



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

**OPTIMALIZACE A VALIDACE METODY STANOVENÍ
VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN**

THE OPTIMIZATION AND VALIDATION OF THE METHOD FOR ASSESSMENT OF FREE FATTY ACIDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michal Sýkora

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0982/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Michal Sýkora	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Eva Vítová, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Martina Mahdalová	

Název diplomové práce:

Optimalizace a validace metody stanovení volných mastných kyselin

Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - přehled metod vhodných pro stanovení mastných kyselin (MK) v sýrech (izolace z matrice vzorku, derivatizace, stanovení)
 - přehled metod vhodných pro stanovení volných MK
2. Vyberte metodu vhodnou pro stanovení volných MK v sýrech
3. Optimalizujte podmínky a ověřte validační parametry vybrané metody

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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

Bc. Michal Sýkora
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

Táto diplomová práca sa zaoberá vývojom metódy pre stanovenie voľných mastných kyselín v prírodných a tavených syroch. Teoretická časť bola zameraná na možnosti extrakcie, separácie a stanovenia lipidov, charakterizácie mastných kyselín, rôzne spôsoby ich stanovenia, vrátane stanovenia voľných mastných kyselín.

Hlavnou náplňou experimentálnej časti je optimalizácia a validácia metódy na stanovenie voľných mastných kyselín v rôznych matriciach.

Pre extrakciu lipidov zo vzorky bola zvolená zmes dietyléteru a petroléteru podľa ČSN EN ISO 1735. Pre separáciu voľných mastných kyselín boli vyskúšané a porovnané dve metódy: tenkovrstevná chromatografia a extrakcia na pevnej fáze. Pre esterifikáciu bola vybraná metóda podľa ČSN EN ISO 5509 s použitím metanolového roztoku bortrifluoridu. Na stanovenie metylesterov mastných kyselín bola použitá plynová chromatografia s plameňovo-ionizačnou detekciou.

ABSTRACT

This master thesis deals with the development of method for free fatty acids determination in natural and processed cheese. In the theoretical part the possibilities of extraction, fractionation and determination of lipid fractions, characterization of fatty acids and various methods of their determination are described, as well as determination of free fatty acids.

The main scope of the experimental section is optimization and validation of the selected method for determination of free fatty acids in various cheese matrices.

For extraction of lipids from the sample the method with the mixture of diethylether and petrolether according to ČSN EN ISO 1735 was selected. Thin-layer chromatography and solid phase extraction were tested and compared for separation of free fatty acids. The method according to ČSN EN ISO 5509, using methanol solution of bortrifluoride, was applied for esterification. Fatty acid methyl esters were determined by gas chromatography with flame-ionization detection.

KLÍČOVÉ SLOVÁ

sýry, GC, MK, VMK

KEY WORDS

cheese, GC, FA, FFA

CITÁCIA

SÝKORA, M. *Optimalizace a validace metody stanovení volných mastných kyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 68 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brně a môže byť použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Moc ďakujem pani Ing. Eve Vítovej, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady a pomoc počas písania tejto práce. Ďalej chcem poďakovať kolegom z laboratória za spoluprácu.

Obsah

1 Úvod	7
2 Teoretická časť	8
2.1 Mastné kyseliny	8
2.1.1 Nasýtené mastné kyseliny	9
2.1.2 Nenasýtené mastné kyseliny	9
2.2 Možnosti stanovenia mastných kyselín – použité metódy	10
2.2.1 Vzorkovanie	10
2.2.2 Extrakcia	10
2.2.3 Predbežné rozdelenie extraktu	11
2.2.4 Extrakcia na pevnej fáze	13
2.2.5 Chromatografia na tenkej vrstve	16
2.2.6 Esterifikácia mastných kyselín	18
2.2.7 Plynová chromatografia	20
2.3 Možnosti stanovenia voľných mastných kyselín v potravinových matriciach	21
3 Experimentálna časť	23
3.1 Laboratórne vybavenie a chemikálie	23
3.1.1 Plyny	23
3.1.2 Prístroje	23
3.1.3 Pracovné pomôcky	23
3.1.4 Chemikálie	23
3.2 Analyzované vzorky	25
3.3 Použité metódy	25
3.3.1 Extrakcia lipidov zo vzorky podľa normy ČSN EN ISO 1735	25
3.3.2 Frakcionácia lipidov metódou SPE	26
3.3.3 Frakcionácia lipidov metódou TLC	27
3.3.4 Esterifikácia mastných kyselín	29
3.4 Podmienky metódy stanovenia metylesterov mastných kyselín	31
3.5 Identifikácia a kvantifikácia mastných kyselín	32
3.6 Štatistické spracovanie výsledkov	32
4 Výsledky a diskusia	33
4.1 Extrakcia lipidov zo vzorky	34
4.2 Výber metódy esterifikácie mastných kyselín	35
4.3 Skladovanie extraktov	36
4.4 Frakcionácia lipidov – optimalizácia experimentálnych podmienok	37
4.4.1 Frakcionácia lipidov metódou tenkovrstvej chromatografie.	37
4.4.2 Frakcionácia lipidov metódou extrakcie na pevnej fáze	41
4.4.3 Porovnanie metód TLC a SPE	51
4.4.4 Stanovenie celkového obsahu mastných kyselín vo vzorkách	53
4.5 Vybrané validačné parametre	53
4.5.1 Opakovateľnosť metódy SPE-GC-FID	54
4.5.2 Opakovateľnosť metódy TLC-GC-FID	56
4.6 Analýza vzorky taveného syru	58
4.6.1 Identifikácia a kvantifikácia mastných kyselín	58
4.6.2 Zastúpenie voľných a viazaných MK vo vzorke taveného syru	59
5 Záver	61

6 Použitá literatúra	62
7 Zoznam použitých skratiek.....	66
8 Prílohy	67

1 ÚVOD

Tuky tvoria významnú časť nami konzumovaných potravín, teda aj mliečnych výrobkov ako sú syry, analógy tavených syrov a mnohé ďalšie výrobky. Udeľujú potravinám sensorické vlastnosti, medzi ktoré patrí jemná chuť, príjemná vôňa, výborné reologické a iné vlastnosti. Tuky sú tiež najbohatšie zložky potravín z pohľadu energetického obsahu, dodávajú pocit sýtosti. Sú dôležité pre ľudský organizmus, fungujú ako rozpúšťadlá pre dôležité vitamíny a iné nepochybné látky. Jednou z významných súčastí tuku sú mastné kyseliny. Mastných kyselín sa v lipidoch vyskytuje viacero druhov, odlišujúcich sa navzájom rôznymi fyzikálnymi vlastnosťami. Okrem iných aj mastné kyseliny sa podieľajú na konečných vlastnostiach potravín ako sú konzistencia či nutričná hodnota.

Cieľom tejto práce bolo vybrať a optimalizovať metódu stanovenia voľných mastných kyselín v rôznych syrových matriciach. Pre separáciu vyextrahovaných lipidov a získanie frakcie voľných mastných kyselín boli vyskúšané a porovnané dve metódy; tenkovrstevná chromatografia (TLC) a extrakcia na pevnej fáze (SPE). Pre stanovenie mastných kyselín bola použitá plynová chromatografia s plameňovo-ionizačnou detekciou (FID).

2 TEORETICKÁ ČASŤ

Vzhľadom k tomu, že táto práca je zameraná na problematiku stanovenia mastných kyselín (MK), je tu najprv stručne zmienená charakteristika MK, ich výskyt a funkcie v potravinách, resp. v mlieku a mliečnych výrobkoch. Hlavná pozornosť však bude zameraná na podrobný popis možností ich analytického stanovenia.

2.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) sú najdôležitejšie a z hľadiska výživy najvýznamnejšou zložkou lipidov. Podľa názvoslovía používaného v organickej chémii sa za MK označujú karboxylové kyseliny s alifatickým uhl'ovodíkovým reťazcom. Táto definícia nepokrýva celú škálu MK prítomných v lipidoch. Niektoré MK podľa definície (napr. kyselina octová) nie sú prítomné v prírodných lipidoch, aj keď sa môžu vyskytovať v priemyslových výrobkoch obsahujúcich tuk. Naopak niektoré mastné kyseliny viazané v lipidoch sú cyklické alebo dokonca aromatické zlúčeniny.

V potravinách obsahujúcich lipidy sa vyskytujú tieto skupiny MK:

- nasýtené MK
- nenasýtené MK s jednou dvojnou väzbou (monoénové)
- nenasýtené MK s niekoľkými dvojnými väzbami (polyénové)
- MK s trojitými väzbami a s rôznymi substituentmi (rozvetvené, cyklické, s kyslíkatými, sírnymi alebo dusíkatými funkčnými skupinami)

Pre mliečne tuky sú typické nasýtené MK s kratším reťazcom, napr. kyselina maslová a skupina kyselín s 6-10 uhlíkmi v molekule. Pre porovnanie je uvedený obsah MK vybraných syrov a surového mlieka (Tabuľka 1) [1].

Tabuľka 1: Obsah tuku a MK vo 100 g jedlého podielu vybraných syrov (pozn.: T. v S. = tuk v sušine) [2]

Zloženie	Syr Eidam 30 % T. v S.	Syr Hermelín 50 % T. v S.	Syr tavený nízkoenergetický Lipno, 30 % T. v S.	Surové mlieko
Lipidy celkové	16,00 g	22,30 g	11,40 g	4,10 g
Nasýtené MK	10,35 g	14,40 g	7,38 g	2,65 g
Maslová	0,54 g	0,76 g	0,39 g	0,14 g
Kapronová	0,35 g	0,49 g	0,25 g	0,09 g
Kaprylová	0,22 g	0,31 g	0,16 g	0,13 g
Kaprinová	0,50 g	0,69 g	0,35 g	0,06 g
Laurová	0,62 g	0,87 g	0,44 g	0,16 g
Myristová	1,76 g	2,45 g	1,25 g	0,45 g
Palmitová	4,74 g	6,59 g	3,37 g	1,21 g
Stearová	1,62 g	2,25 g	1,15 g	0,41 g

Zloženie	Syr Eidam 30 % T. v S.	Syr Hermelín 50 % T. v S.	Syr tavený nízkoenergetický Lipno, 30 % T. v S.	Syrové mlieko
Mononenasýtené MK	4,32 g	6,01 g	3,08 g	1,11 g
Myristolejová	0,22 g	0,31 g	0,16 g	0,06 g
Palmitolejová	0,35 g	0,49 g	0,25 g	0,09 g
Olejová	0,19 g	0,27 g	0,14 g	0,05g
Cis-11- eicosenová	0,19 g	0,27 g	0,14 g	0,05 g
Polynenasýtené MK	0,46 g	0,65 g	0,33 g	0,12 g
Linolová	0,34 g	0,47 g	0,24 g	0,09 g
Linolenová	0,13 g	0,18 g	0,09 g	0,03 g

2.1.1 Nasýtené mastné kyseliny

Nasýtené MK neobsahujú žiadne dvojné alebo trojité väzby. Všeobecne najrozšírenejšími MK sú palmitová a stearová, ktoré sa vyskytujú takmer vo všetkých živočíšnych a rastlinných lipidoch, a to v TAG i fosfolipidoch. Nasýtené MK s nepárnym počtom uhlíkových atómov sú pomerne vzácne a vyskytujú sa zriedkavo ako stopové zložky. Vo väčšom množstve (hlavne kyselina pentadekanová a heptadekanová, do 1 %) sú prítomné len v lipidoch niektorých mikroorganizmov, v kožných lipidoch, ale aj v depótnom či mliečnom tuku prežúvavcov [1].

2.1.2 Nenasýtené mastné kyseliny

Obsah nenasýtených MK v prírodných lipidových materiáloch, napr. v tukoch a v olejoch sa pohybuje v širokom rozmedzí, od viac ako 90 % všetkých MK (napr. repkový olej) po menej než 10 % (napr. kokosový tuk). Obsah nenasýtených MK v tukoch živočíchov sa pohybuje v d'aleko menšom rozmedzí medzi 50-70 %. V rastlinách je v porovnaní so živočíchmi omnoho rozmanitejšia pestrosť v zložení nenasýtených MK [1].

Najbežnejšou nenasýtenou MK je kyselina olejová, ktorá sa prinajmenšom v malom množstve vyskytuje prakticky vo všetkých živočíšnych a rastlinných lipidoch. Z polyénových MK je najbežnejšia linolová kyselina, ktorá je rovnako prítomná minimálne v stopových množstvách vo všetkých tukoch. V mliečnom tuku sa vyskytujú ďalšie nenasýtené MK, napr. palmitoolejová (asi 4 %) a vakcenová (1-5 %) [1].

Prírodné nenasýtené MK majú väčšinou konfiguráciu *cis*. Kyseliny s konfiguráciou *trans* sa vyskytujú hlavne v depótnom tuku prežúvavcov, kam sa dostávajú z potravy premenenej mikroorganizmami v bacheru, kde vznikajú pri hydrogenácii kyseliny linoleovej. Podobne majú zvýšený obsah *trans*-nenasýtených MK tiež iné cicavce, v ktorých tráviacom trakte je listie či tráva pred-trávená mikroorganizmami (napr. klokan).

Tieto *trans*-nenasýtené MK prechádzajú čiastočne do mlieka. S potravou sú prijímané ľuďmi a preto sa vyskytujú aj v ľudskom depótnom tuku [1].

Kyseliny s konfiguráciou *trans* vznikajú tiež priemyselnou katalytickou hydrogenáciou nenasýtených MK, preto sa vyskytujú v značnom množstve stužených tukov a v tukových výrobkoch z nich pripravených.

Tvoria sa tiež pri zahriatí tukov obsahujúcich polyénové MK na teploty nad 240 °C, napr. pri ich dezodorácií. Celkový obsah *trans*-nenasýtených MK u mlieka a masla je 2 až 4 % zo všetkých MK [1].

2.2 Možnosti stanovenia mastných kyselín – použité metódy

2.2.1 Vzorkovanie

Nedielnou súčasťou analýzy je odber a príprava vzorky. Odobraná vzorka by mala obsahovať všetky súčasti v rovnakom hmotnostnom alebo objemovom pomere ako sú v pôvodnej matrici. Odobranú vzorku, pokiaľ nie je ihneď spracovaná, treba uchovať v uzavretej nádobe pri nízkej teplote, aby nedošlo ku kontaminácii a nežiadúcim zmenám [3,4].

2.2.2 Extrakcia

Než dôjde ku vlastnému stanoveniu MK, je nutné izolovať vzorku lipidov (mastných kyselín) z matrice potravy [4,5].

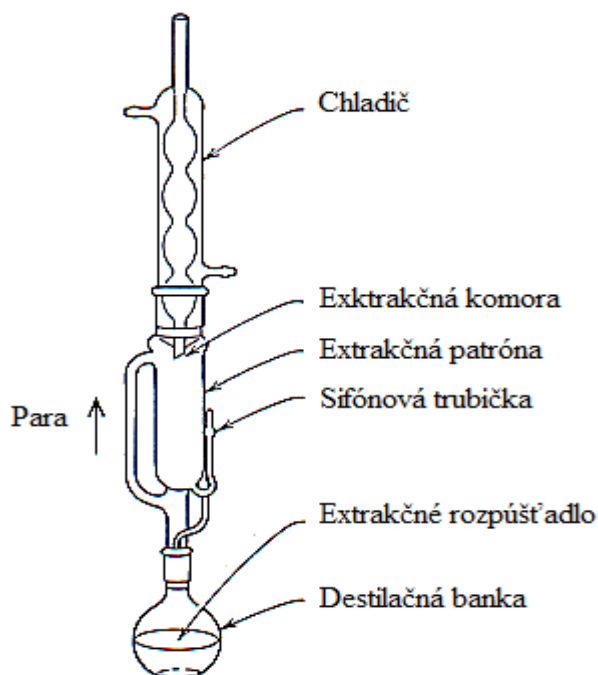
Sú známe rôzne typy izolácie lipidov. Vhodnosť metódy sa volí podľa matrice, zo ktorej sú lipidy extrahované. Pri extrakcii je dôležitá teplota, pretože pri vyšších teplotách by mohlo dôjsť k enzymatickému štepeniu [6]. Extrakcia rozpúšťadlom je často využívaná metóda, aj keď má mnohé nevýhody, a to najmä náročnosť na čas a produkciu veľkého množstva organického odpadu. Z tohto dôvodu sa už dnes aplikujú rôzne modernejšie extrakčné techniky. Voľba extrakčnej metódy hlavne závisí na použitej matrici, z ktorej extrahujeme [3,6].

2.2.2.1 Extrakcia podľa Soxhleta

Jedná sa o kontinuálnu extrakciu, ktorá sa používa prevažne k deleniu organických látok. Aparatúra je zložená z destilačnej banky, extraktoru a chladiča (Obrázok 1). Do extrakčnej komory sa vkladá papierová extrakčná patróna plnená vzorkou, ktorá má valcovitý tvar a guľaté dno. Varná banka sa naplní vhodným rozpúšťadlom, v ktorom je dobre rozpustná extrahovaná zložka. Varná banka je zahrievaná k varu rozpúšťadla a jeho pary stúpajú postrannou trubičkou okolo extrakčnej časti extraktoru do chladiča. V chladiči rozpúšťadlo kondenzuje a kvapká na papierovú patrónu, v ktorej je vzorka.

Extrakčná komora je postupne naplnená kondenzujúcim rozpúšťadlom, ktorého hladina postupne stúpa aj v tenkom prepádovom sifóne. V momente dosiahnutia hladiny rozpúšťadla v extrakčnej časti extraktoru najvyššej časti prepádového sifónu, pretečie roztok do destilačnej banky a celý proces sa opakuje. Nakoniec je získaný roztok jednej alebo viacerých zložiek v destilačnej banke, z ktorej sa po ukončení extrakcie rozpúšťadlo oddestiluje. Potom zostane v banke iba vyextrahovaná zložka, prípadne zložky [7].

Táto metóda sa používa k izolácii tukov u potravinárskych výrobkov alebo k izolácii éterických olejov z kvetov a iné [7].



Obrázok 1: Aparatúra na extrakciu podľa Soxhletha [7]

2.2.2.2 Extrakcia podľa Folche

Metóda podľa Folche je založená na extrakcii vzoriek zmesou chloroformu a metanolu a potom homogenizácií vzorky za studena. Homogenizácia trvá minimálne 3 minúty, ale aj dlhšie v závislosti na konzistencii vzorky. Následne je suspenzia odfiltrovaná alebo centrifugovaná, aby došlo k oddelení nerozpustených podielov vzorky. Extrakt je ďalej premývaný roztokom NaCl, z dôvodu dosiahnutia konečného pomeru zmesi chloroform : metanol : voda a to v pomere 8 : 4 : 3 [8].

Na záver je pridaný metanol a tým je extrakt nariedený do požadovaného objemu chloroformu a metanolu a to v pomere 2 : 1. Potom dôjde k oddestilovaniu rozpúšťadla na vákovej rotačnej odparke pri teplote neprevyšujúcej 40 °C. Po oddestilovaní sa produkt zvaží [8]. Metóda sa primárne využíva pre stanovenie tuku v matriciach s väčším obsahom vody a polárnych lipidov (fosfolipidy, komplexné lipidy) alebo pre mäso a mäsové výrobky [6].

2.2.3 Predbežné rozdelenie extraktu

Jedlé tuky a oleje sú zložitá zmes triacylglycerolov (TAG) (90-95 %), diacylglycerolov (DAG) (1-2 %), voľných mastných kyselín (VMK) ($\approx 0,5$ %), fosfolipidov a ďalších menej významných zložiek (Tabuľka 2). Niektoré z komponentov prispievajú k textúre a chuti prírodných tukov a olejov. Väčšina z nich hrá dôležitú úlohu v ľudskej výžive. Prítomnosť kyslíku, pôsobenie teploty, času a skladovacích podmienok môže zmeniť zlúčeniny uvedené vyššie [10].

Tabuľka 2: Hlavné triedy lipidov v mlieku [36]

Trieda lipidov	Zastúpenie [hm. %]
TAG	98,3
DAG	0,3
MAG	0,03
VMK	0,1
Fosfolipidy	0,8
Steroly	0,3
Karotenoidy	stopy
Vitamíny rozpustné v tukoch	stopy
Senzoricky aktívne zlúčeniny	stopy

Extrakčné produkty získané pomocou extrakčných techník sú teda zmesi obsahujúce rôzne lipidy, a to TAG, VMK, steroly, estery sterolov, fosfolipidy a ďalšie lipidické zložky alebo látky podobné lipidom (Tabuľka 3).

Pre ďalšiu analýzu je teda potrebné skupinu lipidov odseparovať. K tomuto účelu využívame rôzne adsorpčné techniky [9].

V rámci tejto práce boli vyskúšané a porovnané dve frakčionačné metódy: tenkovrstevná chromatografia (TLC) a extrakcia pevnou fázou (SPE). Podrobnejšie sú popísané v nasledujúcich kapitolách.

Tabuľka 3: Hlavné mastné kyseliny v mliečnom tuku [36]

Mastná kyselina	Triviálne pomenovanie	Systematické pomenovanie	Typické zloženie	
			Zastúpenie [hm. %]	Zastúpenie [mol. %]
4:0	maslová	butánová	3,7	9,6
6:0	kaprónová	hexánová	2,4	4,7
8:0	kaprylová	oktánová	1,5	2,3
10:0	kaprinová	dekánová	3,2	4,2
12:0	laurová	dodekánová	3,6	4,1
14:0	myristová	tetradekánová	11,1	11,0
14:1	myristoolejová	cis-9-tetradekánová	0,9	0,9
15:0	-	pentadekánová	1,2	1,1
16:0	palmitová	hexadecénová	28,3	25,3
16:1	palmitoolejová	cis-9-hexadecénová	1,6	1,5

Mastná kyselina	Triviálne pomenovanie	Systematické pomenovanie	Typické zloženie	
			Zastúpenie [hm. %]	Zastúpenie [mol. %]
18:0	stearová	oktadecénová	11,8	9,5
18:1	olejová	cis-9-oktadecénová	18,8	15,4
18:1	vakcenová	trans-11-oktadecénová	4,2	3,4
18:2	linolová	cis, cis-9,12-oktadekadiénová	1,4	1,1
18:2c	linolová (konjugovaná)	cis, trans-9,11-oktadekadiénová	1,1	0,9
18:3	linolenová (alfa)	cis, cis, cis-9,12,15-oktadekatriénová	0,9	0,8
-	ostatné kyseliny	-	4,4	3,7

2.2.4 Extrakcia na pevnej fáze

Kolóny pre extrakciu na pevnej fáze (Solid Phase Extraction; SPE) boli vynájdené v polovici 1970. V roku 1978 Waters podporovali kolónky Sep-Pak, pohodlné jedno rázové kolónky na báze oxidu kremíku (SiO₂). O dva roky neskôr Williams, McCluer a tiež Paell zverejnili prvé dokumenty o uplatnení SPE v oblasti lipidov. Prvý z nich sa zaoberá izoláciou gangliosidov z extraktov zvieracieho tkaniva, druhý sa zaoberal frakčnými metabolitmi kyseliny arachidonovej. Neskôr boli princípy SPE metódy, izolácie a frakcionácie lipidov v biologických a potravinárskych matriciach značne preskúmané Wachobom, Chrisiom, Ebelerom a Schimotom [10].

Univerzálnosť SPE umožňuje, aby bola použitá pre veľké množstvo účelov, napr. ako efektívne čistenie vzoriek, alebo pre izoláciu zlúčenín a odstránenie prebytku činidla. Aj vzorky metylesterov určené pre plynovú chromatografiu (GC), môžu byť čistené priechodom cez SPE kolónku, ktorá môže odstrániť peroxidy a hydroxidy. Veľké množstvo kvantitatívnych metód (GC, HPLC) využívajú výhod SPE a používajú ju ako predprípravný krok [10].

SPE je založená na princípu kvapalinovej chromatografie, silnej ale reverzibilnej interakcie medzi analytom a stacionárnou fázou obsiahnutou v SPE kolónkach. Zlúčeniny vo vzorke reagujú viac so stacionárnou fázou ako s rozpúšťadlom, a tým zostávajú v stacionárnej fáze, z ktorej sú následne vymyté vhodne zvolenými rozpúšťadlami [10].

Aj napriek veľmi častému použitiu, postup SPE, a najmä jej aplikácie na delenie lipidov, sú v dostupných publikáciách mnohokrát nedostatočne popísané, vrátane predprípravy vzorky pred analýzou. Aj v prípade, kedy sú publikované metódy popísané ako dôkladné a reprodukovateľné, sú v praxi len ťažko úspešne opakovateľné. Dôvody týkajúce sa zvolenia správnej SPE kolónky, mobilnej fáze, objemu vzorku alebo prietokovej rýchlosti nie sú často v publikáciách komentované. Typické interakcie sú napr. nepolárne interakcie medzi C–H väzbami analytu a C–H väzbami v absorbentu (Van der Waalsove sily) [10].

Najbežnejším variantom pre výskum nepolárnych interakcií sú C18 kolónky. Pre separáciu lipidov sa používajú taktiež kolónky C8 a C2. Oproti tomu polárne interakcie sú typické pre všetky látky s kyano- (CN) a amino- (NH₂) skupinami, dioly alebo oxidy kremíku. Ďalej sa vyskytujú ionomeničové interakcie, ako sú u kvartérnych amínov, benzén-sulfónových kyselín alebo propyl-sulfónových kyselín. K týmto interakciám dochádza vtedy, keď analyty majú negatívny alebo pozitívny iónový charakter [10].

2.2.4.1 Prevedenie SPE

Metóda SPE sa skladá z piatich krokov, a to z kondicionovania kolónky, dávkovania vzorky, premývania, sušenia a elúcie. Pred-úprava, inak tiež označované ako kondicionovanie kolónky, sa používa na prípravu kolónky na reprodukovateľnú interakciu zložiek vzorky s pevnou fázou. Kolónka je prepláchnutá predpísaným rozpúšťadlom z dôvodu aktivácie pevnej fáze pre interakciu so vzorkou [11].

Pri dávkovaní vzorky je dôležitý predovšetkým výber pevnej fáze, pretože dochádza ku špecifickým interakciám látok s pevnou fázou. Ostatné látky obsiahnuté vo vzorke voľne prechádzajú kolónou. Premývanie kolónky vhodným rozpúšťadlom slúži k vymytiu zvyškov matrice vzorky z kolónky. Žiadané zložky vzorky zostávajú uchytané na pevnej fáze [11].

Sušenie sa prevádza v prípadoch, kedy sa premývací roztok zásadne líši od roztoku elúčného. K vysušeniu sa používa prúd inertného plynu, najčastejšie sa jedná o dusík. Pri premývaní kolónky elúčnym činidlom dochádza k selektívnej desorpcii zložiek vzorky z pevnej fáze a tým k ich vymytiu z kolónky. Eluát sa zbiera a upravuje pre ďalšie použitie (chromatografická analýza) [11].

2.2.4.2 Inštrumentácia SPE

Na metódu SPE sa používajú buď kolónky alebo extrakčné disky. SPE kolónky majú tvar injekčnej striekačky, bez pohyblivého piestu a sú naplnené povrchovo modifikovanými sorbentmi o rôznej veľkosti častíc. Jednotlivé kolónky charakterizujú typ pevnej fáze (Tabuľka 4), objem kolónky (0,4 – 15 ml), maximálna prietoková rýchlosť, kapacita (1 – 500 mg), minimálny elúčny objem (10 µl – 50 ml) a materiál kolónky (polypropylén, sklo) [11]. Extrakčné disky sa používajú ako moderná forma SPE. Jedná sa o tenké kompozitné membrány z teflónu a príslušného modifikovaného sorbentu (až 90 % hm.). Výhody týchto diskov: nie sú obmedzené prietokovou rýchlosťou, skoncentrovanie vzorky prebieha vo veľmi úzkej zóne membrány a k elúcií sa používa minimálne množstvo elúčného činidla (rádovo µl). Vďaka tomu sa nemusí odparovať nadbytočné rozpúšťadla pred chromatografickou analýzou vzorky [11].

Tabuľka 4: Charakterizácia SPE kolónok [11]

Princíp	Absorbent	Vzorka	Elúčne činidlo
Nepolárna extrakcia	C18, C8, fenyl, CN	pesticídy, antibiotiká, kofeín, vitamín, PCB	hexan, dichlórmetán, acetonitril, alkoholy
Polárna extrakcia	silikagél, NH ₂ , CN, OH	antibiotiká, pesticídy, steroidy, vitamíny, aflatoxíny	di- a trichlórmetán, ethylacetát, alkoholy, voda
Katiónová výmena	kyslý katex	aminokyseliny, chlorofyl, PCB	kyseliny, roztoky solí, pufry
Aniónové výmena	bázický anex	organické kyseliny, kofeín, sacharín	zásady, roztoky solí, pufry
Extrakcia vo zmesnom móde	CN/SiOH, NH ₂ /C18	PCB z odpadných olejov, telné tekutiny	chloroform, acetón, ethylacetát, metanol

2.2.4.3 Výhody a nevýhody SPE

Jedná sa o rýchlu a lacnú metódu, výhodou ktorej je práca s malými objemami vzorky, znížená spotreba organických rozpúšťadiel a v neposlednej rade ľahká automatizácia [10,11]. Nevýhodou tejto techniky je, že pre niektoré špecifické izolácie nie sú doposiaľ vhodné SPE kolónky, ale sortiment SPE kolónok sa neustále rozširuje [10,11].

2.2.4.4 Aplikácia SPE pre frakcionáciu lipidov

Väčšina prác zaoberajúcich sa separáciou lipidov na SPE je založená na typu SPE kolónok so základnou molekulou C18 s aminopropyllovou skupinou. Prvá zmienka o využití techniky SPE pre separáciu lipidických tried je z roku 1985 od tímu vedeného Kalužným [40]. Táto štúdia sa zaoberá rozdelením celkového extraktu dvojím spôsobom. Jednoduchšia metodika využíva iba jednu SPE kolónku a delí celkový extrakt lipidov na tri frakcie – neutrálne lipidy, VMK a fosfolipidy.

Pri použití dvoch SPE kolónok možno dosiahnuť frakcionáciu vzorky na estery cholesterolu, triglyceridy, diglyceridy, monoglyceridy, cholesterol, voľné masné kyseliny a fosfolipidy [40].

Metodika navrhnutá Kalužným je základom pre ďalšie štúdie zaoberajúce sa technikou samotnou alebo jej aplikáciou.

Analýza čiastočných glyceridov (MAG a DAG) je zvyčajne prevedená pomocou kapilárnej GC. Tieto zlúčeniny, medziprodukty v biosyntéze TAG, sú tiež ukazovateľmi čerstvosti a technologickej úpravy. Pre ich stanovenie možno použiť aj HPLC, ale napr. Cortesi zistil, že HPLC je vhodná ak ide iba o informáciu o celkovom množstve týchto látok. Pérez-Camino referoval o alternatívach pre zistenie DAG s použitím rôznych typov SPE kolónok (diol, silikagél, amino-). Zistil, že diolová fáza nespôsobila izomériu počas extrakcie [34].

Následne spolu s Ruíz-Gutiérrezom Pérez-Camino v rovnaký čas ako Conte komentujú túto prácu a ostatné dáta s tým, že je nutné dávať veľkú pozornosť pri výbere vhodného sorbentu [34].

Hopia uvádza stanovenie VMK v rastlinnom oleji ako jednoduchú záležitosť (s výnimkou olivového). Využíva SPE a popisuje analýzu lipidických tried elúcií VMK v jedlých olejoch a tukoch. Procedúry podobné tejto triede lipidov sú popísané Innocenteom aj pri iných kategóriách potravinových produktov s rôznym obsahom a zložením, pri ktorých obsah a zloženie VMK. Obzvlášť VMK s krátkym uhlíkovým reťazcom ovplyvňujú senzorické charakteristiky cieľového produktu [34].

Hopia použil SPE k separácii TAG, pre odstránenie ich veľkého množstva, ktoré by interferovalo v použití na HPSEC (high-performance size-exclusion chromatography; vysokoúčinná veľkostne-vylučovacia chromatografia). Použité boli kolónky s modifikovaným silikagélom s NH_2 skupinou. Ako nepolárne rozpúšťadlo použil 20 ml roztoku hexan : dietyléter (9:1). Ako polárne rozpúšťadlá použil 10 ml roztoku chloroform : metanol (2:1) a 10 ml roztoku metanol : kyselina octová (98:2) [35].

2.2.5 Chromatografia na tenkej vrstve

Chromatografia na tenkej vrstve (TLC) je chromatografická technika používaná pre kvantitatívnu separáciu rôznych neprchavých zmesí. TLC je prevádzaná na doštičke zo skla, plastu alebo hliníkovej fólie potiahnutej tenkou vrstvou adsorbentu (zvyčajne silikagél, Al_2O_3 , celulóza). Tenká vrstva adsorbentu sa nazýva stacionárna fáza [10].

2.2.5.1 Prevedenie TLC

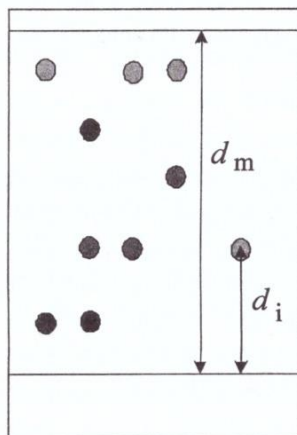
Po nadávkovaní vzorky na doštičku a jej vysušení sa vloží doštička do komory na vyvíjanie. Komora na vyvíjanie obsahuje rozpúšťadlo alebo zmes rozpúšťadiel (mobilná fáza), ktoré vzliňajú cez adsorbent pomocou kapilárnych síl. Na základe rôznej afinity analytu k rozpúšťadlu migrujú analyty rôznou rýchlosťou pričom dochádza k ich separácii. Mobilná fáza má odlišné vlastnosti ako stacionárna fáza. Silikagél, ako veľmi polárny adsorbent, je využívaný spolu s heptánom, čo je nepolárna zlúčenina. Pre lepšie vyladenie vlastností mobilnej fázy sa často používa zmes rozpúšťadiel [32].

Po experimente je TLC doštička vyňatá z komory na vyvíjanie, vysušená a následne prenesená do komory pre vizualizáciu.

Detekcia chromatografovaných látok sa prevádza buď priamo vizuálne, ak sú chromatografované látky farebné, alebo sa využíva ich fluorescencie pod UV žiarením, či sa prevádza postrek detekčným činidlom za vzniku farebných škvŕn. Často sa využíva jednoduché ožiarenie UV žiarením a následným ošetrením fosforom. Čierne škvŕny identifikujú separované analyty. Ďalšie metódy sú za použitia par jódu, ktorý sfarbí analyty na oranžovo; anisaldehydu, ktorý vytvára farebné adukty s viacerými zlúčeninami; kyseliny sírovej, ktorá spáli väčšinu organických zlúčenín a zanechá tmavé miesto na doštičke [24].

Podľa polohy škvŕny látky vo vzorke sa v porovnaní so štandardom, prípadne i rovnakého správania pri detekcii, určí kvalita látky. Pre identifikáciu analytov sa vzdialenosť urazená analytom podielí totálnou vzdialenosťou vyvinutého rozpúšťadla na doštičke. Mobilná fáza nesmie dosiahnuť konca stacionárnej fázy. Tento pomer sa nazýva retenčný faktor (R_f) (Obrázok 2).

Vo všeobecnosti, analyt s nízkym R_f bude mať nízku afinitu k rozpúšťadlu, a teda vysokú afinitu k adsorbentu, zatiaľ čo analyt s vysokým R_f bude mať vysokú afinitu k rozpúšťadlu, a teda nízku afinitu k adsorbentu. R_f sú pre daný analyt charakteristické a menia sa s podmienkami vyvíjania (mobilná a stacionárna fáza) [30].



Obrázok 2: Chromatogram TLC [38]

d_i ... vzdialenosť zložiek vzorky od štartu

d_m ... vzdialenosť čela mobilnej fázy od štartu

Kvantifikovať je možné jednotlivé analyty priamo na chromatogramu z porovnania veľkosti či intenzity zafarbenia škvŕn, pomocou fotodensimetru, alebo sa extrahujú z chromatogramu a potom stanovujú vhodnou metódou.

TLC môže byť použitá pre monitorovanie priebehu reakcie, identifikáciu zlúčenín v zmesi, alebo stanovenie čistoty látky. V praxi sa používa napr. pre analýzu ceramidov a mastných kyselín, detekciu pesticídov a insekticídov v jedle a vo vode, analýzu farbív vlákien v kriminalistike, stanovenie rádio-chemickej čistoty v rádiofarmaceutikách, pre identifikáciu liečivých rastlín a ich zložiek ap. [32]. V dnešnej dobe je TLC len zriedka používané samostatne, ale obvykle sa kombinuje s ďalšími metódami [13].

2.2.5.2 Výhody a nevýhody TLC

K výhodám TLC patrí hlavne jednoduchosť, presnosť, robustnosť a veľmi účinná deliaca schopnosť metódy. Tú možno ešte zvýšiť niekoľko násobným vyvíjaním s rôznymi rozpúšťadlami.

Nevýhodou sú problémy spojené so separáciou komplexných biologických vzoriek, nežiadúce oxidácie polynenasýtených lipidov počas procesu TLC a problémy, ktoré vznikajú pri prekročení maximálnej dávky vzorky [13].

2.2.5.3 Aplikácia TLC pre frakcionáciu lipidov

TLC je jednou z najstarších chromatografických techník a v mnoho publikovaných prácach bola aplikovaná k frakcionácii lipidov v rôznych biologických vzorkách (bunečné tkanivá, krv, moč apod.), ako uvádza vo svojej prehľadnej práci Touchstone [31].

Možno nájsť aj aplikácie na mlieko, ktoré uvádza Precht [41] a Fontecha [42], alebo všeobecne mliečny tuk v prácach Robinsona [43], Fragu [44] a Cruz-Hernandeza [45]. Dodnes sa táto metóda teší pomerne veľkej obľube, napr. nedávno Upadhyay a kol. [46] použili TLC k detekcii falšovania mliečneho tuku rastlinnými olejmi.

Vo svojej prehľadnej práci Fuchs a kol. [31] zhrňujú doterajšie poznatky aplikácii TLC v oblasti lipidov. V oblasti lipidov sa TLC v poslednej dobe využíva hlavne na rýchlu separáciu lipidických tried. TLC lipidov je zvyčajne prevádzaná na sorbentoch na báze silikagélu, ktoré môžu byť impregnované kyselinou boritou či dusičnanom strieborným. Touto metódou môžu byť VMK ľahko oddelené od zostatkových lipidov a následne stanovené pomocou GC; prípadne v kombinácii s MS [29].

Pre podrobnejšiu analýzu sa používa impregnácia TLC doštičiek AgNO_3 . TLC doštičky impregnované AgNO_3 boli použité napr. Wilsonom a Samotom k oddeleniu polynenasýtených MK, ktoré majú veľký fyziologický význam. Silikagél 60 TLC doštičky boli potiahnuté vrstvou AgNO_3 jednoduchou sprejovou technikou, následne sušené na vzduchu, zahrievané na 100°C po dobu 30 minút k dosiahnutiu aktivácie. MK boli po izolácii pomocou stĺpcovej chromatografie nanosené na naimpregnované TLC doštičky. Ako mobilná fáza bola použitá zmes toluénu a acetonitrilu (97 : 3, v/v). Následne boli doštičky sušené, potom ľahko nasprejované 3% roztokom octanu meďnatého, 8% kyselinou fosforečnou a spálené pri teplote 180°C po dobu 20 minút pre vizualizáciu. Pomocou tohto postupu mohli byť oddelené diény od triénov a tetraénov [29].

Ako najlepšia metóda vyzerá byť oddelenie MK s 0-2 dvojnými väzbami na jednej TLC doštičke pokrytej iónmi striebra, resp. MK s 3 a viac dvojnými väzbami na druhej doštičke. Vhodné elúčne činidlo pre prvú doštičku je zmes hexan : dietyléter (9 : 1, v/v) a pre druhú doštičku zmes hexánu a dietyléteru (2 : 3, v/v). Vo všeobecnosti je ale toto oddelenie pomerne náročné a neumožňuje dobre reprodukovateľné výsledky [13].

Scwerthner a Mosser ukázali, že kvantitatívne stanovenie rôznych MK je možné pomocou inej metódy. Metóda je založená na extrakcii lipidov zmesou chloroformu, metanolu a butylhydroxytoluénu (BHT) ako antioxidantu. Celkový extrakt lipidov bol následne rozdelený na silikagéle za použitia zmesi n-hexan – dietyléter – kyselina octová – BHT (95 : 5 : 1 : 0,1; v/v/v/v).

Doštičky boli nastriekané rhodomínom 6G a jednotlivé zložky lipidov boli sledované pod UV svetlom [29].

2.2.6 Esterifikácia mastných kyselín

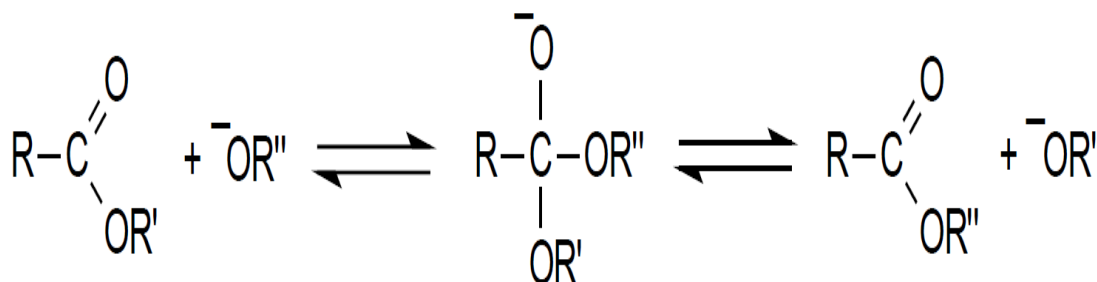
Pre stanovenie MK sa najčastejšie používa GC, preto musia byť prevedené na prchavú formu. Medzi najpoužívanejšie deriváty sa radia alkyl deriváty: metyl-, etyl-, propyl-, isopropyl-, butyl- a/alebo isobutyl- zlúčeniny, z ktorých v praxi najčastejšie bývajú príslušné metylestery. Oproti vyšším esterom majú radu výhod: najväčšia prchavosť zo všetkých esterov, veľká reakčná rýchlosť, vysoké výťažky a v neposlednom rade široké spektrum zavedených metylačných postupov [13].

V prípade požiadavku na kvalitné rozlíšenie nenasýtených MK, musí byť v rámci derivatizácie neutralizovaná polárna karboxylová skupina. Až potom je možná ich separácia podľa bodu varu, stupňa nenasýtenosti, pozície dvojných a trojitých väzieb a dokonca aj *cis* a *trans* izomérov [12].

Esterifikácia sa prevádza niekoľkými možnými spôsobmi, ktoré sa dajú použiť na širší okruh matric. Ako základné derivačné reakcie sa používa bázicky alebo kyslo katalyzovaná esterifikácia [14].

2.2.6.1 Bázicky katalyzovaná esterifikácia

Bázicky katalyzované reakcie (Obrázok 3) sú rýchlejšie a prebiehajú za miernejších podmienok než kyslo katalyzované esterifikácie. Dochádza k esterifikácii iba viazaných mastných kyselín, preto tieto postupy nie sú príliš vhodné, pokiaľ je vo vzorke vysoké množstvo VMK. Tieto esterifikácie prebiehajú rýchlo v bezvodom metanole v prítomnosti roztoku metoxidu sodného a v bezvodom metanole ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Menej často sa využíva metoxid draselný, hydroxid sodný a/alebo hydroxid draselný [9].



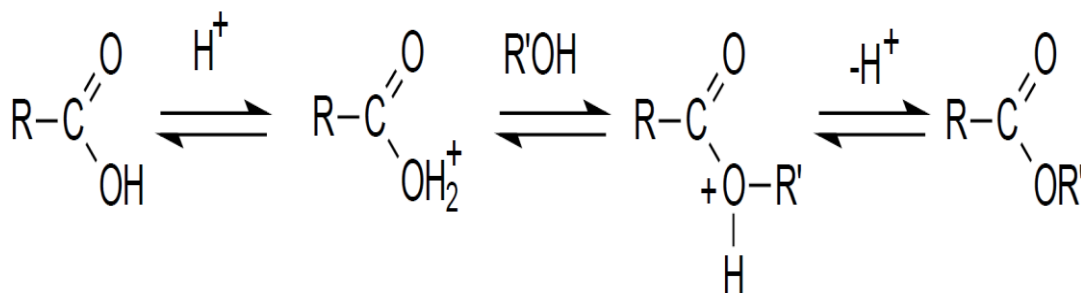
Obrázok 3: Schéma bázicky katalyzovanej transesterifikácie [9]

2.2.6.2 Kyslo katalyzovaná esterifikácia

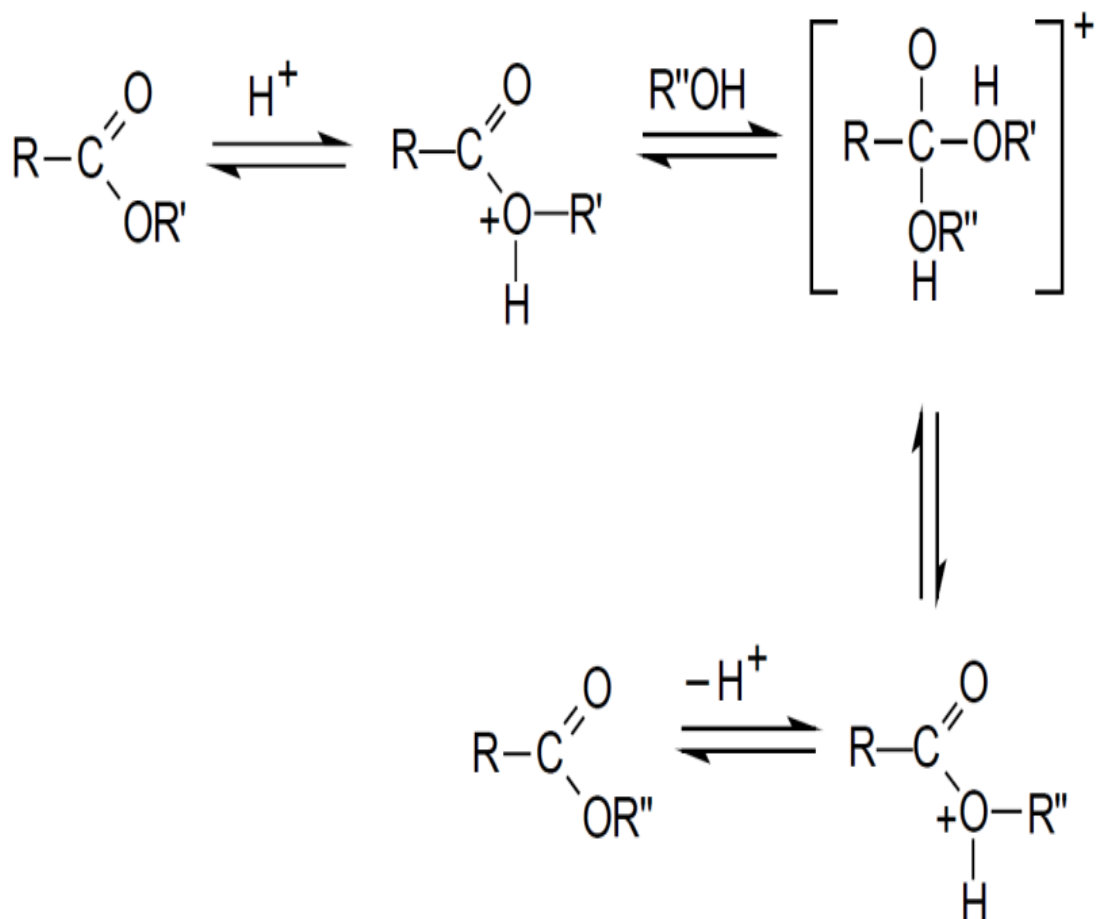
Kyslo katalyzovaná esterifikácia (Obrázok 4) v prebytku bezvodého metanolu pomocou zahrievania je vhodná i pre stanovenie VMK. Ako katalyzátory sa používajú HCl, H₂SO₄, BCl₃, AlCl₃ a/alebo BF₃. Zahrievaním dochádza k urýchleniu esterifikácie. Obvykle sa vzorka lipidu s činidlom zahrieva zhruba 2 až 4 hodiny pod spätným chladičom. Prítomnosť vody môže zabrániť úplnej reakcii (Obrázok 5). Esterifikované nie sú iba voľné mastné kyseliny, ale aj viazané [33].

V poslednej dobe sa v praxi najčastejšie používa ako katalyzátor BF₃ (12 až 14% roztok v metanole), aj napriek svojim nevýhodám ako najmä vysoká toxicita a krátka trvanlivosť (cca 3 mesiace). Tento postup uvádzajú i platné ISO normy pre stanovenie MK v tukoch [47, 48].

Možným činidlom je i 5% bezvodý chlorovodík v metanole, ktorý vzniká postupným prebublaním bezvodého metanolu chlorovodíkom. Na rovnakom princípe funguje aj esterifikácia s 1-2% roztokom kyseliny sírovej v metanole. Reakčná doba je pomerne dlhšia a výťažky sú o niečo nižšie než pri katalýze BF₃ [33].



Obrázok 4: Schéma kyslo katalyzovanej esterifikácie [9]



Obrázok 5: Schéma kyslo katalyzovanej transesterifikácie [9]

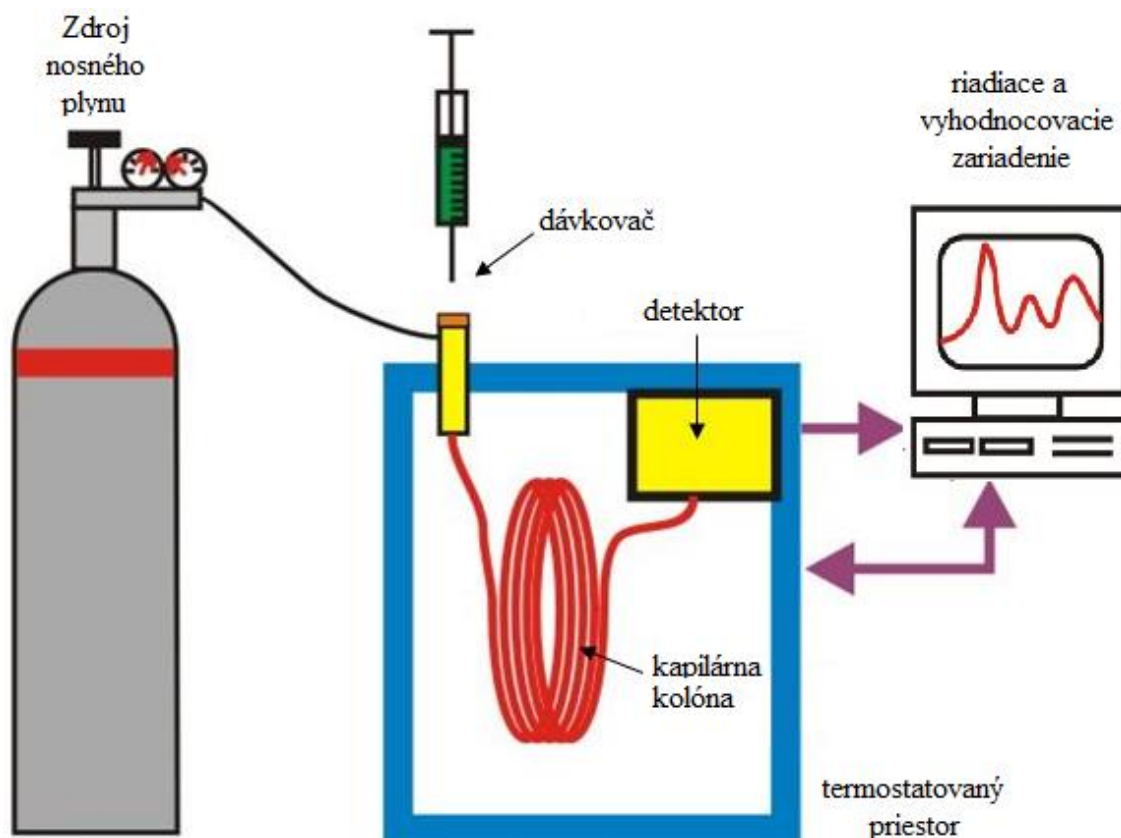
2.2.7 Plynová chromatografia

Plynová chromatografia (GC) je analytická separačná metóda, ktorá sa využíva najčastejšie ku stanoveniu prchavých látok. Jej hlavnou výhodou je jednoduché a rýchle prevedenie analýzy, účinná separácia látok a použitie veľmi malého množstva vzorky. Metóda je určená ku deleniu a stanoveniu pevných látok, plynov a kvapalín s bodom varu do 400 °C. Delenie zložiek zmesi prebieha medzi mobilnou a stacionárnou fázou. Mobilnou fázou je nosný plyn, najčastejšie sa používa dusík, vodík, hélium alebo argón. Stacionárnou fázou je pevný sorbent alebo kvapalina nanosená v tenkej vrstve na pevný nosič.

Princípom tejto metódy je nanášanie vzorky do vyhrievaného bloku vstrekovacej komôrky (injektor), kde dochádza k odpareniu vzorky, ktorá je vo forme pár unášaná nosným plynom do kolóny.

V kolóne (Obrázok 6), dochádza k separácii zložiek na základe rôznej afinity zložiek so stacionárnou fázou. Takto oddelené zložky opúšťajú kolónu a sú detegované pomocou detektoru.

Pre stanovenie MK sa najčastejšie používa plameňovo-ionizačný (FID), resp. hmotnostný (MS) detektor. Signál z detektoru sa ďalej vyhodnocuje najčastejšie pomocou počítača, ktorý zaznamenáva závislosť intenzity signálu na čase (chromatogram). Na základe porovnání so štandardmi je možná identifikácia píkovo zlúčenín a ich kvantifikácia v zmesi [15, 17].



Obrázok 6: Schéma plynového chromatografu

2.3 Možnosti stanovenia voľných mastných kyselín v potravinových matriciach

V prípade stanovenia VMK z komplexných matric, akými sú potravinárske výrobky, je nutné ich oddeliť od ostatných frakcií lipidov. K tomu možno použiť rôzne metódy. Najčastejšie sú aplikované SPE a TLC v kombinácii s ďalšími technikami [12]. Nevýhodou býva v týchto prípadoch pomerne veľká časová náročnosť [9]. Zatiaľ čo pre separáciu rôznych zložiek lipidov z biologických matric je SPE široko využívaná už dlhšiu dobu, v analýze jedlých tukov a olejov je jej používanie iba zriedkavé [10].

V rastlinnom materiáli stanovovali VMK napr. Čertík a kol., ktorí extrahovali tuk z rastlinnej matrice metódou podľa Folche. Delenie takto získaných lipidov prebiehalo metódou TLC.

Mobilnou fázou bol roztok hexan : dietyléter : kyselina octová (80 : 20 : 1 obj.%, v/v/v). Získané VMK boli prevedené na metylestery pomocou metanolu a BF_3 a následne stanovené GC-FID [22].

Podobné stanovenie VMK z piva na SPE kolónkach popisujú aj Horák a kol. [21]. Rozdiel tvorí použitie kolónky etylvinylbenzén-divinylbenzén polymér s extrémne špecifickým povrchom. Ako elúčne činidlo bol použitý chloroform. Prevedenie na metylestery bolo pomocou derivačnej zmesi metanol a BF_3 (metanol 14 %, v/v) s následnou analýzou metódou GC-FID.

V mliečnom tuku je 96 až 98 % z celkového obsahu MK naviazaných na glycerol; najčastejšie sa jedná o TAG. V mliečnych výrobkoch, teda aj v syroch, sa vyskytujú MK aj vo forme voľnej.

Jedná sa o malé množstvá, ktoré aj v nízkych koncentráciách ovplyvňujú aromatické a senzorické vlastnosti zmienенých produktov [18].

Z rôznych aplikácií na mliečne výrobky možno uviesť napr. prácu De Jonga a kol. [49], ktorí publikovali metódu pre stanovenie VMK v mliečnych výrobkoch s použitím aminopropyl SPE kolónok.

Rovnaký princíp je aplikovaný aj v diplomovej práci Knotka [19] alebo v dizertačnej práci Šípalovej [20], kde boli stanovené VMK v jogurte. Na separáciu VMK bola použitá metóda SPE. Elúcia VMK z NH₂-kolóniek bola realizovaná 2% roztokom kyseliny mravčej v dietyléteru; VMK boli prevedené na metylestery pomocou metoxidu sodného v metanolu a stanovené metódou GC-FID.

Innocente a kol. publikovali jednoduchú a rýchlu metódu stanovenia VMK s krátkym reťazcom (< C6) v syroch s použitím extrakcie vodou [50].

Tuomala a Kallio [23] stanovovali VMK v syru typu ementál priamym spojením superkritickej fluidnej extrakcie s plynovým chromatografom. Pomocou superkritickej fluidnej extrakcie oxidom uhličitým bola získaná zo vzorky prchavá frakcia s VMK a ďalšími prchavými zlúčeninami. Tieto frakcie boli potom analyzované na plynovom chromatografe s FID a MS detekciou. Rýchlu a jednoduchú metódu stanovenia VMK v mlieku popisujú Amer a kol. [24]. Jedná sa o metódu, kedy VMK boli prevedené etylesterom kyseliny chlórnavčej na etylestery a následne stanovené na plynovom chromatografe s MS detekciou. Wijesundera a kol. [18] stanovovali obsah VMK zo vzorky syrov čedar. Pre sorpciu VMK bolo použité SPME vlákno pokryté polyakrylátom. Tie boli následovne stanovené GC-FID.

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Laboratórne vybavenie a chemikálie

3.1.1 Plyny

- Dusík 5.0 SIAD v tlakovej bombe s redukčným ventilom a kovovou membránou;
- Vodík 5.5 SIAD v tlakovej bombe s redukčným ventilom;
- Vzduch 5.0 SIAD v tlakovej bombe s redukčným ventilom pre kyslík.

3.1.2 Prístroje

- Plynový chromatograf TRACE GC (Thermoquest Italia S. p. A., Taliansko) s plameňovo-ionizačným detektorom, split/splitless injektorom a kapilárnou kolónou DB-23 o rozmeroch 60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m.
- SPE manifold (SUPELCO VISIPREP™)
- Počítač PC, Intel Pentium Procesor
- Analytické digitálne váhy HeLAGO, GR-202-EC, Taliansko
- Chladničky
- Vodná kúpeľ so stojanmi, Julabo TW2
- Digestor
- Sušiareň, Memmert
- Vákuová rotačná odparka, KIKA WERKE-RVO6-ML, s príslušenstvom

3.1.3 Pracovné pomôcky

- Mikropipeta Biohit-Proline (0,5 – 1000 μ l)
- Bežné laboratórne sklo
- SPE kolónky Amino Bag, 10 x 3 ml tubes 500mg, USA
- TLC doštičky Silikagel 60, 20 x 20 cm, MERCK, Nemecko
- Vyvíjacie komory
- Hamiltonova striekačka
- Parafilm Pechiney PASTIC PACKAGING
- Nôž, nožnice, špachle
- Vialky

3.1.4 Chemikálie

3.1.4.1 Chemikálie pre extrakciu

- Kyselina chlorovodíková 35 % p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Etanol 96 % p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Petroléter p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Dietyléter stabil. p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Hexan p. a., Lach-Ner, Česká republika

3.1.4.2 Chemikálie pre esterifikáciu

Chemikálie pre bázičnú esterifikáciu

- Isooktán p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Hydroxid draselný p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Metanol p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Hexan p. a., Lach-Ner, Česká republika

Chemikálie pre kyslú esterifikáciu s HCl

- Metanol p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Kyselina chlorovodíková 35 % p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Heptan p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Bezvodý síran sodný, p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Methylovan, p. a., Lach-Ner, Česká republika

Chemikálie pre kyslú esterifikáciu s BF₃

- Bortrifluorid (14% roztok v metanole), p. a., SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Hydroxid sodný p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Metanol p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Isooktán p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Chlorid sodný, p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Bezvodý síran sodný, p. a., Lach-Ner, Česká republika

3.1.4.3 Chemikálie pre SPE

- Dietyléter stabil. p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Kyselina octová 99 % p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Chloroform p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Propanol čistý, LACHEMA, Česká republika
- Hexan p. a., Lach-Ner, Česká republika

3.1.4.4 Chemikálie pre TLC

- Dietyléter stabil. p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Hexan p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Kyselina octová 99 % p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Jód

3.1.4.5 Chemikálie pre stanovenie MK

- Štandardy jednotlivých MK: kapronová, kaprylová, laurová, myristová, palmitová, stearová, olejová, linolová, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Zmesový štandard metylesterov mastných kyselín, Supelco™ 37 Component FAME Mix, SIGMA-ALDRICH, Nemecko

3.2 Analyzované vzorky

Pre experimentálnu časť tejto diplomovej práce boli použité a analyzované 3 typy testovacích vzoriek: slnečnicový olej, tvrdý syr holandského typu (Gouda) zakúpené v bežnej tržnej sieti a modelový tavený syr vyrobený na Univerzite Tomáše Bati ve Zlíne štandardným technologickým postupom

Vzorky boli uchované v chladničke pri teplote do 6 °C. Pred analýzou bola vzorka Goudy vždy nastrúhaná na jemnom strúhadle, premiešaná a na analytických váhach bolo navážené potrebné množstvo pre jednotlivé skúšky. Tavený syr a olej boli iba premiešané a pre jednotlivé skúšky zvážené na analytických váhach.

3.3 Použité metódy

3.3.1 Extrakcia lipidov zo vzorky podľa normy ČSN EN ISO 1735

Zo vzorky bol odvážený 1 g na analytických váhach s presnosťou na štyri desatinné miesta. Po kvantitatívnom prevedení vzorky do skúmavky bolo pridaných 5 ml kyseliny chlorovodíkovej. Táto zmes bola vložená do vodnej kúpele nastavenej na teplotu 80 °C. Vzorky boli v tejto kúpeli ponechané do zmeny farby roztoku na temne fialovú (Obrázok 7), a to približne 10 minút.



Obrázok 7: Zmena farby zmesi (t = 10 minút)

Potom boli skúmavky ochladené pod prúdom studenej vody. Po ochladení bolo ku zmesi pridaných 5 ml etanolu a roztok bol kvantitatívne prevedený do deliaceho lievika. Do deliaceho lievika boli vždy pridané extrakčné činidlá; v prvom kroku 8,4 ml dietyléteru, po minúte trepania ešte 8,4 ml petroléteru. Po minútovom pretrepaní sa nechal roztok odstáť 30 minút pre oddelenie fáz (pri laboratórnej teplote cca 22 °C). Celý proces extrakcie sa opakoval ešte dvakrát s polovičným množstvom extrakčných činidiel [33].

Horná vrstva (Obrázok 8) sa po jednotlivých 30 minútových odstátiach odoberala pipetou do predom zváženej destilačnej banky (100 ml). Všetky tri extrakty boli spojené a rozpúšťadlo bolo následne odparené na vákuovej rotačnej odparke pri teplote 40 °C.

Množstvo vyextrahovaného tuku bolo zistené gravimetricky – zvážením banky s presnosťou na 0,000 1 g a odčítaním váhy prázdnej banky. Tuk bol následne prevedený do 1 ml hexanu a použitý na ďalšiu analýzu.

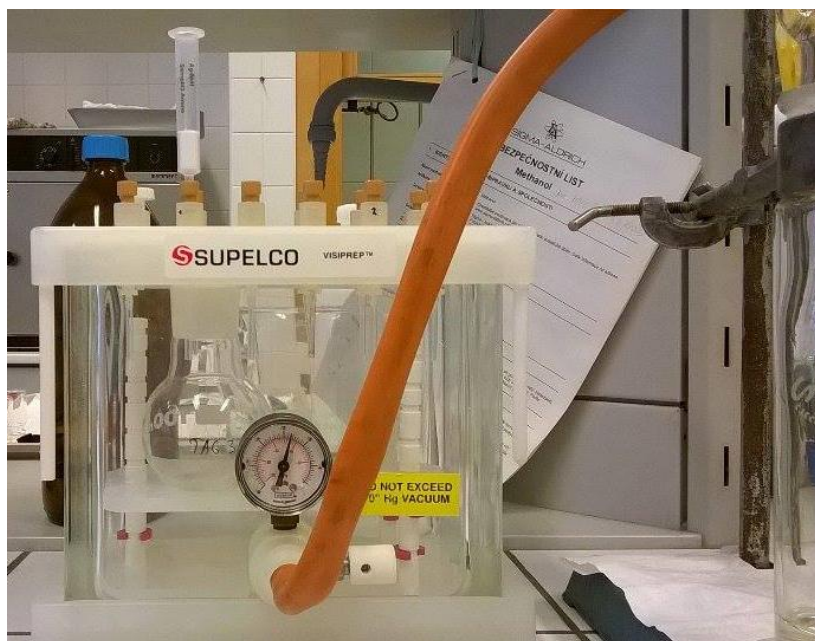


Obrázok 8: Deliaci lievik po extrakcii (vrchná organická fáza)

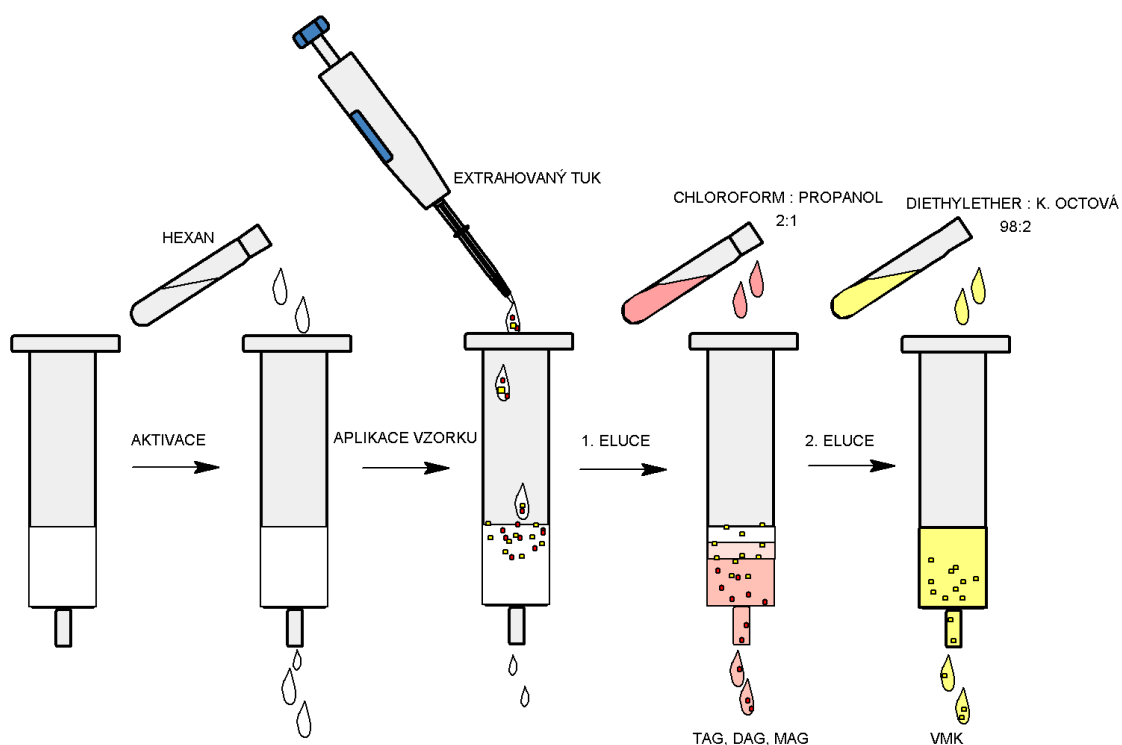
3.3.2 Frakcionácia lipidov metódou SPE

SPE kolónky boli pripevnené do zariadenia SPE manifold (Obrázok 9), v ktorom sa pomocou vodnej vývevy vytvorilo vákuum. Potom boli NH_2 -kolónky aktivované pomocou 3 ml hexanu (Obrázok 10). Prietok hexanu kolónkami sa reguloval otočným ventilom, približne 1-2 kvapky za sekundu. Po premytí kolónok hexanom bola na kolónku dávkováná vzorka. Na prvú elúciu bolo použitých 7 ml zmesi chloroform : propanol v pomere 2 : 1 (v/v), a na druhú elúciu 7 ml 2 % roztok kyseliny octovej v dietyléteru (v/v). Získané frakcie boli zachytávané do vysušených a predom zvážených destilačných bánk (50 ml) s normalizovaným zábrusom. Následne bolo rozpúšťadlo odparené na vákuovej rotačnej odparke. Množstvo jednotlivých frakcií bolo zistené gravimetricky – zvážením s presnosťou na 0,000 1 g a odčítaním váhy prázdnej banky. Koncentrované frakcie boli následne kvantitatívne prevedené do 1 ml hexanu a esterifikované (viď kap. 3.3.4). Po esterifikácii boli jednotlivé frakcie (dávkových 1 μl) analyzované na plynovom chromatografe s FID detekciou [19, 20].

Príprava elúčnych rozpúšťadiel bola vždy priamo pred experimentom z dôvodu nutnosti čerstvých zmesí. Ide o veľmi prchavé látky a teda skladovanie po dlhšiu dobu by mohlo viesť k zmene pomerov rozpúšťadiel (napr. slabo prchavá kyselina octová oproti veľmi prchavému dietyléteru).



Obrázok 9: SPE Manifold



Obrázok 10: Schéma postupu frakcionácie lipidov metódou SPE [37]

3.3.3 Frakcionácia lipidov metódou TLC

Hliníková TLC doštička pokrytá silikagélom sa najprv nechala aktivovať v sušiarňi pri teplote 100 °C po dobu 30 minút zabalená vo filtračnom papieri. Potom sa na doštičke vyznačil štart, na ktorý sa následne nanášali vzorky extraktov lipidov pomocou Hamiltonovej striekačky (dávkaných 20 µl) na rovný úsek o dĺžke 3 cm.

Takto nanesené vzorky sa nechali na doštičke zaschnúť cca 5 minút a potom sa nechali vyvíjať v komorách (Obrázok 11) na vyvíjanie (cca 1,5 hod). Na vyvíjanie bola použitá zmes rozpúšťadiel hexan : dietyléter : kyselina octová v pomere 80 : 20 : 1 (v/v/v). Vo chvíli, kedy dosiahla zmes čela (cca 1 cm od horného okraja dosky), sa doska z komory na vyvíjanie vytiahla a nechala sa v digestore schnúť počas 5 minút a bola ďalej vložená do druhej komory s parami jódu. V druhej komore (Obrázok 12) došlo po cca 20 minútach k vizualizácii jednotlivých škvŕn (frakcií lipidov). Výsledok po vizualizácii je vidieť nižšie (Obrázok 13).



Obrázok 11: Komora pre vyvíjanie vzorky



Obrázok 12: Komora pre vizualizáciu vzorky



Obrázok 13: TLC doštička po vizualizácii v parách jódu

Škvrny odpovedajúce jednotlivým frakciám boli označené a po odparení jódu vyškrabané kovovou špachtľou. Takto vyškrabaná vrstva bola kvantitatívne prevedená do destilačnej banky, v ktorej bola vzorka následne esterifikovaná (vid' kap. 3.3.4) a analyzovaná (dávkovaný 1 μ l) na plynovom chromatografe s FID detekciou. Všetka manipulácia so vzorkou a aj TLC doštičkou bola z dôvodu vyhnutia sa kontaminácií tukom prevedená v rukaviciach [33].

Príprava zmesi na vyvíjanie hexan : Et₂O : AcOH (80 : 20 : 1, v/v/v)

Nadávkujú sa potrebné objemy vzhľadom ku rozmerom komory. V našom prípade je vhodné použiť pomer 40 ml hexanu : 10 ml dietyléteru : 0,5 ml kyseliny octovej. Zmes musí byť vždy nová, pripravená pred experimentom. Z dôvodu predchádzajúcej adsorpcie rôznych objemov rozpúšťadiel na TLC doštičku nemožno použiť zmes na vyvíjanie opakovane.

Z dôvodu perfektnej tesnosti komory na vyvíjanie je možné si túto zmes pripraviť vopred.

3.3.4 Esterifikácia mastných kyselín

3.3.4.1 Bázická esterifikácia

Tuk (resp. vyextrahovaný tuk) bol kvantitatívne prevedený pomocou 1 ml hexanu do vialiek s gumovou zátkou. Do vialky bolo ďalej pridaných 5 ml isooktanu a 0,5 ml metanolickeho roztoku KOH ($c = 2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Vialky boli potom 8 minút pretrepávané a následne sa nechali 6 minút stáť pre oddelenie fáz. Po uplynulej dobe 6 minút bol z hornej vrstvy odobraný 1 ml k analýze na plynovom chromatografu [47,48].

Príprava metanolickeho roztoku KOH ($c = 2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Navážka 2,24 g KOH sa za mierneho ohrievania rozpustí v 20 ml metanolu. Pripravený roztok metanolickeho KOH je uchovávaný v chladničke maximálne po dobu 3 mesiacov, alebo kým sa nezačnú tvoriť kryštáliky na dne [24].

3.3.4.2 Kyslá esterifikácia s kyselinou chlorovodíkovou

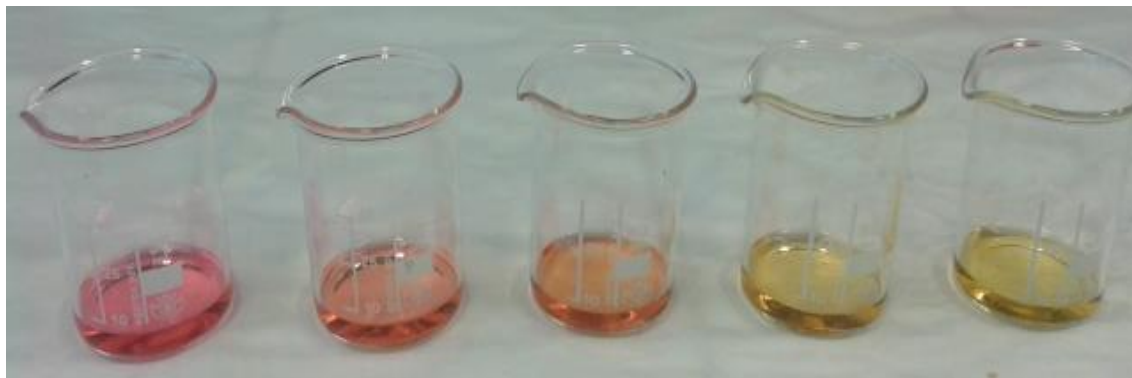
Tuk (resp. vyextrahovaný tuk) sa kvantitatívne prevedie pomocou 1 ml hexanu do destilačnej banky (50 ml) a pridá sa 7 ml metanolickeho roztoku chlorovodíku ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a varný kamienok. Na banku sa pripojí reflux a obsah sa varí 10 minút.

Banka sa ochladí pod tečúcou vodou, pridá sa 12,5 ml vody. Celý obsah sa kvantitatívne prevedie do oddeľovacieho lieviku a pridajú sa 4 ml heptanu. Silne sa pretrepe (1 min) a nechá sa stáť až do momentu oddelenia dvoch fáz. Oddelí sa vrchná heptanová vrstva; vodná sa ďalej extrahuje ďalšími 4 ml heptanu. Oba heptanové extrakty sa spoja a premývajú vždy 5 ml vody až do úplného odstránenia kyselín, ktoré sa indikuje metyloranžou (Obrázok 14). Roztok sa vysuší bezvodým síranom sodným a filtruje cez filtračný papier do 10 ml odmernej banky. Doplní sa heptanom po rysku [47,48].

Z pripraveného roztoku sa odoberie 1 ml k analýze na plynovom chromatografe.

Príprava metanolickeho roztoku HCl ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Objem 0,6 ml HCl (35%) sa pridá do 6,4 ml metanolu. Pripravený roztok metanolickeho HCl možno uchovávať v digestore [33].



Obrázok 14: Zmena farby roztoku postupným vymytím kyselín (indikátor metyloranž)

3.3.4.3 Kyslá esterifikácia s bortrifluoridom

S ohľadom na jedovatosť BF_3 je nutné prevádzať nasledovné úkony v digestore. Všetko laboratórne sklo musí byť ihneď po použití umyté vodou. Skúšobná vzorka musí byť suchá a čistá. Preto je vhodné ohriať vzorku tesne nad bod topenia [33].

Kyslá esterifikácia s bortrifluoridom - TAG

Tuk (resp. vyextrahovaný tuk) sa kvantitatívne prevedie pomocou 1 ml hexanu do destilačnej banky (50 ml) a pridá sa 4 ml metanolickeho roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a varný kamienok. K destilačnej banke sa pripojí spätný chladič.

Obsah banky sa varí pod spätným chladičom do vymiznutia kvapôčok tuku.

Každých 30 sekúnd sa jemne krúži s bankou, aby nedošlo k tvorbe pevného krúžku hydroxidu sodného na stene banky. Tento krok trvá približne 5 až 10 minút. Potom sa pridá 5 ml metanolickeho roztoku bortrifluoridu (BF_3) cez horný koniec chladiča a varí sa (3 min). Následne sa pridajú cez horný koniec chladiča 3 ml isooktanu do variacej sa zmesi.

V momente pridania sa var zastaví, odstráni sa chladič a ihneď, bez akéhokoľvek chladenia sa pridá 20 ml nasýteného vodného roztoku chloridu sodného (NaCl). Banka sa uzavrie a poriadne sa pretrepe (15 s).

Pridá sa väčšie množstvo nasýteného roztoku chloridu sodného tak, aby sa hladina kvapaliny dostala do hrdla banky. Následne sa nechajú oddeliť obe fázy (5 min).

Z vrchnej isooktanovej vrstvy sa odoberie 1 až 2 ml a prenesú sa do 4 ml vialky. Pridá sa malé množstvo bezvodého síranu sodného, aby sa odstránili stopy vlhkosti [47, 48]. Z pripraveného roztoku sa odoberie 1 ml k analýze na plynovom chromatografu.

Príprava metanolickeho roztoku NaOH ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Navážka 2 g NaOH sa za mierneho ohrievania rozpustí v 100 ml metanolu. Pripravený roztok metanolickeho NaOH je uchovávaný v chladničke maximálne po dobu 3 mesiacov. Ak má byť roztok skladovaný dlhšiu dobu, môžu sa vytvoriť malé množstvá bielej zrazeniny uhličitanu sodného, ktoré nemajú vplyv na prípravu metylesterov [33].

Kyslá esterifikácia s bortrifluoridom - VMK

Tuk (resp. vyextrahovaný tuk) sa kvantitatívne prevedie pomocou 1 ml hexanu do destilačnej banky (50 ml) a pridá sa varný kamienok. Cez horný koniec chladiča sa pridá 5 ml metanolickeho roztoku bortrifluoridu (BF_3) a varí sa 3 minúty. Následne sa pridajú cez horný koniec chladiča 3 ml isooktanu do variacej sa zmesi.

V momente pridania sa var zastaví, odstráni sa chladič a ihneď, bez akéhokoľvek chladenia sa pridá 20 ml nasýteného vodného roztoku chloridu sodného (NaCl). Banka sa uzavrie a poriadne sa pretrepe (15 s).

Pridá sa väčšie množstvo nasýteného roztoku chloridu sodného tak, aby sa hladina kvapaliny dostala do hrdla banky. Následne sa nechajú oddeliť obe fázy (5 min). Z vrchnej isooktanovej vrstvy sa odoberie 1 až 2 ml a prenesú sa do 4 ml vialky. Pridá sa malé množstvo bezvodého síranu sodného, aby sa odstránili stopy vlhkosti [47, 48].

Z pripraveného roztoku sa odoberie 1 ml k analýze na plynovom chromatografu.

3.4 Podmienky metódy stanovenia metylesterov mastných kyselín

- **Plynový chromatograf** TRACE GC (ThermoQuest S.p.A., Taliansko)
- **Autosampler** AI/AS 3000
- **Kapilárna kolóna:** DB-23 o rozmeroch 60 m x 0,25 mm x 0,25 μm
- **Oven – teplotný program**
 - 60 $^{\circ}\text{C}$ 10 minút
 - Vzostupný gradient 12 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ do 200 $^{\circ}\text{C}$ s výdržou 10 minút
 - Vzostupný gradient 5 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ do 220 $^{\circ}\text{C}$ s výdržou 15 minút
 - Vzostupný gradient 10 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ do 240 $^{\circ}\text{C}$ s výdržou 7 minút
 - Celková doba analýzy: 60 minút

- **Inlet**
 - Teplota injektoru: 250 °C
 - Splitless time: 5 minút
 - Dávkovanie: autosampler bez deliča toku (splitless) (1 µl)
- **Carrier gas**
 - Prietok dusíku: 0,5 ml·min⁻¹
- **Detektor FID (plameňovo-ionizačný)**
 - Teplota detektoru: 250 °C
 - Prietok vzduchu: 350 ml·min⁻¹
 - Prietok vodíku: 35 ml·min⁻¹
 - Make-up dusíku: 30 ml·min⁻¹

3.5 Identifikácia a kvantifikácia mastných kyselín

Mastné kyseliny boli stanovené po prevedení na metylestery (MEMK) (vid'. kapitola 3.3.4). Identifikácia jednotlivých MEMK v testovaných vzorkách bola prevedená na základe porovnania retenčných časov identických štandardov. Semikvantitatívne zastúpenie vybraných mastných kyselín je vyjadrené ako plocha príslušných píkov na chromatograme.

Kvantifikácia vybraných mastných kyselín bola prevedená výpočtom ich koncentrácie (c_{MEMK}) z plôch píkov MEMK vo vzorke (P_{MEMK}) a známej koncentrácie (c_s) a plôch píkov (P_s) štandardov.

Výpočet:

$$c_{\text{MEMK}} = \frac{c_s \cdot P_{\text{MEMK}}}{P_s} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}] \quad [1]$$

Vypočítané množstvo metylestero mastných kyselín (c_{MEMK}) bolo prepočítané na obsah MK:

$$c_{\text{MK}} = \frac{c_{\text{MEMK}} \cdot Mr_{\text{MK}}}{Mr_{\text{MEMK}}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}] \quad [2]$$

Kde:

c_{MK} koncentrácia MK vo vzorke [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]

c_{MEMK} koncentrácia MEMK vo vzorke [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]

Mr_{MK} molárna hmotnosť MK [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]

Mr_{MEMK} molárna hmotnosť MEMK [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]

Platí: $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \approx \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ vzorky

3.6 Štatistické spracovanie výsledkov

Dáta boli spracované a vyhodnotené pomocou programu MS Excel 2013. Každá vzorka bola zmeraná dvakrát ($n = 2$). Pre namerané dáta boli v rámci štatistického vyhodnotenia použité nasledujúce štatistické parametre: aritmetický priemer, smerodajná odchýlka (SD) a relatívna smerodajná odchýlka (RSD).

Zastúpenie vybraných mastných kyselín je vyjadrené semikvantitatívne ako plocha príslušných píkov na chromatogramu, alebo ako percentuálne zastúpenie, príp. po prepočte v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Táto práca je súčasťou projektu riešeného v rámci nášho ústavu, ktorý sa zaoberá problematikou lipidov v prírodných, resp. tavených syroch a ich zmenami počas výroby, zrenia a skladovania.

Tuk v syroch významne ovplyvňuje textúru, ale je nevyhnutný aj pre vývoj správnej chuti a vône syru. Lipidy v syroch môžu podliehať oxidačnej a/alebo hydrolytickej degradácii. Oxidácia lipidov v syroch väčšinou nebýva príliš rozsiahla, pravdepodobne kvôli nízkemu redox potenciálu (-250 mV) a prítomnosti prirodzených antioxidantov (napr. vitamín E); ich príspevok k flavouru syru je menej dôležitý. Na druhú stranu enzymatická hydrolýza TAG na mono-/di-acylglyceroly a VMK (lipolýza) je jedným zo zásadných procesov prebiehajúcich počas zrenia syrov a je považovaná, spolu s proteolýzou, za hlavnú metabolickú cestu pre tvorbu chuti a vône syru [51].

Následkom lipolýzy sa uvoľňujú VMK, ktoré jednak priamo prispievajú k syrovému arómu, zvlášť MK s kratším a stredným C-reťazcom (< 12 C), a jednak sú dôležitými prekursorami ďalších prchavých aromatických zlúčenín, ako sú alkány, estery, sekundárne alkoholy, metylketóny a laktóny. Na druhú stranu pokiaľ sa koncentrácia VMK zvýši nad určitú medzu, dôjde k vývoji zatuchnutej chuti [52].

V rámci štúdia zmien tuku počas zrenia syru sme doposiaľ používali stanovenie celkového obsahu MK. Jedná sa o klasickú metódu, ktorá sa používa v mnohých laboratóriách napr. pri kontrole kvality potravín.

Pred samotným stanovením je najprv treba izolovať lipidy/MK z matrice syru. Navzdory možnostiam použitia niektorých moderných metód (extrakcia pomocou mikrovln, PSE, SFE, SPME a pod.), sa v praxi doposiaľ často používa klasická extrakcia zmesami rozpúšťadiel [24].

Aj keď je v zásade možné a v niektorých prácach publikované, priame stanovenie MK [52], stanovenie MK pomocou GC vyžaduje tzv. derivatizáciu pre zvýšenie prchavosti. MK sú najčastejšie prevádzané na metylestery [24].

Najfrekvencovanejšie využívanou analytickou metódou pre stanovenie MK je GC, menej často HPLC (vysokoúčinná kvapalinová chromatografia), prípadne tieto metódy spojené s MS (hmotnostná detekcia). Medzi ďalšie techniky patria spektrometrické metódy (UV, MIR) a elektromigračné techniky [24, 52].

Na našom ústave bola metóda stanovenia MK overená a zavedená v rámci diplomovej práce Pruknerovej [24]. Metóda používa extrakciu lipidov zo vzorky modifikovanou metódou podľa Folche (zmes chloroform – metanol), esterifikáciu s použitím metanolového roztoku KOH a stanovenie pomocou GC-FID. Avšak stanovením celkového obsahu MK nemožno dobre postihnúť zmeny lipidických frakcií a vzhľadom k vyššie zmienenej dôležitosti VMK v chuti a vône syru nastala potreba mať k dispozícii metódu schopnú stanoviť VMK. Publikácií na toto téma nie je mnoho, zvlášť aplikácií na syry, prípadne mliečne výrobky; používajú sa rôzne metódy (viď kapitola 2.3). Ich podstatou je väčšinou separácia jednotlivých lipidových frakcií, ktoré je možno analyzovať oddelene. Pre tento pred-separačný krok možno využiť rôzne metódy. V minulosti sa často používala TLC, kolónová chromatografia a neskôr HPLC. Dnes je najčastejšie aplikovaná SPE [13].

Cieľom tejto práce bolo nájsť optimálne podmienky a overiť vybrané validačné parametre metódy vhodné pre stanovenie voľných a viazaných MK založené na použití TLC, prípadne SPE. Metóda bola vypracovaná tak, aby bola použiteľná predovšetkým pre analýzu rôznych typov prírodných a tavených syrov, resp. z nich vyextrahovaného tuku. Všeobecne ju však možno aplikovať na akýkoľvek typ tuku (oleje).

Prvé experimenty boli pre zjednodušenie prevádzané na vzorkách slnečnicového oleja, neskôr bola metóda aplikovaná na tuk vyextrahovaný zo vzoriek modelových tavených syrov. Pre stanovenie MK vo všetkých získaných frakciách bola použitá plynová chromatografia s FID detekciou.

4.1 Extrakcia lipidov zo vzorky

Cieľom extrakčného procesu je oddeliť lipidy od ostatných komponentov (proteíny, polysacharidy a iné). Výber extrakčného procesu závisí tiež na komplexnosti potravinovej matrice, napr. v prípade mliečnych výrobkov môžu byť lipidy pomerne silne naviazané na proteíny [52].

Klasická extrakcia rozpúšťadlom je doteraz často používaná, i keď vykazuje radu nedostatkov: inštrumentálna a časová náročnosť, veľká spotreba vzorky, množstvo drahých a častokrát toxických rozpúšťadiel (možná kontaminácia, vznik organického odpadu), môže dochádzať ku stratám analytu, môže poskytovať nižšie výťažky a iné [24]. V ideálnom prípade má byť extrakčný proces kvantitatívny a reprezentatívny s ohľadom na sledované zložky, rýchly, jednoduchý, robustný, lacný a umožňujúci automatizáciu [40].

Zmes lipidov získaná extrakciou obsahuje heterogénnu zmes komponentov rôznej štruktúry a vlastností: TAG, VMK, estery sterolov, voľné steroly, fosfolipidy, glyceroglykolipidy, gangliosidy, ceramidy a sfingolipidy a tiež nelipidové látky. Kvôli tomu je náročná ich kompletná izolácia.

Lipidy svojou povahou patria medzi nepolárne až mierne polárne zlúčeniny, preto sa k ich extrakcii používajú nepolárne organické rozpúšťadlá (napr. dietyléter alebo chloroform), avšak je vhodná ich kombinácia s polárnym rozpúšťadlom, predovšetkým kvôli denaturácii proteínov a degradácii vodíkových väzieb medzi lipidmi a proteínmi. Najčastejšou metódou používanou v prípade biologických vzoriek je postup navrhnutý Folchem v roku 1957. Extrakčné činidlo je v tomto prípade chloroform s metanolom v pomere 2 : 1. [10, 22].

V prípade VMK je situácia ešte zložitejšia, keďže v mlieku a v mliečnych výrobkoch existuje rovnováha medzi VMK v tukovej fáze a mliečnej plazme. Čím kratší C reťazec, tým väčší podiel sa nachádza v plazme. Je jasné, že kompletná extrakcia VMK je zložitá a je treba počítať s nižšími výťažkami zvlášť v prípade nízko-uhlíkatých MK [51, 52]. Innocente a kol. dokonca použili pre získanie VMK s krátkym reťazcom extrakciu vodou [50].

V našom prípade bola pre extrakciu lipidov zo vzoriek syrov použitá zmes dietyléteru a petroléteru. Väzba lipidov na proteín sa naruší prídavkom HCl a zahriatím. Tento postup je prevzatý z normovanej referenčnej metódy pre stanovenie obsahu tuku v syroch [47, 48] a bol vyskúšaný v našich podmienkach v diplomovej práci Pruknerovej [24].

4.2 Výber metódy esterifikácie mastných kyselín

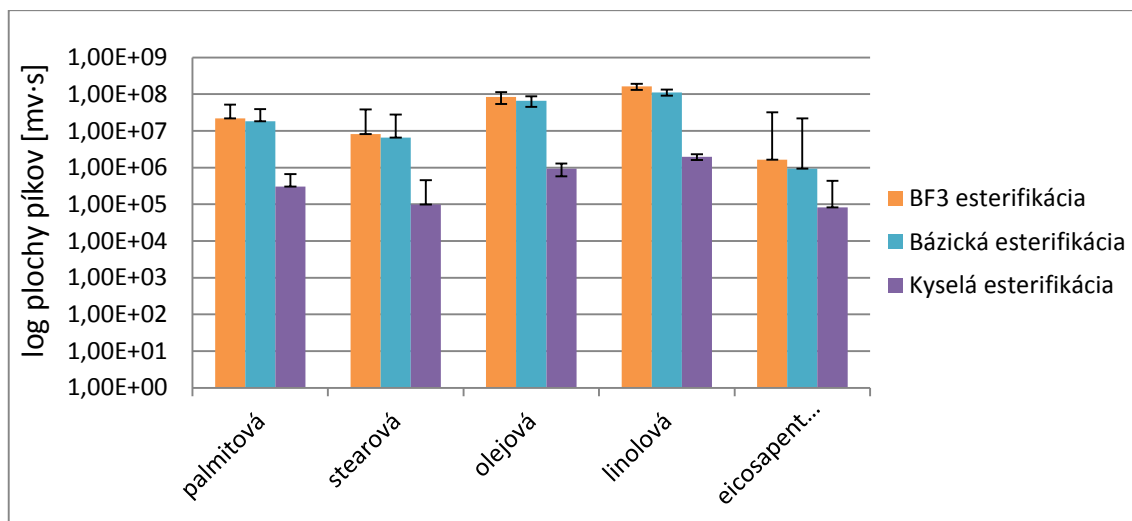
Ďalším krokom tejto práce bol výber vhodnej metódy derivatizácie, resp. esterifikácie MK. Boli vyskúšané a porovnané tri esterifikačné metódy: bázičná esterifikácia s metanolicným roztokom KOH, kyslá esterifikácia s metanolicným roztokom HCl a/alebo bortrifluoridom. Postupy boli prevzaté s príslušných noriem [47, 48].

Pre prvé experimenty bola použitá bázičná esterifikácia, ktorá bola vybratá a optimalizovaná v diplomovej práci Pruknerovej [24]. Problém je, že bázičky katalyzovaná transesterifikácia nepôsobí na VMK, aj keď je zaujímavé, že na chromatogramu boli i vo frakcii VMK zdanlivé píky. Zrejme sa mohlo jednať o stopy TAG, príp. vzniknuté artefakty alebo nečistoty z použitých rozpúšťadiel. V prípade GC metylesterov určité činidlá, napr. metanolicný roztok BF_3 , môžu poskytovať náhodné píky na chromatogramu (v prípade methanolicného BF_3 v oblasti kyselín C_{20} - C_{22}). Následkom toho nové prípravky činidla a rozpúšťadla by mali byť kontrolované prípravou metylesterov čistej kyseliny olejovej a jej chromatografiou. Ak sa objavia cudzie píky, činidlo by malo byť vyradené [33].

Vzhľadom k tomu, že jedna z frakcií, z nášho pohľadu tá najdôležitejšia, bola tvorená VMK, bolo nutné pre zisk metylesterov použiť kyslo katalyzovanú esterifikáciu, ktorá je síce dlhšia a náročnejšia na prevedenie, ale umožňuje i esterifikáciu VMK [20]. Bola vyskúšaná metóda s bortrifluoridom a alternatívna metóda s HCl. Bázičná esterifikácia je rýchla, jednoduchá a šetrná vzhľadom k malým objemom rozpúšťadiel s ktorými sa ľahko pracuje (viď kapitola 3.1.4.2). Kyslá esterifikácia je dlhšia a vyžaduje bezvodé prostredie. Je nevyhnutné využívať vysoko kvalitné derivatizačné činidlá s nízkym obsahom vlhkosti, keďže prítomnosť vody bráni úplnej derivatizačnej reakcii. Okrem toho esterifikácia s metanolicným roztokom BF_3 vyžaduje prácu v digestore, pretože ide o toxickú a karcinogénnu zmes.

Porovnanie troch esterifikačných metód bolo prevedené stanovením celkového obsahu MK (bez frakcionácie). Bolo navážené približne rovnaké množstvo (40 mg) slnečnicového oleja. Jednotlivé esterifikácie boli prevedené podľa postupu (viď kapitola 3.3.4). Následne boli vzorky analyzované na GC. Z výsledných chromatogramov boli odčítané plochy pík vybraných MK. Namerané dáta boli graficky spracované (Graf 1). Pre lepšiu viditeľnosť rozdielov bol použitý logaritmus plochy pík.

Ako už bolo zmienené, pre naše účely bolo nevyhnutné používať kyslú esterifikáciu, hoci bázičná esterifikácia vykazuje pomerne vysoké výťažky, v našom prípade je eventuálne použiteľná iba pre frakciu TAG. Z hľadiska výťažku najúčinnější esterifikácia je s použitím BF_3 , naopak najhoršie dopadla kyslá esterifikácia s HCl, ktorá mala vždy o rád nižšiu výťažnosť. Zmes BF_3 -metanol je obzvlášť vhodná pre prípravu metylesterov karboxylových kyselín a esterov (s C_8 až C_{24} dĺžkou reťazca). Keď sa činidlo so vzorkou zohreje v uzatvorenej vialke na krátku dobu, tak sa analyt skombinuje s bezvodým metanolom v prítomnosti kyslého katalyzátoru BF_3 . V tejto reakcii sa analyt a alkohol spoja za úbytku vody [54].



Graf 1: Porovnanie účinnosti troch testovaných esterifikačných metód

Po zhodnotení metód z hľadiska získaného výťažku, dostupnosti a bezpečnosti chemikálií, jednoduchosti a rýchlosti prevedenia bola nakoniec vybraná v praxi najpoužívanejšia metóda s BF_3 , aj napriek jej nevýhodám ako sú vysoká toxicita a obmedzená trvanlivosť metanolickeho roztoku BF_3 .

Pri esterifikácii frakcie VMK je navyše možné použiť jednoduchší postup bez predošlého zmydelnenia (viď kapitola 3.3.4.3), čím možno ešte skrátiť dobu analýzy.

Počas jednotlivých experimentov bola vždy overovaná výťažnosť esterifikácie spätným prepočítaním na navážku vzorky. Vychádzala pomerne nízka, čo bolo pravdepodobne spôsobené radou problémov, ktoré môžu nastať pri príprave esterov, ako napr. nekompletná konverzia tuku na MEMK, rozklad polynenasýtených MK, zmena zloženia MK (tvorba polohových a geometrických izomérov), strata vysoko prchavých nízkoúhlíkatých MK alebo nekompletná extrakcia MEMK po esterifikácii [33].

Preto bude táto esterifikačná metóda ďalej optimalizovaná za účelom minimalizácie množstva vzorky a použitých reagentov, skrátenia doby analýzy a predovšetkým zisku maximálneho výťažku. Inšpirovali sme sa postupom mikro-esterifikácie s BF_3 uvedeným v katalógu firmy Sigma Aldrich [56], ktorý pracuje s navážkou 10 mg vzorky (čo je ideálne pre naše potreby, zisk z jednotlivých frakcií je malý). Esterifikácia prebieha v 5 ml vialke za použitia 2 ml metanolickeho roztoku BF_3 (10% w/w) a zahriatím. Celý proces trvá cca 10 až 15 minút [33].

4.3 Skladovanie extraktov

Ak je potrebné extrakty lipidov/MK uchovávať dlhšiu dobu, je potrebné brať v úvahu prípadné zmeny zloženia vzorky. MAG a DAG môžu podliehať izomérii, nenasýtené MK autooxidácii. Nemali by byť uskladnené v suchom stave, oxidačná degradácia je v roztoku pomalšia. Najlepšie je extrakt ihneď (ešte pred skladovaním) podrobiť derivatizácii.

Derivatizované extrakty lipidov by mali byť analyzované čo najskôr. Ak je nutné, môže byť heptanový/hexanový (ak MK obsahujú 20 alebo viac atómov, mal by byť hexan nahradený heptanom) roztok metylesterov uchovávaný pod inertným plynom v chladničke najlepšie pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ alebo aj nižšej.

Pre ďalšie skladovanie sa odporúča chrániť metylestery pred autooxidáciou prídavkom antioxidantu v takej koncentrácii, aby pri nasledujúcej analýze nerušila, napr. roztok $0,05 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ BHT (2,6-di-terc-butyl-4-metylfenol) [33].

Metylestery obsahujúce metylester kyseliny maslovej môžu byť uskladnené v zatavených ampulkách a je nutné zachovať opatrnosť, aby nedochádzalo ku stratám počas plnenia a uzatvárania ampuliek.

Metylestery bez rozpúšťadla majú byť ihneď analyzované. Ak je to nutné, môžu sa 24 hodín uchovávať v chladničke, alebo dlhšiu dobu vo vákuu v zatavenej skúmavke v mrazničke [33].

Všetky extrakty boli uchovávané v chladničke pri teplote cca 4°C max. do druhého dňa; do GC injektoru bolo autosamplerom dávkovaných vždy $1 \mu\text{l}$ extraktu.

Z vyššie zmienených dôvodov boli v našom prípade všetky extrakty spracované najneskôr do druhého dňa.

4.4 Frakcionácia lipidov – optimalizácia experimentálnych podmienok

Hlavnou náplňou práce bolo vybrať vhodnú frakcionačnú metódu. Pre frakcionáciu extraktu lipidov zo vzoriek boli v rámci tejto práce vyskúšané a porovnané dve metódy: TLC a SPE. Postup TLC bol prevzatý z práce Touchstona [31] a Čertíka a kol. [22]; postup SPE bol prevzatý z práce De Jonga [49] a Šípalovej [20]. Obe tieto metódy boli v našom laboratóriu po prvý krát vyskúšané v diplomovej práci Horňákovej [13]. Boli optimalizované niektoré parametre a metódy boli aplikované na frakcionáciu lipidov v modelových vzorkách tavených syrov a prírodných syroch typu Gouda. Zároveň bolo prevedené predbežné porovnanie oboch metód.

4.4.1 Frakcionácia lipidov metódou tenkovrstvej chromatografie

TLC je síce stará, ale doposiaľ často používaná metóda, v rade prípadov bola použitá i na frakcionáciu lipidov, o čom svedčí množstvo vyššie zmienených publikácií (viď kapitola 2.2.5.3).

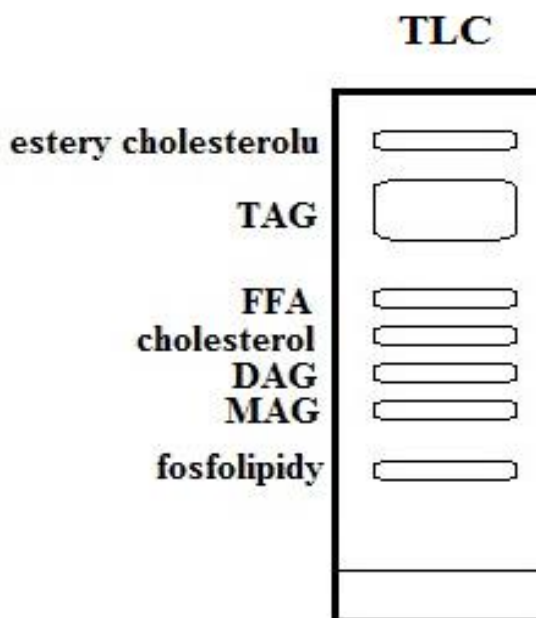
V rámci tejto práce boli optimalizované vybrané parametre TLC: typ stacionárnej fáze, doba a spôsob vyvíjania, množstvo dávkovanej vzorky a zloženie zmesi rozpúšťadiel na vyvíjanie. Parametre boli optimalizované za účelom dosiahnutia čo najlepšej separácie a viditeľnosti jednotlivých škvŕn.

Vybrané parametre boli najprv testované na vzorke slnečnicového oleja (odpadá zdĺhavý krok extrakcie tuku) a na záver boli overené na vzorkách taveného syra (resp. z nich vyextrahovaného tuku). Všetky experimenty boli prevedené nasledujúcim schematickým postupom.

Z komerčne vyrábaných TLC doštičiek bol vystrihnutý obdĺžnik o rozmeroch cca $15 \times 20 \text{ cm}$, skutočná dráha pre vyvíjanie bola cca 18 cm . Po aktivácii TLC doštičky (100°C , 30 minút) bola na štart nanesená vzorka oleja (resp. vyextrahovaného tuku) na dĺžku 3 cm (množstvo bolo optimalizované) rozpustená v 1 ml hexanu. Vyvíjanie prebiehalo so zmesou rozpúšťadiel (hexan : dietyléter : kyselina octová, $80 : 20 : 1$, v/v/v) približne 90 minút (bolo optimalizované). Vizualizácia prebiehala v komore s parami jódu približne 15 minút do objavenia žltých škvŕn. Škvŕny (frakcie lipidov) boli označené ceruzkou, po vyprchaní jódu vyškrabané a samostatne analyzované.

Všeobecné elúčne schéma lipidických frakcií na TLC bolo získané aplikáciou vzorky oleja je znázornené nižšie (Obrázok 15).

Identifikácia škvr sa bežne prevádza pomocou retenčných faktorov R_f a porovnaním so štandardmi [16], čo v našom prípade nebolo nutné, pretože frakcie boli ľahko identifikovateľné vizuálne podľa polohy a poradia na chromatogramu na základe práce Kalužného (Obrázok 15) [40]. Pre naše účely bola táto identifikácia dostačujúca.



Obrázok 15: TLC lipidických frakcií [40]

4.4.1.1 Voľba separačného systému

V prípade TLC je pre ovplyvnenie rozlíšenia najdôležitejšia selektivita systému, ktorá je daná voľbou stacionárnej a mobilnej fázy. Účinnosť nemožno ovplyvniť zmenou rýchlosti toku mobilnej fázy, a preto výber mobilnej fázy a stacionárnej fázy rozhoduje o kvalite rozdelenia látok na chromatogramu [13]. Vrstva stacionárnej fázy sa volí podľa povahy separovaných látok, čím sa taktiež určí mechanizmus separácie. Je vhodné zvoliť taký adsorbent, ktorý neviaže jednotlivé zložky delenej zmesi ani príliš pevne, ani príliš slabo. V prvom prípade zmes zostáva na štarte, v druhom prípade zmes látok bez rozdelenia putuje s rozpúšťadlom až na koniec. Na základe práce Čertíka a kol. [22] boli vybrané komerčne dostupné TLC doštičky so silikagélom ako stacionárnou fázou.

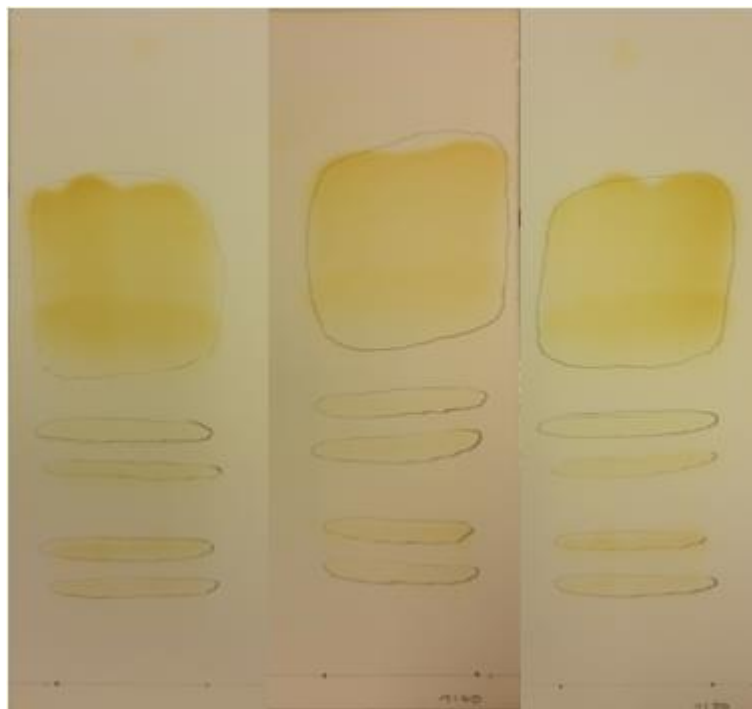
Taktiež zloženie zmesi na vyvíjanie bolo prevzaté z práce Čertíka a kol. [22], bola použitá zmes hexan : dietyléter : kyselina octová v pomere 80 : 20 : 1 (v/v/v). Podľa Touchstone [31] je táto mobilná fáza vhodná pre náš účel, zaručuje dobrú separáciu TAG, DAG, MAG a zisk frakcie VMK.

4.4.1.2 Doba vyvíjania TLC

Vyvíjanie chromatogramu trvá cca 80 minút, než dosiahne mobilná fáza čela [13]. Pre lepšiu separáciu zložiek boli vyskúšané rôzne doby vyvíjania. Na tri dosky bolo nanesených 15 μ l roztoku tuku v hexanu vždy dvakrát ($c = 370 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Pre tento účel bol použitý tuk vyextrahovaný z taveného syru.

Vzorky boli vyvíjané po dobu 80, 90 a 100 minút. Výsledok po vizualizácii v parách jódu je vidieť nižšie (Obrázok 16).

Ako už bolo zmienené, účinnosť separácie nemožno ovplyvniť zmenou rýchlosti toku mobilnej fázy [14] a dlhšia doba vyvíjania teda nemala požadovaný účinok, škvrny boli rozdelené prakticky rovnako (Obrázok 16). Ako optimálna doba vyvíjania TLC doštičky bola zvolená 80 minút predovšetkým z hľadiska kratšej doby celej analýzy. Separácia jednotlivých frakcií je uspokojivá.



Obrázok 16: Chromatogram TLC, doba vyvíjania 80 minút (vľavo), 90 minút (v strede), 100 minút (vpravo)

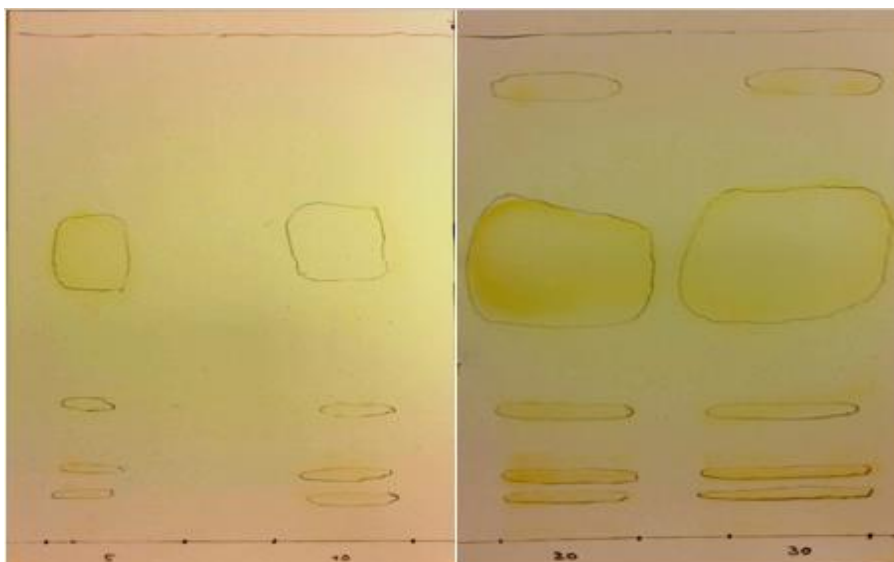
4.4.1.3 Množstvo (objem) dávkovanej vzorky

Pre úspešné prevedenie TLC je potrebné určiť množstvo vzorky, ktoré bude nanosené. Najčastejšie sa pohybuje v rozmedzí 2 až 10 μl a závisí samozrejme taktiež na koncentrácii. Pri dávkovaní príliš vysokej koncentrácie vzorky mobilná fáza nebude schopná analyt rozpustiť a zhorší sa separácia škvŕn [14].

Pre zistenie optimálneho množstva vzorky dávkovanej na TLC doštičku bol použitý slnečnicový olej. Pre tento účel bol vytvorený roztok oleja v hexánu ($c = 365,7 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Táto koncentrácia bola zvolená zámerne, aby približne odpovedala koncentrácii extraktu zo syra. Boli dávkované štyri rôzne objemy: 5, 10, 20 a 30 μl roztoku oleja. Výsledok po vizualizácii v parách jódu je vidieť nižšie (Obrázok 17).

Pri vyhodnocovaní boli brané v úvahu veľkosť, tvar a intenzita sfarbenia škvŕn. Ako optimálne bolo zvolené množstvo dávkovanej vzorky 20 μl .

U množstva 5 a 10 μl sú škvrny malé a ťažko detekovateľné, navyiac dávkovanie takto malého objemu je veľmi zložité, kvôli nutnosti rovnomerného rozprestretia vzorky na celú dĺžku. Pri množstve 30 μl sú škvrny príliš rozpité.

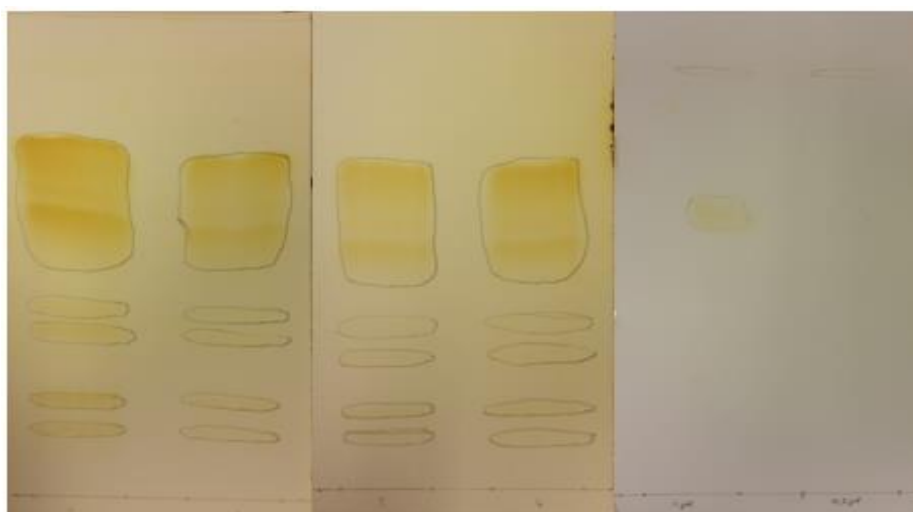


Obrázok 17: Chromatogramy TLC, objem dávkovanej vzorky zľava: 5, 10, 20 a 30 μl

4.4.1.4 Koncentrácia (hmotnosť) nadávkovanej vzorky

Pre naše účely bolo dôležité zistiť minimálnu hmotnosť vzorky, ktorú možno nadávkovať. Na TLC doštičku boli vzorky dávkové postupne so znižujúcou sa koncentráciou. Z vyextrahovaného tuku v hexanu ($c = 370 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) boli riedením získané a nadávkované koncentrácie 185; 92; 46; 23; 12 a 6 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po vizualizácii v parách jódu bola určená medzná koncentrácia vzorky, pri ktorej je ešte detekovateľná. Viditeľná je znižujúca sa intenzita sfarbenia a zmenšujúca sa veľkosť škvŕn s klesajúcou koncentráciou (Obrázok 18). Najnižšia detekovateľná koncentrácia, kedy sú jednotlivé frakcie stále ešte dobre rozpoznateľné, je 23 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, čo je prepočítané na hmotnosť 347 μg lipidov. Pri nižších koncentráciách už nie je možná identifikácia.

Podľa našich výsledkov je teda minimálne množstvo lipidov dávovaných na TLC cca 330 μg , čo je v súlade s prácou Čertíka a kol. [22]. Naopak Kalužnému [40] sa podarilo dosiahnuť zreteľného rozdelenia pri dávkovanom množstve 0,5 μg lipidov.



Obrázok 18: Chromatogramy TLC so znižujúcou sa koncentráciou dávkovanej vzorky (zľava: 185; 92; 46; 23; 12 a 6 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)

4.4.2 Frakcionácia lipidov metódou extrakcie na pevnej fáze

Táto separačná metóda je oproti TLC pomerne nová, prvé SPE kolónky sa objavili v roku 1979, ale k najväčšiemu rozmachu došlo až koncom 90. rokov minulého storočia. Vďaka vývoju nových sorbentov došlo ku spresneniu, väčšej špecifite, zvýšeniu výťažnosti a zlepšeniu opakovateľnosti metódy. V on-line prevedení sú vhodné pre plne automatizované metódy [28].

Zatiaľ čo pre frakcionáciu lipidov z rôznych biologických vzoriek (tkanivá, mikrobiálne kultúry) je SPE používané už pomerne dlhú dobu, jej aplikácia na vzorky jedlých tukov a olejov je menej častá [10].

Nevyhnutným krokom je aktivácia kolónky, ktorá pripraví sorbent na efektívnu interakciu s cieľným analytom. Prevádza sa prietokom vhodného rozpúšťadla (najlepšie tým, v ktorom je dávkovaná rozpustená vzorka alebo analyt), v množstve odpovedajúcom cca objemu kolónky. V priebehu celého procesu potom už nemôže dôjsť k vyschnutiu náplne, keďže suchý sorbent negatívne ovplyvní žiaduce interakcie sorbent-analyt [10]. Lipidické vzorky je vhodné aplikovať na SPE kolónku v nepolárnom rozpúšťadle, Kalužny [40] odporúča < 0,5 ml, čo môže byť výhodnejšie z hľadiska doby analýzy a bude ešte optimalizované [31].

Všetky experimenty boli prevádzané nasledujúcim schematickým postupom:

SPE kolónka bola aktivovaná 3 ml hexánu, následne bol automatickou pipetou aplikovaný olej (resp. vyextrahovaný tuk) rozpustený v 1 ml hexánu.

Kolónka bola prepláchnutá dvoma typmi zmesových rozpúšťadiel. Prvá a druhá elúcia zmesou chloroform : propanol v pomere 2 : 1, tretia a štvrtá elúcia 2 % roztokom kyseliny octovej v dietyléteri. Podľa predpokladu bola z prvej frakcie eluovaná zmes o zložení mono-, di- a triacylglycerolov, z tretej elúcie zmes obsahujúca iba voľné masné kyseliny. Druhá a štvrtá elúcia boli prevedené pre kontrolu; po dosiahnutí optimálneho množstva rozpúšťadiel by nemali obsahovať žiadne analyty. Celkovo boli teda zachytávané 4 frakcie označené:

- TAG
- kontrolná TAG
- VMK
- kontrolná VMK

Tento proces trvá celý s prípravou elúčnych činidiel cca hodinu.

Ďalším krokom bolo odparenie elúčnych činidiel, čo bolo v prípade prvej a druhej elúcie zložené. Elúčne činidlo obsahuje chloroform a propanol, ktoré majú tendenciu vzlietať. Aj tak trvalo odparenie jednej frakcie 15 minút. U frakcie z tretej a štvrtej elúcie, kde bolo elúčnym činidlom 2 % roztok kyseliny octovej v dietyléteri, trvalo odparenie veľmi krátku dobu (5 min). Obe cieľné frakcie (TAG a VMK) boli po odparení esterifikované a analyzované na GC.

Z hľadiska časovej náročnosti je SPE metóda trochu rýchlejšia, aj keď prietok kolónky bol nastavený tak, aby dochádzalo k pomalému prekvapkávaniu.

4.4.2.1 *Optimalizácia podmienok SPE*

Parametre boli optimalizované za účelom zisku maximálneho výťažku. Hlavné optimalizované parametre: výber vhodnej SPE kolónky, resp. množstvo a typ sorbentu, množstvo vzorky, ktoré môže byť aplikované bez straty výťažnosti, zloženia, množstvo a rýchlosť prietoku zmesi rozpúšťadiel na premývanie a elúciu, ktoré môžu byť aplikované bez straty analytov.

Vybrané parametre boli testované jednak pomocou štandardov MK, potom na vzorke slnečnicového oleja (odpadá zdĺhavý krok extrakcie tuku) a na záver boli overené na vzorkách taveného syra (resp. z nich vyextrahovaného tuku).

Výsledky boli najprv kontrolované jednoduchým vysušením a zvážením frakcií, zachytávaných po aplikácii vzorky na SPE kolónku. Takto získané výsledky síce neboli príliš presné; bolo pomerne ťažké odpariť frakcie skutočne do sucha, avšak poskytlo nám to prvé veľmi cenné informácie o úspešnosti metódy a naznačilo ďalší smer optimalizácie postupu.

Súbežne s optimalizáciou SPE prebiehalo testovanie a optimalizácia TLC (viď kapitola 4.4.1) a výber metódy vhodnej pre esterifikáciu (viď kapitola 4.2). Výsledky potom boli vyjadrované po esterifikácii pomocou plôch pík. Zloženie jednotlivých frakcií bolo kontrolované pomocou TLC.

Výber vhodnej SPE kolónky

Výber zahŕňa:

- typ sorbentu – závisí na fyzikálne chemických vlastnostiach analytu
- množstvo sorbentu – závisí na množstve/koncentracii analytu
- veľkosť SPE kolónky – závisí na objemu aplikovanej vzorky

Najdôležitejším krokom je výber vhodného sorbentu. Najčastejšie sa ako pevná fáza využíva silikagél (silica) či oxid hlinitý (alumina) alebo reverzná fáza C18; silikagél potom môže byť rôznym spôsobom modifikovaný, napr. vhodnou polárnou funkčnou skupinou: -CN, -NH₂, -diol a iné [28].

Hennion v svojej práci uvádza jednoduché delenie sorbentov:

- reverzná fáza
- normálna fáza
- iónomeničová fáza
- adsorpčná fáza [28].

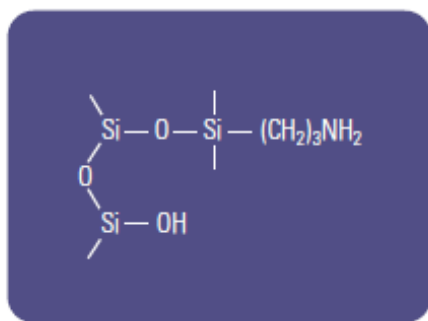
Podstatou SPE sú silné, ale reverzibilné interakcie medzi analytom a sorbentom. Typické interakcie sú:

- nepolárne medzi C-H väzbou analytu a C-H väzbou sorbentu (Van der Waalsove sily)
- polárne interakcie zahŕňujú vodíkové väzby, π - π interakcie, dipól-dipól interakcie a dipól-indukovaný dipól interakcie [10].

Silné interakcie sú dobré pre retenciu analytu, ale horšie sa prekonávajú pri spiatočnej elúcii [28].

Pri izolácii frakcií lipidov sa v publikáciách najčastejšie používajú sorbenty Si, -NH₂, -NH₄⁺, -diol a C18 [10].

Pre náš účel boli na základe Kalužného [40], de Jonga [49] a odporúčenia výrobcu vybrané kolónky obsahujúce ako sorbent silikagél modifikovaný amino skupinou (aminopropyl SPE kolónky). Tento sorbent má na povrchu silikagélu naviazanú alifatickú aminopropylovú skupinu (Obrázok 19). Sorbent môže pôsobiť buď ako normálna polárna fáza, alebo ako slabý aniónomenič. Pokiaľ je kondicionovaný nepolárnym rozpúšťadlom (napr. hexan, ako je tomu v našom prípade), viaže pomocou vodíkových väzieb všetky molekuly obsahujúce funkčné skupiny -OH, -NH₂ či -SH. Vo vodnom prostredí pri pH 7, 8 a nižšom funguje ako slabý aniónomenič [54].



Obrázok 19: Štruktúra aminopropyl(NH₂)silánu, kovalentne spojeným s povrchom silikagélu [54]

Polárne lipidy, ako sú VMK a fosfolipidy, prípadne aj lipidy obsahujúce polárnu skupinu (MAG a DAG), pravdepodobne interagujú s aminopropylovou skupinou silnejšie prostredníctvom vodíkových väzieb [40]. Na NH₂ kolónkach sa teda zachytávajú predovšetkým VMK a fosfolipidy, nepolárne zlúčeniny (acylglyceroly) prechádzajú kolónkou. Podľa niektorých autorov [49] však tieto fáze nie sú pre adsorpciu fosfolipidov dostatočne selektívne a možno predpokladať ich nedostatočné výťažky; pre ich elimináciu bola vzorka lipidov podľa odporúčenia Kalužného [40] rozpustená v hexanu miesto v chloroformu (fosfolipidy majú nízku rozpustnosť v hexanu).

Podľa nášho predpokladu sa teda na zvolených NH₂ kolónkach zachytávali predovšetkým VMK.

Čo sa týka vhodných rozmerov, pre menšie objemy vzoriek sú na trhu dostupné kolónky veľkosti 1, 3 a 6 ml s 50 až 2000 mg sorbentu. V našom prípade bola dávkovaná vzorka rozpustená v 1 ml hexanu – výrobca odporúča použitie kolónky 3 ml alebo 6 ml, pričom 6 ml kolónka by mala mierne urýchliť extrakciu [54]. Vyššia hmotnosť sorbentu umožní extrakciu väčšieho množstva analytu, ale na druhú stranu je k jeho elúcii potrebné väčšie množstvo rozpúšťadla. Navyše sa zvyšuje navážka syra pre získanie potrebného množstva tuku [28]. Po uvažovaní všetkých týchto faktorov, s prihliadnutím k práci de Jonga [49] a predpokladanej koncentrácii lipidov v syroch bola pre naše účely zvolená SPE kolónka o objemu 3 ml s 500 mg sorbentu.

pH vzorky

Rozpúšťadla používané v rámci SPE majú široký rozsah pH. Fáze založené na silikagélu majú obvykle stabilné pH v rozmedzí 2 až 7,5. Pri pH mimo toto rozmedzie, modifikované fáze môžu byť hydrolyzované a odštiepené od povrchu silikagélu, prípadne sa môže rozpustiť samotný silikagél.

Na druhú stranu sorbent je v kontakte s rozpúšťadlom iba počas veľmi krátkej doby, čo v zásade umožňuje jej použitie pri akomkoľvek pH [54].

Maximálna sorpčná kapacita SPE kolónky

Princípom SPE je zadržanie cieleného analytu na kolónke, rozpúšťadlo vychádzajúce z kolónky analyt neobsahuje. Po aplikácii určitého množstva vzorky však dochádza k tzv. prieniku, kedy rozpúšťadlo vytekajúce z kolónky analyt obsahuje. Ideálnym stavom z hľadiska maximálneho výťažku je samozrejme 100% záchyt; množstvo vzorky/analytu teda nesmie presahovať maximálnu sorpčnú kapacitu kolónky, na druhú stranu však musí byť dostatočne veľké, aby bola sorpčná kapacita kolónky maximálne využitá [54]. Je preto dôležité zistiť optimálne množstvo vzorky, ktoré možno aplikovať na daný typ SPE kolónky.

Maximálna sorpčná kapacita/prienik sa najčastejšie meria monitorovaním rozpúšťadla na výstupe z kolónky, kedy sa postupne zvyšuje množstvo aplikovanej vzorky/analytu. Hneď ako dôjde k prieniku, je dosiahnutá maximálna sorpčná kapacita [28, 54].

Pre zjednodušenie bola najprv sorpčná kapacita testovaná na vybraných štandardoch MK, výsledky sú uvedené nižšie (Tabuľka 5).

Tabuľka 5: Postup testovania sorpčnej kapacity kolónky (štandardy MK)

Štandardy	Hmotnosť frakcie [mg]	
Navážka MK [mg]	TAG	VMK
16,1	0	18
30,7	0	32,7
35,9	0	36,3
37,4	0	38,2
44,7 prienik	5	43,1

Ten istý postup bol aplikovaný na vzorky slnečnicového oleja (Tabuľka 6). Výsledky sú vyjadrené ako hmotnosť príslušných frakcií buď po vysušení a zvážení alebo po esterifikácii výpočtom pomocou plôch pík.

Čistota frakcií bola kontrolovaná pomocou TLC (viď kapitola 4.4.1).

Množstvo analytu by nemalo byť väčšie ako 5 % hmotnosti sorbentu v kolónke [54]. Pri použití kolónky s 500 mg sorbentu možno očakávať kapacitu cca 25 mg analytu.

V prípade štandardov MK bol proces jednoduchý a výsledky dobre preukázateľné. Bola vždy aplikovaná zmes troch vybraných MK po 5 – 15 mg (celkovo aplikované množstvo cca v rozsahu 15 až 45 mg). Ako je vidieť (Tabuľka 5) pri 45 mg došlo k prieniku. Možno teda predbežne usudzovať, že maximálna sorpčná kapacita nášho typu kolónky je cca 35-40 mg VMK.

V prípade slnečnicového oleja bola situácia zložitejšia, vzhľadom k prítomnosti ostatných frakcií, predovšetkým prevažujúcich TAG.

Kalužný [40] uvádza ako maximálne množstvo lipidov, ktoré možno dávkovať na tento typ kolónky, **10 mg**. Na kolónku bolo postupne dávkované množstvo oleja cca v rozsahu 5 až 45 mg. Ako je vidieť (Tabuľka 6) aj v našom prípade k prieniku (VMK vo frakcii TAG) došlo už pri aplikácii cca 10 mg oleja, čo je ale výrazne menšie množstvo než bolo možné očakávať z výsledkov získaných pri aplikácii samotných štandardov VMK. Dokonca, ako vyplýva z kontroly frakcií pomocou TLC (Tabuľka 6), aj pri aplikácii 5 mg sa vo frakcii TAG nachádzali stopy VMK.

Vzhľadom k nejednoznačnosti získaných výsledkov pre definitívne určenie maximálnej kapacity kolónky budú ešte prevedené ďalšie overujúce experimenty.

Tabuľka 6: Postup testovania sorpčnej kapacity kolónky (olej)

Navážka tuku [mg]	Hmotnosť frakcie [mg]		Kontrola pomocou TLC		Kontrola pomocou GC [μg]	
	TAG [frakcia 1]	VMK [frakcia 3]	VMK vo frakcii TAG	TAG vo frakcii VMK	VMK vo frakcii TAG	TAG vo frakcii VMK
46,29	42,4	2,6	ns	ns	ns	ns
11,2	9,4	3	áno	áno	ns	ns
10,8	16,1	3,4	ns	ns	ns	ns
10,3	7,2	6,8	ns	ns	ns	ns
10 prienik	9*	0,2**	ns	ns	11,7	84,3
10,1	10,8	1,1	áno	áno	ns	ns
5,2	4,7	0,4	áno	áno	ns	ns

* - kontrola na GC so ziskom 0,68 mg, tj. výťažnosť 7,6 %,

** - kontrola na GC so ziskom 0,081 mg, tj. výťažnosť 40,7 %.

ns – nebolo stanovené

Optimalizácia objemu rozpúšťadiel

Pri klasickom prevedení SPE sú potrebné dva rôzne typy zmesových rozpúšťadiel (viď kapitola 2.2.4.1). Prvé (k premývaniu) slúži k vymytiu zvyškov matrice vzorky a odstráneniu prípadne interferujúcich zložiek; druhá (elúčna) k selektívnej desorpcii cieľných analytov [11]. Zloženie oboch zmesí bolo zvolené na základe práce Kalužného [40] a de Jonga [49].

Ako už bolo zmienené, podľa nášho predpokladu sa na zvolených NH₂ kolónkach zachytávajú predovšetkým VMK, nepolárne zlúčeniny (acylglyceroly) prechádzajú kolónkou. Ako prvá (k vymývaniu) bola aplikovaná zmes chloroform : propanol (2 : 1, v/v) (zmes A) → zisk nepolárnych lipidov; ako elučné činidlo možno použiť 2% roztok kyseliny octovej (v našom prípade), prípadne mravenčej [10, 19, 20] v dietyléteru (zmes B) → zisk nasorbovaných VMK.

Množstvo zmesi rozpúšťadiel A i B bolo optimalizované pre dosiahnutie maximálneho výťažku; vybrané výsledky v postupe optimalizácie sú uvedené nižšie (Tabuľka 7, Tabuľka 8 a Tabuľka 9).

Optimalizácia rozpúšťadla pre prvú elúciu (zmes A) (TAG)

Zo všeobecného princípu SPE vyplýva, že prvá elúcia obvykle slúži k vymytiu zvyškov matrice vzorky a odstráneniu prípadne interferujúcich zložiek [11]; v našom prípade však je i takto získaná frakcia dôležitá, keďže podľa predpokladu obsahuje MAG, DAG a TAG. Množstvo zmesi A musí byť dostatočné, aby odplavilo všetky TAG a iné. Pre zisk maximálneho výťažku by nemali zostávať ako kontaminanty vo frakcii VMK, na druhú stranu je žiadúce minimalizovať objemy rozpúšťadiel.

Vzhľadom k tomu, že v citovaných prácach sú objemy rozpúšťadiel použitých pre prvú elúciu rôzne (v rozsahu 4 až 10 ml) [19, 20, 49], bol pre začiatok zvolený na základe práce Hornákovej [39] objem zmesi A 5 ml. Postup optimalizácie objemu zmesi je znázornený nižšie (Tabuľka 7).

Tabuľka 7: Optimalizácia objemu rozpúšťadla pre prvú elúciu (zmes A)

Experiment	Navážka tuku [mg]	Frakcia		Kontrolná frakcia	
		Rozpúšťadlo [ml]	Výťažok [mg]	Rozpúšťadlo [ml]	Zbytok [mg]
1	46,29	5	42,4	5	0
2	20,1	5	17,6	5	0
3	10,1	5	10,8	5	0
4	5,2	5	4,7	5	0
5	10,8	7	9,1	3	0
6	11,2	7	9,4	2	0
7	10,3	7	7,2	3	0
8	10	7	9,0*	2	0

* - kontrola na GC – zisk 0,7 mg, tj výťažnosť 7,6 %

Pri experimentoch č. 3 a 4 bolo prevedené kontrolné TLC, z ktorého vyplynula kontaminácia TAG vo VMK frakcii. V rámci zamedzenia kontaminácie bol zvýšený objem zmesi A na 7 ml. I keď teória hovorí, že je dostačujúci objem rozpúšťadla zhruba odpovedajúci objemu kolónky [56], čo je v našom prípade 3 ml, pre dostatočné odplavenie frakcií TAG sa ukázalo nevyhnutné použiť 7 ml zmesi A.

Pri experimente č. 8 bola skontrolovaná výťažnosť metódou GC a analýzou pík (viď kapitola 3.5). Pri gravimetrickej metóde bol zisk TAG 9,0 mg, avšak po GC analýze 0,7 mg; čo je výťažnosť esterifikácie približne 7,6 %.

Optimalizácia rozpúšťadla pre druhú elúciu (zmes B) (VMK)

Množstvo zmesi B musí byť dostatočné, aby eluovalo všetky nasorbované VMK, ale nie zbytočne veľké. Menšie množstvo rozpúšťadla šetrí životné prostredie, vedie ku zisku viac koncentrovaného extraktu a skracuje dobu analýzy. Na druhú stranu hrozí, že analyt nebude desorbovaný úplne, čo vedie ku zníženiu výťažku [41].

Podobne ako u testovania sorpčnej kapacity kolónky, množstvo zmesi B bolo najskôr optimalizované na zmesi štandardov MK z dôvodu jednoduchšej prípravy (odpadá krok extrakcie). Tiež bolo týmto krokom vylúčené použitie zložitej matrice, ktorá by mohla upchať SPE kolónku, zmeniť jej separačné vlastnosti (špecifický povrch, afinita k analytu – vid' kapitola 4.4.2.1 -) a/alebo zmeniť jej prietokovú rýchlosť. Postup optimalizácie objemu rozpúšťadla pre druhú elúciu na štandardoch MK je znázornený nižšie (Tabuľka 8).

Taktiež v tomto prípade sa v citovaných prácach objemy použitých rozpúšťadiel líšia (v rozsahu 2 až 8 ml) [19, 20, 49]. Na základe práce Hornákovej [39] sa začína optimalizácia zmesi B na objeme 10 ml.

Objem rozpúšťadla bol postupne znižovaný; na navážku približne 35 až 45 mg štandardov bol dostačujúci objem zmesi B 7 ml. V kontrolnej frakcii sa neobjavili stopy MK. Pre kontrolnú frakciu boli použité vždy 3 ml rovnakého rozpúšťadla.

Tabuľka 8: Optimalizácia objemu rozpúšťadla pre druhú elúciu (zmes B) – štandardy MK

Štandard MK [mg]	Frakcia		Kontrolná frakcia	
	Rozpúšťadlo [ml]	Výťažok [mg]	Rozpúšťadlo [ml]	Zbytok [mg]
44,7	10	43,1	3	0
30,7	10	32,7	3	0
16,1	10	18	3	0
37,4	8	38,2	3	0
35,9	7 opt	36,3	3	0

opt – optimum

Výsledok bol overený aplikáciou na komplexnú maticu tuku (postup optimalizácie Tabuľka 9). Z dôvodu komplexnosti matrice bola pôvodná navážka zmenšená na 20 mg a objem rozpúšťadla zvýšený na 8 ml a postupne znižovaný. Pri elúcii 6 ml zmesi B (pri pokuse č. 3 a 4) už bol v kontrolnej frakcii vážením zistený zbytok VMK, čo znamená že VMK zrejme neboli eluované kompletne. Teória SPE opäť uvádza, že pre elúciu by malo byť dostačujúce malé množstvo rozpúšťadla (typicky 200 µl až 2 ml v závislosti na veľkosti kolónky) [56], v našom prípade sa ukázalo nevyhnutné použiť minimálne 7 ml zmesi B.

Tabuľka 9: Optimalizácia objemu rozpúšťadla pre druhú elúciu (zmes B) - tuk

Navážka tuku [mg]	Frakcia		Kontrolná frakcia		
	Rozpúšťadlo [ml]	Výtťažok [mg]	Rozpúšťadlo [ml]	Zbytok [mg]	Zbytok na GC [μg]
20,1	8	2,4	2	0	ns
10,1	7	1,1	2	0	ns
10,8	6	3,4	2	1,2	ns
10,3	6	6,8	2	2	ns
11,2	7 opt	3	2	0	ns
10,0	7 opt	0,2*	2	0	27,36
5,2	7 opt	0,4	2	0	ns

* - kontrola na GC so ziskom 0,081 mg, tj. výtťažnosť 40,7 %

ns – nebolo stanovené; opt – optimum

Kontrolná GC analýza zdanlivo prázdnych (gravimetria) bánk kontrolných frakcií však ukázala prítomnosť VMK i pri použití 7 ml zmesi B (27,36 μg – pokus č. 6).

Pre definitívne potvrdenie optimálneho množstva zmesi B budú ešte prevedené ďalšie experimenty.

Pri šiestom meraní s navážkou 10,0 mg tuku bola opäť s použitím GC skontrolovaná výtťažnosť (40,7 %).

Prietoková rýchlosť

Prietok kolónkou je zaistený pomocou vývevy a mal by byť pokiaľ možno pomalý. Rýchlosť prietoku ovplyvňuje retenciu analytov; príliš vysoká rýchlosť môže viesť k nereprodukateľným výsledkom, na druhú stranu rýchlosť prietoku ovplyvňuje dobu trvania celej analýzy. Výtťažok analytu je najvyšší, pokiaľ rozpúšťadlo zostane v kontakte so sorbentom minimálne 20 až 60 s. Doporučená rýchlosť prietoku vzorky a/alebo rozpúšťadiel je cca 1 ml·min⁻¹, nemala by presiahnuť 5 ml·min⁻¹. Ideálne je obyčajné odkvapkávanie [54]. Vzhľadom k tomu, že náš prístroj neumožňuje presné nastavenie prietokovej rýchlosti, nebolo možné ju optimalizovať a bola nastavená čo najpomalšie, cca 1 až 2 kvapky·s⁻¹.

4.4.2.2 Výtťažnosť SPE extrakcie

Výtťažnosť SPE extrakcie bola overená zvážením jednotlivých frakcií, príp. spätným prepočtom z plôch pík po esterifikácii. V prípade aplikácie samotných štandardov VMK bola celkom uspokojivá (> 90 %), v prípade aplikovaných olejov však vychádzala veľmi nízka (< 40 %), čo pravdepodobne nie je problém SPE, ale súvisí s vyššie zmienenými problémami pri esterifikácii [33], ktoré budú riešené v rámci ďalších experimentov. Z hľadiska kvantifikácie analytov je dobré mať výtťažnosť pri SPE minimálne 70 % [28, 31].

4.4.2.3 Opakovateľné použitie SPE kolónky

Použitie SPE kolónky je v zásade jednorazové. Vzhľadom k tomu, že ich cena je pomerne vysoká, bola testovaná možnosť ich opakovaného použitia. Niektorí autori a dokonca aj výrobca uvádzajú, že NH_2 kolónky môžu byť opakovane použité 4 až 6krát [10, 54].

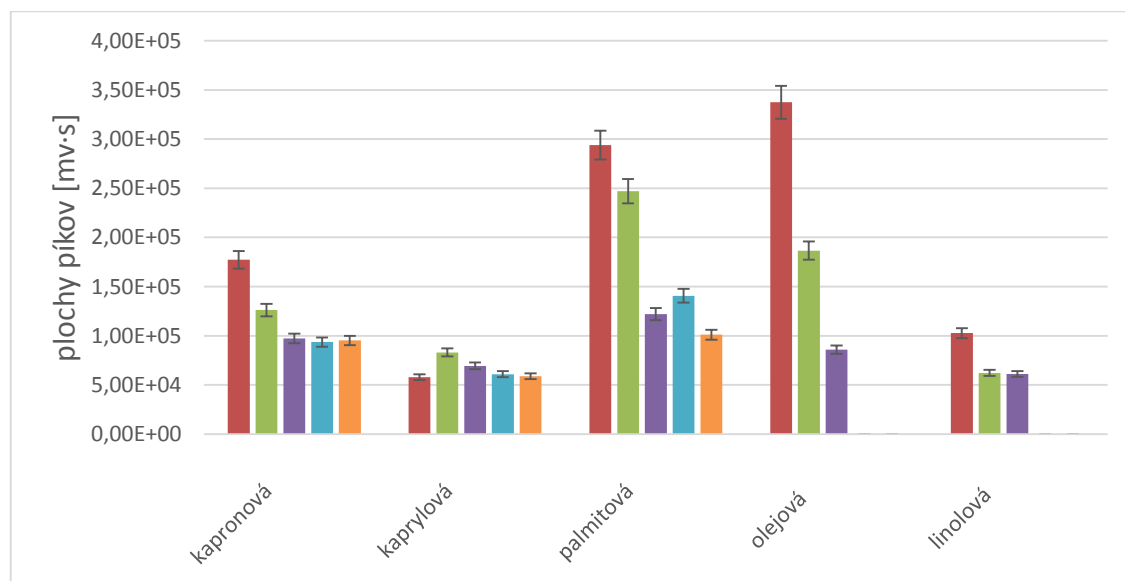
Za týmto účelom bolo na kolónku opakovane aplikované 10 až 15 mg vzorky oleja (celkovo 5x) a prebehol celý proces preplachovania a elúcie (za použitia optimalizovaných parametrov).

Vždy bola zachytávaná frakcia VMK (Tabuľka 10) a po jej esterifikácii s použitím BF_3 – VMK (viď kapitola 3.3.4.3) bol sledovaný výťažok. Medzi jednotlivými vzorkami bola kolónka prepláchnutá 3 ml hexanu.

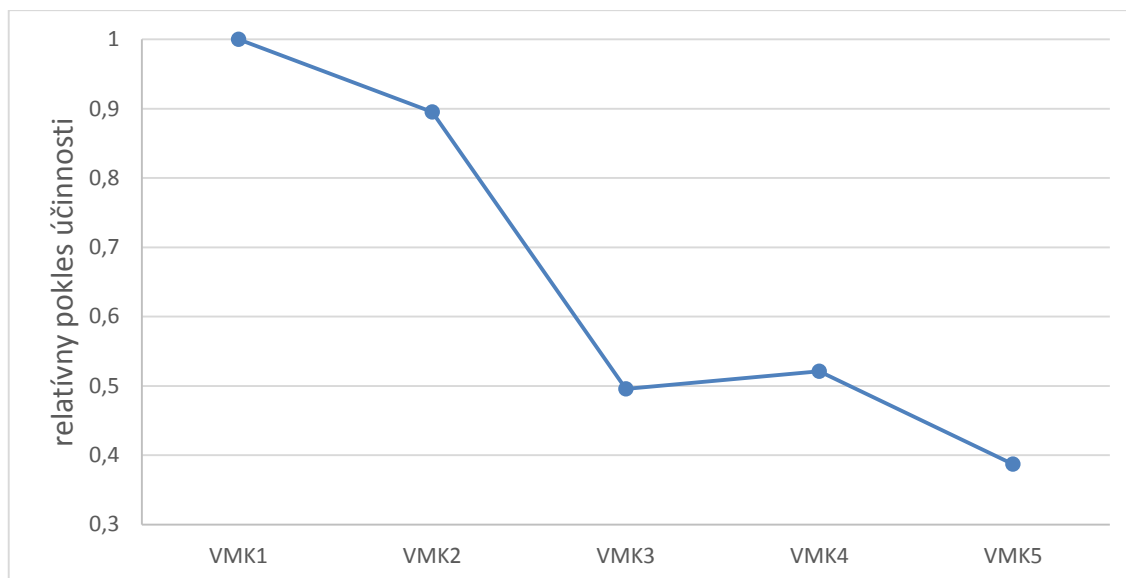
Z plôch píkov, koncentrácie štandardov a ich plôch boli dopočítané koncentrácie jednotlivých analytov (viď kapitola 3.5). Vypočítané dáta boli graficky spracované (Graf 2 a Graf 3).

Tabuľka 10: Opakovateľné použitie SPE kolónky

Vzorka	Celková hmotnosť [mg]	Hmotnosť VMK [mg]	Výťažnosť esterifikácie [%]	Relatívna účinnosť [%]
VMK1	13,2	1,2	0,8	1
VMK2	14,9	1,0	0,7	0,9
VMK3	10,1	0,6	0,4	0,5
VMK4	14,1	0,8	0,4	0,5
VMK5	13,9	0,7	0,3	0,4



Graf 2: Opakovateľné použitie SPE kolónky



Graf 3: Relatívny pokles sorpčnej kapacity kolónky

Ako je vidieť (Graf 2) dochádzalo k postupnému znižovaniu sorpčnej kapacity kolónky, za týchto podmienok by bolo možné opakované použitie kolónky maximálne dvakrát bez významného zníženia výťažnosti.

Hennion [28] odporúča medzi jednotlivými vzorkami regenerovať kolónku 2 ml HNO_3 ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a 30 ml deionizovanej vody. Kolónka by potom mala byť použiteľná až 35 sorpčných cyklov bez zreteľného poklesu sorpčnej kapacity [28].

Iní autori [10] odporúčajú medzi jednotlivými vzorkami regenerovať kolónku prepláchnutím 100% etylacetátom. Bude vyskúšané v ďalších experimentoch.

4.4.2.4 Overenie zloženia frakcií pomocou TLC

V mnohých vyššie citovaných prácach [31, 49] sa pri frakcionácii lipidov používa kombinácia oboch testovaných metód, SPE i TLC. Buď je SPE aplikovaná pre predčistenie extraktu následne použitého na TLC; pre naše účely bol aplikovaný variant na základe práce Kalužného [40], kedy sa zloženie jednotlivých frakcií získaných SPE overuje pomocou TLC. Kalužný [40] odporúča jednotlivé frakcie vysušiť do sucha a späťne ich rozpustiť v 200 μl hexanu.

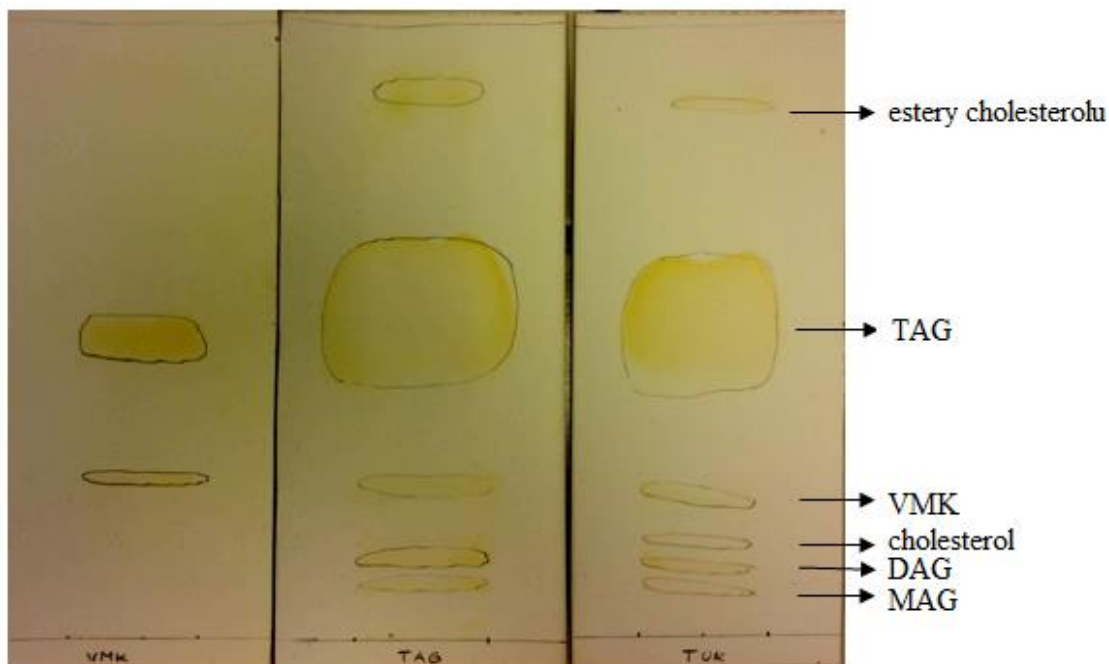
Vzhľadom k tomu, že bolo problematické odpariť SPE frakcie do sucha, spočiatku dochádzalo k problému s dávkovaním na TLC. Vzhľadom k nízkej koncentrácii aplikovanej vzorky škvrny neboli viditeľné. Podľa výsledkov optimalizácie (viď kapitola 4.4.1.4) je minimálna hmotnosť lipidu, ktorú je možné aplikovať na TLC, 300 μg . Pomerne dlhá doba (až 60 minút) bola potrebná k odpareniu jednotlivých frakcií.

Vysušené frakcie po SPE boli späťne rozpustené v 100 μl hexanu, nanesené v množstve 20 μl na TLC doštičku a bol aplikovaný vyššie zmienený postup (viď kapitola 4.4.1). Kontrola čistoty frakcií bola prevedená vizuálne porovnaním so štandardom (tj. TLC vzorky oleja).

Obrázok 20 reprezentuje ukážku uvedených výsledkov TLC frakcií VMK, TAG a pre porovnanie vzorky tuku. V oboch frakciách je viditeľná prítomnosť „nečistôt“ (zóna TAG vo frakcii VMK a/alebo naopak). Pokiaľ sa vo frakcii TAG nachádzajú VMK, je možné, že dochádza k prieniku a znižuje sa výťažok VMK.

Pokiaľ sa vo frakcii VMK nachádzajú TAG, súvisí to s optimálnym množstvom zmesi A, je pravdepodobné nedostatočné vyplavenie TAG a znižuje sa výťažok TAG.

Táto kontrola bola prevedená v rámci rady experimentov a prakticky vždy boli nájdené tieto nežiadúce škvrny. Po overení na GC bolo síce zistené, že sa jedná o stopové koncentrácie; dočisteniu frakcií bude venovaná pozornosť ešte v ďalších experimentoch.



Obrázok 20: Chromatogram TLC, lipidické frakcie po SPE extrakcii, zľava: VMK, TAG, vzorka oleja – identifikácia plôch (viď kapitola 4.4.1)

4.4.3 Porovnanie metód TLC a SPE

Metódy TLC a SPE je možné porovnať na základe rôznych parametrov.

4.4.3.1 Výťažnosť separačných techník

Výťažnosť priamo po separácii je možné stanoviť iba pri SPE. Gravimetricky sa zistí rozdiel medzi navážkou a frakciami. Aj keď tento spôsob nie je príliš presný, pri našich experimentoch sa podarilo udržať výťažnosť SPE pri cca 90 %. Merať výťažnosť pri TLC je omnoho náročnejšie. Bolo by nutné odseparovať kvantitatívne analyt/jednotlivé frakcie zo silikagélú rozpúšťadlom, ktoré by bolo následne potrebné odpariť. Do merania by sa zanášala významná chyba a namerané dáta by boli veľmi nepresné. Výťažnosť možno vyjadriť iba po celej analýze, teda aj po esterifikácii, počas ktorej dochádza k najväčším stratám, či už z dôvodu nedostatočného prevedenia reakcie, prítomnosti vody ap. (viď kapitola 3.3.4.3).

4.4.3.2 Jednoduchosť prevedenia

SPE i TLC majú určité kroky, ktoré nie sú ľahké na prevedenie. Pri SPE je zložitá úprava prietoku vzorky kolónkou a nastavenie správneho vákuu. Je tiež nutné sledovať kedy rozpúšťadlo dosiahne vrch sorbentu, aby nedošlo k jeho vyschnutiu.

Všetky tieto úkony nie sú až tak náročné a po krátkej praxi sú automaticky zvládnuteľné.

TLC je naopak zložitejšia metóda. Po aktivácii TLC doštičky je nutné aplikovať vzorku na predom vyznačený pás (v našom prípade 3 cm). Keďže sa dávkuje veľmi malé množstvo analytu (v našom prípade 20 μ l) je nutné pracovať veľmi opatrne a aj operátor so skúsenosťami môže spraviť chybu. Nielenže je vzdialenosť dlhšia ako pri klasickom TLC (aplikácia bodky), ale aj rovnomerné rozprestretie má vplyv na samotnú separáciu (možnosť úniku vzorky do krajov TLC doštičky). Navyše TLC doštička veľmi rýchlo vsakuje vzorku, a preto je nutné pracovať rýchlo a presne. Ideálny variant je možnosť použitia automatického dávkovača vzorky, ktorý nie je na ÚCHPBT vzhľadom k veľkej finančnej náročnosti k dispozícii.

Ďalšie sťaženie prichádza pri vyškrabávaní vzorky z TLC doštičky, kedy dochádza k najväčším stratám neopatrným a nezručným zachádzaním. Najlepším spôsobom je zoškrabať adsorbent pomocou malej špachtličky po malých kúskoch, ktoré vždy po chvíľke odsypávame do banky. Je nutné mať určitú prax a vedieť ako sa správa silikagél pri separácii od hliníkovej platničky a následne prepraviť túto vzorku do vhodnej nádoby (destilačná banka pre esterifikáciu).

Z toho vyplýva, že TLC je náročnejšia metóda pre operácie spojené so zručnosťami obsluhujúceho personálu, či už ide o dávkovanie vzorky alebo separáciu analytu zo silikagélu.

4.4.3.3 *Rýchlosť prevedenia*

Z hľadiska časovej náročnosti je SPE metóda rýchlejšia. Celá analýza pripravenej vzorky/vyextrahovaného tuku trvá približne 1 hodinu spolu s esterifikáciou.

Naproti tomu analýza metódou TLC je zdĺhavá a má veľké časové straty ako napríklad:

- aktivácia TLC doštičky – 30 minút
- vyvíjanie v komore – 90 minút
- vizualizácia – 20 minút

Následne potrebné vyškrabanie frakcií (viď kapitola 2.2.5.1) a esterifikácia zaberie ďalší čas. Spolu trvá analýza jednej vzorky takmer 3 hodiny od aktivácie TLC doštičky, cez dávkovanie vzorky, vyvíjanie v komore, vizualizáciu, vyškrabanie frakcií a esterifikáciu.

V tomto momente by sa mohlo zdať, že využitie TLC je neefektívne, avšak pomer **jedna** hodina pre SPE a **tri** hodiny pre TLC sú práve pre jednu vzorku. Teda ak máme viac vzoriek, napr. štyri, tak pri TLC je možné analyzovať všetky vzorky naraz v rovnakej komore na vyvíjanie a aj pri vizualizácii. Celková analýza teda trvá približne 3 hodiny, keďže pri esterifikácii je možné robiť viac úkonov na raz (predpoklad väčšieho množstva laboratórneho skla). Naopak pri SPE je možno separovať na našom prístroji maximálne 2 vzorky naraz, čo vytvára problémy pri sušení frakcií (nutnosť vysušiť frakcie pred esterifikáciou, aby neobsahoval rozpúšťadlo – viď kapitola 4.4.2), ktoré sa vykonáva tiež na prístroji SPE Manifold (Obrázok 9). Z toho vyplýva, že je možné buď separovať alebo sušiť, čo vytvára časové straty.

Konečný čas potrebný pre analýzu štyroch vzoriek je teda pri SPE nakoniec rovnaký ako pri TLC.

Záverom je, že pri analýze jednej unikátnej vzorky je vhodnejšie použiť SPE. Pri analýze štyroch a viac vzoriek je výhodnejšie použiť TLC, z dôvodu komfortnejšej práce (odpadá nutnosť obsluhovať viacero zariadení naraz).

Pre skúseného operátora je možné tieto časy samozrejme skrátiť (nutnosť operovať viacero prístrojov naraz, tvorba časového plánu).

4.4.3.4 Možnosť uchovania extraktu

Pri oboch metódach je možné uchovať extrakt pre ďalšie spracovanie.

Pri SPE je možné uchovať frakcie v uzavretých (parafilm) bankách po rôznu dobu. Vyextrahované TAG a MK sa po vysušení nenachádzajú v žiadnom rozpúšťadle a nedochádza k ich zmenám (hydrolýza, izomerácia). Môže dochádzať jedine ku oxidácii, ktorú je možno zamedziť prídavkom inertného plynu/nepriedušným utesnením.

V prípade TLC je to však možné iba na 24 hodín. Najlepšie je však spracovať vyškrapanú frakciu okamžite, pretože začne dochádzať k pevnej adsorpcii analytu a/alebo vlhkosti na silikagél, ktorá ústi k nízkym výťažkom pri esterifikácii z dôvodu nemožnosti odseparovania od silikagélu. Navyše sa tvoria zrazeniny, ktoré nie je možné rozmiešať a je nutné celú zmes filtrovať [33].

V spolupráci so Stavínohovou [37], ktorá pracuje na bakalárskej práci zaoberajúcej sa konkrétne SPE sa zistilo, že po esterifikácii je možné skladovať vzorky v chladničke minimálne 3 dni. Nezáleží či ide o extrakty z esterifikácie po SPE alebo po TLC, pretože obidve formy sú rovnako uskladnené – sklenená vialka s plynotesným septom vhodná pre GC analýzu.

Avšak pri oboch metódach je vhodné frakcie spracovať čo najrýchlejšie. Následná esterifikácia je o to jednoduchšia (nedochádza k tvorbe vložiek, ktoré je nutné separovať – úbytok výťažku).

Po zvážení všetkých zmienených výhod/nevýhod, a zvlášť prihliadnutím k lepšej možnosti kvantifikácie MK, bola nakoniec zvolená metóda používajúca SPE. Taktiež podľa Kalužného [40] je SPE jednoduchá, rýchla, šetrí materiál, čas i rozpúšťadlá; je ekonomickejšia než ostatné skôr používané techniky (TLC), poskytuje vysoké výťažky a čistotu lipidických frakcií. Táto metóda bude validovaná a aplikovaná na analýzy syrov v rámci ďalších nadväzujúcich prác.

Hlavné využitie TLC bude spočívať v jej nadväznosti na SPE, a teda v overení zloženia lipidických frakcií.

4.4.4 Stanovenie celkového obsahu mastných kyselín vo vzorkách

Počas niektorých vyššie zmienených experimentov bol pre úplnosť meraný aj celkový obsah MK v analyzovaných vzorkách. K tomuto účelu bola aplikovaná klasická metóda stanovenia (bez frakcionácie). Presný postup bol prevzatý z diplomovej práce Pruknerovej [24].

4.5 Vybrané validačné parametre

Pre zistenie kvality a funkčnosti metódy je nevyhnutné ju validovať. Validácia je definovaná napr. ako proces, pri ktorom sa určuje vhodnosť použitia daného systému pre získanie relevantných dát. Za základné validačné parametre sú považované opakovateľnosť, linearita, limity detekcie a limity stanoviteľnosti [26, 55].

Z časových dôvodov bola overená iba opakovateľnosť metódy, ostatné parametre budú overené v rámci ďalších experimentov.

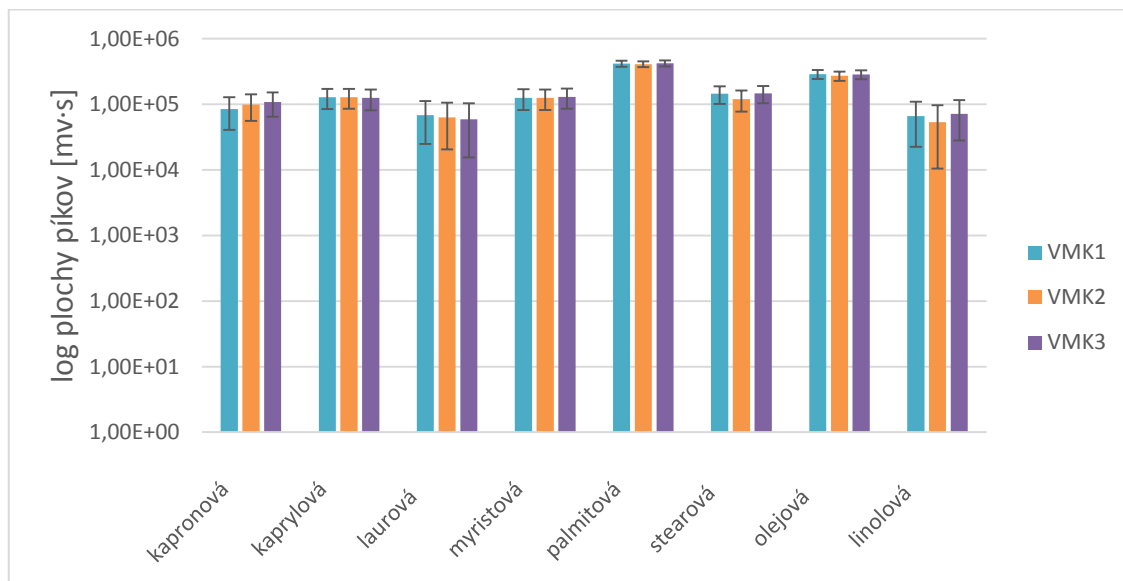
4.5.1 Opakovateľnosť metódy SPE-GC-FID

Opakovateľnosť je typ presnosti vzťahujúci sa k meraniam prevádzaným za opakovateľných podmienok; charakterizuje metódu a precíznosť jej prevedenia v laboratóriu. Analýzy sa prevádzajú všetky naraz, na rovnakom zariadení s tou istou obsluhou [26, 55].

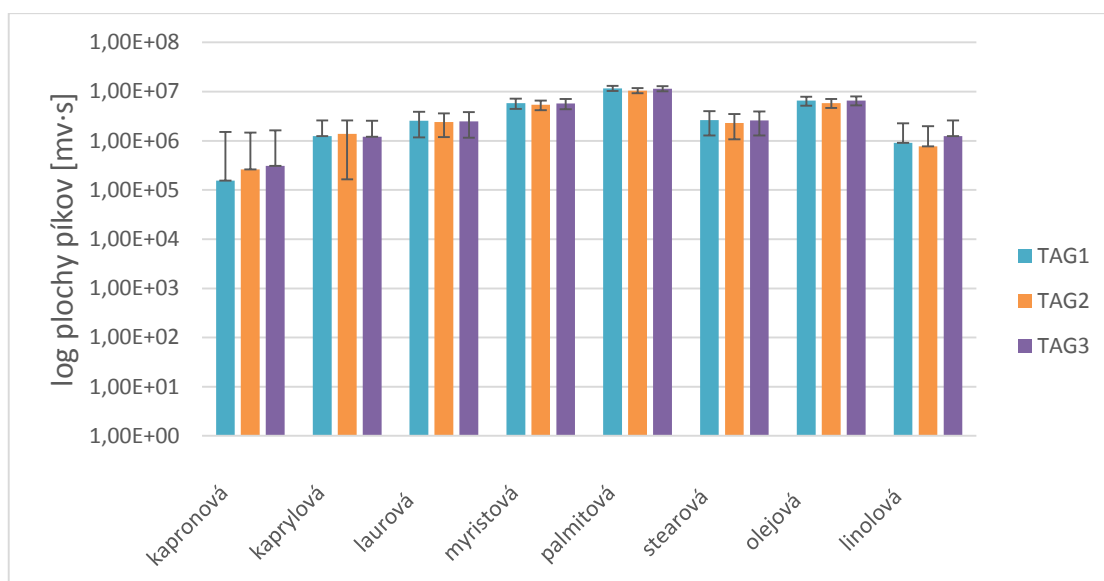
Metóda je opakovateľná pokiaľ u všetkých výsledkov meraní, prevedeného za podmienok opakovateľnosti, nepresiahne relatívna smerodajná odchýlka (RSD) hodnotu 10 % [26, 55].

Opakovateľnosť bola overená zo série troch meraní, ktoré boli realizované v priebehu jedného dňa. Boli analyzované tri vzorky s podobnou navážkou (približne 15 mg) slnečnicového oleja. Jednotlivé analýzy boli prevedené za optimálnych podmienok metódy SPE-GC-FID.

Z výsledných chromatogramov boli odčítané plochy píkov. Namerané dáta boli graficky spracované zvlášť pre VMK (Graf 4) a zvlášť pre TAG (Graf 5). Pre lepšiu viditeľnosť podobnosti meraní bol použitý logaritmus plochy píkov.



Graf 4: Opakovateľnosť metódy SPE-GC-FID (frakcia VMK)



Graf 5: Opakovateľnosť metódy SPE-GC-FID (frakcia TAG)

Tabuľka 11 zobrazuje prehľadne spracované dáta vybraných MK po esterifikácii frakcie VMK. Hodnoty RSD musia byť pod hranicou 10 %, aby bolo možné potvrdiť opakovateľnosť metódy [26, 55]. Vidíme, že všetky MK okrem kapronovej (10,21 %) a linolovej (12,04 %) túto podmienku spĺňajú.

Tabuľka 11: Opakovateľnosť metódy SPE-GC-FID – koncentrácia vybraných MK (frakcia VMK)

Mastná kyselina	VMK1	VMK2	VMK3	X [mg·l ⁻¹]	SD [mg·l ⁻¹]	RSD [%]
Kapronová	1,34	1,57	1,72	1,55	0,16	10,21
Kaprylová	1,49	1,48	1,45	1,47	0,02	1,32
Laurová	0,63	0,58	0,54	0,59	0,04	6,01
Myristová	0,98	0,97	1,01	0,99	0,02	1,68
Palmitová	2,11	2,08	2,15	2,11	0,03	1,25
Stearová	0,95	0,78	0,96	0,90	0,08	8,99
Olejová	0,93	0,88	0,92	0,91	0,02	2,57
Linolová	0,23	0,19	0,25	0,23	0,03	12,04

Tabuľka 12 zobrazuje prehľadne spracované dáta vybraných MK po esterifikácii frakcie TAG. Hodnoty RSD musia byť pod hranicou 10 %, aby bolo možné potvrdiť opakovateľnosť metódy [26, 55]. Všetky MK okrem kapronovej (26,97 %) a linolovej (20,64 %) túto podmienku spĺňajú.

Tabuľka 12: Opakovateľnosť metódy SPE-GC-FID – koncentrácia vybraných MK (frakcia TAG)

Mastná kyselina	VMK1	VMK2	VMK3	X [mg·l ⁻¹]	SD [mg·l ⁻¹]	RSD [%]
Kapronová	2,45	4,14	4,93	3,84	1,04	26,97
Kaprylová	14,37	15,98	13,98	14,78	0,87	5,86
Laurová	23,31	22,12	22,86	22,76	0,49	2,16
Myristová	45,21	41,98	44,48	43,89	1,38	3,15
Palmitová	59,01	53,14	58,30	56,82	2,62	4,60
Stearová	17,28	14,97	17,03	16,43	1,03	6,30
Olejová	21,08	18,94	21,33	20,45	1,07	5,23
Linolová	3,22	2,71	4,41	3,45	0,71	20,64

Obe frakcie teda vykazujú podobný charakter. MK kapronová a linolová neposkytujú dobre opakovateľné výsledky. Kapronová kyselina obsahuje 6 uhlíkov a ide teda o MK s kratším reťazcom, ktoré sú podľa teórie (viď kapitola 3.5) vysoko prchavé a môže teda dôjsť k ich úniku. Príslušná norma [33] uvádza, že esterifikácia s BF₃ je vhodná pre MK s C₈ až C₂₄. Kapronová kyselina je mimo toto rozmedzie. Kyselina linolová je síce v uvedenom rozmedzí a nie je natoľko prchavá, avšak obsahuje 2 dvojné väzby, ktoré môžu podliehať oxidácii, všeobecne nenasýtené MK vykazujú horšiu opakovateľnosť.

Možno povedať, že metóda vykazuje pomerne dobrú opakovateľnosť pre väčšinu MK, avšak opakovateľnosť bude ešte overená, s predpokladom, že dôjde k jej zlepšeniu, po optimalizácii vybraného typu esterifikácie (viď kapitola 4.2).

4.5.2 Opakovateľnosť metódy TLC-GC-FID

Pre zaujímavosť bola skontrolovaná i opakovateľnosť metódy TLC-GC-FID.

Opakovateľnosť bola overená zo série štyroch meraní, ktoré boli realizované v priebehu jedného dňa. Na TLC doštičku bola nanosená štyrikrát vzorka oleja ($c = 365,7 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Analýza bola prevedená za optimálnych podmienok metódy TLC-GC-FID. U vybraných VMK bola vyhodnotená opakovateľnosť merania.

Z nameraných dát bol vypočítaný priemer ($\bar{x}$), smerodajná odchýlka (SD) a relatívna smerodajná odchýlka (RSD), ktorá je hlavným ukazovateľom opakovateľnosti merania. Výsledky sú uvedené nižšie (Tabuľka 13 a Tabuľka 14).

Tabuľka 13: Opakovateľnosť metódy TLC-GC-FID – koncentrácie vybraných MK (frakcia TAG)

Koncentrácia [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]					
Číslo merania	Kaprylová	Myristová	Palmitová	Olejová	Linolová
1.	1,80	0,78	11,93	21,36	18,06
2.	1,90	0,80	13,29	27,34	25,31
3.	1,76	0,98	10,85	20,53	18,00
4.	1,93	0,84	13,91	26,92	23,30
x [$\text{mV}\cdot\text{s}$]	1,85	0,85	12,50	24,04	21,16
SD [$\text{mV}\cdot\text{s}$]	0,07	0,08	1,19	3,11	3,22
RSD [%]	3,72	9,38	9,52	12,94	15,20

Ako je vidieť (Tabuľka 13) u kyseliny olejovej a linolovej je hodnota RSD vyššia než 10 %.

Tabuľka 14: Opakovateľnosť metódy TLC-GC-FID – plochy pík vybraných MK (frakcia VMK)

Koncentrácia [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]				
Číslo merania	Kaprylová	Myristová	Palmitová	Palmitová*
1.	1,20	1,26	0,73	-
2.	1,11	1,23	0,39	0,39
3.	1,09	1,25	0,32	0,32
4.	1,13	1,25	0,26	0,26
x [$\text{mV}\cdot\text{s}$]	1,13	1,25	0,43	0,32
SD [$\text{mV}\cdot\text{s}$]	0,04	0,01	0,18	0,05
RSD [%]	3,69	0,80	43,24	16,63

Vo frakcii VMK (Tabuľka 14) potom neposkytuje dobre opakovateľné výsledky kyselina palmitová. Po úprave dát a vyradení zjavne nesprávnej hodnoty pre kyselinu palmitovú z prvého merania (145199) (Tabuľka 14) sa zmenila hodnota RSD na 16,63 %, čo je stále nad hodnotou 10 %.

Taktiež v tomto prípade metóda nevykazuje uspokojivú opakovateľnosť, zvlášť v prípade viacuhlíkatých MK.

4.6 Analýza vzorky taveného syru

Ako už bolo zmienené, po zvážení všetkých výhod/nevýhod bola pre frakcionáciu lipidov získaných z matrice syru zvolená metóda používajúca SPE. Na záver tejto práce bol optimalizovaný postup SPE-GC-FID použitý pre stanovenie obsahu voľných MK vo vzorke modelového taveného syru.

4.6.1 Identifikácia a kvantifikácia mastných kyselín

Identifikácia MK vo vzorke bola prevedená na základe zrovnania retenčných časov s retenčnými časmi štandardov, kvantifikácia bola prevedená zrovnaním plôch pík so štandardmi o známej koncentrácii.

V nasledujúcej tabuľke (Tabuľka 15) sú uvedené štandardy s ich koncentráciou, plochou píku a retenčným časom potrebnými k identifikácii a kvantifikácii MK obsiahnutých vo vzorke.

Tabuľka 15: Tabuľka štandardov použitých pre identifikáciu a kvantifikáciu MK vo vzorke taveného syra.

Číslo píku	Mastná kyselina	Retenčný čas	Koncentrácia (c_s) [mg·ml ⁻¹]	Plocha píku (P_s) [mV·s]
1	maslová	13,39	0,04	367958
2	kapronová	18,28	0,04	2825843
3	kaprylová	21,68	0,04	3466573
4	kaprinová	24,15	0,04	3824882
5	undekanová	25,26	0,02	2083691
6	laurová	26,39	0,04	4363197
7	tridekanová	27,59	0,02	2160471
8	myristová	28,99	0,04	5142349
9	myristooľejová	29,72	0,02	2165183
10	pentadekanová	30,61	0,02	2198462
11	pentadecenová	31,55	0,02	2002343
12	palmitová	32,63	0,06	11862097
13	palmitooľejová	33,35	0,02	2204918
14	heptadekanová	34,61	0,02	1951607
15	heptadecenová	35,41	0,02	1855260
16	stearová	36,79	0,04	6146507
17	elaidová	37,20	0,02	2123704
18	olejová	37,56	0,04	12419087

Číslo píku	Mastná kyselina	Retenčný čas	Koncentrácia (c _s) [mg·ml ⁻¹]	Plocha píku (P _s) [mV·s]
19	linolelaidová	38,04	0,02	1732572
20	linolová	38,86	0,02	5671779
21	gama-linolenová	39,69	0,04	1789686
22	linolenová	40,60	0,02	1986463
23	arachová	42,02	0,02	3477495
24	eicosenová	43,03	0,02	2041954
25	eicosadienová	44,97	0,02	1641102
26	heneicosanová	45,38	0,02	1676667
27	eicosatrienová 6	46,24	0,04	1632369
28	arachidonová	47,10	0,02	1269034
29	eicosatrienová 3	47,58	0,02	1405360
30	eicosapentaenová	49,54	0,02	3310808
31	behenová	50,04	0,02	1303750
32	eruková	51,03	0,02	1683480
33	docosadienová	53,00	0,02	1489194
34	trikosanová	53,26	0,04	1614542
35	lignocerová	56,70	0,02	3029313
36	docosaheptaenová	57,97	0,02	1501724
37	nervonová	58,31	0,02	867969

4.6.2 Zastúpenie voľných a viazaných MK vo vzorke taveného syru

Analýza vzorky bola prevedená za optimalizovaných podmienok SPE-GC-FID. Vyextrahovaný tuk zo syra bol nanosený na SPE kolónku v množstve 10 µg. Po separácii, frakcie VMK a dohromady frakcie MAG, DAG a TAG (viazané MK) boli esterifikované. Frakcia fosfolipidov a cholesterolu bola zanedbaná. Po prevedení VMK na metylestery prebehla analýza frakcií metódou GC. Dáta (Tabuľka 16 a Tabuľka 17) zobrazujú percentuálne zastúpenie identifikovaných MK v oboch frakciách. Zo dvoch paralelných stanovení bola vyjadrená relatívna smerodajná odchýlka.

Celkovo bolo vo vzorke identifikovaných 20 MK, 7 vo frakcii voľných a 20 vo frakcii viazaných MK. V prílohe č. 1 a 2 sú ukážky chromatogramov metylesteroz masných kyselín vo frakcii VMK a frakcii TAG, mono- a diacylglycerolov.

Výsledky sú v súlade s doterajšími znalosťami o zložení mliečneho tuku [36], z hľadiska kvantitatívneho sú vo vzorke taveného syru najviac zastúpené MK myristová a palmitová, z nenasýtených olejová a linolová, s kratším reťazcom kapronová, kaprylová a kaprinová.

Tabuľka 16: Zastúpenie MK vo vzorke taveného syru (frakcia TAG)

	Vzorka 1	Vzorka 2			
MK	Zastúpenie [%]		x [%]	SD [%]	RSD [%]
kapronová	3,45	4,78	4,04	1,36	7,93
kaprylová	2,91	3,41	3,13	0,93	7,00
kaprinová	5,51	7,54	6,40	1,89	6,95
undekanová	0,13	0,17	0,15	0,01	1,08
laurová	5,27	7,01	6,04	1,11	4,34
tridekanová	0,32	0,23	0,28	0,56	46,87
myristová	12,41	16,04	14,01	1,11	1,87
myristoolejová	0,23	0,30	0,26	0,02	1,46
pentadekanová	1,12	1,44	1,26	0,07	1,23
cis-10-pentadecenová	0,21	0,30	0,25	0,10	9,12
palmitová	26,39	31,46	28,63	6,44	5,31
palmitoolejová	1,08	1,37	1,21	0,00	0,03
heptadekanová	0,36	0,46	0,40	0,01	0,58
cis-10-heptadecenová	0,13	0,19	0,15	0,07	11,32
stearová	5,72	6,67	6,14	1,89	7,27
elaidová	0,81	1,09	0,93	0,23	5,72
olejová	18,69	15,05	17,08	28,52	39,40
linolelaidová	0,17	0,16	0,17	0,16	23,48
linolová	14,94	2,19	9,31	55,44	140,47
linolenová	0,15	0,16	0,16	0,09	13,12

Tabuľka 17: Zastúpenie MK vo vzorke taveného syru (frakcia VMK)

	Vzorka 1	Vzorka 2			
MK	Zastúpenie [%]		x [%]	SD [%]	RSD [%]
kapronová	5,57	9,25	6,59	3,25	39,25
kaprylová	5,87	15,97	8,67	0,43	3,91
laurová	2,88	5,63	3,64	1,15	25,19
myristová	7,41	13,63	9,13	3,49	30,44
palmitová	30,32	34,12	31,37	27,71	70,28
stearová	8,83	7,45	8,45	9,61	90,52
olejová	39,12	13,96	32,14	54,35	134,52

5 ZÁVER

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce bolo vybrať, optimalizovať a validovať metódu vhodnú pre stanovenie voľných mastných kyselín v syrovej matrici. Ako modelové matrice pre testovanie a optimalizáciu parametrov metódy boli použité slnečnicový olej, tvrdý syr holandského typu a modelový tavený syr vyrobený na Univerzite Tomáše Bati ve Zlíně.

Pre extrakciu lipidov zo vzoriek syrov bola použitá zmes dietyléteru a petroléteru podľa ČSN EN ISO 1735. Pre esterifikáciu mastných kyselín boli vyskúšané a porovnané tri metódy: bázičná esterifikácia s metanolickým roztokom KOH, kyslá esterifikácia s metanolickým roztokom HCl a/alebo bortrifluoridom. Postupy boli prevzaté s príslušných noriem. Na základe zhodnotenia metód z hľadiska výťažku, dostupnosti a bezpečnosti chemikálií, jednoduchosti a rýchlosti prevedenia bola vybraná metóda podľa ČSN EN ISO 5509 s použitím metanolického roztoku bortrifluoridu.

Na základe prevedenej literárnej rešerše boli pre frakcionáciu vyextrahovaných lipidov a získanie frakcie voľných mastných kyselín vyskúšané a porovnané dve metódy: chromatografia na tenkej vrstve a extrakcia na pevnej fáze. Po porovnaní týchto dvoch metód bola ako výhodnejšia vybraná metóda SPE, pretože je jednoduchšia, rýchlejšia a poskytuje vyššie výťažky získaných mastných kyselín.

Na stanovenie metylesterov mastných kyselín v získaných frakciách bola použitá plynová chromatografia s plameňovo-ionizačnou detekciou. Celý proces SPE-GC-FID bol následne optimalizovaný, predovšetkým z hľadiska množstva dávkovanej vzorky a elučných činidiel, za účelom získania maximálneho výťažku.

Pre frakcionáciu lipidov v syroch boli vybrané kolónky obsahujúce silikagél modifikovaný aminoskupinami. Pre ich aktiváciu bol použitý hexan. Pre analýzu boli zachytávané dve frakcie: prvá (doplňková) bola eluovaná zmesou A (chloroform : propanol, 2 : 1) a obsahovala zmes mono-, di- a triglycerolov (viazané MK), a pre naše účely zásadná druhá frakcia voľných MK, eluovaná zmesou B (2 % roztok kyseliny octovej v dietylétere). Zloženie získaných frakcií bolo overené pomocou tenkovrstvej chromatografie.

V rámci validácie bola overená opakovateľnosť metódy, RSD sa pohybovali v rozsahu 1,25 až 26,97 %.

Metóda SPE-GC-FID bola na záver aplikovaná na vzorky modelového taveného syru. Celkovo bolo vo vzorke identifikovaných 20 MK, z hľadiska kvantitatívneho boli najviac zastúpené myristová a palmitová, z nenasýtených olejová a linolová, s kratším reťazcom kapronová, kaprylová a kaprinová.

V nadväzujúcich experimentoch budú overené ďalšie validačné parametre optimalizované SPE-GC-FID metódy a jej použiteľnosť bude potvrdená aplikáciou na širšie spektrum rôznych typov prírodných a tavených syrov. Optimalizovaná a validovaná metóda bude používaná v kombinácii s metódou TLC v rámci štúdie sledujúcej voľné mastné kyseliny v syroch.

6 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, xxii, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6
- [2] ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÉ EKONOMIKY A INFORMACÍ A VÝZKUMNÝ ÚSTAV POTRAVINÁŘSKÝ PRAHA. *Centrum pro databázi složení potravin: On-line databáze složení potravin ČR, verze 4.13* [online]. 2013. vyd. 2013 [cit. 2015-03-26]. Dostupné z: <http://www.nutridatabase.cz/>
- [3] JANČÁŘOVÁ, Irena a Luděk JANČÁŘ. *Analytická chemie*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 195 s. ISBN 978-80-7157-647-12008.
- [4] JANÍČEK, Gustav, Karel ŠANDERA a Bohuš HAMPL. *Rukověť potravinářské analytiky*. Vyd. 1. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1962, 740 s.
- [5] The AOCS Lipid Library. CHRISTIE, W. *GAS CHROMATOGRAPHY AND LIPIDS* [online]. 1989, 2011 [cit. 2015-03-22].
- [6] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 202 s. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [7] LUQUE DE CASTRO, M.D. and F. PRIEGO-CAPOTE. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*. 2010, vol. 1217, issue 16, s. 2383-2389. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.027.
- [8] AMBROŽOVÁ, J. *Stanovení lipidů a mastných kyselin v řasách*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2011. 115 s. Vedoucí diplomové práce: Ing. Ladislava Mišurcová, Ph.D.
- [9] CHRISTIE, W. W. *Lipid library* [online]. 2011 [cit. 2014-08-03]. Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/index.html>
- [10] RUIZ-GUTIÉRREZ, V and M.C PÉREZ-CAMINO. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*. 2000, vol. 885, 1-2, s. 321-341. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00181-3.
- [11] COUFAL, Pavel. *Separční metody* [online]. 1996 [cit. 2014-04-23]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>
- [12] LabPlanet: SPE [online]. 2005 [cit. 2016-09-01]. Dostupné z: <http://blog.labplanet.com/2013/09/16/spe-2/>
- [13] HORNÁKOVÁ, M. *Možnosti stanovení volných mastných kyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 54 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D..
- [14] CHRISTIE, W.W. MRS Lipid Analysis Unit. *Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis*. 2006, vol. 43, issue 3, s. 31.
- [15] BUTOROVÁ, L. *Vybrané validační parametry metody stanovení aromatických látek v tavených sýrových analozích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 83 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [16] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. upr. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [17] SOMMER, L. *Základy analytické chemie* 2. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [18] WIJESUNDERA, C, L DRURY and T WALSH. Determination of free fatty acids and lactones in cheese by solid phase microextraction (SPME). *Australian Journal of Dairy Technology* [online]. 1998, vol. 53, issue 2 [cit. 2014-05-10].
- [19] KNOTEK, J. *Stanovení volných mastných kyselin v jogurtech v závislosti na skladování*. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Markéta Šípalová

- [20] ŠÍPALOVÁ, M. *Změny jakostních parametrů mléka a mléčných výrobků*. Zlín, 2011. Disertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc.
- [21] HORÁK, T., J. ČULÍK, M. JURKOVÁ, P. ČEJKA a J. OLŠOVSKÁ. Stanovení mastných kyselin v pivu rychlou, rutinní metodou. *Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s.* 2013, č. 58
- [22] Čertík, M., Andráši, P., Šajbidor, J. *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, 1996, vol. 73, issue 3, s. 357-365. ISSN: 0003-021X. DOI: 10.1007/BF02523431.
- [23] TUOMALA, Terhi and Heikki KALLIO. *Identification of free fatty acids and some other volatile flavour compounds from Swiss cheese using on-line supercritical fluid extraction-gas chromatography*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung [online]. 1996, vol. 203, issue 3, s. 236-240 [cit. 2014-05-07]. DOI: 10.1007/BF01192870.
- [24] 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.
- [25] AMER, Bashar, Caroline NEBEL, Hanne C. BERTRAM, Grith MORTENSEN, Kjeld HERMANSEN and Trine K. DALSGAARD. *Novel method for quantification of individual free fatty acids in milk using an in-solution derivatisation approach and gas chromatography-mass spectrometry*. International Dairy Journal [online]. 2013, vol. 32, issue 2, s. 199-203 [cit. 2014-05-08]. DOI: 10.1016/j.idairyj.2013.05.016.
- [26] SUCHÁNEK, M. *Vhodnost analytických metod pro daný účel: laboratorní příručka pro validaci metod a související činnosti*. Praha: Eurachem-ČR, 1999, 61 s. Kvalimetrie, 9. ISBN 80-901-8687-4.
- [27] RUPRICHOVÁ, L. *Zavedení metody stanovení konjugované linolové kyseliny (CLA)*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 63 s. Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [28] HENNION, Marie-Claire. *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00832-8. ISBN: 10.1016/S0021-9673(99)00832-8.
- [29] FUCHS, Beate, Rosmarie SÜß, Kristin TEUBER, Mandy EIBISCH and Jürgen SCHILLER. *Lipid analysis by thin-layer chromatography—A review of the current state*. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.11.066.
- [30] SHERMA, Joseph, Rosmarie SÜß, Kristin TEUBER, Mandy EIBISCH and Jürgen SCHILLER. *Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis*. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)01132-2. ISBN 10.1016/S0021-9673(99)01132-2.
- [31] TOUCHSTONE, Joseph C., Rosmarie SÜß, Kristin TEUBER, Mandy EIBISCH and Jürgen SCHILLER. *Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation*. DOI: 10.1016/0378-4347(95)00232-8.
- [32] REICH, Eike a Anne SCHIBLI. *High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants*. New York: Thieme, 2007. ISBN: 9783131416018.
- [33] ČSN EN ISO 1735 *Sýry a sýrové výrobky – Stanovení obsahu tuku – Gravimetrická metoda (Referenční metoda)*.
- [34] PANAGIOTOPOULOU, P. M. a M. TSIMIDOU. *Solid phase extraction: Applications to the chromatographic analysis of vegetable oils and fats*. DOI: 10.3989/gya.2002.v53.i1.292.

- [35]HOPIA, Anu I., Vieno I. PIIRONEN, Pekka E. KOIVISTOINEN and Lea E. T. HYVÖNEN. *Analysis of lipid classes by solid-phase extraction and high-performance size-exclusion chromatography: Applications to the chromatographic analysis of vegetable oils and fats*. DOI: 10.1007/BF02635913.
- [36]FOX, P a P MCSWEENEY. *Dairy chemistry and biochemistry*. 1st ed. New York: Blackie Academic & Professional, 1998. ISBN 0412720000.
- [37]STAVINHOVÁ, K. *Použití extrakce tuhou fází pro frakcionaci lipidů v sýrové matrici*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [38]ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum 2004, s. 263, ISBN: 80-246-0852-9.
- [39]HORNÁKOVÁ, M. *Možnosti stanovení volných mastných kyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 54 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph. D..
- [40]KALUŽNY, M.A., Duncan, L.A., Merritt, M.V., Epps, D.E. *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.
- [41]PRECHT, D., Molkentin, J. *Identification and quantification of cis/trans C16 : 1 and C17 : 1 fatty acid positional isomers in German human milk lipids by thin-layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2000, Vol. 102, no. 2, pp. 102-112. ISSN: 1438-7697. DOI: 10.1002/(SICI)1438-9312(2000002)102:2<102::AID-EJT102>3.0.CO;2-C.
- [42]FONTECHA, J., Rios, J.J., Lozada, L., Fraga, M.J., Juarez, M. *Composition of goat's milk fat triglycerides analysed by silver ion adsorption-TLC and GC-MS*. International Dairy Journal 2000, Vol. 10, no. 1-2, pp. 119-128. ISSN: 0958-6946. DOI: 10.1016/S0958-6946(00)00026-1.
- [43]ROBINSON, NP., MacGibbon, AKH. *Separation of milk fat triacylglycerols by argentation thin-layer chromatography*. Journal of The American Oil Chemists Society 1998, Vol. 75, no. 7, pp. 783-788. ISSN: 0003-021X. DOI: 10.1007/s11746-998-0226-1.
- [44]FRAGA, M.J., Fontecha J, Lozada, L., Juarez, M. *Silver ion adsorption thin layer chromatography and capillary gas chromatography in the study of the composition of milk fat triglycerides*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1998, Vol. 46, no. 5, pp. 1836-1843. ISSN: 0021-8561. DOI: 10.1021/jf970838e.
- [45]CRUZ-HERNANDEZ, C., Deng, ZY., Zhou, JQ., Hill, AR., Yurawecz, MP., Delmonte, P., Mossoba, MM., Dugan, MEER., Kramer, JKG. *Methods for analysis of conjugated linoleic acids and trans-18 : 1 isomers in dairy fats using a combination of gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography/gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography*. Journal of AOAC International, 2004, Vol. 87, no. 2, pp. 545-562. ISSN: 1060-3271,
- [46]UPADHYAY, N., Kumar, A., Rathod, G., Goyal, A., Lal, D. *Development of a method employing reversed-phase thin-layer chromatography for establishing milk fat purity with respect to adulteration with vegetable oils*. International Journal of Dairy Technology 2015, Vol. 68, no. 2, pp. 207-217. ISSN: 1364-727X. DOI: 10.1111/1471-0307.12178.
- [47]ČSN ISO 5508: Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Analýza methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií.
- [48]ČSN EN ISO 5509: Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Příprava methylesterů mastných kyselin.

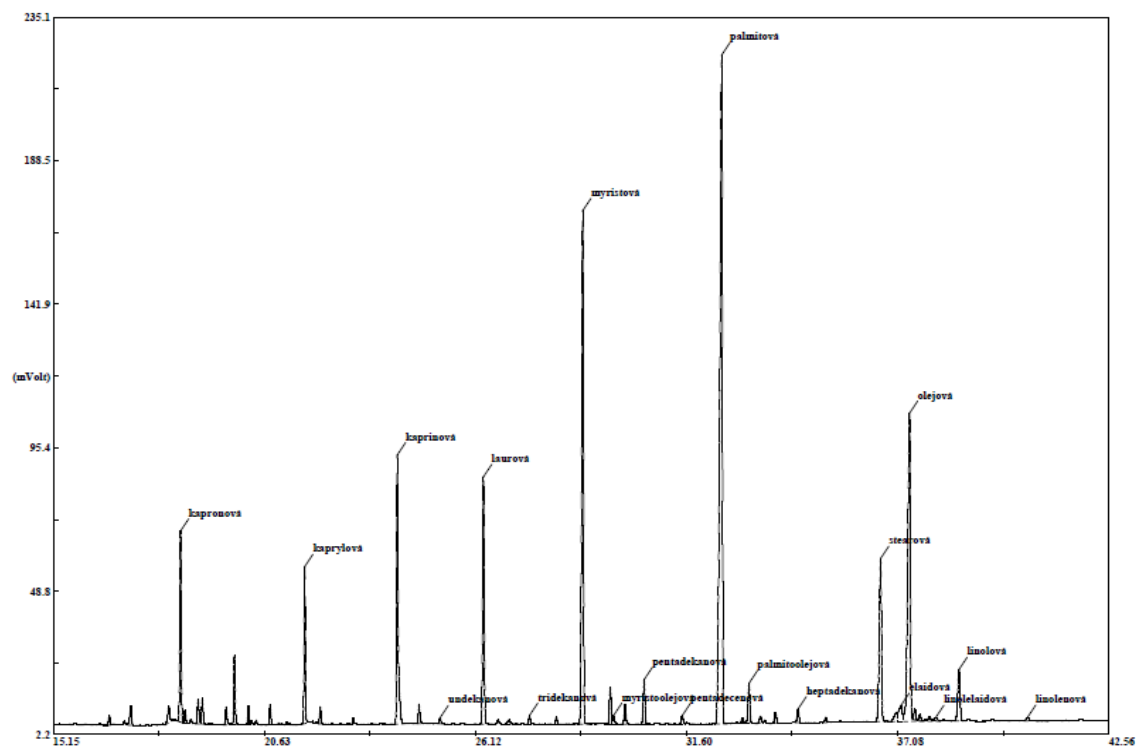
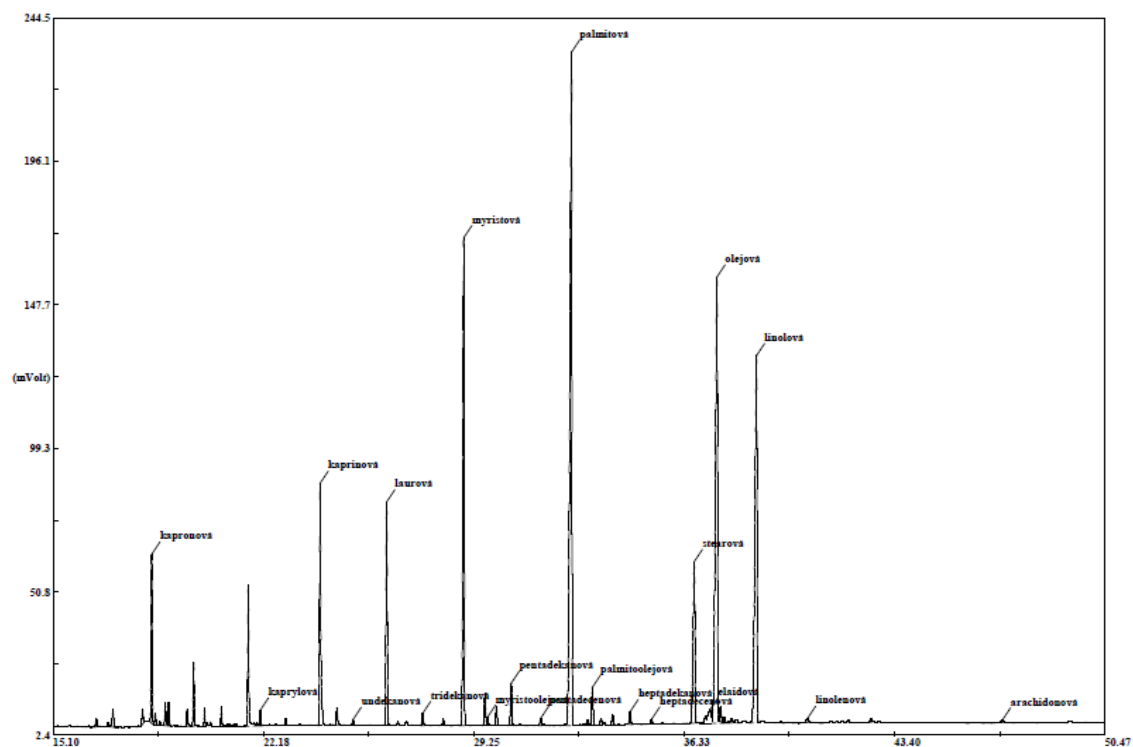
- [49] DE JONG, Catriens; Badings, Herman T. *Determination of free fatty acids in milk and cheese. Procedures for extraction, clean up and capillary gas chromatographic analysis*. Journal of High Resolution Chromatography. 1990, Vol. 13, s. 94-98.
- [50] INNOCENTE, N., Moret, S., Corradini, C., Conte, L.S. 2000. *A rapid method for the quantitative determination of short-chain free volatile fatty acids from cheese*. J. Agr. Food Chem. 48, 3321-3323.
- [51] COLLINS, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G. *Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: review of current knowledge*. International Dairy Journal, 2003, vol. 13, no. 11, pp. 841-866. ISSN: 0958-6949. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00109-2.
- [52] ROGINSKI, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. *Encyclopedia of Dairy Science*. London: Academic Press, 2002. ISBN: 0-12-227235-8
- [53] MARILLEY, L., Casey, M.G. *Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains*. International Journal of Food Microbiology, 2004, vol. 90, no. 2, pp. 139-159. ISSN: 0168-1605. DOI: 10.1016/S0168(03)00304-0.
- [54] Guide to solid phase extraction. In: SIGMA-ALDRICH [online]. 1998 [cit. 2016-04-08]. <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- [55] MELOUN, M., Militký, K. *Kompendium statistického zpracování dat*. Vyd.3., nakl. Karolinum 1. Praha: Karolinum, 2012, 982 s. ISBN: 978-80-246-2196-8.
- [56] Company catalogue SIGMA-ALDRICH corporate, BF₃-methanol 10% w/w catalogue. St.Louis, Missouri, USA

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

MAG	monoacylglyceroly
DAG	diacylglyceroly
TAG	triacylglyceroly
MK	mastné kyseliny
VMK	voľné mastné kyseliny
MEMK	metylestery mastných kyselín
GC	plynová chromatografia (gas chromatography)
HPLC	vysoko-účinná kvapalinová chromatografia (high-performance liquid chromatography)
MS	hmotnostná spektroskopia (mass spectroscopy)
TLC	tenkovrstevná chromatografia (thin-layer chromatography)
SPE	extrakcia na tuhej fáze (solid-phase extraction)
PSE	extrakcia rozpúšťadlom za zníženého tlaku (pressurized solvent extraction)
SFE	superkritická fluidná extrakcia (supercritical fluid extraction)
SPME	mikroextrakcia na pevnej fáze (solid-phase microextraction)
FID	plameňovo-ionizačný detektor (flame-ionization detector)
MIR	infračervená spektroskopia strednej oblasti (mid infrared)

8 PRÍLOHY

Príloha 1: Ukážka chromatogramu metylesterov mastných kyselín vo vzorke taveného syru (frakcia TAG): vzorka č. 1 (hore) a vzorka č. 2 (dole)



Príloha 2: Ukážka chromatogramu metylesterov mastných kyselín vo vzorke taveného syru (frakcia VMK): vzorka č. 1 (hore) a vzorka č. 2 (dole)

