



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Aktivita 2340/1-2

STUDIJNÍ MATERIÁL PRO PRAKTICKÁ CVIČENÍ ZÁKLADNÍ PRINCIPY POUŽITÉ METODY

Stanovení mastných kyselin metodou GC

Určeno pro výuku 4. ročníku magisterského studijního programu předmětu *Chemie potravin*

MLÉČNÝ TUK

Mléko savců obsahuje tuk v různých koncentracích (tabulka č. 1). Hlavní funkci má jako zdroj energie, zdroj esenciálních mastných kyselin, podílí se na tvorbě aroma a rheologických vlastnostech mléčných výrobků např. smetany, másla, plnotučného sušeného mléka a sýrů (MacGibbon a Taylor, 2006).

Tabulka č. 1 Obsah tuku v mléce různých druhů savců (Christie, 1995)

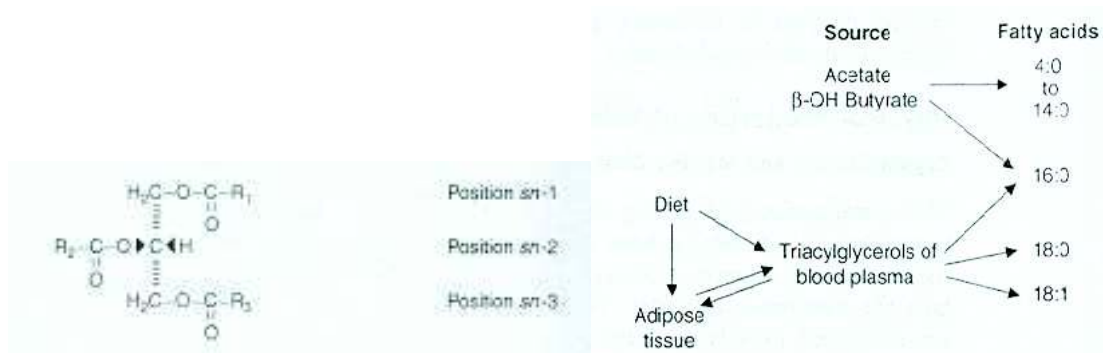
druh	tuk (g.l⁻¹)
kráva	33 – 47
buvol	47
ovce	40 – 99
koza	41 – 45
člověk	38
kůň	19
prase	68
slon	85 – 190
králík	183
delfín	62 - 330

Mléčný tuk je složen převážně z triacylglycerolů (98 %). Dále jsou zastoupeny fosfolipidy, cholesterol, volné mastné kyseliny, mono- a diacylglyceroly. Ve stopových množstvích se v něm vyskytují také beta karoteny, vitamíny rozpustné v tucích (A, D, E a K) a složky mající vliv na aroma. Procentuální zastoupení je uvedeno v tabulce č. 2 (Taylor a MacGibbon, 2003a).

Tabulky č. 2 Složení mléčného tuku (Taylor a MacGibbon, 2003a)

lipidy	obsah (hm%)
triacylglyceroly	98,3
diacylglyceroly	0,3
monoacylglyceroly	0,03
volné mastné kyseliny	0,1
fosfolipidy	0,8
steroly	0,3
karoteinoidy	stopy
vitamíny rozpustné v tucích	stopy
složky ovlivňující aroma	stopy
(C4 – C12; aldehydy; laktony; methylketony)	

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Obrázek č. 1 a 2 Struktura triacylglycerolu a zdroj mastných kyselin v mléčném tuku (Taylor a MacGibbon, 2003a)

MASTNÉ KYSELINY

Mastné kyseliny jsou nejdůležitější a z hlediska výživy nejvýznamnější složkou lipidů (Velíšek, 2003). Tuk kravského mléka obsahuje velké množství mastných kyselin. Nicméně, mnoho z nich je zastoupeno ve velmi malých koncentracích. Pouze cca 15-16 MK je zastoupeno $\geq 1\%$.

Na základě využití chromatografických a spektrofotometrických metod bylo identifikováno přibližně 400 mastných kyselin (MacGibbon a Taylor, 2006). Hlavní mastné kyseliny jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 Mastné kyseliny (hm%) v mléce (¹Taylor a MacGibbon, (2003b), ²Christie, (1995))

triviální název		kráva ¹	buvol ²	ovce ²	koza ²
máselná (4:0)	butanová	3,7	3,6	4,0	2,6
kapronová (6:0)	hexanová	2,4	1,6	2,8	2,9
kaprylová (8:0)	oktanová	1,5	1,1	2,7	2,7
kaprinová (10:0)	dekanová	3,2	1,9	9,0	8,4
laurová (12:0)	dodekanová	3,6	2,0	5,4	3,3
myristová (14:0)	tetradekanová	11,1	8,7	11,8	10,3
myristoolejová (14:1; cis)	tetradecenová	0,9			
- (15:0)	pentadekanová	1,2			
palmitová (16:0)	hexadekanová	28,3	30,4	25,4	24,6
palmitoolejová (16:1; cis)	hexadecenová	1,6	3,4	3,4	2,2
stearová (18:0)	oktadekanová	11,8	10,1	9,0	12,5
olejová (18:1; cis)	oktadecenová	18,8	28,7	20,0	28,5
vakcenová (18:1; trans)	oktadecenová	4,2			
linolová (18:2; cis, cis)	oktadekadienová	1,4	2,5	2,1	2,2
CLA (18:2c)	oktadekadienová	1,1			
linolenová (18:3; cis, cis, cis)	oktadekatrienová	0,9	2,5	1,4	-
minoritní kyseliny		4,4	-	-	-

CLA – konjugovaná kyselina linolová



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Složení tuku a mastných kyselin je ovlivněno celou řadou různých faktorů např. výživou, stádiem laktace, ročním obdobím, způsobem chovu, individualitou zvířete, typem krmení, zdravotním stavem, věkem zvířete, intervaly mezi dojeními atd. (Taylor a MacGibbon, 2003b; Fox a McSweeney, 1998).

Tabulka č. 4 Zastoupení mastných kyselin u sýrů (Hauff a Vetter, 2009)

	Mozzarella		Camembert		kozí smetanový sýr	
	g.100g ⁻¹	%	g.100g ⁻¹	%	g.100g ⁻¹	%
4:0	3,6	18,3	2,8	9,3	1,1	4,6
6:0	2,2	9,2	2,1	7,0	2,1	9,5
8:0	1,2	5,2	1,3	4,2	2,4	10,8
10:0	2,9	12,4	3,2	10,8	8,3	36,8
12:0	3,5	14,6	4,0	13,3	4,8	21,0
14:0	9,5	39,9	11,6	38,7	9,3	41,3
15:0	1,2	4,9	1,2	4,1	0,91	4,0
16:0	23,8	100	30,0	100	22,6	100
17:0	0,57	2,4	0,68	2,3	0,63	2,8
18:0	8,7	36,6	9,6	32,0	7,4	32,7
18:1n-9tr	2,1	8,6	1,9	6,3	1,5	6,6
18:1n-9	16,5	69,3	16,3	54,4	14,9	65,9
18:2n-6	1,6	6,6	1,7	5,7	2,0	8,8
20:0	0,15	0,6	0,16	0,5	0,35	1,6
suma všech MK	77,4		86,7		78,4	

STANOVENÍ MASTNÝCH KYSELIN

Nejpoužívanější metodou pro stanovení mastných kyselin je metoda plynové chromatografie. Před stanovením, musí být mastné kyseliny přeměněny na své methylestery pomocí různých metod derivatizace. Existují dva základní mechanismy (Wrolstad *et al.*, 2000-2005):

a) *hydrolyza mastných kyselin s následnou methylací* – zahrnuje saponifikaci (alkalická hydrolyza), při které dochází k rozštěpení esterových vazeb mezi mastnou kyselinou a alkoholem (glycerolem) během zahřívání vzorku s následnou methylací za přítomnosti kyselého katalýzy v metanolu.

b) *přímá transesterifikace* – v rámci jednoho kroku zahrnuje alkalickou nebo kyselou katalýzu.

Chromatografie

Jedná se o kvantitativní i kvalitativní separační metodu, při které se oddělují – separují složky obsažené ve vzorku. Vzorek se vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze: stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) (Klouda, 2003).

Plynová chromatografie

Vzorek se dávkuje do proudu plynu, který jej unáší kolonou. Aby vzorek mohl být transportován, musí se ihned přeměnit na plyn. V koloně se složky separují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Složky opouštějící kolonu indikuje detektor. Signál

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek (Klouda, 2003).

Využití je u látek, které jsou tepelně stálé, mají relativní molekulovou hmotnost menší než 1000. Metoda je použitelná k separaci plynů, většiny nedisociovatelných kapalin a pevných organických molekul mnoha organokovových látek (Klouda, 2003).

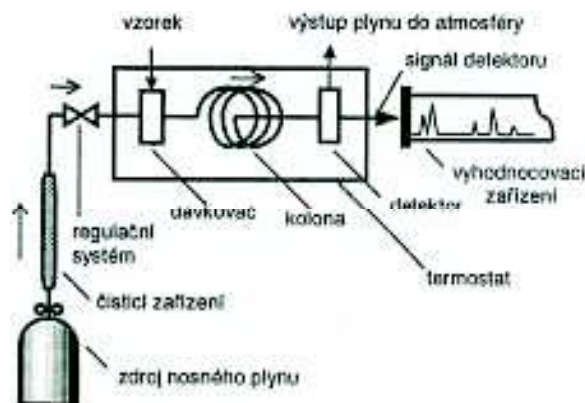
Složení plynového chromatografu je uvedeno na obrázku č. 3.

- zdroj nosného plynu – tlaková láhev, používány jsou vodík, dusík, helium, argon;
- čisticí zařízení – zachycuje vlhkost a nečistoty;
- regulační systém – stálý nebo programově měnící průtok nosného plynu;
- dávkovač – zavedení vzorku do nosného plynu;
- kolona – umístěna stacionární fáze. Kolony mohou být náplňové a kapilární;
- detektor – detekce látek v nosném plynu. Např. ionizační detektory - plamenově-ionizační detektor, detektor elektronového záchyty; tepelně-vodivostní detektor;

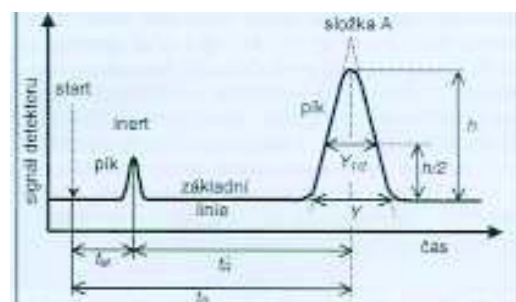
princip plamenově-ionizačního detektoru

Molekuly plynu se ionizují v kyslíkovodíkovém plameni a vedou ionizační proud mezi elektrodami. Nosný plyn se před vstupem do hořáku míší s vodíkem, vzduch je přiváděn z vnějšku. Přítomnost složky zvýší ionizaci a elektrický proud se zvětší. Detektor je velmi citlivý. Detekční limity jsou v pikogramech analytu. Jako nosný plyn se nejlépe hodí dusík.

- vyhodnocovací zařízení – počítač;
- termostat – zajištění dostatečné teploty (Klouda, 2003)



Obrázek č. 3 Schéma plynového chromatografu (Klouda, 2003)



Obrázek č. 4 Chromatogram (Klouda, 2003)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

inert – látka, která se nezachycuje na koloně a pohybuje se kolonou stejnou rychlostí jako nosný plyn.

h – výška píku

Y – šířka píku v základně

$Y_{1/2}$ - šířka píku v polovině výšky

A – plocha píku

t_R – retenční čas (určitá doba strávená molekulou v koloně)

t_M – mrtvý retenční čas (molekula v mobilní fázi)

t'_R – redukovaný retenční čas (molekula v stacionární fázi)

Validace metody

Každá metoda musí splňovat určitá kritéria. Mezi validační parametry patří: přesnost, opakovatelnost, reprodukovatelnost, střední přesnost, správnost metody, selektivita, citlivost, linearita, mez detekce, mez stanovitelnosti, rozsah, rozlišení a slepý pokus (Příručka k programu Effi Validation 3.0).

Použitá literatura

FOX, PF., McSWEENEY, PLH. *Dairy chemistry and biochemistry*. London: Blackie academic & Professional, 1998, 478 p. ISBN 0-412-72000-0.

HAUFF, S., VETTER, W. Quantification of fatty acids as methyl esters and phospholipids in cheese samples after separation of triacylglycerides and phospholipids. *Analytica Chimica Acta*, 2009, vol. 636, p. 229-235.

CHRISTIE, WW. Composition and structure of milk lipids. In FOX, PF. *Advanced dairy chemistry. Volume 2, Lipids*. 2nd edn. London: Chapman & Hall, 1995, 136 p.

KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

MacGIBBON, AKH., TAYLOR, MW. Composition and structure of bovine milk lipids. In FOX, PF. and McSWEENEY, PLH. *Advanced dairy chemistry, Volume 2. Lipids*. 3rd edn. New York: Springer Science + Business Media, Inc., 2006, 801 p.

Příručka k programu EffiValidation 3.0, 1999-2007 (<http://www.efficem.com>)

TAYLOR, MW., MacGIBBON, AKH. Lipids. General characteristics. In Roginski et al. *Encyclopedia of dairy science*. Amsterdam: Academic press, 2003a, vol. 3, 1544 – 1550. ISBN 0-12-227238-2.

TAYLOR, MW., MacGIBBON, AKH. Fatty acids. Different type of fatty acids. In Roginski et al. *Encyclopedia of dairy science*. Amsterdam: Academic press, 2003b, vol. 3, 1550 – 1554. ISBN 0-12-227238-2.

VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1. 2. vyd.* Tábor: OSSIS, 2002, 320 s. ISBN 80-86659-00-3.

WROLSTAD, RE., ACREE ,TE., DECKER, EA., PENNER, MH., REID, DS., SCHWARTZ, SJ., SHOEMAKER, CF., SMITH, D., SPORNS, P. *Handbook of food analytical chemistry*. Volume 1. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2000-2005, 768 p. ISBN 0-471-66378-6.