

## CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ POLYENASACENÝCH MASTNÝCH KYSELIN VE VYBRANÝCH ŽIVOČIŠNÝCH TKÁNÍCH

TOMÁŠ KOMPRDA, ALENA ANSORGOVÁ,  
VERONIKA ROZÍKOVÁ a BARBORA NĚMCOVÁ

Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno  
komprda@mendelu.cz

Došlo 15.9.14, přijato 29.9.2014.

Klíčová slova: kyselina  $\alpha$ -linolénová; kyselina eikosapentaénová; kyselina dokosahexaénová; lipidy; plynová chromatografie

### Úvod

Jako polyenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids, PUFA) se označují mastné kyseliny obsahující v molekule dvě až šest dvojných vazeb. Podle toho, zda první dvojná vazba vychází z třetího nebo šestého uhlíku počítáno od metylového konce molekuly, rozdělují se PUFA do dvou skupin, n-3 a n-6 (v mnoha literárních zdrojích je použito alternativní značení  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6).

Výchozími látkami řad n-3 a n-6 jsou (pro člověka esenciální) kyselina  $\alpha$ -linolénová (ALA; 18:3n-3) a kyselina linolová (LA; 18:2n-6), které jsou následně metabolizovány stejnou sadou enzymů (elongas a desaturas) na polyenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (long-chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFA). Klíčovými metabolity řad n-6 a n-3 jsou kyselina arachidonová (AA; 20:4n-6), respektive kyselina eikosapentaénová (EPA; 20:5n-3) a kyselina dokosahexaénová (DHA; 22:6n-3)<sup>1</sup>.

AA, resp. EPA/DHA jsou dále metabolizovány cyklooxygenasovou a lipoxygenasovou drahou na biologicky účinné eikosanoidy<sup>2</sup> typu prostaglandinů, tromboxanů a leukotrienů. Eikosanoidy vzniklé z kyseliny arachidonové působí v organismu prozánětlivě, způsobují shlukování krevních destiček a smršťují cévní stěnu, čímž zvyšují riziko srdečně-cévních onemocnění. Eikosanoidy vzniklé z EPA/DHA mají uvedené účinky mnohem slabší, v mnoha případech opačné<sup>3</sup>.

Pro přesné a spolehlivé stanovení uvedených mastných kyselin, např. za účelem srovnání nutriční hodnoty potravin<sup>4</sup> nebo pro posouzení depozice v metabolicky aktivních tkáních v rámci biomedicínského výzkumu se jako metoda první volby nabízí plynová chromatografie, jedna ze stěžejních moderních separačních metod s širokým spektrem použití od stanovení toxických chemických lá-

tek<sup>5</sup> po metabolomiku<sup>6</sup>. Cílem předkládané práce tedy bylo standardizovat metodu stanovení mastných kyselin se středním a dlouhým řetězcem s důrazem na LC-PUFA a ověřit ji na reálných vzorcích různých živočišných tkání.

### Experimentální část

#### Použitý materiál

V experimentu byly analyzovány dva druhy matic: 1) vzorky živočišných produktů, jakožto funkčních potravin obohacených PUFA-n-3; 2) vzorky jater potkanů krmených dietami s přidavkem různých zdrojů mastných kyselin.

V prvním případě se jednalo o prsní (PS), resp. stehenní svalovinu (SS) kuřat, kterým bylo podáváno krmivo obohacené (60 g kg<sup>-1</sup>) o semeno šalvěje španělské (*Salvia hispanica* L.; vysoký obsah kyseliny  $\alpha$ -linolénové), vejce křepelek (KV) konzumujících krmivo obohacené o semeno šalvěje španělské (75 g kg<sup>-1</sup>) a poslední nymfální stadium cvrčka (CR; *Gryllus assimillis*; příklad jedlého hmyzu) chovaného na substrátu šrotu pšeničných otrub s přidavkem semen šalvěje španělské (500 g kg<sup>-1</sup>). Počet vzorků analyzovaných ve trojím opakování byl v případě PS, SS, KV a CR n = 16, 16, 90, resp. 6 (v případě CR představoval jeden vzorek cca 50 g jedinců uvedeného vývojového stadia).

Ve druhém experimentu byla analyzována játra potkanů krmených 7 týdnů samotnou základní dietou (kontrola, K; kompletní směs pro myši a potkany, Biokron, Blučina, Česká republika), resp. základní dietou s přidavkem 5 % (w/w) rybího oleje (RO), oleje ze světlíce barvířské (SO) nebo palmového oleje (PO). Z každé skupiny potkanů bylo analyzováno 10 vzorků (n = 10), vždy ve dvojitým opakování.

#### Příprava vzorku

Vzorky kuřecí svaloviny byly nakrájeny na velikost částic 0,5 cm, vloženy do hliníkových misek, lyofilizovány a po extrakci celkových lipidů byly stanoveny mastné kyseliny. Stejně byly zpracovány vzorky potkaních jater. V případě KV byly připraveny směsné vzorky vždy ze 4 vajec a tyto vzorky byly následně zpracovány jako v předešlém případě. Vzorky CR po inaktivaci při -20 °C po dobu 1 h byly následně zpracovány výše uvedeným způsobem.

#### Přístrojové vybavení

Rotační vakuová odparka IKA RV 05-ST a IKA HB 4 basic (IKA Werke GmbH, Staufen, Německo); lyofilizátor Christ Alpha 1-2 LD (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Německo); homogenizátor DIAX 900 Heidolph (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo); ultrazvuková lázeň PS10000 (Notus-Powersonic, Vrāble, Slovensko); vodní lázeň K 10 E 1 Medingen (Labortechnik Medingen, Fre-

ital, Německo); třepačka GFL 3005 (GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Německo); plynový chromatograf Fisons 8000 Series (Fisons Instruments S.p.A., Rodano, Itálie) vybavený plameno-ionizačním detektorem (FID) a autosamplerem HT300A (HTA, Brescia, Itálie).

#### Chemikálie

Hexan p.a.; 2-propanol p.a.; methanol p.a.; izooktan p.a.; fluorid boritý (14 %ní roztok v methanolu); sodík 99% (Sigma-Aldrich); bezvodý síran sodný p.a.; chlorid sodný p.a.; methylpentadekanoát 98,5% GC standard; kyselina pentadekanová (15:0) 99% GC standard; standard 16 FAME (methylestery mastných kyselin; GLC Reference Standard 455, NU-CHECK PREP, Inc., Elysian MN, USA); plyny: dusík (čistota 99,999%; SIAD Czech spol. s r.o., Praha, Česká republika), vodík (čistota 99,999%), vzduch technický.

#### Lyofilizace

Vzorky byly lyofilizovány na přístroji Christ Alpha 1-2 LD za následujících podmínek: hlavní sušení při  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  24 h, finální dosušení při  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  3 h.

#### Extrakce celkových lipidů

K navážce cca 5 g vzorku bylo přidáno 15 ml směsi hexan/2-propanol 3:2 (v/v; HIP 1) a tkáň byla rozmixována na homogenizátoru DIAX 900 Heidolph po dobu dvou minut. Po převedení směsi do Erlenmayerovy baňky (250 ml) byl vzorek ponechán 15 minut v ultrazvukové lázni PS10000. Následně byla směs přefiltrována přes Büchnerovu nálevku a k filtrátu bylo přidáno 24 ml vodného roztoku síranu sodného o koncentraci  $0,5\text{ mol l}^{-1}$ . Vzorek byl protřepán v dělicí nálevce 3 minuty. Po oddělení horní organické fáze byla spodní vodná vrstva podrobena opakované extrakci s 10 ml směsi hexan/2-propanol 7:2 (v/v; HIP 2). Vytvořená horní organická fáze s HIP 2 byla spojena s organickou fází po extrakci s HIP 1. Směs byla přefiltrována přes bezvodý síran sodný. Směs rozpouštědla HIP byla odpařena na rotační vakuové odparce při teplotě  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  při padesáti otáčkách za minutu. Zbytek rozpouštědla byl odfoukán pod dusíkovou atmosférou do konstantní hmotnosti. Obsah celkových lipidů byl stanoven gravimetricky.

#### Derivatizace mastných kyselin

Navážka vzorku vyextrahovaných celkových lipidů v rozmezí 40–60 mg byla umístěna do varné baňky se zábrusem. Byly přidány 3 ml roztoku vnitřního standardu: pentadekanová kyselina (15:0) v isooktanu (koncentrace  $1\text{ mg ml}^{-1}$ ) a další 3 ml methanolátu sodného (kovový sodík v množství 1,15 g na 100 ml methanolu). Následně byla směs zahřívána ve vodní lázni K 10 E 1 Medingen při  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  pod zpětným chladičem. Po 15 min byly přes

zpětný chladič přidány 3 ml methanolového roztoku fluoridu boritého ( $\text{BF}_3$ ; koncentrace 14 %) a směs byla pod zpětným chladičem zahřívána dalších 5 min při  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Po uplynutí stanovené doby byla baňka oddělena od chladiče a zchlazena na laboratorní teplotu. Následně byly přidány 2 ml isooktanu a 5 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (NaCl) a směs byla třepána 10 min na třepačce GFL 3005. Z horní organické vrstvy byl odebrán 1 ml roztoku do lahvičky na vzorky o objemu 2 ml pro chromatografickou analýzu.

#### Stanovení mastných kyselin

Methylestery mastných kyselin (FAME) byly analyzovány na plynovém chromatografu Fisons 8000 Series s plameno-ionizačním detektorem a autosamplerem HT300A. Separace FAME probíhala na kapilární koloně DB-23 o rozměrech  $60\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA) za použití následujícího teplotního programu: počáteční teplota  $140\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 2 min, nárůst teploty  $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ , setrvání na teplotě  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 15 min. Teplota injektoru byla  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ , teplota detektoru  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jako nosný plyn byl použit dusík čistoty 99,999 %. Vstupní tlak na kolonu byl 200 kPa. Vzorek byl nastříkovan v objemu  $1\text{ }\mu\text{l}$  v režimu split, splitovací poměr byl 1:20.

#### Kalibrace

Chromatograf byl kalibrován směsí standardů 16 FAME s přidavkem vnitřního standardu (methylpentadekanoát). Kalibrační řada byla v rozsahu  $2,5\text{--}250\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ . Vyhodnocení vzorků probíhalo metodou vnitřního standardu. Výsledky byly vyjádřeny jako obsah dané mastné kyseliny v mg na 100 g čerstvé hmoty vzorku.

#### Kontrola kvality analytické metody

Validační parametry byly stanoveny pro mastné kyseliny se středním a dlouhým řetězcem. Pro stanovení meze detekce (LOD), meze stanovitelnosti (LOQ) a návratnosti byly použity roztoky standardů analyzovaných mastných kyselin (FAME). Hodnoty LOD a LOQ byly vypočteny na základě stanovení poměru signál/šum 3, resp. 10. Návratnost byla stanovena pomocí přidavku známých množství standardů FAME do extraktu celkových lipidů vzorku prsní kuřecí svaloviny (PS); hodnoty byly vypočteny pomocí vzorce: návratnost (%) =  $[(C1 - C2)/C3]$ , kde C1 je koncentrace methylesteru dané mastné kyseliny v obohaceném vzorku, C2 koncentrace ve vzorku bez přidavku FAME a C3 koncentrace odpovídající přidavku FAME.

Přesnost metody byla kvantifikována pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD; %) jako krátkodobá, resp. dlouhodobá opakovatelnost měření. V prvním případě byly v rámci jednoho dne šestkrát měřeny analytické koncentrace FAME v roztoku standardu FAME; ve druhém případě byla měřena analytická koncentrace FAME v roztoku stan-

dardu FAME šestkrát v různých dnech v průběhu celého experimentu.

#### Statistické vyhodnocení

Rozdíly v obsahu mastných kyselin v rámci souboru testovaných potravin, resp. v rámci souboru jater laboratorních potkanů byly kvantifikovány pomocí jednoduchého třídění analýzy rozptylu s následným *post-hoc* Tukeyovým testem.

### Výsledky a diskuse

Nedávno publikovaný přehled metod pro stanovení mastných kyselin ve vzorcích potravin<sup>7</sup> zmiňuje jako nej-

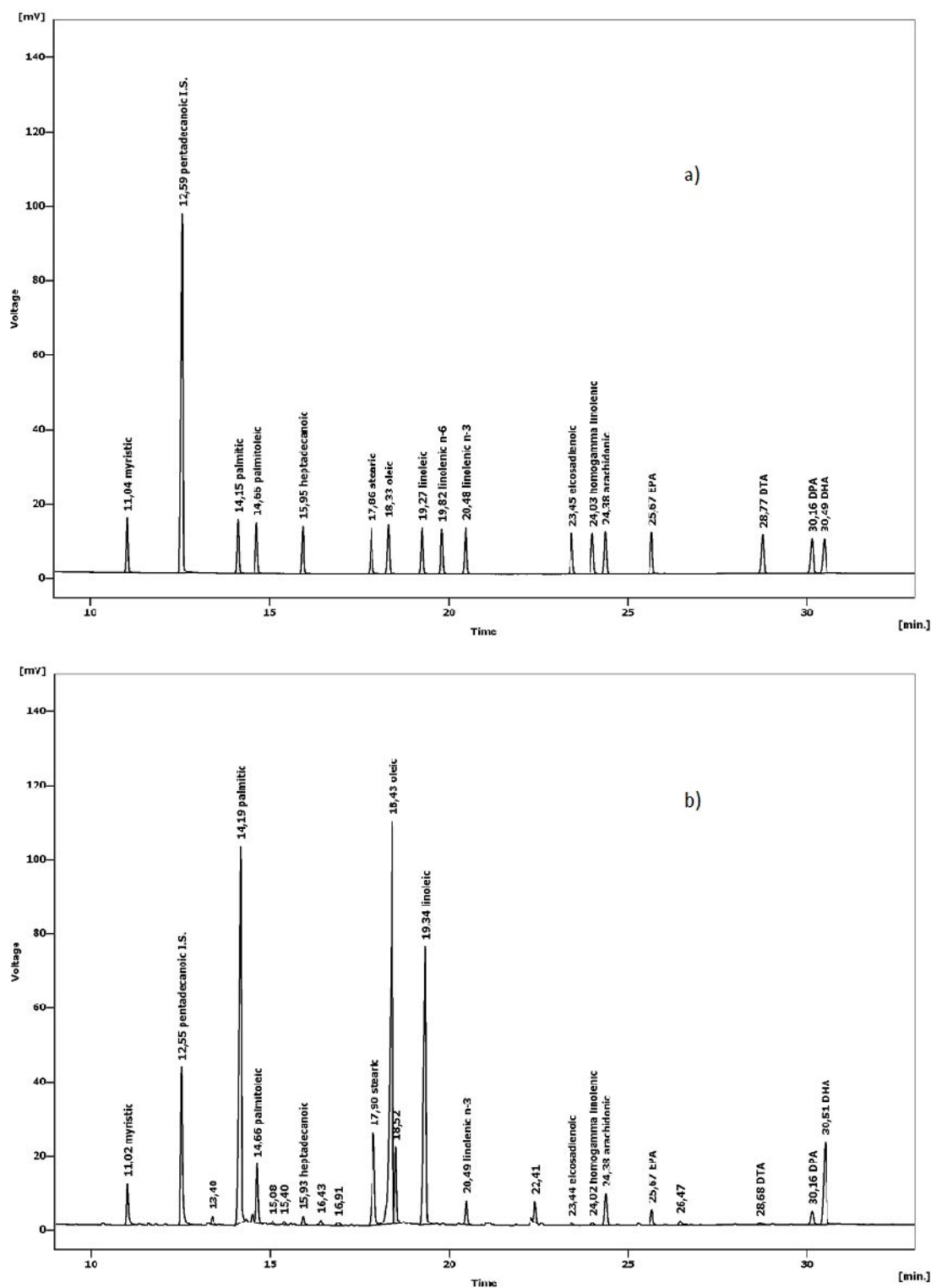
častěji používané metodu AOAC<sup>8</sup>, ISO<sup>9</sup> a metodu podle Folcha<sup>10</sup>. V předkládané práci byla pro extrakci celkových lipidů modifikována metoda používající směs hexan/2-propanol (HIP)<sup>11</sup>, která je podstatně méně toxická než směs chloroform/methanol<sup>10</sup>. Ve srovnání s extrakcí v Soxhletově přístroji<sup>9</sup>, resp. použití diethyletheru nebo petroletheru v Mojonnierově nádobě<sup>8</sup>, je podle našich předchozích výsledků<sup>12</sup> při použití směsi HIP dosahováno asi o 5–10 % vyšších návratností LC-PUFA. Směs polárnějšího (2-propanol) + méně polárního (hexan) rozpouštědla je schopna kromě neutrálních lipidů spolehlivě vyextrahovat z živočišných tkání i fosfolipidy buněčných membrán s vysokým obsahem kyseliny arachidonové (20:4n-6) a EPA (20:5n-3)<sup>13</sup>.

Tabulka I

Kontrola kvality analytické metody stanovení vybraných mastných kyselin plynovou chromatografií (polynenasycené mastné kyseliny + kvantitativně významné nasycené a mononenasycené mastné kyseliny); chromatograf Fisons 8000 Series s plameno-ionizačním detektorem; kapilární kolona DB-23 60 m × 0,25 mm × 0,25 μm

Mastná kyselina (triviální název)	LOD <sup>a</sup> [mg/100 g]	LOQ <sup>b</sup> [mg/100 g]	Opakovatelnost [RSD, %], n = 6		Návratnost <sup>c</sup> [%]	Rozsah [μg ml <sup>-1</sup> ]	Linearita	R <sup>f</sup>
			krátko- dobá <sup>e</sup>	douho- dobá <sup>d</sup>				
14:0 (myristová)	0,26	0,87	0,3%	1,4%	105%	2,5–250	0,2357	0,99990
16:0 (palmitová)	0,21	0,71	1,0%	1,5%	103%	2,5–250	0,2393	0,99978
16:1 (palmitolejová)	0,31	1,02	0,4%	1,2%	102%	2,5–250	0,2371	0,99982
17:0 (heptadekanová)	0,32	1,06	0,4%	1,6%	94%	2,5–250	0,2374	0,99988
18:0 (stearová)	0,26	0,87	0,6%	1,1%	88%	2,5–250	0,2421	0,99978
18:1n-9 (olejová)	0,20	0,67	1,5%	2,5%	93%	2,5–250	0,2444	0,99976
18:2n-6 (linolová)	0,32	1,05	1,2%	1,7%	83%	2,5–250	0,2419	0,99980
18:3n-6 (γ-linolénová)	0,40	1,34	0,2%	1,8%	99%	2,5–250	0,2430	0,99981
18:3n-3 (α-linolénová)	0,38	1,27	0,5%	1,1%	95%	2,5–250	0,2424	0,99981
20:2n-6 (eikosadiénová)	0,40	1,32	0,5%	1,8%	97%	2,5–250	0,2390	0,99979
20:3n-6 (homo-γ-linolénová)	0,36	1,20	0,5%	1,8%	100%	2,5–250	0,2373	0,99971
20:4n-6 (arachidonová)	0,38	1,27	0,7%	1,3%	94%	2,5–250	0,2410	0,99978
20:5n-3 (eikosapentaénová)	0,34	1,12	0,6%	1,6%	96%	2,5–250	0,2412	0,99971
22:4n-6 (dokosatetraénová)	0,42	1,41	0,8%	2,5%	101%	2,5–250	0,2380	0,99984
22:5n-3 (dokosapentaénová)	0,42	1,40	0,6%	1,9%	105%	2,5–250	0,2318	0,99960
22:6n-3 (dokosaheptaénová)	0,42	1,41	0,7%	2,4%	98%	2,5–250	0,2275	0,99982

<sup>a</sup> Mez detekce, <sup>b</sup> mez stanovitelnosti, <sup>c</sup> relativní směrodatná odchylka souboru šesti měření v průběhu jednoho dne analytické koncentrace dané mastné kyseliny ve standardu mastných kyselin, <sup>d</sup> relativní směrodatná odchylka souboru šesti měření analytické koncentrace dané mastné kyseliny ve standardu v různých dnech v průběhu celého experimentu, <sup>e</sup> návratnost (%) = [(C1 – C2)/C3]; C1 – koncentrace methylesteru dané mastné kyseliny (FAME) v obohaceném vzorku; C2 – koncentrace ve vzorku bez přídavku FAME; C3 – koncentrace odpovídající přídavku FAME, <sup>f</sup> regresní koeficient



Obr. 1. a) Separace standardu 16 FAME (methylestery mastných kyselin; GLC Reference Standard 455, NU-CHECK PREP, Inc., Elysian MN, USA); b) Separace FAME po extrakci celkových lipidů směsí hexan/2-propanol ze vzorku jater potkana krměného dietou s přidavkem rybího oleje; kapilární kolona DB-23, 60 m × 0,25 mm × 0,25 μm (Agilent Technologies); chromatograf Fisons 8000 Series s plameno-ionizačním detektorem

Hodnoty meze detekce, meze stanovitelnosti, opakovatelnosti a návratnosti jsou pro jednotlivé analyzované mastné kyseliny uvedeny v tab. I; všechny uvedené parametry jsou v rozsahu hodnot zjišťovaných v obdobných experimentech<sup>14</sup>.

Srovnání chromatogramu standardu 16 FAME (GLC Reference Standard 455) a chromatogramu reálného vzorku jater potkana krmeného dietou s přidavkem rybiho oleje znázorňuje obr. 1.

Obsahy sledovaných mastných kyselin v reálných vzorcích živočišných tkání (tab. II a III) jsou uvedeny v mg/100 g (nikoliv jako procentické zastoupení); absolutní množství jsou relevantní jak pro konzumenta potravin (tab. II), tak z hlediska ovlivnění biochemických reakcí ve vnitřním prostředí organismu (tab. III). Z tohoto důvodu jsou i hodnoty LOD a LOQ v tab. I uvedeny v mg/100 g.

Jak plyne ze srovnání uvedeného v tab. II, obsah kyseliny linolové (18:2n-6) se zvyšoval ( $P < 0,05$ ) v řadě PS < SS < KV < CR. Vzorek CR měl navíc řádově vyšší ( $P < 0,05$ ) obsah kyseliny arachidonové (20:4n-6) ve srovnání s ostatními analyzovanými vzorky. Pokud jde o PUFAn-3, jejich nejvyšší ( $P < 0,05$ ) obsah byl zjištěn v křepelčích vejcích; výjimkou byla pouze DPA (22:5n-3), jejíž obsah ve vzorcích KV byl pod mezí detekce.

Kyselina  $\alpha$ -linolénová i kyselina linolová jsou pro člověka nepostradatelné. Poměr PUFAn-6/PUFAn-3 v lidské stravě by měl být optimálně 1, v hospodářsky vyspělých zemích je však podstatně vyšší s důsledkem zvýšeného rizika chronických degenerativních onemocnění.

ní<sup>3</sup>. Z tohoto pohledu je vzorek CR podstatně ( $P < 0,05$ ) méně hodnotný ( $n-6/n-3 = 295,4$ ) ve srovnání s ostatními testovanými vzorky ( $n-6/n-3$  v rozmezí 2,41–2,64).

Na druhé straně je však nález EPA v matrici nymfálního stádia cvrčka velmi zajímavý (byť obsah DPA, resp. DHA byl pod mezí detekce): existence  $\Delta^6$ -desaturasy a  $\Delta^5$ -desaturasy v metabolické dráze syntetizující EPA z  $\alpha$ -linolénové kyseliny nebyla totiž u hmyzu prokázána<sup>15</sup>. Možnost obohacení tkání jedlého hmyzu o PUFAn-3 může dále zvýšit zajímavost tohoto produktu, známého mimo jiné např. jako zdroj významných antimikrobiálních peptidů<sup>16</sup>.

Výsledky uvedené v tab. III naznačují ukládání PUFA v játrech laboratorních potkanů podle obsahu těchto PUFA v dietě. Výrazně nejvyšší ( $P < 0,05$ ) obsah kyseliny linolové ve skupině SO odráží skutečnost, že zastoupení 18:2n-6 v příslušné dietě bylo vyšší než 65 % ze sumy mastných kyselin. V játrech potkanů krmených SO dietou byl dále zjištěn nejvyšší ( $P < 0,05$ ) obsah kyseliny arachidonové, což ukazuje na relativně účinnou konverzi 18:2n-6  $\rightarrow$  20:4n-6 v této tkáni.

Na druhé straně byly v játrech potkanů krmených dietou obsahující rybí olej (vysoký obsah EPA a DHA) zjištěny nejvyšší ( $P < 0,05$ ) koncentrace všech sledovaných PUFAn-3 (tab. III). Tomu odpovídal i nejnižší ( $P < 0,05$ ) poměr PUFAn-6/n-3 ve skupině RO (1,00); u ostatních tří skupin byl tento ukazatel v rozmezí 6,10 (kontrola) – 18,8 (SO).

Tabulka II

Srovnání obsahu kvantitativně významných mastných kyselin se středním a dlouhým řetězcem ve vybraných živočišných produktech obohacených o PUFAn-3

Mastná kyselina	Obsah ve tkáni (mg/100 g čerstvé hmoty) [průměr $\pm$ střední chyba průměru]									
	PS <sup>1)</sup>		SS <sup>2)</sup>		KV <sup>3)</sup>		CR <sup>4)</sup>			
14:0	8 <sup>a</sup>	$\pm$ 0,2	22 <sup>b</sup>	$\pm$ 2,7	46 <sup>c</sup>	$\pm$ 1,2	74 <sup>d</sup>	$\pm$ 3,0		
16:0	296 <sup>a</sup>	$\pm$ 4,7	879 <sup>b</sup>	$\pm$ 10,3	3275 <sup>c</sup>	$\pm$ 39,7	3339 <sup>c</sup>	$\pm$ 77,9		
18:0	82 <sup>a</sup>	$\pm$ 4,3	246 <sup>a</sup>	$\pm$ 6,9	1213 <sup>b</sup>	$\pm$ 28,5	1383 <sup>b</sup>	$\pm$ 24,4		
18:1n-9	470 <sup>a</sup>	$\pm$ 10,1	1417 <sup>b</sup>	$\pm$ 16,3	3916 <sup>c</sup>	$\pm$ 37,3	2017 <sup>b</sup>	$\pm$ 24,3		
18:2n-6	245 <sup>a</sup>	$\pm$ 3,9	721 <sup>b</sup>	$\pm$ 22,9	1103 <sup>c</sup>	$\pm$ 21,1	5564 <sup>d</sup>	$\pm$ 58,9		
20:4n-6	9 <sup>a</sup>	$\pm$ 0,8	30 <sup>a</sup>	$\pm$ 2,1	<0,38 <sup>a</sup>		3298 <sup>b</sup>	$\pm$ 46,6		
18:3n-3	93 <sup>a</sup>	$\pm$ 3,8	247 <sup>b</sup>	$\pm$ 7,8	347 <sup>c</sup>	$\pm$ 20,7	9 <sup>a</sup>	$\pm$ 0,3		
20:5n-3	3 <sup>a</sup>	$\pm$ 0,4	10 <sup>a</sup>	$\pm$ 0,8	51 <sup>b</sup>	$\pm$ 0,6	21 <sup>a</sup>	$\pm$ 0,6		
22:5n-3	4 <sup>b</sup>	$\pm$ 0,6	14 <sup>c</sup>	$\pm$ 0,7	<0,42 <sup>a</sup>		<0,42 <sup>a</sup>			
22:6n-3	5 <sup>a</sup>	$\pm$ 0,6	13 <sup>a</sup>	$\pm$ 0,8	35 <sup>b</sup>	$\pm$ 0,9	<0,42 <sup>a</sup>			

<sup>1)</sup> Prsní svalovina kuřat krmených dietou obohacenou semenem šalvěže španělské (*Salvia hispanica* L.) v množství 60 g/kg krmiva ( $n = 16$ ), <sup>2)</sup> stehenní svalovina kuřat krmených dietou obohacenou semenem šalvěže španělské v množství 60 g/kg krmiva ( $n = 16$ ), <sup>3)</sup> vejce křepelky krmených dietou obohacenou semenem šalvěže španělské v množství 75 g/kg krmiva ( $n = 90$ ), <sup>4)</sup> poslední nymfální stadium cvrčka (*Gryllus assimilis*; příklad jedlého hmyzu) chovaného na substrátu šrotu pšeničných otrub a semen šalvěže španělské v poměru 1:1 ( $n = 6$ ; jeden vzorek  $\approx$  50 g jedinců daného vývojového stádia); a – d: průměry označené různými exponenty v daném řádku se průkazně liší ( $P < 0,01$ ); jednostupňové třídění analýzy rozptylu s *post-hoc* Tukeyovým testem

Tabulka III

Srovnání obsahu kvantitativně významných mastných kyselin se středním a dlouhým řetězcem v játrech potkanů krměných 7 týdnů dietami s přidavkem olejů s vysokým zastoupením nasycených mastných kyselin (PO), polynenasycených mastných kyselin (PUFA) n-6 (SO), resp. PUFAn-3 (RO)

Mastná kyselina	Obsah v jaterní tkáni (mg/100 g čerstvé hmoty) [průměr ± střední chyba průměru]											
	K <sup>1)</sup>			PO <sup>2)</sup>			SO <sup>3)</sup>			RO <sup>4)</sup>		
14:0	21 <sup>a</sup>	±	0,5	23 <sup>a</sup>	±	1,2	23 <sup>a</sup>	±	3,3	39 <sup>b</sup>	±	2,4
16:0	687 <sup>b</sup>	±	11,3	749 <sup>a</sup>	±	13,4	772 <sup>a</sup>	±	32,2	1033 <sup>b</sup>	±	44,5
18:0	360 <sup>a</sup>	±	5,5	425 <sup>b</sup>	±	10,2	444 <sup>bc</sup>	±	22,7	499 <sup>c</sup>	±	19,8
18:1n-9	454 <sup>b</sup>	±	11,5	685 <sup>c</sup>	±	16,2	267 <sup>a</sup>	±	19,5	500 <sup>b</sup>	±	27,1
18:2n-6	384 <sup>a</sup>	±	13,9	495 <sup>b</sup>	±	13,2	1272 <sup>d</sup>	±	53,8	717 <sup>c</sup>	±	31,2
20:4n-6	476 <sup>b</sup>	±	10,0	497 <sup>b</sup>	±	14,2	779 <sup>c</sup>	±	35,9	354 <sup>a</sup>	±	14,4
18:3n-3	7 <sup>a</sup>	±	0,6	9 <sup>ab</sup>	±	0,4	10 <sup>b</sup>	±	0,7	29 <sup>c</sup>	±	1,7
20:5n-3	6 <sup>a</sup>	±	0,4	4 <sup>a</sup>	±	0,3	3 <sup>a</sup>	±	1,0	342 <sup>b</sup>	±	15,4
22:5n-3	24 <sup>a</sup>	±	1,1	22 <sup>a</sup>	±	0,7	13 <sup>a</sup>	±	1,0	124 <sup>b</sup>	±	9,2
22:6n-3	104 <sup>a</sup>	±	1,9	104 <sup>a</sup>	±	2,8	83 <sup>a</sup>	±	5,3	571 <sup>b</sup>	±	32,8

<sup>1)</sup> Kontrolní dieta (kompletní směs pro myši a potkany) bez přidavku olejů; n = 10, <sup>2)</sup> kompletní směs pro myši a potkany s přidavkem 5 % (w/w) palmového oleje; n = 10, <sup>3)</sup> kompletní směs pro myši a potkany s přidavkem 5 % (w/w) oleje ze světlíce barvířské; n = 10, <sup>4)</sup> kompletní směs pro myši a potkany s přidavkem 5 % (w/w) rybiho oleje; n = 10; a – c: průměry označené různými exponenty v daném řádku se průkazně liší ( $P < 0,01$ ); jednostupňové třídění analýzy rozptylu s *post-hoc* Tukeyovým testem

Zjištění obsahu jednotlivých PUFA v játrech laboratorních zvířat, včetně poměru n-6/n-3, je významné např. pro posouzení rozsahu metabolismu cholesterolu v tomto orgánu<sup>17</sup> s důsledkem odhadu rizika srdečně-cévních onemocnění.

## Závěr

Navrženou metodu zahrnující extrakci celkových lipidů směsí hexan/2-propanol a derivatizaci mastných kyselin pomocí methanolového roztoku BF<sub>3</sub> lze úspěšně použít pro spolehlivé stanovení PUFA v rozdílných maticích od potravin (maso, vejce), přes metabolicky aktivní vnitřní orgány (játra – aplikace v biomedicinském výzkumu), po tkáň hmyzu. Při použití vhodné kolony (DB-23, 60 m × 0,25 mm × 0,25 μm) byla i na starším typu přístroje (Fisons 8000) dosažena vysoká kvalita analytické metody: mez detekce v rozsahu 0,32 (18:2n-6) – 0,42 (22:6n-3) mg/100 g čerstvé hmoty; dlouhodobá opakovatelnost od 1,1 % (18:3n-3) po 2,5 % (22:4n-6); návratnost v rozsahu 83 % (18:2n-6) – 105 % (22:5n-3).

*Experimenty byly provedeny s podporou Interní Grantové Agentury Mendelovy univerzity v Brně: projekt číslo TP3/2014.*

## LITERATURA

- Das U.: *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7, 467 (2006).
- Hoffman P., Bezáčková L., Holková I., Pekárová M., Obložinský M.: *Chem. Listy* 106, 639 (2012).
- Komprda T.: *J. Funct. Foods* 4, 25 (2012).
- Dostálová J.: *Chem. Listy* 108, 565 (2014).
- Bova Š., Puliš P.: *Chem. Listy* 108, 596 (2014).
- Wojtowicz P., Janečková H., Friedecký D., Adam T.: *Chem. Listy* 107, 2 (2013).
- Taha A.Y., Metherel A.H., Stark K.D.: *Food Chem.* 134, 427 (2012).
- AOAC: *AOAC Official Method* 996.06 (2005).
- Luque-Garcia J.L., Luque de Castro M.D.: *J. Chromatogr. A* 1034, 237 (2004).
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H.: *J. Biol. Chem.* 226, 497 (1957).
- Hara A., Radin N.S.: *Anal. Biochem.* 90, 420 (1978).
- Komprda T., Zelenka J., Tieffová P., Štohandlová M., Foltýn J.: *Arch. Geflügelk.* 63, 36 (1999).
- Komprda T., Zelenka J., Fajmonová E., Fialová M., Kladroba D.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 6804 (2005).
- Omar T.A., Salimon J.: *J. Taibah Univ. Sci.* 7, 56 (2013).
- Komprda T., Zorníková G., Rozíková V., Borkovcová M., Przywarová A.: *J. Food Comp. Anal.* 32, 36 (2013).
- Čeřovský V.: *Chem. Listy* 108, 44 (2014).

17. Komprda T., Škultéty O., Křížková S., Zorníková G., Rozíková V., Krobot R.: *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* DOI: 10.1111/jpn.12221 (2014).

**T. Komprda, A. Ansorgová, V. Rozíková, and B. Němcová** (*Department of Food Technology, Mendel University, Brno*): **Chromatographic Determination of Polyunsaturated Fatty Acids in Selected Animal Tissues**

The objective of the study is to standardize GC determination of polyunsaturated fatty acids in animal tissues

by lipid extraction with a hexane/propan-2-ol mixture and subsequent derivatization with  $\text{CH}_3\text{ONa}/\text{BF}_3$ . The limits of detection and recoveries for 18:2n-6, 20:4n-6, 18:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3 fatty acids was in the range 0.32–0.42 mg/100 g, and 83–105 %, respectively. The content of physiologically important icosapentaenoic acid (EPA) in chicken breast meat, thigh meat, quail eggs and cricket nymphs was 3, 10, 51 and 21 mg/100 g of fresh matter ( $P < 0.05$ ). The EPA contents in livers of laboratory rats fed diets supplemented with palm oil, safflower oil and fish oil was 4, 3 and 342 mg/100 g, respectively ( $P < 0.05$ ).



## 67. Zjazd Chemikov 2015

7. 9. až 11. 9. 2015

Grand Hotel Bellevue, Starý Smokovec

<http://www.schems.sk/67zjazd/>  
e-mail: [zjazd.chemikov@gmail.com](mailto:zjazd.chemikov@gmail.com)

### Organizačný výbor:

Predseda: Dušan Velič  
Vedecký tajomník: Viktor Milata  
Vedecký tajomník: Jan John  
Výkonný tajomník: Monika Jerigová  
Hospodár: Zuzana Hloušková

### Sekcie:

1. Analytická a fyzikálna chémia
2. Anorganická a materiálová chémia
3. Organická chémia a polyméry
4. Vyučovanie a história chémie
5. Životné prostredie, potravinárstvo a biotechnológie
6. Chemprogress
7. Súťaž mladých – posterová sekcia

### Termíny:

Registrácia do 1. júna 2015  
Platba a abstrakt do 1. júna 2015