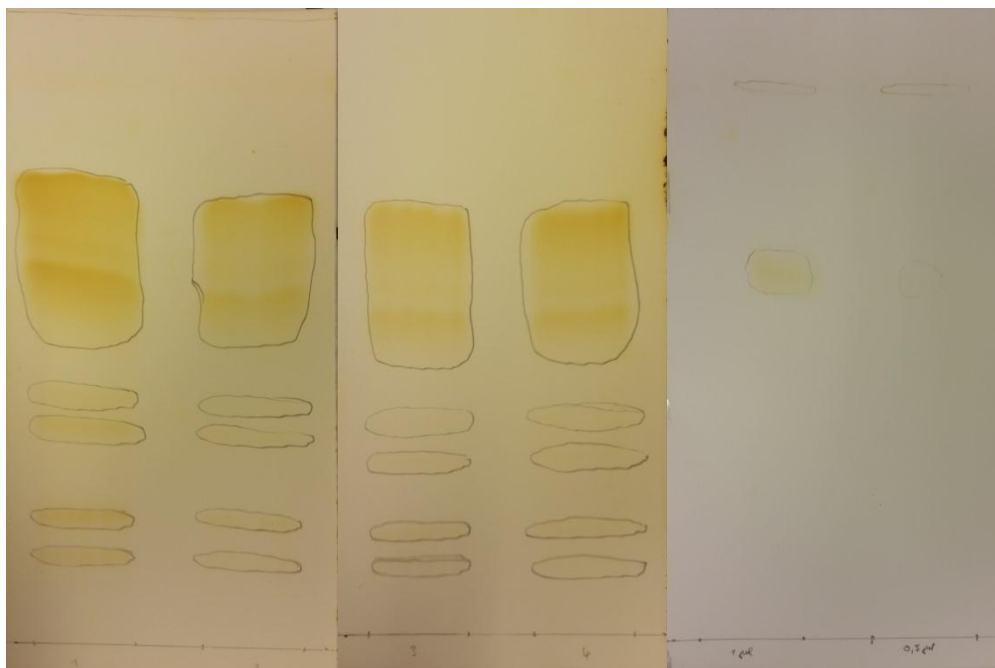
Pro zjištění optimálního množství vzorku dávkovaného na TLC desku byl použit slunečnicový olej. Pro tento účel byl vytvořen roztok oleje v hexanu o koncentraci $365 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato koncentrace byla zvolena záměrně, aby přibližně odpovídala koncentraci extraktů ze sýrů. Byla dávkována čtyři různá množství: 5, 10, 20 a 30 μl roztoku oleje. Výsledek po vizualizaci v parách jódu je na obrázku č. 6. Při vyhodnocení byly brány v úvahu velikost, tvar a intenzita zbarvení skvrn. Jako optimální bylo zvoleno množství dávkovaného vzorku 20 μl . U množství 5 a 10 μl jsou skvrny malé a špatně detekovatelné, navíc dávkování takto malého množství je obtížné, vzhledem k tomu, aby byla dávka rovnoměrně nanesena do souvislého pruhu. Při množství 30 μl jsou skvrny příliš rozptité.



Obr. 6 Chromatogramy TLC, množství dávkovaného vzorku zleva 5, 10, 20, 30 µl vzorku

4.3.4 Koncentrace nadávkovaného vzorku

Na TLC desku byly dákovány postupně se snižující koncentrace vzorku. Byl použit tuk vyextrahovaný ze sýru rozpuštěný v hexanu o koncentraci $370 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Postupným ředěním byly získané dávkované koncentrace 185; 93; 46; 23; 12 a $6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tomu odpovídá dávkované množství lipidu 2,78; 1,39; 0,69 mg; 347; 185 a 93 µg. Po vizualizaci v parách jódu byla určena minimální koncentrace vzorku, která je ještě dobře detekovatelná. Na obrázku č. 7 je patrná snižující se intenzita zbarvení a zmenšující se velikost skvrn s klesající koncentrací zleva doprava. Nejnižší dávkovatelné množství vzorku je 347 µg. Při nižších hmotnostech již nejsou některé frakce viditelné. Množství 347 µg je zároveň optimální, z důvodu dobré detekovatelnosti a malého rozpíjení skvrn. Podle našich výsledků je tedy minimální množství lipidu dávkovatelného na TLC cca 300 µg, což je v souladu s prací Čertíka a kol. [28]. Naopak Kalužnému [35] se podařilo dosáhnout zřetelného rozdělení ještě při dávkovaném množství 0,5 µg lipidů.



Obr. 7 Chromatogramy TLC, hmotnost dávkovaného vzorku zleva 2,776; 1,388; 0,694; 0,347; 0,185 a 0,093 mg

4.3.5 Výsledné optimální podmínky TLC

Zde jsou shrnuty do přehledné tabulky experimentálně zjištěné optimální podmínky pro vyvíjení TLC (tabulka č. 8).

Tabulka č. 8: Výsledné optimální podmínky TLC

stacionární fáze	silikagel
mobilní fáze	hexan : diethylether : kyselina octová v poměru 80 : 20 : 1 (v/v/v)
dávkovaný objem	20 μ l
množství vzorku	cca 300 μ g
doba vyvíjení	1:20 hodiny
detekce	páry jódu

4.4 Zhodnocení použitelnosti TLC metody pro frakcionaci lipidů

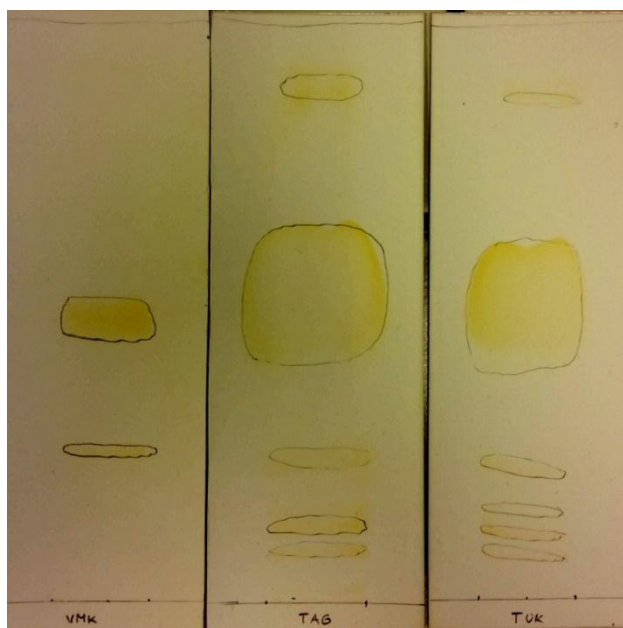
Hlavní výhodou TLC je bezesporu nenáročnost na instrumentaci a chemikálie, kdy se používají běžně dostupná rozpouštědla a laboratorní vybavení, TLC desky jsou dnes také běžně komerčně dostupné. Výhodou je možnost současné separace většího množství vzorků za nízkou cenu, s minimálním vybavením a zaškolením obsluhy. Vzorek zpravidla není nutno tak důkladně čistit, což vedle úspory práce, času a materiálních nákladů znamená i menší riziko ztrát při čištění [11, 17]. Z našeho hlediska mezi další výhody patří okamžitá a snadná identifikace separovaných zón (lipidických frakcí) po vizualizaci v parách jódu, na základě porovnání s chromatogramem z práce Kalužného [35] viz obrázek č. 4. Mezi hlavní nevýhody TLC patří subjektivní vyhodnocení výsledku, problematická

reprodukovatelnost, obtížnější a méně přesná kvantifikace, nemožnost automatizace, získání a ukládání elektronických dat [11, 17]. Z našeho pohledu lze k nevýhodám zařadit nutnost jisté praxe při nanášení vzorku a vyškrabávání separovaných frakcí z TLC desky. Při nanášení je důležité nanést vzorek do souvislého a nejlépe rovnoměrně silného pruhu, aby se při vyvíjení skvrna nerozpíjela do stran. Tento úkon je náročný, vzhledem k dávkování velmi malého množství (20 µl) mikrostříkačkou a vyžaduje zručnost a citlivost. Při vyškrabávání skvrn špachtlí dochází k praskání vrstvičky silikagelu a odlétávání malých kousíčků, což komplikuje kvantitativní převedení vzorku do destilační baňky a souvisí s výše zmíněnou problematickou kvantifikací.

4.5 Ověření složení frakcí vzorku oleje

TLC je jednou z metod, která se v praxi používá pro ověřování čistoty látek ve výzkumu a vývoji [11, 17]. Vzhledem k problematické reprodukovatelnosti a nepřesné kvantifikaci [11, 17], hlavní zamýšlené použití TLC v rámci našeho výzkumu spočívá v ověření složení lipidických frakcí získaných po SPE extrakci, která probíhala současně v rámci bakalářské práce Stavinochové [37]. Za tímto účelem byly na TLC desku nanášeny lipidové frakce získané metodou SPE a rozděleny za optimalizovaných podmínek.

Jako standard pro porovnání vzdálenosti migrace jednotlivých zón byl použit vzorek slunečnicového oleje. Frakce po SPE extrakci byly odpařeny do sucha, rozpuštěny v 100 µl hexanu a naneseny v množství 20 µl na desku. Po vyvíjení byly vizualizovány v parách jódu. Na obrázku č. 8 jsou na ukázkou uvedeny TLC desky s mírně kontaminovanými frakcemi VMK, TAG a vzorkem tuku (standard). Na desce náležící frakci VMK je vidět zóna VMK, ale také zóna odpovídající TAG (sice malá, ale zřetelná), které by v této frakci neměly být přítomny. Stejně tak ve frakci TAG jsou vidět všechny zóny a jsou tak přítomny všechny lipidické složky včetně VMK, které by v této frakci rovněž neměly být. S maximálním využitím optimalizované metody TLC bude dočištění SPE frakcí věnována pozornost v dalších navazujících experimentech.



Obr. 8 Chromatogram TLC, lipidické frakce po SPE extrakci, zleva VMK, TAG, vzorek oleje

4.6 Ověření vybraných validačních parametrů

Pro zjištění kvality a funkčnosti metody je nezbytné ji validovat. Validace je definována např. jako proces, při kterém se určuje vhodnost použití daného systému pro získání relevantních dat. Za základní validační parametry jsou považovány opakovatelnost, linearita, meze detekce a meze stanovitelnosti [36]. Z časových důvodů byla ověřena pouze opakovatelnost metody, ostatní parametry budou ověřeny v rámci navazující diplomové práce.

4.6.1 Opakovatelnost měření

Opakovatelnost je typ přesnosti vztahující se k měřením provedeným za opakovatelných podmínek; charakterizuje metodu a preciznost jejího provedení v laboratoři. Analýzy se provádějí všechny najednou, na téže zařízení s touž obsluhou [36].

Pro ověření opakovatelnosti TLC-GC-FID metody byl na TLC desku nanesen čtyřikrát vzorek oleje o koncentraci $365 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Po vyvíjení a vizualizaci v parách jódu, byly ze všech vzorků vyškrábány frakce VMK a TAG. Ty byly esterifikovány metodou využívající bortrifluorid jako katalyzátor [29,30]. Methylestery mastných kyselin byly následně analyzovány na GC, opakovatelnost byla vyhodnocena na základě ploch píků vybraných MK. Z naměřených dat byl vypočítán průměr ($\bar{x}$), směrodatná odchylka (SD) a relativní směrodatná odchylka (RSD), která je hlavním ukazatelem opakovatelnosti měření. Výsledek je uveden v tabulce č. 9 a 10.

Tabulka č. 9: Opakovatelnost měření u vybraných MK z frakce TAG

Frakce TAG					
plocha píku ($\text{mV} \cdot \text{s}$)					
číslo měření	kaprylová	myristová	palmitová	olejová	linolová
1.	156375	100297	2359314	6632966	5120634
2.	164605	102688	2627513	8487605	7176831
3.	152937	126538	2145049	6372674	5103839
4.	167672	108605	2750317	8358882	6606456
$\bar{x}$ ($\text{mV} \cdot \text{s}$)	160397	109532	2470548	7463032	6001940
SD ($\text{mV} \cdot \text{s}$)	5968	10274	235176	965685	912290
RSD (%)	3,72	9,38	9,52	12,94	15,20

Hodnota relativní směrodatné odchylky podle doporučení IUPACU by měla být do 10 % [36]. Ve frakci TAG bylo identifikováno celkem 11 MK, vybrané jsou uvedeny v tabulce č. 9. RSD se pohybuje v rozmezí 3,7 až 15,2 %.

Tabulka č. 10: Opakovatelnost měření u vybraných MK z frakce VMK

Frakce VMK			
plocha píku (mV·s)			
číslo měření	kapronová	kaprylová	palmitová
1.	103932	162124	145199
2.	96523	158512	77564
3.	94096	160738	62330
4.	98034	160307	51679
x (mV·s)	98146	160420	84193
SD (mV·s)	3624	1290	36403
RSD (%)	3,69	0,80	43,24

Ve frakci VMK bylo detekováno méně MK (celkem 4). RSD (tabulka č. 10) se pohybují mezi 0,8 a 43,3 %.

Mezi nevýhody TLC obecně patří horší reprodukovatelnost a obtížnější a méně přesná kvantifikace [11, 17]. Vzhledem k tomu, že nemáme vhodné vybavení, bylo provedeno pouze nepřímé semikvantitativní vyhodnocení vyškrábáním skvrn, což může do výsledků vnášet další nepřesnosti. To jsou zřejmě hlavní důvody zjištěné horší opakovatelnosti v případě některých MK. Vyšší RSD byly zjištěny hlavně u MK s vyšším počtem uhlíků (palmitová, olejová, linolová).

4.7 Analýza vzorku taveného sýru

Na závěr byl optimalizovaný postup (TLC-GC-FID) použit pro stanovení obsahu volných a vázaných MK ve vzorku modelového taveného sýra (totožný jako byl použit při optimalizaci metody). Veškerý vyextrahovaný tuk ze sýra (cca 0,3 g) byl rozpuštěn v 1 ml hexanu a nanesen na TLC desku v množství 20 μ l. Po vyvíjení a vizualizaci byla z desek vyškrábána frakce VMK a dohromady frakce TAG, mono- a diacylglycerolů (tj. vázané MK). Frakce fosfolipidů a cholesterolu byla zanedbána. Po esterifikaci MK byly analyzovány na GC. MK byly identifikovány srovnáním retenčních časů se standardy (parametry standardů viz tabulka 11), zastoupení a množství MK je vyjádřeno jako plocha piků, ze dvou paralelních stanovení byla vyjádřena RSD (tabulka č. 12 a 13). Tabulka č. 14 a 15 zobrazuje procentuální zastoupení MK. V příloze č. 1 a 2 jsou ukázky chromatogramů methylesterů mastných kyselin ve frakci VMK a frakci TAG, mono- a diacylglycerolů.

Tabulka č. 11: Standardy MEMK použité pro identifikaci

MK	Symbol	Retenční čas (min)
máselná	C4:0	13,39
kapronová	C6:0	18,28
kaprylová	C8:0	21,68
kaprinová	C10:0	24,15
undekanová	C11:0	25,26
laurová	C12:0	26,39
tridekanová	C13:0	27,59
myristová	C14:0	28,99
myristolejová	C14:1 n9c	29,72
pentadekanová	C15:0	30,61
cis-10-pentadecenová	C15:1	31,55
palmitová	C16:0	32,63
palmitolejová	C16:1 n9c	33,35
heptadekanová	C17:0	34,61
cis-10-heptadecenová	C17:1	35,41
stearová	C18:0	36,79
elaidová	C18:1 n9t	37,20
olejová	C18:1 n9c	37,56
linolelaidová	C18:2n6t	38,04
linolová	C18:2n6c	38,86
γ-linolenová	C18:3n6	39,69
linolenová	C18:3n3	40,60
arachová	C20:0	42,02
cis-11-eicosenová	C20:1	43,03
cis-11,14-eicosadienová	C20:2	44,97
heneicosanová	C21:0	45,38
cis-8,11,14-eicosatrienová	C20:3n6	46,24
arachidonová	C20:4n6	47,10
cis-11,14,17-eicosatrienová	C20:3n3	47,58
cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenová	C20:5n3	49,54
behenová	C22:0	50,04
eruková	C22:1n9	51,03
cis-13,16-docosadienová	C22:2	53,00
tricosanová	C23:0	53,26
lignocerová	C24:0	56,70
cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenová	C22:6n3	57,97
nervonová	C24:1	58,31

Tabulka č. 12: Zastoupení MK ve vzorku taveného sýra (frakce mono-, di- a TAG)

Mono-, di-, triacylglyceroly					
	vzorek 1	vzorek 2			
MEMK	plocha píku (mV·s)		x	SD	RSD
kapronová	1394882	1525582	1460232	115826	7,93
kaprylová	1177438	1087907	1132673	79342	7,00
kaprinová	2225324	2407052	2316188	161047	6,95
undekanová	52682	53326	53004	571	1,08
laurová	2130130	2237074	2183602	94774	4,34
tridekanová	128542	74775	101658,5	47648	46,87
myristová	5013512	5120303	5066908	94638	1,87
myristolejová	93578	95137	94357,5	1382	1,46
pentadekanová	452000	458297	455148,5	5580	1,23
cis-10-pentadecenová	85948	95270	90609	8261	9,12
palmitová	10666330	10045690	10356010	550011	5,31
palmitolejová	438334	438161	438247,5	153	0,03
heptadekanová	145084	146040	145562	847	0,58
cis-10-heptadecenová	52202	59326	55764	6313	11,32
stearová	2312792	2130486	2221639	161560	7,27
elaidová	325847	347599	336723	19277	5,72
olejová	7551173	4804685	6177929	2433938	39,40
linolelaidová	67896	52010	59953	14078	23,48
linolová	6037865	698872	3368369	4731416	140,47
linolenová	60810	52430	56620	7426	13,12

Tabulka č. 13: Zastoupení MK ve vzorku taveného sýra (frakce VMK)

Volné mastné kyseliny					
	vzorek 1	vzorek 2			
MEMK	plocha píku (mV·s)		x	SD	RSD
kapronová	145337	92640	118988,5	46700	39,25
kaprylová	152991	159885	156438	6109	3,91
laurová	75058	56375	65716,5	16557	25,19
myristová	193087	136488	164787,5	50158	30,44
palmitová	790502	341617	566059,5	397802	70,28
stearová	230284	74580	152432	137985	90,52
olejová	1019993	139774	579883,5	780050	134,52

Tabulka č. 14: Procentuální zastoupení MK ve vzorku taveného sýra (frakce mono-, di- a TAG)

Mono-, di-, triacylglyceroly		
	vzorek 1	vzorek 2
MK	procentuální zastoupení (%)	
kapronová	3,45	4,78
kaprylová	2,91	3,41
kaprinová	5,51	7,54
undekanová	0,13	0,17
laurová	5,27	7,01
tridekanová	0,32	0,23
myristová	12,41	16,04
myristoolejová	0,23	0,30
pentadekanová	1,12	1,44
cis-10-pentadecenová	0,21	0,30
palmitová	26,39	31,46
palmitoolejová	1,08	1,37
heptadekanová	0,36	0,46
cis-10-heptadecenová	0,13	0,19
stearová	5,72	6,67
elaidová	0,81	1,09
olejová	18,69	15,05
linolelaidová	0,17	0,16
linolová	14,94	2,19
linolenová	0,15	0,16

Tabulka č. 15: Procentuální zastoupení MK ve vzorku taveného sýra (frakce VMK)

Volné mastné kyseliny		
	vzorek 1	vzorek 2
MK	procentuální zastoupení (%)	
kapronová	5,57	9,25
kaprylová	5,87	15,97
laurová	2,88	5,63
myristová	7,41	13,63
palmitová	30,32	34,12
stearová	8,83	7,45
olejová	39,12	13,96

Výsledky jsou v souladu s poznatky o složení mléčného tuku [5,2], z hlediska kvantitativního jsou ve vzorku taveného sýra nejvíce zastoupeny MK myristová a palmitová, z nenasycených olejová a linolová, s kratším řetězcem kapronová, kaprylová a kaprinová.

5 ZÁVĚR

Tato práce se zabývá použitím tenkovrstvé chromatografie pro frakcionaci lipidů v sýrové matici. Byly použity vzorky oleje a taveného sýru. V práci jsou výsledky optimalizace podmínek tenkovrstvé chromatografie pro frakcionaci lipidů, výsledky ověřování lipidických frakcí získaných metodou extrakce pevnou fází a na závěr byla provedena analýza vzorku taveného sýra a vyhodnocen obsah mastných kyselin v jednotlivých frakcích.

Pro extrakci lipidů ze vzorku taveného sýra byla použita extrakce podle ČSN EN ISO 1735, směsí diethylether a petrolether. Separace lipidických složek byla provedena na komerčně dostupných TLC deskách se silikagelem. Pro esterifikaci mastných kyselin byla použita metoda podle ČSN EN ISO 5509 s použitím methanolického roztoku bortrifluoridu jako katalyzátoru. Vzniklé methylestery mastných kyselin byly stanoveny pomocí plynové chromatografie s FID detekcí.

Optimalizace podmínek TLC byla provedena za účelem rychlého a snadného ověření složení frakcí lipidů, získaných metodou SPE, která je důležitá při sledování VMK v sýrech. Při volbě separačního systému byla na základě publikovaných prací zvolena TLC deska se silikagelem a směs rozpouštědel hexan : diethylether : kyselina octová (80 : 20 : 1 v/v/v), které poskytovaly dobré výsledky. Podle literatury není možné delším vyvíjením TLC desky docílit lepšího rozdělení separovaných látek. Tento fakt byl experimentálně potvrzen. Jako nejvhodnější dávkovaný objem vzorku byl určen 20 μ l. Tento objem nanášeného vzorku zajišťuje dobré rozdělení frakcí, snadnou vizuální identifikaci a malé rozpíjení skvrn. Optimální množství vzorku dávkovaného na TLC je cca 300 μ g, kdy jsou skvrny opět dobře detekovatelné při minimálním rozpíjení skvrn. Toto množství je zároveň minimální, které je nutné dávkovat na TLC.

V rámci ověření validačních parametrů byla určena opakovatelnost měření, která charakterizuje preciznost provedení. Ve frakci TAG bylo identifikováno celkem 11 MK, z toho byla u pěti vyhodnocena opakovatelnost měření. Hodnota RSD se pohybovala v rozmezí 3,7 až 15,2 %. Ve frakci VMK byly identifikovány celkem čtyři MK. Hodnota RSD se pohybovala v rozmezí 0,8 až 43,3 %. Vzhledem k absenci vhodného vybavení bylo provedeno pouze nepřímé semikvantitativní vyhodnocení vyškrábáním skvrn. To je zřejmě hlavní důvod zjištěné horší opakovatelnosti v případě některých MK, zejména těch s vyšším počtem atomů uhlíku.

Při analýze vzorku taveného sýra bylo ve frakci TAG identifikováno celkem 20 mastných kyselin. Nejvíce zastoupené byly nasycené kyseliny myristová a palmitová, z nenasycených kyselina olejová. Ve frakci VMK bylo identifikováno celkem 7 mastných kyselin. V největším zastoupení byla nasycená kyselina palmitová a nenasycená kyselina olejová. Metoda TLC se osvědčila jako jednoduchá, rychlá a levná metoda pro rozdělení frakcí lipidů a zároveň vhodný doplněk pro dělení frakcí metodou extrakce pevnou fází. V navazujících experimentech budou ověřeny další validační parametry optimalizované TLC-GC-FID metody a její použitelnost bude potvrzena aplikací na širší spektrum různých typů přírodních a tavených sýrů. Optimalizovaná a validovaná metoda bude používána v kombinaci s metodou extrakce pevnou fází v rámci studie sledující volné mastné kyseliny v sýrech.

6 LITERATURA

- [1] DRDÁK, M., J. STUDNICKÝ, E. MÓROVÁ a J. KAROVIČOVÁ. *Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočišných surovín cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 1996, 495 s. ISBN 80-967-0641-1.
- [2] ČERNÁ, Marie. *Nutriční hodnota mléka a mléčných výrobků*. 1. vyd. Praha: Středisko technických informací potravinářského průmyslu Výzkumného ústavu potravinářského průmyslu, 1979, 141 s.
- [3] CERMANOVÁ, Ivana. *Srovnání kvality mléka jako potravinové suroviny z konvenčních a ekologických hospodářských podmínek*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2011, 70 s.
- [4] LOUPANCOVÁ, Blanka. *Studium faktorů ovlivňujících tvorbu těkavých aromaticky aktivních látek v přírodních materiálech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011, 145 s.
- [5] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 2 sv. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [6] Fatty acid. [online]. 2008 [cit. 2015-11-5]. Dostupné z <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/202621/fatty-acid>
- [7] BRUŽA, J. *Oleje a tuky rostlinné a živočišné: Přehled komerčních požadavků*. 1. vyd. Praha: Průmyslové vydavatelství, 1951. 87 s.
- [8] SÝR, EIDAM, 50 %. *Nutriční databáze* [online]. [cit. 2015-11-08]. Dostupné z: <http://www.nutridatabase.cz/potravin/?id=137#tab-2>
- [9] DOSTÁL, Jiří, Hana PAULOVÁ, Jiří SLANINA a Eva TÁBORSKÁ. *Biochemie: pro posluchače bakalářských oborů*. 1. vyd. Brno: Galén, 2009, 158 s. ISBN 978-80-2105020-4.
- [10] FENNEMA, Owen R. *Food chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, c1996, xii, 1069 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), v. 76. ISBN 08-247-9691-8.
- [11] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 263 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [12] SHERMA, Joseph. Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, 880(1-2), 129-147 [cit. 2016-01-28]. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)01132-2. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967399011322>
- [13] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [14] JOHNSON, Richard, Gustav TRÄFF, Martin SUNDÉN a Ulf ELLERVIK. Evaluation of quantitative thin layer chromatography using staining reagents. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, 1164(1-2), 298-305 [cit. 2016-01-28]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.07.029. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307012502>
- [15] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Analytická chemie II: Chemické dělicí metody*. Brno, 2015.
- [16] PETROVIĆ, Marinko, Nataša KEZIĆ a Vesna BOLANČA. Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples. *Food Chemistry* [online]. 2010, 122(1), 285-291 [cit. 2016-01-29]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.02.018. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610001822>

- [17] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [18] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002, 201 s. ISBN 978-80-246-0553-1.
- [19] FUCHS, Beate, Rosmarie SÜß, Kristin TEUBER, Mandy EIBISCH a Jürgen SCHILLER. Lipid analysis by thin-layer chromatography—A review of the current state. *Journal of Chromatography A* [online]. 2011, 1218(19), 2754-2774 [cit. 2016-02-01]. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.11.066. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967310016547>
- [20] PROSSER, Václav. *Experimentální metody biofyziky: celostátní vysokoškolská učebnice pro studující matematicko-fyzikálních a přírodovědných fakult oboru 11-66-8 Biofyzika a chemická fyzika*. 1. vyd. Praha: Academia, 1989, 712 s.
- [21] WAKSMUNDZKA - HAJNOS, Monika. Thin-Layer Chromatography. *Thin-Layer Chromatography* [online]. 2008, (46) [cit. 2016-02-11]. Dostupné z: <http://chromsci.oxfordjournals.org/content/46/4/289>
- [22] REBECHI, S.R., M.A. VÉLEZ, S. VAIRA a M.C. PEROTTI. Adulteration of Argentinean milk fats with animal fats: Detection by fatty acids analysis and multivariate regression techniques. *Food Chemistry* [online]. 2016, 192, 1025-1032 [cit. 2016-02-11]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.107. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615011401>
- [23] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996, 186, 134, 191 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [24] GÜNZLER, Helmut, Alex WILLIAMS, *Handbook of analytical techniques*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, c2001, s. v-xii, 562-1182. ISBN 35-273-0165-8.
- [25] TOUCHSTONE, Joseph C. Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1995, 671(1-2), 169-195 [cit. 2016-02-25]. DOI: 10.1016/0378-4347(95)00232-8. ISSN 03784347. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378434795002328>
- [26] PRUKNEROVÁ, K. Stanovení mastných kyselin v tavených sýrech. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 80 s. Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [27] ČSN EN ISO 1735 (57 1007). Sýry a tavené sýrové výrobky - Stanovení obsahu tuku - Gravimetrická metoda (Referenční metoda). Praha: Český normalizační institut, 1997.
- [28] ČERTÍK, Milan, Peter ANDRÁŠI a Ján ŠAJBIDOR. Effect of extraction methods on lipid yield and fatty acid composition of lipid classes containing γ -linolenic acid extracted from fungi. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 1996, 73(3), 357-365 [cit. 2016-04-08]. DOI: 10.1007/BF02523431.
- [29] ČSN EN ISO 5509 (588767). Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Příprava methylesterů mastných kyselin. Praha: Český normalizační institut, 2001.
- [30] ČSN ISO 5508 (588766) A. Živočišné a rostlinné tuky a oleje. Analýza methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií. Praha: Český normalizační institut, 1994.
- [31] COLLINS, Yvonne F., Paul L.H. MCSWEENEY a Martin G. WILKINSON. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy*

- Journal [online]. 2003, 13(11), 841-866 [cit. 2016-04-08]. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00109-2. ISSN 09586946.
- [32] MARILLEY, L, Paul L.H. MCSWEENEY a Martin G. WILKINSON. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. International Journal of Food Microbiology [online]. 2004, 90(2), 139-159 [cit. 2016-04-08]. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00304-0. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503003040>
- [33] HORNÁKOVÁ, M. Možnosti analytického stanovení volných mastných kyselin. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [34] ROGINSKI, Hubert, John W FUQUAY a P FOX. *Encyclopedia of dairy sciences*. New York: Academic Press, 2003. ISBN 01-222-7235-8.
- [35] Kaluzny, MA., Duncan, LA., Merritt, MV., Epps, DE. Rapid separation of lipid classes in high-yield and purity using bonded phase columns. Journal of Lipid Research, 1985, Vol. 26, no. 1, pp. 135-140. ISSN: 0022-2275
- [36] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. Kompendium statistického zpracování dat. Vyd. 3., V nakl. Karolinum 1. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2196-8.
- [37] STAVINHOVÁ, K. Použití extrakce tuhou fází pro frakcionaci lipidů v sýrové matrici. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

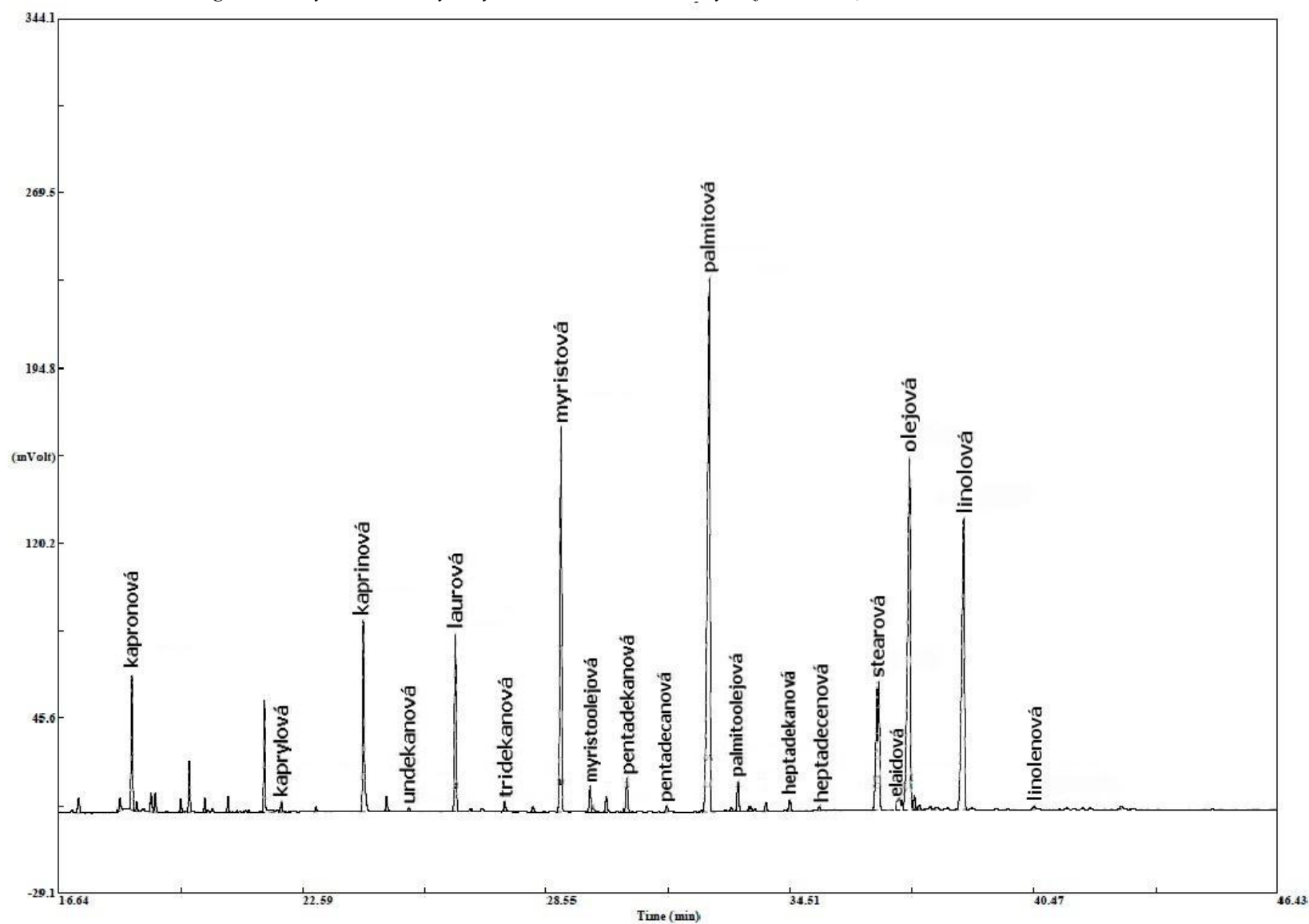
7 SEZNAM ZKRATEK

DAG	diacylglyceroly
ESI MS	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
MAG	monoacylglyceroly
MALDI	hmotnostní spektrometrie s laserovou ionizací
MEMK	methylestery mastných kyselin
MK	mastné kyseliny
NMR	spektroskopie nukleární magnetické rezonance
SPE	extrakce pevnou fází (Solid Phase Extraction)
TAG	triacylglyceroly
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
VMK	volné mastné kyseliny

8 PŘÍLOHY

- Příloha 1 Ukázka chromatogramu methylesterů mastných kyselin ve vzorku taveného sýra (frakce TAG)
- Příloha 2 Ukázka chromatogramu methylesterů mastných kyselin ve vzorku taveného sýra (frakce VMK)

Příloha 1: Ukázka chromatogramu methylesterů mastných kyselin ve vzorku taveného sýra (frakce TAG)



Příloha 2: Ukázka chromatogramu methylesterů mastných kyselin ve vzorku taveného sýra (frakce VMK)

