

# Stanovení monoacylglycerolů v reálných systémech

Bc. Ivana Andrlíková

---

Diplomová práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ivana Andrlíková**  
Osobní číslo: **T13396**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Stanovení monoacylglycerolů v reálných systémech**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši v oblasti přípravy MAG a jejich analýzy v reálných systémech
2. Připravte vysoce čisté MAG vybraných mastných kyselin
3. Okalibrujte HPLC systém
4. Použijte připravené MAG do potravinářských systémů
5. Proveďte izolaci MAG, navrhnete postup extrakce a pomocí HPLC stanovte "recovery"
6. Výsledky kriticky zhodnoťte a diskutujte

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

**O'BRIEN, Richard D.: Fats and oils: formulating and processing for applications. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c2004**

**BELITZ, H, W GROSCH a Peter SCHIEBERLE: Food chemistry. 4th rev. and extended ed. Berlin: Springer, c2009**

**STAMPFLI, L. a B. NERSTEN. Emulsifiers in bread making. Food Chemistry. 1995, vol. 52, issue 4**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

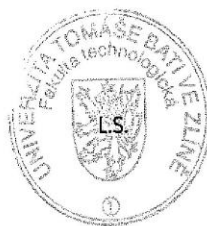
**20. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce:

**18. května 2015**

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
Ing. Martina Černeková, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: ANDRÁŠKOVÁ IVANA ..... Obor: TTDK .....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 13.5.2015 .....

 .....

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací;

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.



Ve Vlně, dne 2. 12. 2023

## **ABSTRAKT**

Cílem práce je navrhnout a ověřit metodiku stanovení monoacylglycerolů v reálných systémech. Parciální acylglyceroly připravené ve vysoké čistotě (99%) adicí mastné kyseliny na glycidol byly použity pro přípravu vzorků pečiva, ze kterých byly následně extrahovány ethanolem. Stanovení bylo provedeno pomocí kapalinové chromatografie na reverzní fázi isokratickou a gradientovou elucí pomocí UV a ELSD detekce.

Návratnost monoacylglycerolu kyseliny laurové ze vzorků připravených při teplotě 170 °C činila 79,3 % a u vzorků připravených při 70 °C byla zjištěna hodnota 80,7 %. V případě monoacylglycerolu kyseliny palmitové ze vzorků podrobených teplotě 170 °C byla „recovery“ 51,6 % a u teploty 70 °C toto bylo 91,1 %. Experimentálně bylo prokázáno, že rozdíl mezi původním a vyextrahovaným množstvím monoacylglycerolů lze přičíst jejich interakci se složkami oleje. Ze zjištěných hodnot dále vyplývá, že teplota má výraznější vliv na vznik interakcí mezi monoacylglycerolem kyseliny palmitové a olejem než v případě monoacylglycerolu kyseliny laurové.

Klíčová slova: Monoacylglyceroly, HPLC, extrakce, pečivo

## **ABSTRACT**

This thesis aims to create and test the methodology of monoacylglycerols determination in real systems. Partial acylglycerols were produced in a high purity (99 %) by addition of a fatty acid to glycidol and were used for preparation of pastry samples, from which they were then extracted. The determination was performed by the reversed phase liquid chromatography with an isocratic and gradient elution with UV and ELSD detectors.

The recovery of monoacylglyceride of lauric acid from samples prepared at temperature of 170°C was 79.3 % and a found value for samples prepared at the temperature of 70°C was 80.7 %. In case of monoacylglyceride of palmitic acid the recovery from samples subjected to the temperature of 170°C recovery 51.6 % and for the temperature of 70°C it was 91.1 %. Experimentally it has been demonstrated, that the difference between the original and the extracted amount of monoacylglycerides is caused by their interaction with compounds of oil. Detected values show, that the temperature has stronger impact on creation of interactions between monoacylglyceride of palmitic acid and oil than in case of monoacylglyceride of lauric acid.

Keywords: Monoacylglyceride, HPLC, extraction, pastry

Chci touto cestou poděkovat vedoucímu této práce panu doc. Ing. Rahulovi Janišovi CSc. za jeho cenné rady, odborné vedení a zájem v průběhu vypracovávání této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Evě Svobodové za ochotu a pomoc při práci v laboratoři.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.



# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>13</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>14</b>
<b>1 MONOACYLGLYCEROLY</b> .....	<b>15</b>
1.1 VLASTNOSTI MONOACYLGLYCEROLŮ.....	15
<b>2 VYUŽITÍ MONOACYLGLYCEROLŮ</b> .....	<b>17</b>
2.1 VYUŽITÍ MONOACYLGLYCEROLŮ V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU .....	17
2.1.1 Funkce emulgátorů v pekařství .....	17
2.1.1.1 Posilovače těst .....	18
2.1.1.2 Změkčovače střídy .....	18
2.1.1.3 Vliv monoacylglycerolů na hnětení těsta .....	19
2.1.1.4 Vliv monoacylglycerolů na kvalitu chleba .....	19
2.1.1.5 Vliv monoacylglycerolů na pevnost střídy .....	20
2.1.1.6 Tvorba komplexů s amylosou .....	20
2.2 VYUŽITÍ MONOACYLGLYCEROLŮ V KOSMETICE .....	21
2.2.1 Monoacylglyceroly jako součást kosmetických vehikul .....	21
2.2.2 Monoacylglyceroly jako lipofilní emolienty a oklusiva .....	21
<b>3 ANTIMIKROBNÍ ÚČINKY MONOACYLGLYCEROLŮ</b> .....	<b>23</b>
3.1 VLIV ALKOHOLU A MASTNÉ KYSELINY NA ANTIMIKROBNÍ ÚČINKY MONOACYLGLYCEROLŮ .....	23
3.1.1 Účinky na bakterie .....	23
3.1.2 Účinky na kvasinky a mikromycety .....	24
<b>4 VÝROBA MONOACYLGLYCEROLŮ</b> .....	<b>25</b>
4.1 GLYCEROLÝZA .....	25
4.2 PŘÍPRAVA Z GLYCIDOLU .....	26
4.3 ENZYMATICKÁ PŘÍPRAVA .....	27
<b>5 KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE</b> .....	<b>28</b>
5.1 DETEKTORY POUŽÍVANÉ V KAPALINOVÉ CHROMATOGRFII.....	28
5.1.1 Fotometrický detektor .....	29
5.1.2 Odpařovací detektor rozptylu světla .....	29
<b>6 MOŽNOSTI IZOLACE A ANALÝZY MAG OBSAŽENÝCH V     REÁLNÝCH SYSTÉMECH</b> .....	<b>31</b>

6.1	STANOVENÍ MAG TITRAČNÍ METODOU .....	31
6.2	STANOVENÍ MAG V POTRAVINÁCH KAPALINOVOU CHROMATOGRAPHIÍ .....	31
6.3	STANOVENÍ MAG V TUCÍCH PLYNOVOU CHROMATOGRAPHIÍ.....	32
6.4	IZOLACE A ANALÝZA MAG A MASTNÝCH KYSELIN Z KÝTY IBERSKÉHO PRASETE .....	32
6.5	IZOLACE A ANALÝZA MAG Z BRAMBOROVÉHO ČIPSU .....	33
6.6	IZOLACE A ANALÝZA MAG Z MOŘSKÉ HOUBY .....	34
6.7	IZOLACE MAG Z BOCHNÍKU CHLEBA A ZE SÁDLA .....	34
6.8	IZOLACE A ANALÝZA MAG Z BIODIESLU .....	35
6.9	ANALÝZA SMĚSI VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN A MONO-, DI- A TRIACYLGLYCEROLŮ .....	36
6.10	IZOLACE MONOACYLGLYCEROLU HEXADEKATRIENOVÉ KYSELINY Z LISTOVÉ RŮŽICE ŘEDKVE .....	36
6.11	IZOLACE MONOACYLGLYCEROLŮ Z CHALUHY <i>SARGASSUM SAGAMIANUM</i> .....	37
6.12	KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ MONO- A DIACYLGLYCEROLŮ V OLIVOVÉM OLEJI .....	37
6.13	ANALÝZA MONOACYLGLYCEROLŮ V KOKOSOVÉM OLEJI .....	39
6.14	SIMULTÁNNÍ STANOVENÍ GLYCEROLU MONO-, DI- A TRIACYLGLYCEROLŮ V METHYLESTERECH ROSTLINNÝCH OLEJŮ KAPILÁRNÍ PLYNOVOU CHROMATOGRAPHIÍ .....	40
<b>7</b>	<b>SHRNUTÍ TEORETICKÉ ČÁSTI.....</b>	<b>41</b>
<b>8</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>42</b>
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>44</b>
9.1	SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ A SUBSTANCÍCH .....	44
9.2	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ.....	45
9.3	PŘÍPRAVA MAG KYSELINY LAUROVÉ A PALMITOVÉ .....	47
9.3.1	Příprava monoacylglycerolu kyseliny laurové.....	47
9.3.2	Příprava monoacylglycerolu kyseliny palmitové.....	48
9.3.3	Purifikace vzniklých MAG .....	48
9.3.4	Stanovení stupně konverze připravovaných MAG .....	49
9.3.4.1	Příprava 0,1M ethanolického KOH .....	49
9.3.4.2	Příprava směsi xylen:ethanol (1:1) .....	49
9.3.5	Orientační stanovení čistoty produktů .....	49
9.3.5.1	Příprava chromatografické desky .....	50
9.3.5.2	Příprava vyvíjecí lázně pro TLC.....	50
9.3.5.3	TLC analýza.....	50
9.4	KALIBRACE KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU.....	50
9.4.1	Příprava kalibračních roztoků pro kalibraci UV detektoru .....	51
9.4.2	Příprava kalibračních roztoků pro kalibraci ELSD detektoru.....	51

9.4.3	Příprava mobilní fáze .....	51
9.4.4	Provedení kalibrace .....	51
9.5	PŘÍPRAVA REÁLNÝCH VZORKŮ PEČIVA PRO HPLC ANALÝZU.....	52
9.6	EXTRAKCE MAG ZE VZORKŮ .....	53
9.6.1	Stanovení počtu cyklů pro extrakci .....	53
9.6.2	Extrakce vzorků .....	53
9.7	ANALÝZA VZORKŮ .....	54
9.7.1	HPLC analýza pomocí UV detektoru .....	54
9.7.2	HPLC analýza pomocí ELSD detektoru .....	55
9.7.2.1	HPLC analýza pomocí ELSD detektoru – vzorky s MAG kyseliny laurové .....	55
9.7.2.2	HPLC analýza pomocí ELSD detektoru – vzorky s MAG kyseliny palmitové .....	55
9.8	STANOVENÍ ÚBYTKU MAG V DŮSLEDKU PEČENÍ .....	56
9.9	STANOVENÍ INTERAKCE MONOACYLGLYCEROLŮ S POUŽITÝM OLEJEM.....	56
9.10	ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ .....	57
<b>10</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>59</b>
10.1	PŘÍPRAVA MAG KYSELIN LAUROVÉ A PALMITOVÉ .....	59
10.2	STANOVENÍ STUPNĚ KONVERZE A TLC ANALÝZA PRODUKTŮ .....	59
10.2.1	Stanovení stupně konverze.....	60
10.2.2	Výsledky TLC analýzy .....	63
10.3	KALIBRACE KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU .....	63
10.3.1	Kalibrace UV detektoru .....	64
10.3.2	Kalibrace ELSD detektoru .....	66
10.4	STANOVENÍ POČTU CYKLŮ PRO EXTRAKCI.....	69
10.5	ANALÝZA VZORKŮ A STANOVENÍ „RECOVERY“ .....	69
10.5.1	Analýza vzorků pomocí UV detektoru .....	70
10.5.2	Analýza vzorků pomocí ELSD detektoru a stanovení „recovery“ .....	71
10.5.3	Analýza reálných vzorků s MAG kyseliny laurové a stanovení „recovery“ .....	71
10.5.3.1	Úbytek MAG kyseliny laurové během pečení.....	73
10.5.3.2	Interakce oleje s MAG kyseliny laurové .....	74
10.5.4	Analýza reálných vzorků s MAG kyseliny palmitové a stanovení „recovery“ .....	75
10.5.4.1	Úbytek MAG kyseliny palmitové během pečení.....	78
10.5.4.2	Interakce oleje s MAG kyseliny palmitové .....	78
10.5.5	Analýza reálných vzorků pečiva s obsahem MAG kyseliny laurové a MAG kyseliny palmitové připravených při teplotě 70 °C.....	80
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>82</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>84</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>91</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>92</b>

<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>95</b>
----------------------------	-----------

## ÚVOD

Monoacylglyceroly spolu s diacylglyceroly byly prvními emulgátory přidanými do potravin. Poprvé byly použity v margarínu pro plundrové a listové těsto. První patent týkající se monoacylglycerolů je z roku 1938 z USA a popisuje užitečnost surfaktantů v emulzích a margarínech. V roce 1933 byly poprvé použity v koláčích shorteningy s obsahem monoacylglycerolů a následně se začaly monoacylglyceroly používat i pro pečení chleba [1, s. 298].

Mono- a diacylglyceroly patří k nejrozšířenějším emulgátorům v potravinářství. Můžeme je nalézt např. v pekařských produktech, margarínech a mražených dezertech. Svě široké využití nalézají i v oblasti kosmetiky a farmacie [1, s. 148, 298].

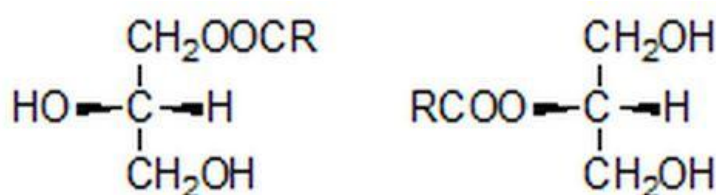
S využitím monoacylglycerolů je spjata i nutnost jejich stanovení v různých systémech, ve kterých se vyskytují, ať už z důvodů kontroly kvality nebo hygienických testů. Důležitým problémem při jejich stanovení je jejich izolace ze systémů. Každý systém se skládá z jiných komponent a není tak možné určit univerzální způsob izolace. Naopak samotná analýza nepředstavuje výrazný problém, lze pro ni využít např. kapalinovou, plynovou nebo gelovou permeační chromatografii.

Tato diplomová práce si klade za cíl připravit monoacylglyceroly o vysoké čistotě a pomocí nich okalibrovat HPLC systém. Dále vytvořit reálný vzorek pečiva, který bude přípravné monoacylglyceroly obsahovat a navrhnout způsob jejich extrakce a analýzy pomocí kapalinové chromatografie.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 MONOACYLGLYCEROLY

Monoacylglyceroly (MAG) jsou z chemického hlediska parciální estery glycerolu a mastných kyselin (Obr. 1). MAG tvoří nejpolárnější složku jednoduchých lipidů a nachází se v tucích a olejích rostlinného i živočišného původu. Často jsou v jejich molekule vázány mastné kyseliny nasycené (palmitová, stearová), ale mohou se vyskytovat i kyseliny nenasycené jako je kyselina olejová. Díky své amfipatické struktuře jsou MAG neionickými surfaktanty. Komerčně vyrobené systémy se skládají ze směsi mono- a/nebo diesterů glycerolu a malého množství triesterů [1, s. 147], [2, s. 884–890], [3], [4].



Obr. 1: Struktura molekuly monoacylglycerolu [3].

### 1.1 Vlastnosti monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly se mohou vyskytovat jako olejovité kapaliny v barvě od světle slámové po hnědou nebo jako voskovité pevné látky krémově bílé barvy. Pevné monoacylglyceroly se nachází ve formě vloček, prášku nebo malých kuliček [5, s. 40–58].

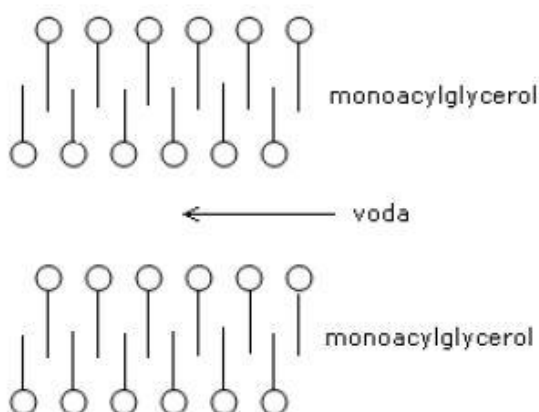
Podobně jako triacylglyceroly vykazují monoacylglyceroly vlastnosti polymorfních látek. Jsou schopny krystalizovat ve třech formách a to v  $\alpha$ ,  $\beta'$  a  $\beta$ . Forma  $\alpha$  vznikne, pokud dojde po roztavení MAG k jeho rychlému zchlazení. Ze všech tří forem je nejméně stabilní a postupně přechází přes  $\beta'$  na nejstabilnější formu  $\beta$  [5, s. 40–58], [6, s. 34–35], [7].

Monoacylglyceroly vykazují nízkou hodnotou HLB (nižší než 5). Díky tomuto jsou hůře rozpustné ve vodě a naopak se dobře rozpouštějí v tucích a olejích. Jako neionogenní emulgátory jsou schopny stabilizovat emulze typu v/o [5, s. 40–58], [6, s. 34–35], [7].

Emulgátor je povrchově aktivní látka, jejíž molekuly se skládají z části hydrofobní a z části hydrofilní. Na rozhraní fází se molekuly orientují tak, že hydrofobní část (řetězce mastných kyselin) směřují do hydrofobní fáze a hydrofilní části do fáze vodné. Tím vytvoří mezi fázemi orientovaný film, který usnadňuje dispergaci a stabilizuje disperzi [5, s. 40–58], [8, s. 157].

Rozpustnost MAGů je závislá na délce uhlovodíkového řetězce navázaného zbytků mastné kyseliny. Jelikož se jedná o nejpolárnější složky jednoduchých lipidů, jsou dobře rozpustné v polárních rozpouštědlech, jako je např. ethanol. Ve vodě jsou MAG nerozpustné [1, s. 147], [2, s. 884–890], [9, s. 41–42]

Mezi další vlastnosti MAG patří schopnost tvořit gel s lamelární strukturou, která je podobná dvojvrstvám lipidů (Obr. 2). Ke tvorbě gelu dochází po roztavení MAG, při jejich zahřívání nad bod tání, který je asi 80 °C [5, s. 40–58], [6, s. 34–35], [7].



Obr. 2: Struktura monoacylglycerolů ve vodě [6, s. 34–35].

Velikost vznikající dvojvrstvy je ovlivněna čistotou MAG. S rostoucím obsahem diacylglycerolů dochází ke snižování její tloušťky a pokud jsou přítomny triacylglyceroly, může dojít k jejímu zániku. K zániku dojde kvůli schopnosti monoacylglycerolů tvořit s triacylglyceroly emulze. Přídavkem ve vodě rozpustného tenzidu (zvláště anionického) lze dosáhnout zvětšení vzdálenosti dvojvrstev a k jejich stabilizaci [6, s. 34–35].



## 2 VYUŽITÍ MONOACYLGLYCEROLŮ

Monoacylglyceroly jsou klasifikovány jako neionické surfaktanty, z čehož plyne jejich využití. Používají se v řadě průmyslových odvětví, jako je například farmacie, kosmetický průmysl a především potravinářský průmysl [1, s. 147].

Monoacylglyceroly patří spolu s diacylglyceroly k nejpoužívanějším emulgátorům v potravinářství, tvoří asi 75 % celkové produkce potravinářských emulgátorů [10, s. 353–360], [11, s. 292–293], [2, s. 884–890].

### 2.1 Využití monoacylglycerolů v potravinářském průmyslu

V potravinářství jsou monoacylglyceroly používány především v pekařství, kde se využívají pro jejich schopnost posílit glutenové struktury výrobku a tím prodloužit jeho čerstvost. Dále se pak využívají při výrobě margarínů, cukrovinek a mléčných produktů. V potravinářském průmyslu jsou kladeny vysoké nároky na čistotu MAG. Přestože jde o přirozené deriváty tuků, je jejich množství regulováno (viz Tab. 1) [6, s. 33–34].

Tab. 1: Povolené množství monoacylglycerolů v potravinách [6, s. 33–34].

Název potraviny	Množství monoacylglycerolů
Piškoty, sušenky, suchary, obilné výrobky	5000 mg/kg
Neemulgované tuky a oleje (mimo olivového)	10000 mg/kg
Chléb	nezbytné množství
Kakao	nezbytné množství
Mléčná výživa určená k výživě kojenců	4000 mg/kg

#### 2.1.1 Funkce emulgátorů v pekařství

V pekařském průmyslu se setkáváme s důležitým problémem. Po upečení pečiva dochází k velice rychlému stárnutí výrobku – okorávání a tím ke zhoršení sensorických vlastností. Takový výrobek se pak stává neprodejný a dochází k ekonomickým ztrátám výrobce. Ztráty se pohybují v rozmezí asi 8 – 10 % z celkové produkce pečiva. Tento problém lze řešit přidávkem emulgátorů, mezi které patří i MAG [10, s. 353–360].

Mezi jejich schopnosti patří, že zlepšují [10, s. 353–360]:

- Hnětení těsta a jeho pevnost.
- Míru hydratace těsta a sorpci vody.
- Toleranci k delší době odležení a fermentace.
- Strukturu střídky (jasnost, velikost zrn, nadýchanost).
- Sílu kůrky.
- Životnost.
- V kombinaci s přidavkem shorteningů zvyšují objem těsta.

Emulgátory používané v pekařství se obecně dělí do dvou skupin: tzv. posilovače těst a změkčovače střídky. Avšak stejný emulgátor může vykazovat vlastnosti obou skupin [10, s. 353–360], [12, s. 266–279].

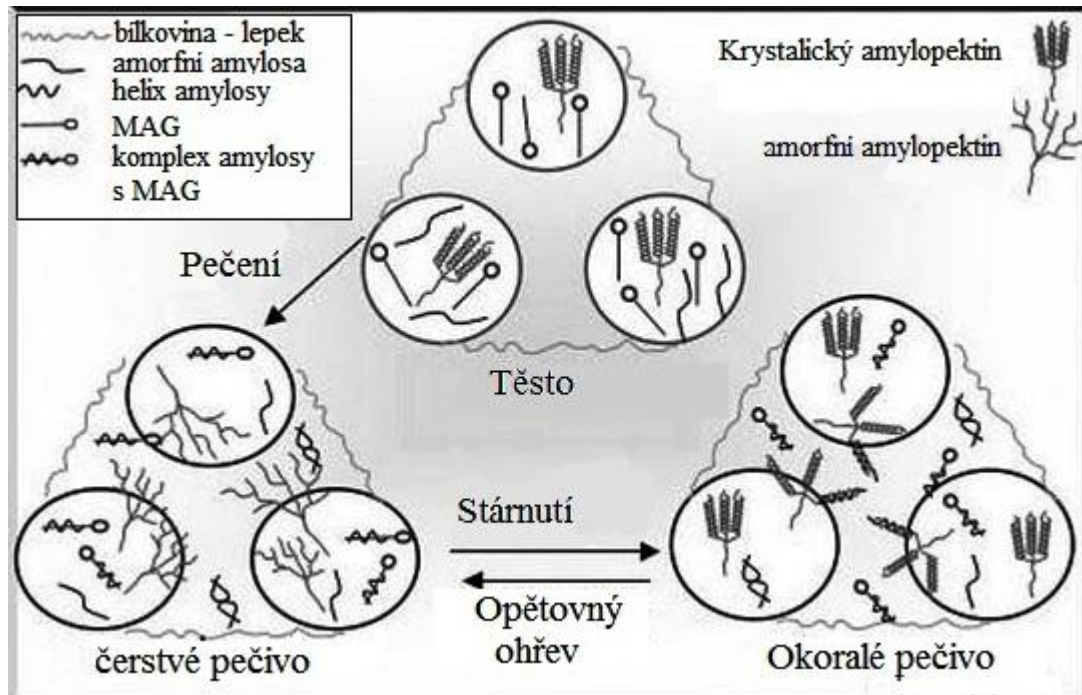
#### **2.1.1.1 Posilovače těst**

Při průmyslové výrobě chleba je předpoklad, že se těsto nebude lepit ke kovovým povrchům a bude odolné vůči vibračním a mechanickému namáhání. Pro zajištění těchto vlastností se právě používají emulgátory, tedy i MAG [10, s. 353–360], [12, s. 266–279].

Pro vysvětlení mechanismu působení emulgátorů na pevnost těsta existuje více teorií. Jedna z nich říká, že molekuly emulgátoru jsou schopny vytvořit kapalně lamelární struktury mezi glutenovými vlákny a škrobem. Tím zlepšují schopnost glutenu tvořit film, který udržuje v těstě plyn vyprodukovaný kvasinkami [10, s. 353–360], [12, s. 266–279].

#### **2.1.1.2 Změkčovače střídky**

Změkčovače střídky interagují se složkami mouky a pomáhají tak udržet střídku chleba déle měkkou a brání tak okorávání chleba (Obr. 3). Okorávání je způsobeno změnami ve frakcích škrobu. Mezi nejběžnější emulgátory používané pro změkčení střídky patří MAG [10, s. 353–360], [12, s. 266–279].



Obr. 3: Mechanismus pečení a stárnutí chleba [13, s. 48]

Monoacylglyceroly mají schopnost tvořit ve vodě nerozpustné komplexy s amylosou. Díky tomu se část amylosy, na kterou jsou navázány MAG, neúčastní tvorby gelu, který normálně škrob tvoří v těstě. Při chlazení tak amylosa navázaná v komplexech nerekrystalizuje a nepodílí se tak na okorávání chleba [10, s. 353–360].

### 2.1.1.3 Vliv monoacylglycerolů na hnětení těsta

Na hnětení těsta má typ a koncentrace použitého MAG významný vliv. Stejně tak ovlivňuje i energii potřebnou k hnětení [2, s. 884–890], [13, s. 145–150].

Při zvýšení koncentrace MAG dochází ke zvýšení doby hnětení. Obecně lze říct, že delší nasycený řetězec zbytku kyseliny v MAG (např. C16:0, C18:0, C20:0) má na dobu hnětení menší vliv, zatímco MAG s nenasyceným řetězcem (např. C18:2) má vliv výrazný [2, s. 884–890], [13, s. 145–150].

### 2.1.1.4 Vliv monoacylglycerolů na kvalitu chleba

Monoacylglyceroly jsou schopné ovlivnit kvalitu a objem bochníku chleba. Tato jejich vlastnost je však závislá na řetězci mastné kyseliny, kterou MAG obsahuje. MAG obsahující kyselinu s nasyceným řetězcem mají na objem bochníku chleba výrazný pozitivní vliv. Naopak, pokud je řetězec kyseliny v MAG nenasycený, je tento vliv nepodstatný. Celkové

působení MAG je však ovlivněno samotným procesem pečení [2, s. 884–890], [13, s. 145–150].

Pozitivní vliv MAG na objem bochníku je nejspíše způsoben jejich schopností chovat se jako náhrady shorteningů. Toto vede ke zlepšeným manipulačním vlastnostem a zlepšení stability plynových buněk během pečení [2, s. 884–890], [13, s. 145–150].

#### **2.1.1.5 Vliv monoacylglycerolů na pevnost střídy**

Monoacylglyceroly ovlivňují i pevnost střídy pečiva. Obecně lze říct, že typ MAG a jeho koncentrace může silně ovlivnit pevnost střídy i délku doby, za kterou dojde během skladování k navýšení její pevnosti. Monoacylglyceroly působí hlavně tak, že zpomalují tvrdnutí střídy. To, jak MAG ovlivní počáteční pevnost střídy, závisí hlavně na povaze MAG (nasycenost uhlovodíkového řetězce, poloha dvojných vazeb). Na funkci MAG má ale také velký vliv samotný výrobní proces výrobku a způsob pečení [2, s. 884–890], [13, s. 145–150].

U MAG s krátkým a polynenasyceným řetězcem bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací se významně zvyšuje pevnost střídy. U MAG s nasyceným řetězcem o délce C14:0 a C22:0 nebyl tento vliv velmi výrazný, avšak MAG s řetězcem C16:0 a C18:0 snižovaly tvrdost střídy velmi výrazně. Nejvýraznější vliv byl zjištěn u 1-monopalmitoylglycerolu (CAS 542-44-9) (C16:0) [2, s. 884–890], [13, s. 145–150].

#### **2.1.1.6 Tvorba komplexů s amylosou**

Prodloužení měkkosti střídy chleba je zapříčiněno komplexy, které jsou tvořeny mezi MAG a amylosou. Při přípravě těsta škrobová zrna botnají a amyulóza přechází z původně krystalického stavu do stavu amorfního. Během pečení toto botnání pokračuje, amorfní stav amylózy přechází do roztoku a dochází ke změně uspořádání amylopektinu z krystalického stavu do gelu. Při následném chlazení amyulóza opět přechází do krystalického stavu. Pokud je však do těsta přidán MAG, dojde k vytvoření komplexu mezi MAG a amylosou a tím se zabrání tvrdnutí chleba. Uspořádání komplexu je takové, že kolem hydrofobní části MAG se vytváří krystalická struktury amylózy (šroubovice) [6, s. 35].

Vlastnosti vzniklých komplexů jsou závislé na délce a na nasycenosti/nenasycenosti řetězce zbytku navázané mastné kyseliny v MAG. Na stabilitu komplexů mají vliv různé látky. Chaotropní anionty, např. thiokyanatan, strukturu komplexů destabilizují. Naopak na jejich

stabilizaci mají dobrý vliv anionty s vysokým Hofmeisterovým číslem a vápenaté ionty v nízké koncentraci. Oproti tomu vysoké koncentrace vápenatých iontů mají na komplexy destabilizující vliv. Dále mohou mít na stabilitu určitý vliv močovina, glycerol, hořečnaté kationty a síranové anionty [50, s. 61–71], [15, s. 95–101].

## **2.2 Využití monoacylglycerolů v kosmetice**

Monoacylglyceroly nacházejí své uplatnění i v kosmetickém průmyslu. Jsou schopny ovlivňovat funkce používaných tenzidů a kůži poskytují různé benefity. Příklady jejich využití jsou v následujících kapitolách.

### **2.2.1 Monoacylglyceroly jako součást kosmetických vehikul**

Prvním příkladem je použití MAG do kosmetických vehikul. Pokud jsou dispergované ve vodě a je v systému přítomen surfaktant s vysokou hodnotou HLB, tvoří MAG lamelární fázi. Za zvýšených teplot dochází k jejímu botnání a to má za následek schopnost zadržovat v lamelární fázi velké množství vody. Po snížení teploty se vytvoří lamelární krystalový gel, který je schopen stabilizovat krémy a lotiony a má vliv na jejich konzistenci [16, s. 115–116].

### **2.2.2 Monoacylglyceroly jako lipofilní emolienty a oklusiva**

Dále mají MAG schopnost zlepšovat stav pokožky a zmenšovat její odmašťování, které je způsobeno používáním čističů na bázi surfaktantů, a mohou zlepšovat kompatibilitu kůže a použitých surfaktantů. Některé MAG jsou přirozenou součástí kožních lipidů. Mezi takové patří např. monoacylglyceroly kyseliny stearové, palmitové nebo laurové. Při mytí kůže produktem obsahujícím tyto MAG dochází k jejich naadsorbování na kůži. Pokud se používají ve směsích s pěnotvornými surfaktanty, zlepšují kvalitu pěny (velikost bublin, krémovitost, stabilitu pěny) [17, s. 251–252].

Jejich etoxylované deriváty jsou schopny dodávat kůži lipidy (míra závisí na délce řetězce a stupni etoxylace), působí jako antiiritační a zklidňující činidla a poskytují pěnám klouzavost. Jeden z nejvyužívanějších je PEG–7 glycerylkokoát. Mezi jeho vlastnosti patří snižování iritace anionických surfaktantů s minimálním vlivem na jejich schopnost pění. Pokud mají etoxylované deriváty delší uhlíkatý řetězec, poskytují kůži hladkost [17, s. 251–252].

Dále se mohou monoacylglyceroly používat do mýdel a syndetů, kde snižují iritaci pokožky [18, s. 279–280].

### 3 ANTIMIKROBNÍ ÚČINKY MONOACYLGLYCEROLŮ

Mastné kyseliny samotné vykazují antimikrobní účinky a stejně je tomu tak i u některých jejich esterů, tedy i u MAG. Tyto účinky jsou ovlivněny alkoholem, který byl použit k esterifikaci mastné kyseliny [19, s. 332–333].

#### 3.1 Vliv alkoholu a mastné kyseliny na antimikrobní účinky monoacylglycerolů

Při použití jednofunkčního alkoholu, jako je např. methanol, bylo zjištěno, že vzniklé estery jsou neúčinné. Aby měly estery antimikrobní účinky, je třeba použít alkohol s více funkčními skupinami, jako je např. glycerol. Vzniklé MAG mají volné hydroxylové skupiny, které jsou pro antimikrobní působení důležité. Antimikrobní působení MAG je tak výraznější než působení samotných kyselin [19, s. 332–333].

Kromě alkoholu má vliv na antimikrobní působení MAG i struktura mastné kyseliny. Mastné kyseliny s kratším řetězcem mají efekt na grampozitivní bakterie. Největší antimikrobní účinky z kyselin s nasyceným řetězcem má kyselina laurová, s nenasyceným kyselina palmitoolejová a s polynenasyceným řetězcem kyselina linolová. Pozice dvojných vazeb a jejich počet je důležitější pro kyseliny s dlouhým řetězcem (více jak C12) a *cis* forma je na rozdíl od formy *trans* aktivní. Na kvasinky působí jen kyseliny s řetězcem obsahujícím 10 až 12 uhlíků [19, s. 332–333].

Bylo zjištěno, že polymery, jako je např. škrob a proteiny, mají na antimikrobní účinky MAG neutralizující účinky. Dále se v různých studiích uvádí, že více účinné jsou MAG s kratším řetězcem a vůbec nejúčinnější je MAG kyseliny laurové [19, s. 332–333], [20, s. 3488–3495], [21, s. 5507–5515].

Mezi další vlivy působící na antimikrobní vlastnosti MAG patří teplota, chelatační činidla nebo přítomnost kyselin. Všechny tyto vlivy zvyšují antimikrobní účinky MAG [21, s. 5507–5515], [22, s. 63–74].

##### 3.1.1 Účinky na bakterie

Monoacylglyceroly působí jak na bakterie grampozitivní, tak i na bakterie s gramnegativním typem buněčné stěny [23, s. 359–366], [24, s. 329–331].

Na grampozitivní bakterie působí především MAG obsahující mastnou kyselinu s nasyceným řetězcem se střední délkou a sudým počtem uhlíkových atomů. Mezi nejstudovanější patří MAG kyseliny laurové a kaprinové. Tyto MAG působí například na *Streptococcus pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*. Dále působí MAG např. proti patogenním listeriím a na sporulující mikroorganismy jako je např. *Bacillus cereus* [25, s. 12–15].

Gramnegativní bakterie vykazují vyšší odolnost vůči antimikrobiálnímu působení MAG. Důvodem je odlišná stavba buněčné stěny oproti grampozitivním bakteriím. Bylo zjištěno, že na gramnegativní bakterie působí inhibičně MAG kyselin laurové, myristové a palmitové. Na různé bakterie působí však různě. Např. zatím co na *E. coli* mají výrazný vliv, na *Salmonella* ssp. je tento vliv mírnější [25, s. 12–15].

### 3.1.2 Účinky na kvasinky a mikromycety

Antimikrobní účinek MAG byl prokázán i na kvasinky a mikromycety. Výrazný inhibiční vliv byl prokázán u MAG kyseliny kaprinové, která působí např. na kvasinku *Candida albicans* a na plísně rodu *Penicillium* [24, s. 329–331]. Dále bylo ve výzkumu Buňkové a spol. (2010) [26, s. 173–179] prokázáno, že aplikace roztoků MAG na povrch čerstvého chleba dokáže potlačit růst mikromycet minimálně po dobu dvou týdnů.

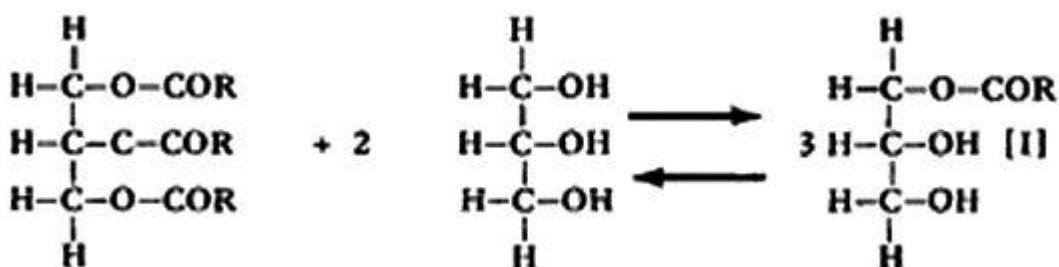


## 4 VÝROBA MONOACYLGLYCEROLŮ

Nejčastěji použitá metoda pro výrobu MAG je glycerolýza triacylglycerolů z tuků a olejů. Mezi další používanou reakcí je příprava 1-monoacylglycerolů z glycidolu.

### 4.1 Glycerolýza

Při glycerolýze (Obr. 4) jsou tuky a oleje za teploty 200–250 °C a přítomnosti alkalického katalyzátoru NaOH nebo Ca(OH)<sub>2</sub> smíchány s přebytkem glycerolu. Tato směs je udržována při vysoké teplotě, než se radikály mastných kyselin z triacylglycerolů náhodně rozdělí na volné hydroxylové skupiny glycerolu [1, s. 147], [27, s. 872–873], [28, s. 145–198].



Obr. 4: Výroba MAG glycerolýzou [27, s. 419-425].

Po dosažení rovnováhy se reakční směs zchladí a katalyzátor se deaktivuje. K deaktivaci katalyzátoru se často používá kyselina fosforečná a vznikají fosforečné soli. Ty lze ze směsi odstranit filtrací. Dále se musí odstranit přebytek glycerolu. Část se po ochlazení směsi usadí ve spodní vrstvě a může tak být odstraněna dekantací. Glycerol, který zůstane rozpůlen ve směsi, se odstraní vakuovou destilací vodní parou [1, s. 147].

Tímto procesem vznikne podstatné množství MAG a dále menší množství diacylglycerolů (DAG), triacylglycerolů s přestavěnou strukturou a volný glycerol. Množství vznikajících MAG lze ovlivnit poměry reaktantů, teplotou, dobou reakce a použitým katalyzátorem. Většinou vznikne 50 % MAG, 40 % DAG a 10 % triacylglycerolů. Převážná část vzniklých MAG (85 %) má esterifikovaný α uhlík glycerolu [1, s. 147].

Mezi výhody této metody patří [1, s. 147]:

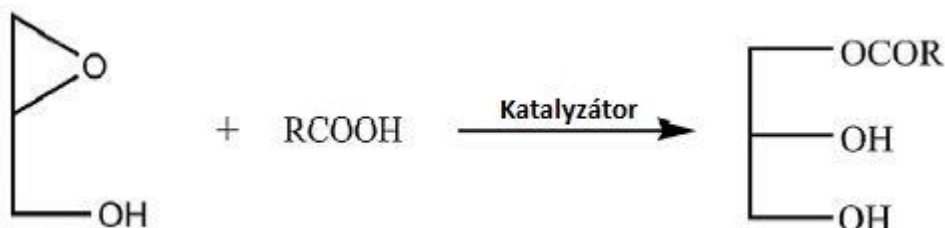
- Možnost využít odpadní tuky.
- Nižší ekonomická náročnost.

Nevýhodami této metody jsou [1, s. 147]:

- Neselektivita reakce.
- Vznik směsi MAG, DAG, triacylglycerolů a mastných kyselin → nutnost další purifikace
- Nutnost vysoké teploty → vznik degradačních produktů tuků

## 4.2 Příprava z glycidolu

Principem přípravy monoacylglycerolů z glycidolu (zjednodušené schéma na Obr. 5) je nukleofilní adice mastné kyseliny na velmi reaktivní glycidol (oxiranylmethanol, CAS 566-52-5), při které dochází k otevření epoxidového kruhu glycidolu. Reakce je katalyzovaná organickými bázemi jako jsou např. aminy nebo amoniové soli, přičemž aminoskupiny jsou pro následné lehčí odstranění katalyzátoru imobilizovány [30, s. 97–107], [31, s. 351–354], [32, s. 199–209].



Obr. 5: Příprava 1-monoacylglycerolů z glycidolu [30, s. 97–107].

Výhody metody spočívají [31, s. 351–354]:

- Mírné reakční podmínky.
- Krátký reakční čas.
- Možnost přípravy MAG z jakékoli kyseliny.
- Vznik čistých produktů (stupeň konverze více jak 90 %).

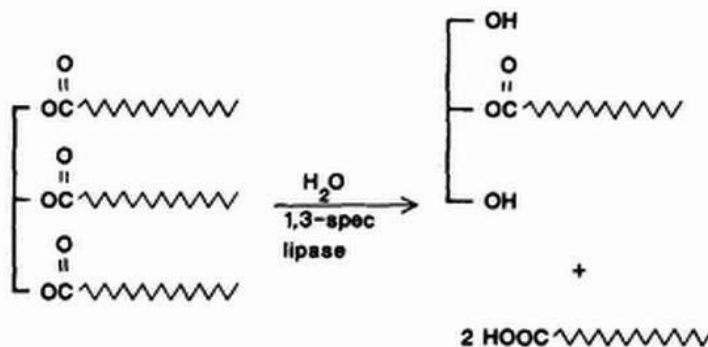
Mezi nevýhody patří [31, s. 351–354]:

- Nutnost odstraňování toxického glycidolu.
- Přítomnost chromu v katalyzátoru.

Nevýhody této metody lze však jednoduše odstranit. Glycidol je možné na konci reakce přeměnit na již netoxický glycerol (v prostředí za přítomnosti vody se glycidol přeměňuje na glycerol). Přítomnost chromu by se mohla zdát důležitým problémem pro následné použití připraveného MAG v potravinářství. Avšak chrom se zde nachází ve formě  $\text{Cr}^{3+}$ , jedná se tedy o biogenní prvek. Dále je odstraňován při purifikaci produktu a jeho množství je v reakci tak i v systému do kterého je následně MAG použit nevýznamné.

### 4.3 Enzymatická příprava

Enzymově katalyzovaná příprava MAG (Obr. 6) má asi 80 % výtěžnost. Reakce probíhá v mikroemulzi bez kosurfaktantu [33, s. 1544–1548].



Obr. 6: Enzymatická výroba MAG [33, s. 1544-1548].

Mikroemulze jako reakční medium zmenšuje problém s rozpustností triacylglycerolů a dalších lipofilních složek. Typ vzniklého MAG závisí na specifitě lipázy, např. použitím 1,3–specifické lipázy dojde k odštěpení mastné kyseliny z glycerolu z polohy 1 a 3 a vzniká tak 2–monoacylglycerol. Vysokou glycerolytickou aktivitu mají např. lipázy *Pseudomonas fluorescens* a *Chromobacterium viscosum*. Optimální teplota reakce je 35 °C a doba 3 hodiny [33, s. 1544–1548], [34, s. 808–834].

Výhody enzymatické přípravy spočívají v [33, s. 1544–1548]:

- Jedná se o ekologický způsob.
- Mírné reakční podmínky.

Mezi nevýhody patří hlavně [33, s. 1544–1548]:

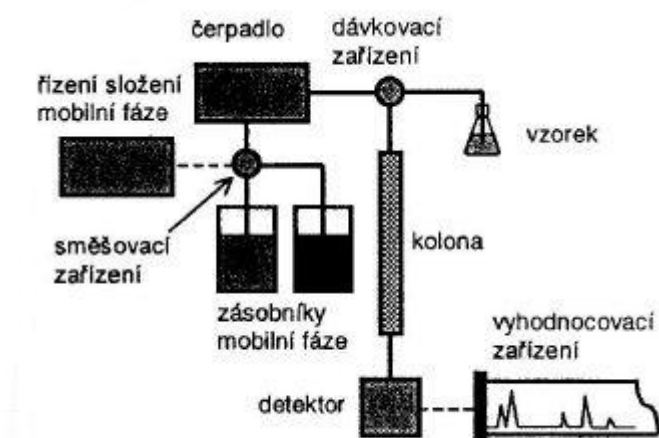
- Ekonomická náročnost.
- Možnost hydrolýzy (při vyšším obsahu vody, než je optimum).

## 5 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Chromatografie je separační metoda sloužící ke kvalitativní a kvantitativní analýze. Vzorek (analyt) se nanáší mezi dvě nemísitelné fáze: stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou). Mobilní fází je analyt unášen přes stacionární fázi, která zachycuje jeho složky a zdržuje je při pohybu. Nejvíce zdržovány jsou ty, které mají největší afinitu ke stacionární fázi. Tím dochází k separaci složek vzorku [35, s. 10–26].

V kapalinové chromatografii je jako mobilní fáze použita kapalina, která má i výrazný vliv na separaci. Analyzovaný vzorek se tedy rozděluje mezi stacionární i mobilní fázi. Při této metodě se mohou využívat všechny možné mechanismy separace (adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii) [35, s. 10–26].

Kapalinový chromatograf (Obr. 7) je modulární povahy a skládá se z několika základních částí: čerpadla, směšovacího zařízení, dávkovacího zařízení a kolony. Každá tato část má svou specifickou funkci [35, s. 10–26].



Obr. 7: Kapalinový chromatograf – schéma [35, s. 10–26].

### 5.1 Detektory používané v kapalinové chromatografii

Používané detektory musí být takové, aby byly selektivní pro analyt a málo citlivé pro mobilní fázi. Mezi používané detektory patří např. [35, s. 10–26]:

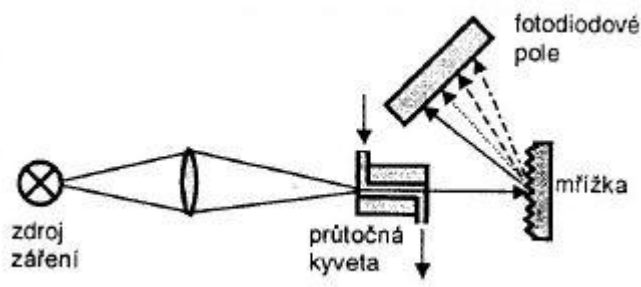
- Fotometrický.
- Refraktometrický.

- Fluorescenční.
- Hmotnostní.
- Elektrochemické.

Přičemž mezi nejpoužívanější patří fotometrický, refraktometrický a fluorescenční [35, s. 10–26].

### 5.1.1 Fotometrický detektor

Tento detektor patří mezi nejběžněji užívané detektory. Je založen na měření absorbance eluátu vycházejícího z kolony. Aby byl optimálně citlivý, je potřeba zajištění dostatečné absorpční dráhy kyvety, kterou paprsek prochází. Fotometrické detektory mohou být jednodušší, které zvládnou měřit ve vlnové délce ultrafialové oblasti nebo složitější, kde je možnost nastavení vlnové délky monochromátorem. Dále jsou takové, které jsou schopny měřit pomocí diodového pole (Obr. 8) absorpční spektrum v určité oblasti vlnových délek a uložit jej. Citlivost fotometrických detektorů je závislá na velikosti molárního absorpčního koeficientu měřené látky [35, s. 10–26].



Obr. 8: Fotometrický detektor s diodovým polem [35, s. 10–26].

### 5.1.2 Odpařovací detektor rozptylu světla

Odpařovací detektor rozptylu světla ELSD ( Evaporative Light Scattering Detector) je dalším detektorem používaným v kapalinové chromatografii. Slouží k detekci látek neobsahující ve své molekule chromofor nebo fluorofor. Jeho nespornou výhodou je jeho univerzálnost [36].

Při vstupu eluentu dojde ve zmlžovači k jeho zmlžení inertním plynem (dusíkem). Zmlžený eluent vstoupí do evaporační komůrky, ve které dojde k odpaření mobilní fáze a vytvoření částic méně těkavé rozpuštěné látky. Ve zmlžovači dojde dále ke kondenzaci eluentu

a ten je následně odveden odpadním výfukem. Proto je zapotřebí využívat mobilní fáze s obsahem těkavých složek (např. kyselina octová, octan amonný). V optické komůrce dojde k rozptylu světla na částicích rozpuštěné látky. Fotodetektor dává následně odezvu, která je přímo úměrná hmotě rozpuštěné látky procházející optickým paprskem [36].

## 6 MOŽNOSTI IZOLACE A ANALÝZY MAG OBSAŽENÝCH V REÁLNÝCH SYSTÉMECH

Analýza samotných MAG nepředstavuje významný problém. Mezi používané metody patří např. titrační metody, analýza kapalinovou chromatografií na reverzní fázi nebo plynovou chromatografií.

Významný problém představuje samotná izolace MAG z reálných systémů. Např. pro izolaci MAG z masa a pečiva nelze využít stejné metody. Tyto metody jsou dále popsány. Dále se při izolaci můžeme setkat s tím, že některé složky systému mohou s MAG interferovat.

### 6.1 Stanovení MAG titrační metodou

Jednou z nejstarších metod je metoda založená na jodometrické titraci. Vzorky jsou kvantitativně oxidovány přebytkem kyseliny jodisté za vzniku formaldehydu a následně jsou podrobeny jodometrické titraci. [37, s. 3758–3766].

Výhody této metody jsou reprodukovatelnost a relativní přesnost, ale mezi její nevýhody patří [37, s. 3758–3766]:

- Pracnost.
- Přítomnost volného glycerolu, který, pokud není vyextrahován vodou nebo solným roztokem, může zasahovat do reakce.
- Potřebnost velkého množství roztoků a toxických reagentů.
- Využitelnost jen pro 1–monoacylglyceroly.

### 6.2 Stanovení MAG v potravinách kapalinovou chromatografií

Suman [37, s. 3758–3766] a spol. provedli analýzu MAG ve vzorcích typu margarín a komplexních potravinách, jako jsou např. koláčky.

Sumanova izolace probíhala tak, že vzorky typu margarín byly po homogenizaci mixérem rozpuštěny v butanolu a roztok byl následně vložen do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok zředěn methanolem a přefiltrován. Před samotnou analýzou byl vzorek ještě přefiltrován přes stříkačkový filtr.

U komplexních potravin musel nejdříve Suman zajistit úplné oddělení MAG od škrobové matrix. To bylo provedeno tak, že byl vzorek dispergován v roztoku vody a  $\alpha$ -amylázy, do kterého byl poté přidán enzym papain. Směs byla zahřívána 30 minut ve vodní lázni o teplotě 60 °C a poté dalších 30 minut při teplotě 70 °C. Následně byla směs přefiltrována, promyta horkou vodou a při pokojové teplotě vysušena.

Takto připravený a vysušený vzorek byl podroben soxhletově extrakci diethyl etherem, odpařen na rotační odparce a znovu rozpuštěn v methanolu [37, s. 3758–3766].

Suman pro analýzu použil kapalinovou chromatografii na reverzní fázi s mobilní fází methanolem s průtokem 0,2 ml/min. Pro detekci byla použita hmotnostní spektrometrie s iontovou pastí [37, s. 3758–3766].

### **6.3 Stanovení MAG v tucích plynovou chromatografií**

Tato metoda pro stanovení monoacylglycerolů v tucích a jejich derivátech byla vyvinuta Joint Committee for the Analysis of Fats, Oils, Fatty Products, Related Products and Raw Materials a je aplikovatelná pro monoacylglyceroly s kyselinami C6–C22 s obsahem větším jak 1 %. Výsledkem je obsah MAG v g/100g [38, s. 532–532].

Principem metody je acetylace vzorku anhydridem kyseliny octové s následnou plynovou chromatografií s použitím vnitřního standardu methyl stearátu. Injektovaný objem vzorku je 1  $\mu$ l a průtok plynu (helium) je 3 ml/min [38, s. 532–532].

### **6.4 Izolace a analýza MAG a mastných kyselin z kýty iberského prasete**

Příprava vzorků proběhla tak, že byly vzorky podkožního tuku z kýty rozpuštěny v mikrovlnné troubě (3 minuty, 360 W) a následně okamžitě filtrovány přes filtrační papír [39, s. 10953–10961].

Pro izolaci volných mastných kyselin a mono- a diacylglycerolů, které tvoří polární frakce tuku, použil Natváez–Rivas a spol. [39, s. 10953–10961] extrakci na pevné fázi. Extrakční kolona byla umístěna do vakua a byla promyta n–hexanem. Po promytí bylo ihned zvýšeno vakuum, aby se zabránilo vyschnutí kolony. Jako standard, který byl tak jako vzorek tuku rozpuštěn v n-hexanu, byl použit 1,3–ditetradecanoylglycerol (CAS 7770-094), který se následně spolu se vzorkem aplikoval na kolonu. Rozpouštědlo kolonou protéklo a zanechalo v ní standart a vzorek.



Natváez–Rivas následně kolonu promyl směsí hexan–methylen, chlorid–ethylu a etheru v poměru 89:10:1 a byla odebrána první frakce. Dále byla kolona promyta směsí chloroform-methanol v poměru 2:1 a byla odebrána druhá frakce. Tato frakce byla odpařena na rotační odparce pod sníženým tlakem a zbytek byl smíšen s 200  $\mu$ l silylačního činidla a 15 minut ponechán při pokojové teplotě.

Jeden mikrolitr silylované frakce byl následně vstříknut do plynového chromatografu, který byl vybaven split\splitless injektorem a plamenově ionizačním detektorem. Byla použita křemenná kapilára a automatický injektor. Jako nosný plyn byl použit vodík s konstantním průtokem 4 ml/min. Teplota injektoru byla 300 °C a dělicí poměr byl 1:40. Pro kvantifikaci byla použita metoda vnitřního standardu.

## 6.5 Izolace a analýza MAG z bramborového čipsu

Neff a spol. [40, s. 785–791] analyzovaly MAG z bramborového čipsu a jako izolační metodu použily superkritickou extrakci oxidem uhličitým a extrakci hexanem.

Prvním krokem experimentu byla příprava samotného bramborového čipsu fritováním při teplotě 190 °C po dobu 20 hodin. Během fritování byly odebírány vzorky čipsů.

Jako první extrakční metodu použil Neff superkritickou extrakci oxidem uhličitým. Vzorky bramborového čipsu byly smíchány s činidlem Leco–Dry od firmy Leco Corporation a byly vloženy do extrakčních komor obsahujících ve spodní části filtr ze skleněných vláken. Komory byly doplněny činidlem a na vrchní část komory byl umístěn další filtr ze skleněných vláken. Extrakce byla provedena při tlaku 68,9 MPa, teplotě 70 °C, průtokem 2 ml/min po dobu 45 minut po počáteční minutové výdrži. Další použitá extrakční metoda byla extrakce hexanem. Kdy jednotlivé vzorky byly za teploty 69 °C extrahovány hexanem na Soxhletově aparatuře.

Vzorky z extrakcí byly následně výše uvedeným autorem podrobeny analýze. Pro analýzu monoacylglycerolů byla použita gelová permeační chromatografie. Ta se skládala ze tří válců v sérii naplněných PL–gelem. Jako detektor byl použit odpařovací detektor rozptylu světla.

Porovnáním superkritické extrakce a extrakce hexanem Neff zjistil, že superkritická extrakce by mohla extrakci hexanem nahradit. Je pro ni zapotřebí menšího množství vzorku,

je méně časově náročná a není potřeba po extrakci odstraňovat rozpouštědlo. Superkritická extrakce je také bezpečnější a ekologičtější než extrakce hexanem.

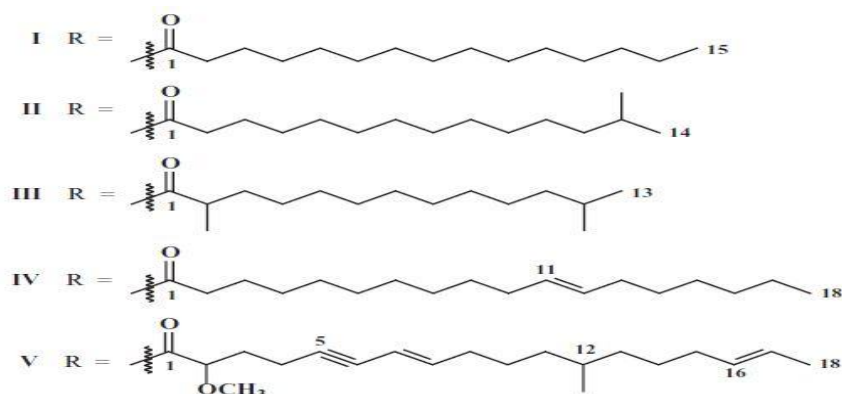
## 6.6 Izolace a analýza MAG z mořské houby

Extrakci methanolem využil ve svém experimentu Gil a spol. [41, s. 1264–1270]. Před samotnou extrakcí byla analyzovaná mořská houba nejprve zmrazena. Samotná extrakce methanolem však probíhala za pokojové teploty.

Dalším krokem bylo rozdělení frakce rozpustné v methanolu mezi vodu a dichlormethan. Dichlormethanová vrstva byla následně rozdělena mezi vodný roztok methanolu a n-hexan, čímž byly získány dvě frakce.

Frakce vodného roztoku methanolu Gill dále podrobil gradientové kolonové chromatografii na reverzní fázi a bylo získáno 20 frakcí. Každá získaná frakce byla dále čištěna pomocí kapalinové chromatografie na reverzní fázi a bylo vyizolováno 5 různých monoacylglycerolů s unikátní strukturou (Obr. 9).

Pro analýzu použil autor metodu bombardování rychlými atomy s hmotnostním spektrometrem (FAB-MS). Vzorčky byly rozpuštěny v methanolu a smíchány s 3-nitrobenzyl alkoholem.



Obr. 9: MAG vyizolované z mořské houby [41, s. 1264–1270].

## 6.7 Izolace MAG z bochníku chleba a ze sádla

Khurt a spol. [42, s. 261–270] využil k izolaci monoacylglycerolů z chleba a sádla metodu skládající se pouze z extrakce rozpouštědlem a krystalizace.

Lipidy byly odstraněny mícháním s velkým množstvím teplého petroletheru. Vyextrahovaný tuk byl dále upraven acetonem, čímž byly odstraněny fosfolipidy. Po odstranění acetonu rozpustil Khurt tuk v ethyletheru a promyl jej destilovanou vodou. Promývání bylo prováděno do doby, než se přestala tvořit emulze. Následovalo vysušení síranem sodným a odstranění rozpouštědla. Tímto byly odstraněny složky s vyšší polaritou než monoacylglyceroly.

Dalším autorovým krokem bylo míchání s teplým methanolem a následná dekantace rozpouštědla. Následně bylo provedeno další míchání s methanolem ve spojení s centrifugací. Odstranění rozpouštědla bylo provedeno pod vakuem. Tímto došlo ke zkoncentrování všech MAGů v methanolové frakci.

V methanolové frakci však zůstali i další složky, jako jsou diacylglyceroly, mastné kyseliny a tokoferoly. Proto bylo dalším krokem rozpuštění methanolové frakce v methanolu a naředění vodou tak, aby vznikl 70% methanolový roztok. Monoacylglyceroly zůstaly v tomto roztoku rozpuštěny téměř v čisté formě. Identifikace monoacylglycerolů byla provedena pomocí saponifikace, infračervené spektroskopie a protiproudou distribucí.

## 6.8 Izolace a analýza MAG z biodieslu

Monoacylglyceroly mají spolu s di- a triacylglyceroly vliv na kvalitu biodieslu. Proto je důležité umět stanovit jejich obsah [43, s. 576–582].

Bondioli a spol. [43, s. 576–582] provedl analýzu pomocí acetylace vzorku. Acetylační činidlo bylo připraveno z ethylacetátu, anhydridu kyseliny octové, destilované vody a N-methylimidazolu. Dále byl připravený vnitřní standard tak, že navážené množství standardu bylo rozpuštěno v tetrahydrofuranu. Příprava samotného vzorku proběhla tak, že byl vzorek smíchán se standardem, proudem dusíku bylo odstraněno rozpouštědlo a nakonec bylo přidáno acetylační činidlo. Tato směs byla následně zahřívána 15 minut při 80 °C.

Purifikace byla provedena pomocí extrakce na pevné fázi (SPE). Tomu předcházelo odstranění těkavých frakcí dusíkem. Netěkavé reagenty, jako jsou anhydrid kyseliny octové a N-methylimidazol, byly odstraněny pomocí hexanu. Následně byla kondicionována náplň kolony pro SPE pomocí směsi hexanu a diethyl etheru. Po kondiciaci byl na kolonu vlit vzorek a pomocí směsi hexanu a diethyl etheru byla jímána první frakce. Následně byla kolona promyta diethyl etherem a byla jímána druhá frakce obsahující acylglyceroly. Po-

mocí vakuové odparky byla z obou frakcí po extrakci odstraněna rozpouštědla a bylo provedeno jejich opětovné rozpuštění v heptanu [43, s. 576–582].

Pro analýzu frakcí Bondioli použil plynovou chromatografii s nosným plynem heliem a plamenově ionizačním detektorem a bylo využito teplotního gradientu. Na vzniklém chromatogramu byly zřetelně vidět píky monoacylglycerolů C16:0, C18:0 a C18:1.

## **6.9 Analýza směsi volných mastných kyselin a mono-, di- a triacylglycerolů**

Tuto analýzu provedl Marcato a spol. [44, s. 83–90] pomocí gradientové kapalinové chromatografie s odpařovacím detektorem rozptylu světla. Prvním krokem byla příprava roztoku vzorku a standardu. Standardní směs alifatických kyselin byla rozpuštěna ve směsi ethyl acetát-chloroform. Vzorek byl připraven rozpuštěním komerčních monostearátů v tomtéž rozpouštědle.

Následná analýza byla, jak je výše uvedeno, provedena kapalinovou chromatografií a jako detektor byl použit odpařovací detektor rozptylu světla. Chromatografické podmínky byly následující: průtok 1,3 ml/min, teplota kolony 40 °C, teplota detektoru 27 °C a tlak nebulizačního plynu 2 bar. Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu, methylen chloridu a směsi voda–kyselina octová v poměru 99,9:0,1. Identifikace byla provedena pomocí srovnání retenčních časů s korespondujícími píky standardu. Pro kvantifikaci monoacylglycerolů byla použita metoda vnějšího standardu.

## **6.10 Izolace monoacylglycerolu hexadekatrienové kyseliny z listové růžice ředkve**

Yuko Yoshida a spol. provedl izolaci a identifikaci monoacylglycerolu hexadekatrienové kyseliny z listové růžice ředkve. Prvním krokem izolace byla extrakce vzorků ethylacetátem. Ethylacetátová frakce byla následně částečně purifikována na silikagelové koloně. Frakce byla rozpuštěna v 5% ethylacetátu v toluenu a byla aplikována na kolonu. Kolona byla následně promyta dalším množstvím stejného rozpouštědla. Složky naabsorbovány na kolonu byly následně postupně vymývány roztoky 10, 20, 40 a 80% ethylacetátem v toluenu a nakonec methanolem [45, s. 1341–1349].

Frakce vymytá 40% ethylacetátem v toluenu byla rozpuštěna v 70% methanolu a byla vnesena na Sep–Pak Vac C18 kolonu. Ta byla promyta 70% methanolem a naabsorbované složky byly následně vymyty 90% a 100% methanolem. Frakce získaná vymytím 90% methanolem byla podrobena HPLC analýze se semipreparativní kolonou. Jako mobilní fáze byl použit 90% methanol s 0,1% kyselinou octovou. Složka, která generovala pík při vlnové délce 210 nm v čase 14,6 minut byla následně purifikována analytickou HPLC s mobilní fází 60% acetonitrilu s 0,1% kyselinou octovou. Jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr s elektronovou ionizací. Pík monoacylglycerolu kyseliny hexadekatrienové byl identifikován v retenčním čase 17,8 minut [45, s. 1341–1349].

### **6.11 Izolace monoacylglycerolů z chaluhy *Sargassum sagamianum***

Hyeun Wook Chang a spol. [46, s. 3589–3592] provedl v rámci svého výzkumu izolaci monoacylglycerolů z chaluhy *Sargassum sagamianum*. Tato chaluha byla nasbírána na přílivovém pobřežním páse ostrova Jeju, Jižní Korea.

U nasbíraných vzorků byla provedena lyofilizace, macerace a opakovaná extrakce methanolem a dichlormethanem. Takto získaný surový extrakt byl následně rozdělen mezi 15% vodný roztok methanolu a n–hexan. Methanolová vrstva byla poté oddělena vakuovou vysokotlakou chromatografií na reverzní fázi s kolonou C18, která byla proplachována směsmi methanolu a vody

Kombinace frakcí, které byly vymyty 20% a 10% vodným roztokem methanolu byly separovány pomocí HPLC na reverzní fázi s mobilní fází acetonitrem. Pomocí protonové NMR analýzy bylo zjištěno, že všechny frakce obsahovaly směs monoacylglycerolů s řetězcem polynenasycené mastné kyseliny.

Následná purifikace byla výše uvedenými autory provedena pomocí HPLC na reverzní fázi, s mobilní fází methanolem, a byla odstraněna většina bioaktivních složek. Produktem purifikace byl 1–oktadekatetraenoyl glycerol. Toto bylo stanoveno pomocí NMR spektrometrie.

### **6.12 Kvantitativní stanovení mono– a diacylglycerolů v olivovém oleji**

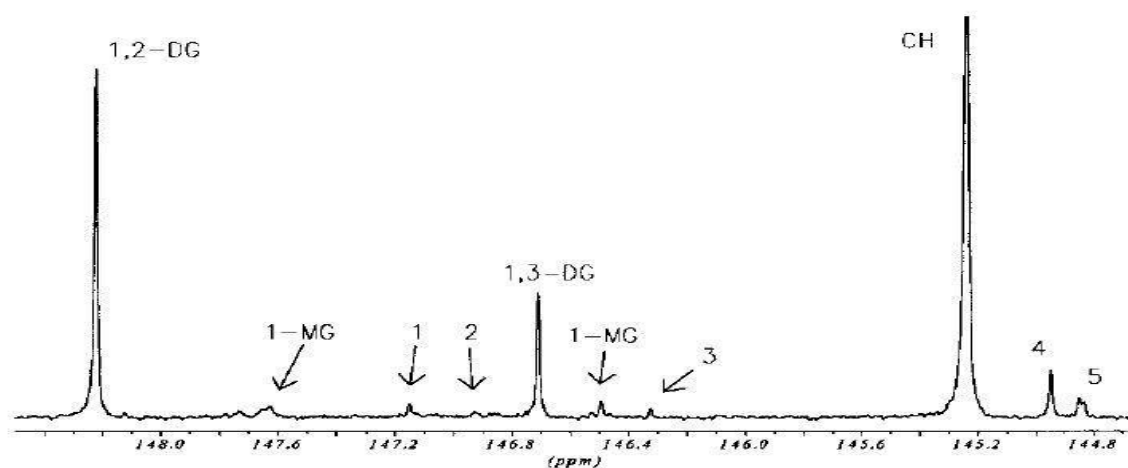
Pro analýzu a kvantitativní stanovení mono– a diacylglycerolů obsažených v olivovém oleji použili Apostolos Spyros a Photis Dais <sup>31</sup>P NMR spektroskopii. Tato metoda je zalo-

žena na derivatizace labilních vodíků funkčních skupin (např. –OH, –COOH a –CHO) složek olivového oleje 2-chloro-4,4,5,5-tetramethyldioxafosfolanem (reagent I). Ten s funkčními skupinami nesoucími labilní proton reaguje rychle a kvantitativně za mírných podmínek. Otestovány byly různé vzorky olivového oleje lišící se regionem a rokem produkce [47, s. 802–805].

Příprava vzorku proběhla následovně. Nejprve byl připraven zásobní roztok složený z pyridinu a  $\text{CDCl}_3$  (deuterovaný chloroform) v objemovém poměru 1,6:1 obsahující  $\text{Cr}(\text{acac})_3$  (chromium acetylacetonát) a cyklohexanol. Dále byly do NMR trubic nadávkovány vzorky olivového oleje, do kterých byl poté nadávkován reagent I a toto bylo v NMR trubicích ponecháno reagovat 0,5 h v pokojové teplotě. Tento roztok byl poté použit pro získání  $^{31}\text{P}$  NMR spekter.

Spektra byla získána pomocí Bruker AMX500 spektrometru, který pracoval při frekvenci 202,2 MHz. Teplota sondy byla 25 °C. Typické parametry pro spektra kvantitativních studií jsou: 90° šířka pulsu 12,5  $\mu\text{s}$ ; šířka pásu 10 kHz, zpoždění signálu 30 s, velikost paměti 16 K.

Takto byl pro každou složku směsi získán separovaný pík. Příklad typického spektra je na Obr. 10. Tato použitá metoda byla zhodnocena jako snadná technika pro kvantifikaci mono- a diacylglycerolů v panenském olivovém oleji.



Obr. 10: Typické spektrum získané  $^{31}\text{P}$  NMR analýzou olivového oleje [47, s. 802–805].

### 6.13 Analýza monoacylglycerolů v kokosovém oleji

Pro tuto analýzu použil Fabian M. Dayrit a spol. [48, s. 5765–5769] taktéž jako Apostolos Spyros [47, s. 802–805], z jehož práce vycházel,  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopii.

Kokosový olej lze podle způsobu získávání rozdělit na rafinovaný, získávaný extrakcí kopry, a panenský, získávaný mechanickými a přírodními procesy. Mezi hlavní složky oleje patří triacylglyceroly, tvořící největší část hmotnosti oleje, a minoritní složky jako monoacylglyceroly, diacylglyceroly, steroly a volné mastné kyseliny. Právě obsah minoritních složek je mimo jiné závislý na způsobu získávání oleje a tím lze rozlišit mezi rafinovaným a panenským olejem. Pro analýzu bylo použito 16 vzorků panenského kokosového oleje a 8 vzorků oleje rafinovaného.

Minoritní složky lze analyzovat pomocí  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopie, proto musí být konvertovány na dioxafofolanové deriváty obsahující fosfor. Vzorky byly rozpuštěny ve směsi pyridin/ $\text{CDCl}_3$  v poměru 1,6:1 s obsahem  $\text{Cr}(\text{acac})_3$  v NMR trubici. Dále byl připraven interní standard rozpuštěním kyseliny benzoové v  $\text{CDCl}_3$ . Interní standart byl následně s 2-chloro-4,4,5,5-tetramethyldioxafofolanem (fosfitylující reagent) nadávkován do NMR trubice, a ponechán reagovat [48, s. 5765–5769].

Dalším krokem byla příprava kalibračních standardů. Pro jejich přípravu byla nejprve přichystána matrix. Rafinovaný olej byl promyt hydroxidem sodným a následně pročištěn přes silikagel. Poté byla matrix vysušena a uchovávána pod chloridem vápenatým v exsikátoru. Jako standardy byly použity 1,2-dipalmitin, 1,3-dipalmitin, 1-monolaurin, 2-monolaurin, kyselina laurová a cholesterol.

Analýza byla Dayritem provedena pomocí JEOL Lambda (magnetické pole 9,4 T) pracující při frekvenci 162 MHz. Výsledkem bylo zjištění, že v průměru obsahuje panenský kokosový olej o 40 % více 1-monoacylglycerolů než rafinovaný. Obsah, dle způsobu získávání, se v panenském oleji pohyboval od 0,022 % do 0,034 %. Oproti tomu 2-monoacylglyceroly nebyly ve vzorcích vůbec detekovány.

## **6.14 Simultánní stanovení glycerolu mono–, di– a triacylglycerolů v methylesterech rostlinných olejů kapilární plynovou chromatografií**

Methylestery rostlinných olejů získaných alkalicky katalyzovanou transesterifikací rostlinných olejů methanolem mohou být kontaminovány z důvodu nekompletní transesterifikace mimo jiné i monoacylglyceroly [49, s. 461–468].

Klasickou metodou pro stanovení jak monoacylglycerolů tak i di– a triacylglycerolů je kapilární plynová chromatografie. Christina Plank a spol. [49, s. 461–468] vyvinula rychlou a spolehlivou proceduru plynové chromatografie pro simultánní stanovení mono–, di– a triacylglycerolu v methylestech rostlinných olejů. Metoda může být použita pro kontrolu kvality methylesterů v průběhu produkce, tak i pro kontrolu jejich shody s požadovanými specifikacemi. Trimethylsilylace volných hydroxylových skupin následovaná plynovou chromatografií s použitím krátké kapilární kolony s tenkým filmem zajišťuje stanovení všech analytů značně se lišících v polaritě a těkavosti naráz.

Cristina Plank použila dva vnitřní standardy, 1,2,4–butantriol a trikaprin, což umožňuje provést spolehlivou kvantifikaci glycerolu, mono–, di– a triacylglycerolů během 30 minut. Kalibrace byla provedena analýzou standardních roztoků připravených rozpuštěním standardu v pyridinu. Pro přípravu vzorků byly jako interní standardy přidány do vialek s methylestery rostlinných olejů butantriol a trikaprin. Dále byl do standardů a vzorků přidán N–methyl–n–trimethylsilyltrifluoroacetamid a po 15 minutách při pokojové teplotě byly silylované směsi rozpuštěny v n–heptanu.

Plynový chromatograf, na kterém proběhla analýza, byl vybaven on–column injektorem a plamenově ionizačním detektorem, předkolonou spojenou v sérii s kapilární kolonou z křemenného skla s filmem o tloušťce 0,1  $\mu\text{m}$ . Vzorky byly do kolony injektovány autosamplerem. Analýza probíhala pod teplotním gradientem s nosným plynem vodíkem a plynem pro detektor dusíkem.



## 7 SHRNUÍ TEORETICKÉ ČÁSTI

Z výše uvedených kapitol vyplývá, že monoacylglyceroly nacházejí své uplatnění v různých odvětvích průmyslu. Nejčastěji se využívají v průmyslu potravinářském a kosmetickém. V potravinářství se používají hlavně pro jejich schopnost zpomalit stárnutí pečiva. Dále patří mezi důležité emulgátory. Jako emulgátory mají své uplatnění i při výrobě kosmetiky.

Monoacylglyceroly lze připravit různými cestami, z nichž každá má své výhody i nevýhody. Mezi tyto patří glycerolýza, reakce s glycidolem, při které dochází k otevření epoxidového kruhu a produktem jsou vždy 1-monoacylglyceroly nebo lze využít enzymatickou přípravu.

Z širokého využití MAG plyne důležitost jejich analýzy v produktech, tedy v reálných systémech. Samotnou analýzu lze provést různými chromatografickými metodami. Izolace MAG však již představuje větší překážku. Protože se MAG mohou vyskytovat v různých reálných systémech s různým složením látek, které mohou při analýze s MAG interferovat, neexistuje univerzální způsob jejich izolace. Vždy je potřeba zvážit složení systému a jeho fyzikální a chemické vlastnosti. Důležité je zvolit takový postup, kdy jsou odstraněny všechny interferující látky a zároveň nedojde ke ztrátám v obsahu MAG.

## 8 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce je:

- Vypracovat literární rešerši v oblasti přípravy MAG a jejich analýzy v reálných systémech.
- Připravit vysoce čisté MAG vybraných mastných kyselin.
- Provést kalibraci HPLC systému.
- Použít připravené MAG do potravinářského systému.
- Provést izolaci MAG, navrhnout postup extrakce a pomocí HPLC stanovit „recovery“.
- Výsledky kriticky zhodnotit.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 9 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V rámci experimentální části byly připraveny monoacylglyceroly kyseliny laurové a palmitové a byla provedena kalibrace kapalinového detektoru. Následně byly připraveny vzorky s obsahem jednotlivých monoacylglycerolů, které byly poté extrahovány a pomocí kapalinové chromatografie byl stanoven jejich konečný obsah ve vzorku.

### 9.1 Seznam použitých chemikálií a substancí

- Hydroxid draselný (p. a., Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- Kyselina boritá (p. a., Lach–Ner, s.r.o., Neratovice)
- Xylen–směs izomerů (p. a., Penta, Chrudim)
- Ethanol denaturovaný 96%
- Chloroform (p. a., Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- Kyselina laurová (čistota  $\geq 98\%$ , SAFC)
- Kyselina palmitová (čistota  $\geq 98\%$ , MERCK)
- Glycidol (čistota  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich, Praha)
- Chromium(III) acetát hydroxid (p. a., Sigma–Aldrich, Praha)
- Destilovaná voda
- Fenolftalein 1% roztok v ethanolu
- Ethanolická roztok 2,7–dichlorfluoresceinu
- Mouka, hladká světlá (Noe, Slovensko)
- Jedlá sůl s jódem (Mammita, Rakousko)
- Čerstvé droždí (Linco, Německo)
- Slunečnicový olej (Vitae d’Oro, Maďarsko)
- Cukr krystal Korunní (Moravskoslezské cukrovary, Česká Republika)

## 9.2 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Filtrační papír Filpap, modrý pruh (Schleicher & Schuell, Německo)
- Chromatografické TLC desky se silikagelem Alugram (Macherey–Nagel GmbH & co. KG, Německo)
- Magnetické míchadlo MM4 s ohřevem (LAVAT, Chotutice)
- Termostat (MLW, Laboratotechnik Medingen, Německo)
- Skleněný dvouplášťový reaktor
- Automatická byreta – Bürette Digital 25 ml (Brand GmbH & co., Německo)
- Automatická pipeta Nichipet EX 0.5-10  $\mu$ l (Nichiryo America, USA)
- UV lampa (Camag, Švýcarsko)
- Analytické váhy (Sartorius)
- Sušárna – Mora 524 (Mora, Praha)
- Vytvájecí TLC komora
- Soxhletův extraktor
- Patrona z filtračního papíru
- Topné hnízdo LTHS 250 (Brněnská Drutěva, Brno)
- 250ml varná baňka s kulatým dnem
- Stříkačkový filtr CMS filterpure Syringe Filters, velikost pórů 0,22  $\mu$ m (Chromservis, Praha)
- Kapalinový chromatograf
  - Pumpa Waters 600E (Waters, USA)
  - Odplyňovač mobilní fáze (Watrex Praha s.r.o, Praha)
  - Dávkovací ventil se smyčkou 20  $\mu$ l Rheodyne (Sigma–Aldrich, Praha)
  - Analytická kolona X-select C18 (Waters, USA)
- Detektor UV 200 DeltaChrom (Watrex Praha s.r.o, Praha)

- Detektor ELSD (Agilent technologies, USA)
- Vakuová odparka (Heidolph, Německo)

### 9.3 Příprava MAG kyseliny laurové a palmitové

První částí experimentu byla příprava MAG kyseliny laurové a palmitové. Reakce proběhla adicí příslušné mastné kyseliny na glycidol (2,3-epoxy-1-propanol) za přítomnosti katalyzátoru chromiium acetát hydroxid (CAH). Čistota vzniklých produktů byla orientačně ověřena titračně a pomocí tenkovrstvé chromatografie. Připravené MAG byly v další fázi experimentu použity pro přípravu vzorků a kalibraci HPLC systému.

#### 9.3.1 Příprava monoacylglycerolu kyseliny laurové

Prvním krokem přípravy MAG kyseliny laurové byla příprava testovacího vzorku z 5 g kyseliny pro ověření průběhu reakce. Bylo naváženo (s přesností 0,001 g) potřebné množství kyseliny laurové a katalyzátoru. Původní molární poměr kyselina:glycidol byl 1:1,2 a obsah katalyzátoru byl 0,4 % hmotnostních (dle experimentu Janiše a spol., 2000, [31]). Molární poměr kyselina:glycidol i obsah katalyzátoru byl pro dosažený nízký stupeň konverze následně změněn na 1:1,5 a na 0,5 % hmotnostních katalyzátoru, který byl před použitím sušen při teplotě 80 °C po dobu 12 h.

Do reaktoru vytemperovaného na 90 °C byla vpravena kyselina a po jejím roztavení byl nadávkován katalyzátor. Směs se ponechala 30 minut reagovat, aby vznikl komplex mezi kyselinou a katalyzátorem. Po uplynutí tohoto času bylo přidáno potřebné množství glycidolu a reaktor byl uzavřen vzduchovým chladičem.

Směs se nechala reagovat a v průběhu reakce byly odebírány kovovou lžičkou 3 kapky do předem zvážených 100ml titračních baněk a titračně byly stanovovány stupně konverze.

Pro experiment bylo použito asi 100 g kyseliny laurové a upravené reakční poměry. Navážky jsou uvedeny v Tab. 2 a reakce byla provedena výše uvedeným postupem.

*Tab. 2: Navážky reaktantů pro přípravu MAG kyseliny laurové pro experiment.*

	Navážka [g]
Kyselina laurová	100,296
Glycidol	55,641 (=cca 50 ml)
Katalyzátor	0,801

### 9.3.2 Příprava monoacylglycerolu kyseliny palmitové

Stejně jako při přípravě MAG kyseliny laurové byl nejprve připraven testovací vzorek. Vzorek byl připraven z 5 g kyseliny palmitové a byl použit katalyzátor v koncentraci 0,5 % hmotnostních a molární poměr kyselina:glycidol byl 1:1,5. Reakce byla provedena postupem uvedeným v kapitole 9.3.1. Po ověření, že lze tímto způsobem dosáhnout dostatečně vysoké konverze, byl připraven vzorek pro následný experiment. Navážky jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 3).

*Tab. 3: Navážky reaktantů pro přípravu MAG kyseliny palmitové pro experiment.*

	Navážka [g]
Kyselina laurová	101,022
Glycidol	43,782 (=cca 2 ml)
Katalyzátor	0,771

### 9.3.3 Purifikace vzniklých MAG

Produkty vzniklé adiční reakce příslušné kyseliny na glycidol (MAG kyseliny laurové i palmitové) musely být v dalším kroku purifikovány. Purifikace byla provedena následujícím postupem.

Nejprve bylo třeba odstranit z reakční směsi katalyzátor a to tak, že horký obsah reaktoru byl po ukončení adiční reakce vlit do 150 ml ledového ethanolu. Tím došlo v několika minutách k flokulaci katalyzátoru, který byl následně odfiltrován na předem vychlazené Büchnerově nálevce přes filtr s modrou páskou.

Po flokulaci a filtraci byl filtrát v kádince vložen ke krystalizaci do mrazničky. V případě, že došlo ke krystalizaci celého obsahu kádinky, bylo přidáno další množství ethanolu (asi 50 ml) a kádinka byla umístěna zpět do mrazničky. Takto se postupovalo do doby, než došlo v kádince k oddělení ethanolové fáze, která obsahovala rezidua glycidolu a kyseliny. Ta byla přefiltrována na Büchnerově nálevce přes filtrační papír s modrým pruhem. MAG zachycený na filtračním papíře byl rozpuštěn ve 200 ml ethanolu a toto spolu s filtrátem bylo vloženo do mrazničky k rekrystalizaci. Rekrystalizace byla provedena celkem dvakrát.



Po rekrystalizaci byla provedena další filtrace. MAG zachycený na filtračním papíře byl přenesen na Petriho misku a uložen k proschnutí při pokojové teplotě do digestoře. Supernatant z této filtrace byl následně odpařen na odparce při 72 °C na přibližně poloviční množství a byl vložen do mrazničky ke krystalizaci. Po vykrytalizování byla provedena filtrace a MAG byl přidán na Petriho misku, která byla dříve umístěna v digestoři.

### **9.3.4 Stanovení stupně konverze připravovaných MAG**

Průběh reakce a čistota připravovaných MAG byl sledován stanovením stupně konverze. Tedy titrací odebíraných vzorků rozpuštěných ve zneutralizované směsi xylen:ethanol v poměru 1:1 0,1M ethanolickým roztokem KOH na fenolftalein do růžového zbarvení. Pro stanovení bylo třeba nejprve připravit titrační činidlo a provést jeho standardizaci.

#### **9.3.4.1 Příprava 0,1M ethanolického KOH**

Celkový objem připravovaného titračního roztoku byl 1 l. S přesností 0,001 g bylo naváženo 5,610 g KOH. Navážka byla rozpuštěna v ethanolu a převedena do odměrné baňky o objemu 1 l, která byla následně ethanolem doplněna po rysku.

U takto připraveného roztoku byla dále stanovena jeho přesná koncentrace. Nejprve byl do odměrné 25ml baňky připraven 0,1M roztok kyseliny laurové v ethanolu a následně bylo titrováno 5 ml tohoto roztoku připraveným ethanolickým roztokem KOH na fenolftalein.

#### **9.3.4.2 Příprava směsi xylen:ethanol (1:1)**

Do kádinky o objemu 1 l bylo odměřeno odměrným válcem 500 ml xylenu a 500 ml ethanolu. Do směsi byly přidány 3 kapky fenolftaleinu a byla provedena titrace ethanolickým 0,1M KOH do růžového zbarvení. Zneutralizovaný roztok byl následně převeden do 1l odměrné baňky.

### **9.3.5 Orientační stanovení čistoty produktů**

Pro orientační ověření čistoty vzniklých produktů byla provedena TLC analýza. Prvním krokem byla příprava chromatografických desek

### 9.3.5.1 Příprava chromatografické desky

Do 100ml odměrné baňky byl připraven 5% vodný roztok kyseliny borité (navážka 4,999 g). Chromatografické desky se vložily do Petriho misky a připravený roztok kyseliny borité byl na ně vylit. Desky se nechaly sytit minimálně 5 minut a následně byly vyjmuty a po okapání byly vloženy na dobu 1 hodiny do sušárny s teplotou 90 °C. Během doby, kdy byly chromatografické desky v sušárně, byla připravena vyvíjecí lázeň pro TLC analýzu.

### 9.3.5.2 Příprava vyvíjecí lázně pro TLC

Vyvíjecí lázeň se skládala z chloroformu, methanolu a kyseliny octové v objemových dílech 95, 4,5 a 0,5, celkový objem byl 10 ml. Lázeň byla připravena v dělicí nálevce, kde byla dobře promíchána a následně vlita do vyvíjecí komory, která se zavřela a nechala sytit párami. Po nasycení vyvíjecí komory byla provedena samotná TLC analýza.

### 9.3.5.3 TLC analýza

Vzorky MAG a jednotlivých kyselin pro analýzu byly připraveny tak, že v množství 0,1 g byly rozpuštěny ve 2 ml chloroformu.

Na chromatografické desky byly mikropipetou nanесeny 2 µl vzorků MAG a kyseliny. Pro každou kyselinu a příslušný MAG byla použita samostatná deska. Po odpaření chloroformu byly desky vloženy do vyvíjecí komory a poté, co vyvíjecí soustava dosáhla 1 cm pod okraj desek, byly desky vyjmuty a bylo označeno čelo. Po oschnutí desek byla provedena detekce ethanolickým roztokem 2,7–dichlorfluoresceinu. Po jeho zaschnutí se desky pozorovaly pod UV lampou při vlnové délce 236 nm a tužkou byly zakresleny polohy skvrn.

## 9.4 Kalibrace kapalinového chromatografu

Dalším krokem práce byla kalibrace kapalinového chromatografu. V experimentu byla použita kapalinová chromatografie na reverzní fázi s kolonou C18 (viz kapitola 9.2) a mobilní fázi složenou z acetonitrilu, vody a kyseliny octové. Použitými detektory byl UV detektor a ELSD detektor, který byl však k dispozici až během měření diplomové práce. Kalibrace byla provedena pomocí připravených vzorků MAG o vysoké čistotě, ze kterých byly připraveny kalibrační roztoky.

#### 9.4.1 Příprava kalibračních roztoků pro kalibraci UV detektoru

Kalibrační vzorky byly připraveny pro MAG kyseliny laurové tak, že byl nejprve v 25ml baňce připraven rozpuštěním naváženého množství v mobilní fázi (kapitola 9.4.3) roztok o koncentraci 5 % (w/w). Z něj byly dále ředěním připraveny roztoky do 5ml baněk. Z důvodu špatné rozpustnosti byl poté použit jako rozpouštědlo ethanol. Kalibrační roztoky pro MAG kyseliny palmitové byly připraveny jako pro MAG kyseliny laurové jen s tím rozdílem, že byl jako rozpouštědlo použit ethanol. Koncentrace kalibračních roztoků pro oba MAG byla 1, 2, 3, 4 a 5 % (w/w).

#### 9.4.2 Příprava kalibračních roztoků pro kalibraci ELSD detektoru

Pro kalibraci ELSD detektoru byly připraveny roztoky MAG kyseliny laurové a palmitové podobným způsobem jako pro kalibraci UV detektoru. Vzhledem k vyšší citlivosti ELSD detektoru než má detektor UV byla však koncentrace kalibračních roztoků řádově menší a to: 0,001, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006 a 0,007 % (w/w).

#### 9.4.3 Příprava mobilní fáze

Mobilní fázi pro chromatografii byla směs acetonitril, voda a kyselina octová v poměru 90:10:0,1. Tato mobilní fáze byla připravena do lahve odměřením 900 ml acetonitrilu, 100 ml vody a 1 ml kyseliny octové. Poté, co byla mobilní fáze připravena, bylo přistoupeno k samotné kalibraci kapalinového chromatografu.

#### 9.4.4 Provedení kalibrace

Prvním krokem kalibrace bylo nezbytné nastavení chromatografických podmínek analýzy. UV detektor byl nastaven na vlnovou délku 205 nm, pro ELSD detektor byla nastavena evaporizační a nebulizační teplota na 40 °C a průtok dusíku na 1,5 l/min. Chromatografický systém byl propláchnut mobilní fází a na počítači spuštěn software Clarity. Před nadávkováním roztoků do kolony byly roztoky nejprve přefiltrovány přes stříkačkový filtr. Pomocí stříkačky byly roztoky dávkovány do nástřikového ventilu o objemu 20 µl, poté byl ventil přepnut do dávkovací polohy, čímž se spustila analýza. Každý kalibrační roztok byl analyzován dvakrát a byly zaznamenány plochy píků. Pomocí naměřených hodnot byla sestavena kalibrační přímka (regresní přímka grafické závislosti plochy píků na koncentraci roz-

toku). Dalším krokem experimentu byla příprava reálných vzorků pečiva, které obsahovaly MAG (popis přípravy je uveden kapitole 9.3.).

## 9.5 Příprava reálných vzorků pečiva pro HPLC analýzu

Připravované reálné vzorky pečiva obsahovaly asi 0,5 % (w/w) MAG. Potřebné množství surovin bylo naváženo s přesností 0,001g (Tab. 4) a sypké suroviny (i MAG) byly smíchány a homogenizovány. Z droždí a části sacharózy byla vytvořena suspenze, která byla smíchána spolu s ostatními kapalnými surovinami a s homogenizovanými sypkými ingrediencemi. Hnětením bylo připraveno hladké, pružné a nelepivé těsto. To bylo při 30 °C ponecháno 20 minut kynout. Poté bylo těsto rozděleno na 19 částí (vzorků) o stejné hmotnosti (4,500 g), které byly za stejných podmínek nechány opět kynout. Následně byly vzorky upečeny při teplotě 170 °C po dobu 20 minut, což jsou běžné podmínky při výrobě pečiva.

Tab. 4: Složení reálných vzorků.

Surovina	Hmotnost [g]
mouka	50,000
sůl	0,900
droždí	2,000
olej	2,000
voda	35,000
sacharóza	2,500
MAG	0,462

Navážky MAG:

- MAG kyseliny palmitové:  $m = 0,4625$  g
- MAG kyseliny laurové:  $m = 0,4626$  g.

Obdobným způsobem byla následně připravena další sada vzorků, připravovaných při teplotě 70 °C. Pro tyto byla použita stejná receptura, jen s polovičním množstvím surovin. Vzniklé těsto, připravené stejným způsobem, bylo rozděleno na 9 částí o stejné hmotnosti. Teplota pro pečení vzorků byla 70 °C a čas pečení byl 30 minut.

Navážky MAG pro vzorky pečené při 70 °C:

- MAG kyseliny palmitové:  $m = 0,2320$  g
- MAG kyseliny laurové:  $m = 0,2314$  g.

Takto připravené vzorky mohly být dále podrobeny extrakci a následné analýze.

## 9.6 Extrakce MAG ze vzorků

Extrakcí vzorků (připravených v kapitole 9.5) byly zpět získávány MAG použité pro jejich přípravu. Před provedením samotné extrakce pro následnou analýzu bylo nejprve třeba zjistit bezpečný počet extrakčních cyklů.

### 9.6.1 Stanovení počtu cyklů pro extrakci

Pro zajištění toho, že se vyextrahuje veškeré možné množství MAG ze vzorku, bylo třeba stanovit bezpečný počet extrakčních cyklů. Vzorek byl extrahován dle způsobu popsaného v následující kapitole (9.6.2) a po 5., 10., 15. a 18. cyklu byl odebírán extrakt. Tento byl analyzován pomocí HPLC systému. Ze získaných chromatografů bylo následně určeno, kdy již nedochází k nárůstu plochy příslušného píku, a tím ke zvyšování, respektive změně množství vyextrahovaných MAG. Po tomto stanovení byla již provedena samotná extrakce pro následnou analýzu kapalinovou chromatografií.

### 9.6.2 Extrakce vzorků

Pro extrakci byl použit Soxhletův extraktor a jako rozpouštědlo ethanol, ve kterém se MAG obsažené ve vzorcích dobře rozpouštějí. Experimentálně bylo zjištěno, že pro následnou analýzu stačí použít jeden kus vzorku pro detekci ELSD detektorem a tři kusy pro UV detektor toto je třeba podrobit 20 extrakčním cyklům. Hmotnost každého vzorku byla při jejich přípravě 4,500 g.

Vzorek byl rozmělněn nožem na malé části a byl vložen do předem zvážené extrakční patrony. Tato byla poté opět zvážena a následně vložena do Soxhletova extraktoru. Soxhletův

extraktor byl spojen s 250 ml varnou baňkou a do tohoto systému bylo přesně napipetováno 130 ml ethanolu. Soxhletův extraktor se vzorkem byl zahříván na topném hnízdě a po proběhnutí 20 cyklů byla extrakce ukončena. Takto vyextrahované vzorky byly podrobeny HPLC analýze.

## 9.7 Analýza vzorků

Analýza vyextrahovaných vzorků byla provedena pomocí HPLC na reverzní fázi s analytickou kolonou X-select (Waters) C18. Nejprve byl pro analýzu vzorků s obsahem MAG kyseliny laurové použit UV detektor. V okamžiku, kdy byl k dispozici, byl vzhledem k řádově vyšší citlivosti pro všechny vzorky použit ELSD detektor.

### 9.7.1 HPLC analýza pomocí UV detektoru

Jak je již uvedeno výše, nejprve byl pro analýzu vzorků s obsahem MAG kyseliny laurové použit UV detektor. Po extrakci byly vzorky k analýze připraveny dvojnásobným způsobem. Prvním bylo jejich odpaření na vakuové odparce téměř do sucha a následné rozpuštění v ethanolu v 5ml baňce. Takto připravené vzorky byly podrobeny analýze. Pro zlepšení výsledků při HPLC separaci odstraněním balastních tukovitých podílů byla poté příprava vzorků provedena druhým způsobem. Množství o objemu 10 ml bylo v dělicí nálevce vytřepáno s n-hexanem, v poměru vzorek: n-hexan 1:2. Po oddělení fází byla spodní fáze odpuštěna a následně byla stejným způsobem ještě dvakrát vytřepána. Po posledním vytřepání byla spodní fáze přepuštěna do 5ml odměrné baňky, která byla doplněna ethanollem. Takto připravený vzorek byl podroben analýze HPLC s UV detektorem. Mobilní fáze pro analýzu byla připravena již při kalibraci systému.

Chromatografické podmínky byly následující:

- Izokratická eluce.
- Průtok mobilní fáze: 1 ml/min.
- Složení mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1).
- Nástřik 20  $\mu$ l.

Na počítači byl spuštěn řídicí software Clarity a byla spuštěna funkce pro sběr dat z UV detektoru. Chromatografický systém byl propláchnut mobilní fází a následně byl

do nástřikového ventilu pomocí stříkačky nadávkován vzorek, který byl nejdříve přefiltrován pomocí stříkačkového filtru.

### **9.7.2 HPLC analýza pomocí ELSD detektoru**

Pro další analýzu byl použit ELSD detektor, který byl k dispozici až v průběhu měření diplomové práce. Tento byl použit jak pro analýzu vzorků s obsahem MAG kyseliny laurové tak i s MAG kyseliny palmitové. Vzorky pro analýzu byly 5 x ředěny, aby byla jejich koncentrace v rozmezí kalibrace. Pro vysokou citlivost nemusely být vzorky, kromě filtrace přes stříkačkový filtr, jinak upravovány. Detektor byl nastaven dle doporučení výrobce, které bylo experimentálně ověřeno. Nastavení bylo následující: evaporizační a nebulizační teplota 40 °C a průtok dusíku 1,5 l/min. Podmínky pro analýzu jsou v kapitolách 9.7.2.1 a 9.7.2.2.

#### ***9.7.2.1 HPLC analýza pomocí ELSD detektoru – vzorky s MAG kyseliny laurové***

Tato analýza byla provedena stejným způsobem jako pomocí UV detektoru. V software Clarity byl spuštěn sběr dat z ELSD detektoru. Chromatografické podmínky zůstaly stejné, jako je uvedeno v kapitole 9.7.1. Ze získaného chromatogramu byly zaznamenány plochy píku pro MAG kyseliny laurové, ze kterých byla pak pomocí kalibrační rovnice vypočtena koncentrace MAG ve vzorku a následně procentuální návratnost množství použitého MAG do vzorků (toto vystihuje v analytické praxi používané slovo „recovery“, které bude v tomto smyslu dále používáno v následném textu). Každý vzorek, který byl připravovaný při teplotě 170 °C, byl analyzován dvakrát a celkově bylo analyzováno osm vzorků. Vzorek připravovaný při teplotě 70 °C byl analyzován třikrát.

#### ***9.7.2.2 HPLC analýza pomocí ELSD detektoru – vzorky s MAG kyseliny palmitové***

Analýza vzorků s obsahem MAG kyseliny palmitové pomocí ELSD detektoru byla nejprve provedena stejným způsobem, jako analýza vzorků s MAG kyseliny laurové. Následně však byly změněny chromatografické podmínky. Pro zlepšení separace píků byla použita gradientová eluce dle Marcata [44]. Složení mobilní fáze je v následující tabulce (Tab. 5).

Tab. 5: Složení mobilní fáze pro gradientovou eluci.

Čas [min]	voda:kyselina octová (99,9:0,1) [%]	acetonitril [%]
0	15	85
4	0	100
12	15	85
20	15	85

Postup analýzy byl následně stejný jako u analýzy vzorků s obsahem MAG kyseliny laurové. Stejně jako u MAG kyseliny laurové byly zaznamenávány plochy píků a následně vypočtená koncentrace MAG a „recovery“.

## 9.8 Stanovení úbytku MAG v důsledku pečení

Pro zjištění k jakému úbytku množství MAG může během pečení dojít, byl do předem vysušených a zvážených kádinek navážen MAG kyseliny laurové ( $m=0,5495$  g) a kyseliny palmitové ( $m=0,5380$  g). Poté bylo toto vloženo do trouby a po dobu 20 minut byly podrobeny teplotě 170 °C. Po uplynutí této doby byly kádinky vloženy do exsikátoru a po vychladnutí byly zváženy. Z rozdílu hmotností bylo stanoveno odpařené množství monoacylglycerolů.

## 9.9 Stanovení interakce monoacylglycerolů s použitým olejem

Roztoky MAG a oleje v ethanolu byly připraveny v poměru olej:MAG, jaký je v receptuře reálného vzorku (kapitola 9.5), tedy 4:1. Navážky MAG jsou uvedeny v Tab. 6. Pro každý MAG byly připraveny dva takové roztoky. Jeden byl pro simulaci procesu pečení zahříván 20 minut při teplotě 170 °C. Poté byly vhodným ředěním všechny roztoky upraveny tak, aby koncentrace MAG odpovídala kalibraci. Tyto roztoky byly následně podrobeny HPLC analýze a bylo zjištěno „recovery“. Stejným způsobem byl analyzován roztok oleje v ethanolu.



Tab. 6: Koncentrace roztoků pro ověření interakce MAG–olej.

	MAG kyseliny laurové		MAG kyseliny palmitové	
	Zahříváný roztok	Nezahříváný roztok	Zahříváný roztok	Nezahříváný roztok
navážka [g]	0,2909	0,2105	0,2877	0,3532
koncentrace [mg/ml]	0,05	0,04	0,05	0,06

## 9.10 Zpracování výsledků

Pro zpracování získaných dat byly použity výpočty pro aritmetický průměr (1), skutečnou koncentraci roztoku (2), stupeň konverze (3), koncentraci látky z kalibrační přímky (4), „recovery“ (5) dle následujících vztahů:

- Aritmetický průměr (1):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (1)$$

kde:

$\bar{x}$  – aritmetický průměr;

$n$  – počet měření;

$x_i$  – hodnota měření.

- Skutečná koncentrace roztoku (2):

$$c = \frac{V}{\bar{a}} \cdot 0,1 \quad (2)$$

kde:

$c$  – koncentrace roztoku [mol/l];

$V$  – pipetovaný objem pro stanovení [ml];

$\bar{a}$  – průměrná hodnota spotřeby při stanovení [ml].

- Stanovení stupně konverze (3):

$$\%C = \frac{a \cdot c_{KOH} \cdot M_k}{1000 \cdot m \cdot p} \cdot 100 \quad (3)$$

$$KONV = 100 - \%C$$

Kde:

$\%C$  – hmotnostní procenta kyseliny vztažené na navážku mastné kyseliny do reakce

$a$  – spotřeba 0,1M ethanolického roztoku KOH [ml]

$c_{KOH}$  – přesná koncentrace ethanolického roztoku KOH [mol/l]

$M_k$  – molární hmotnost mastné kyseliny [g/mol]

$m$  – skutečná navážka vzorku MAG pro titraci [g]

$p$  – poměr skutečné navážky kyseliny do reakce k celkové hmotnosti všech reaktantů

$KONV$  – stupeň konverze [%]

- Koncentrace látky z kalibrační přímky  $y = k \cdot x + q$  (4):

$$x = \frac{y - q}{k} \quad (4)$$

Kde:

$x$  – koncentrace látky [mg/ml]

$y$  – plocha píku [mV · s]

$k, q$  – parametry kalibrační přímky

- „Recovery“ (5):

$$Re = \frac{n_2}{n_1} \cdot 100 \quad (5)$$

Kde:

$Re$  – „recovery“ [%]

$n_2$  – koncentrace analytu [mg/ml]

$n_1$  – teoretická koncentrace vzorku [mg/ml]

## 10 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této práce bylo navrhnout metodiku stanovení návratnosti MAG použitých v reálných systémech. Prvním krokem práce byla příprava vysoce čistých MAG kyseliny laurové a palmitové adicí mastné kyseliny na glycidol. Ve druhé fázi pak byly připraveny modelové vzorky pečiva. Ty byly následně extrahovány a pomocí HPLC analýzy bylo stanoveno „recovery“ MAG.

### 10.1 Příprava MAG kyselin laurové a palmitové

Monoacylglyceroly kyselin laurové a palmitové byly připraveny dle postupu v experimentální části v kapitole 9.3. Během přípravy MAG kyseliny laurové bylo zjištěno, že nebylo dosaženo očekávaného stupně konverze. Z Tab. 7 v kapitole 10.2.1 plyne, že hodnota konverze dosáhla hodnoty jen 78,0 %. Z tohoto důvodu byly upraveny reakční poměry kyselina:glycidol na 1:1,5. Taktéž byl zvýšen obsah katalyzátoru na 0,5 % hm. Kvůli podezření, že katalyzátor absorboval vlhkost, která snižuje jeho funkčnost a tím i snižuje konverzi reakce, byl katalyzátor vysušen v sušárně při 80 °C po dobu 12 hodin. Po těchto úpravách byl zaznamenán výrazný nárůst konverze a tyto parametry byly dále použity pro přípravu MAG. Zjištěné stupně konverze, jak před úpravou parametrů tak i po ní, pro obě kyseliny jsou uvedeny v kapitole 10.2.1.

### 10.2 Stanovení stupně konverze a TLC analýza produktů

Během přípravy MAG a po jejich purifikaci byl stanovován stupeň konverze. Po purifikaci byla taktéž provedena TLC analýza pro orientační ověření čistoty produktů. Zájmem bylo dosáhnout co nejvyššího stupně konverze, jelikož při dosažení teoretické konverze 100 % by odpadl problém s odstraněním nezreagovaného glycidolu a mastné kyseliny. V produktu by zůstala pouze rezidua chromitého katalyzátoru.

Jak je již uvedeno v experimentální části (kapitola 9.3.4), stupeň konverze byl stanoven titrací odebraných vzorků ethanolickým 0,1M roztokem KOH na fenolftalein. Před vlastní titrací byla provedena standardizace připraveného titračního činidla.

Standardizace byla provedena titrací 0,1M roztoku kyseliny laurové na fenolftalein. Stanovení bylo provedeno 3x vedle sebe. Ze spotřeb titračního činidla byl vypočítán aritmetický

průměr (1) a z něj následně byla vypočtena koncentrace (2). Koncentrace titračního roztoku byla stanovena na 0,0814 mol/l.

### 10.2.1 Stanovení stupně konverze

Stupeň konverze (3) byl stanovován jak při ověřování průběhu reakce (testování vzorky), tak i při přípravě vzorků do experimentu. Každé stanovení bylo provedeno s ohledem na zachování poměrů v reakční směsi dvakrát vedle sebe a výsledná hodnota byla aritmetickým průměrem stanovení (1). Zjištěné hodnoty před provedenou purifikací jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 7–11).

V Tab. 7 jsou zaznamenány hodnoty konverze před úpravou reakčních poměrů a před odstraněním vlhkosti z katalyzátoru. Lze z ní vyčíst, že po 60 minutách trvání reakce byla konverze jen 66,3 %. Po dalších 60 minutách, tedy celkem 120 minutách, trvání reakce bylo dosaženo konverze pouze 78,0 %. Výše těchto hodnot byla pro potřeby této práce nedostačující, protože bylo třeba připravit MAG o vysoké čistotě, které by bylo možné využít i jako kalibrační standardy. Proto bylo přistoupeno k úpravě reakčních parametrů.

Tab. 7: Stupně konverze pro testovací vzorek MAG kyseliny laurové (kyselina:glycidol = 1:1,2).

t = 60 minut			t = 90 minut			t = 120 minut			
	navážka pro stanovení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]	navážka pro stanovení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]	navážka pro stanovení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]
1.	0,030	0,38	67,8	0,036	0,35	75,3	0,034	0,38	74,6
2.	0,031	0,43	64,7	0,036	0,36	74,6	0,041	0,3	81,4
		<b>průměr</b>	<b>66,3</b>		<b>průměr</b>	<b>75,0</b>		<b>průměr</b>	<b>78,0</b>

V Tab. 8 lze vidět výrazný nárůst hodnot konverze po úpravě reakčních poměrů z původních (molární poměr kyselina:glycidol byl 1:1,2, obsah katalyzátoru byl 0,4 % hmotnostních). Již po 30 minutách trvání reakce byla konverze 97,5 %, což je výrazně vyšší hodnota, než jaké bylo dosaženo po 120 minutách reakce s prvotně použitými poměry (78,0 %). Po 90 minutách dosáhla konverze hodnoty 98,4 %. Tento nárůst hodnot svědčí o tom, že tímto postupem lze dosáhnout vysoké konverze a takto upravené reakční poměry byly dále použity pro přípravu MAG pro experiment.

Tab. 8: Stupně konverze pro testovací vzorek MAG kyseliny laurové (kyselina:glycidol = 1:1,5).

t = 30 minut			t = 60 minut			t = 90 minut			
	navážka pro sta-novení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]	navážka pro sta-novení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]	navážka pro sta-novení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]
1.	0,065	0,06	97,7	0,073	0,06	98,0	0,073	0,05	98,3
2.	0,068	0,07	97,4	0,072	0,04	98,6	0,065	0,04	98,4
		<b>průměr</b>	<b>97,5</b>		<b>průměr</b>	<b>98,3</b>		<b>průměr</b>	<b>98,4</b>

Tab. 9 uvádí hodnoty konverze při přípravě MAG kyseliny laurové, který byl následně použit pro experiment. Pro reakci bylo použito 100 g kyseliny palmitové. Dosažená konverze (98,6 %) byla o něco vyšší než ve stejném čase při přípravě testovacího vzorku (98,4 %).

Tab. 9: Stupně konverze pro MAG kyseliny laurové pro experiment.

t = 30 minut			t = 60 minut			t = 90 minut			
	navážka pro sta-novení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]	navážka pro sta-novení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]	navážka pro sta-novení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]
1.	0,097	0,07	98,2	0,074	0,05	98,3	0,127	0,07	98,6
2.	0,130	0,06	98,8	0,108	0,05	98,8	0,103	0,06	98,5
		<b>průměr</b>	<b>98,5</b>		<b>průměr</b>	<b>98,6</b>		<b>průměr</b>	<b>98,6</b>

Jak je uvedeno v kapitole 9.3.2, byly pro přípravu MAG kyseliny palmitové použity již upravené reakční poměry. Opět byl nejprve připraven testovací vzorek pro ověření průběhu reakce. V Tab. 10 je vidět výše dosažené konverze 97,3 %. Tato byla uspokojivá a mohlo se přistoupit k přípravě MAG pro experiment.

Tab. 10: Stupně konverze pro testovací vzorek MAG kyseliny palmitové.

t = 30 minut			t = 60 minut			t = 90 minut			
	navážka pro sta-novení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]	navážka pro sta-novení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]	navážka pro sta-novení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]
1.	0,073	0,20	91,7	0,072	0,09	96,2	0,071	0,07	97,0
2.	0,073	0,18	92,6	0,074	0,06	97,6	0,075	0,06	97,6
		<b>průměr</b>	<b>92,2</b>		<b>průměr</b>	<b>96,9</b>		<b>průměr</b>	<b>97,3</b>

Pro přípravu MAG kyseliny palmitové pro experiment bylo stejně jako u MAG kyseliny laurové použito 100 g kyseliny. Během reakce byly stanovovány stupně konverze (Tab. 11). Výsledný stupeň konverze po 120 minutách reakce dosáhl hodnoty 98,9 %. Tato hodnota konverze značí, že MAG kyseliny palmitové byl připraven ve vysoké čistotě, jelikož v reakční směsi zůstalo jen asi 1 % nezreagovaného glycidolu a kyseliny palmitové, tj. 0,5 % každého reaktantu vzhledem k ekvimolaritě reakce.

Tab. 11: Stupně konverze pro MAG kyseliny palmitové pro experiment.

	t = 30 minut			t = 60 minut			t = 90 minut		
	navážka pro stanovení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]	navážka pro stanovení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]	navážka pro stanovení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]
1.	0,121	0,40	90,1	0,103	0,04	98,8	0,081	0,03	98,9
2.	0,106	0,40	88,7	0,103	0,04	98,8	0,131	0,05	98,9
		<b>průměr</b>	<b>89,4</b>		<b>průměr</b>	<b>98,8</b>		<b>průměr</b>	<b>98,9</b>

Po provedené purifikaci za účelem odstranění nezreagovaných reaktantů a katalyzátoru (viz. kapitola 9.3.3) byl u obou připravených MAG stanoven konečný stupeň konverze (Tab. 12). Předpokladem bylo, že dojde ještě k mírnému nárůstu hodnot, tedy čistoty. Je zřejmé, že u MAG kyseliny laurové došlo k nárůstu na hodnotu 98,9 % a u MAG kyseliny palmitové na hodnotu 99,4 %. Takto čisté MAG bylo následně možné použít jako kalibrační standardy při HPLC analýze. Dosažené hodnoty vypovídají o výhodnosti použití adiční reakce mastné kyseliny na glycidol. Reakční podmínky této reakce jsou relativně mírné a během reakce nedochází ke vzniku vedlejších produktů, které by připravované MAG významně znečistily. Jediné nečistoty, které MAG připravené pomocí této reakce obsahují, jsou rezidua glycidolu, mastných kyselin a katalyzátoru. Těchto se však lze úspěšně zbavit procesem purifikace a lze tak získat MAG o vysoké čistotě na úrovni analytického standardu.

Tab. 12: Stupně konverze MAG po purifikaci.

MAG kyseliny laurové				MAG kyseliny palmitové		
	navážka pro stanovení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]	navážka pro stanovení [g]	spotřeba titračního činidla [ml]	stupeň konverze [%]
1.	0,073	0,03	98,9	0,075	0,02	99,6
2.	0,073	0,03	98,9	0,076	0,01	99,2
		<b>průměr</b>	<b>98,9</b>		<b>průměr</b>	<b>99,4</b>

### 10.2.2 Výsledky TLC analýzy

Pro orientační stanovení čistoty připravených MAG, byla provedena TLC analýza (kapitola 9.3.5). Na desky byly vždy naneseny vzorky zleva v pořadí: kyselina, kyselina, MAG a kyselina. Ze zakreslených poloh skvrn na chromatografických deskách na Obr. 11 lze vidět, že připravené MAG (na desce vždy 3. zleva) neobsahují detekovatelné nezreagované zbytky příslušných kyselin, což bylo potvrzeno i pomocí HPLC.



Obr. 11: Chromatografické desky TLC analýzy MAG kyseliny laurové a MAG kyseliny palmitové (vyvíjecí soustava – chloroform/voda/kyselina octová: 95/4,5/0,5).

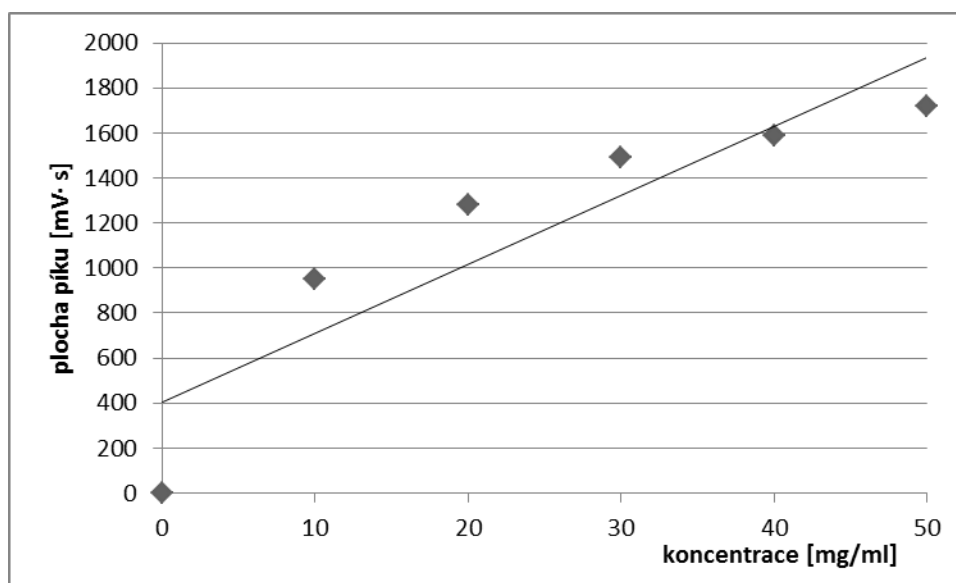
### 10.3 Kalibrace kapalinového chromatografu

Po úspěšné přípravě čistých vzorků MAG bylo přistoupeno ke kalibraci HPLC systému. Pro analýzu byly použity detektory UV a ELSD. Výsledkem kalibrací byly grafické závis-

losti ploch píků na koncentraci kalibračních roztoků, kterými byla proložena regresní přímka. Tato přímka byla použita jako kalibrační přímka a její rovnice byla použita k následným výpočtům. Grafické závislosti byly vytvořeny v počítačovém programu Microsoft Excel 2003. Nejprve byla provedena kalibrace UV detektoru, detektor ELSD byl kalibrován v následujícím kroku.

### 10.3.1 Kalibrace UV detektoru

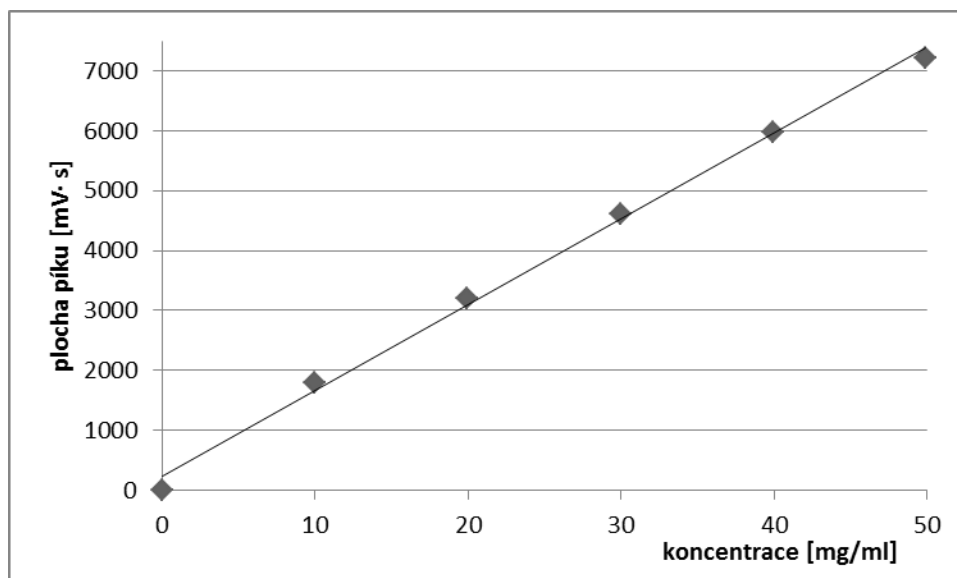
Nejprve byla provedena kalibrace pro MAG kyseliny laurové. Jako rozpouštědlo pro přípravu kalibračních standardů byla použita mobilní fáze. Zde však docházelo k problémům s rozpustností (s rostoucí koncentrací MAG v roztoku rozpustnost klesala) což dokumentuje nelineární průběh naměřených hodnot (Obr. 12). Hodnota korelačního koeficientu proložené regresní přímky byla 0,82. Rovněž tato hodnota potvrzuje, že vzniklá závislost není lineární a je tedy nevhodné proložit vzniklou závislost přímkou.



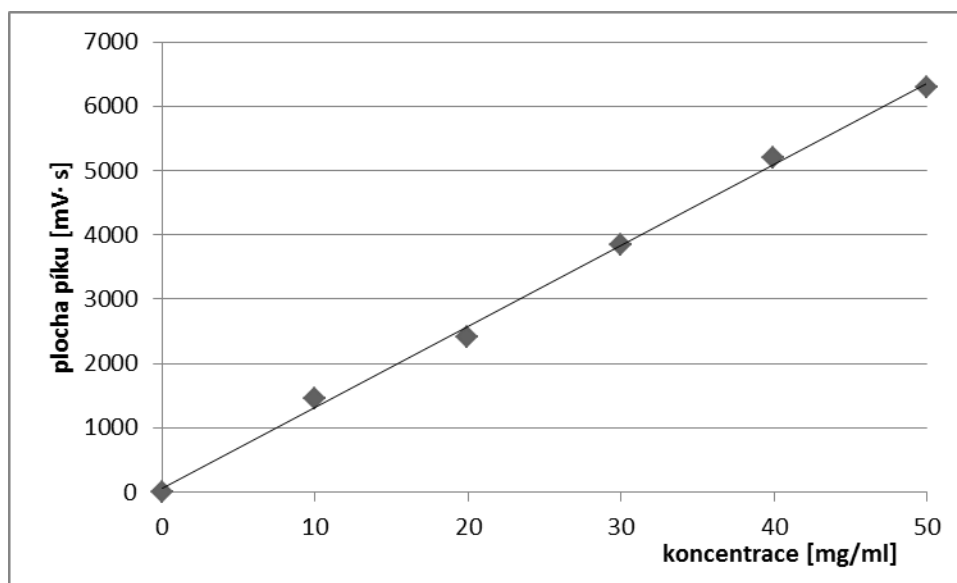
Obr. 12: Kalibrační přímka při použití mobilní fáze jako rozpouštědla  
MAG kyseliny laurové.

Následné použití ethanolu jako rozpouštědla odstranilo problémy s rozpustností a vzniklá závislost byla lineární (Obr. 13). Stejně tak byl ethanol použit pro rozpuštění MAG kyseliny palmitové. Vzniklá závislost je na Obr. 14.





Obr. 13: Kalibrační přímka při použití ethanolu jako rozpouštědla MAG kyseliny laurové – UV detektor.



Obr. 14: Kalibrační přímka pro MAG kyseliny palmitové – UV detektor.

Výsledkem kalibrace UV detektoru jsou tedy kalibrační přímky pro MAG kyseliny laurové a palmitové, vzniklé proložení regresních přímek grafickými závislostmi plochy píků na koncentraci kalibračních roztoků. Rovnice kalibračních přímek a jejich korelační faktory jsou následující:

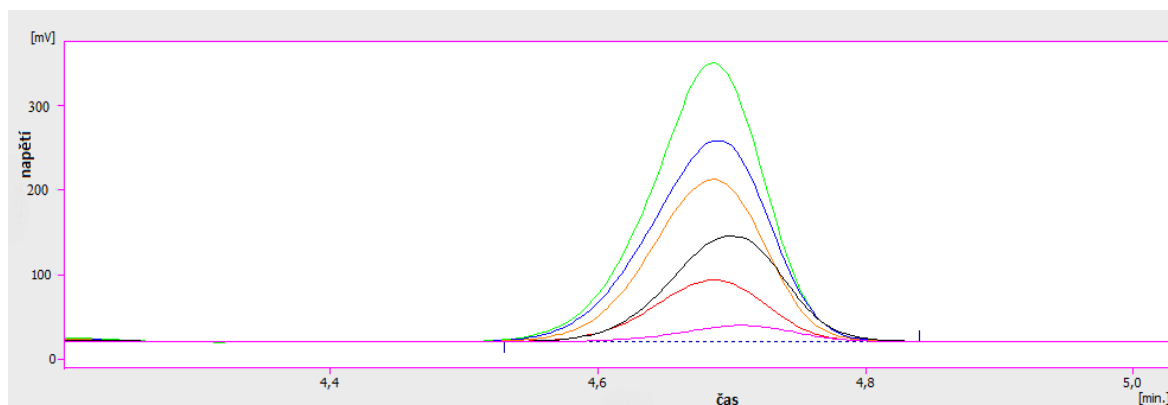
- MAG kyseliny laurové
  - $y = 143,19711x + 228,10962$
  - $R^2 = 0,9966$

- MAG kyseliny palmitové
  - $y = 126,2057x + 49,48736$
  - $R^2 = 0,9974$

Vysoké hodnoty korelačních koeficientů regresních přímek svědčí o vynikající shodě mezi naměřenými a vypočtenými hodnotami.

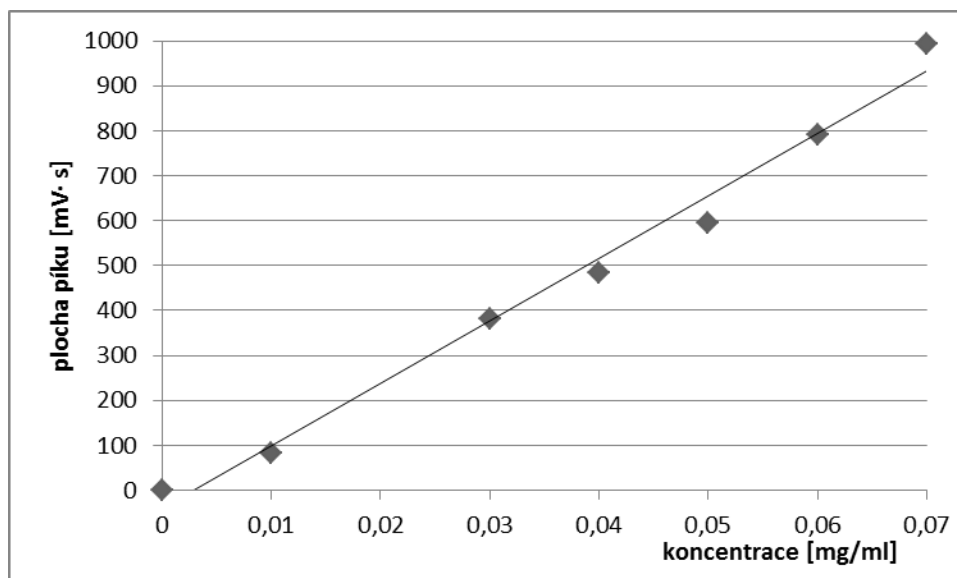
### 10.3.2 Kalibrace ELSD detektoru

Jak bylo řečeno, výsledkem kalibrace ELSD detektoru byla kalibrační přímka a její rovnice. Ta byla získána vytvořením závislosti plochy píků získaných z chromatogramů (Obr. 15) na koncentraci standardu. Na Obr. 15 je patrné, že jednotlivé píky mají stejný retenční čas (4,7 minut). Z toho vyplývá, že analýza vykazovala dobrou reprodukovatelnost.

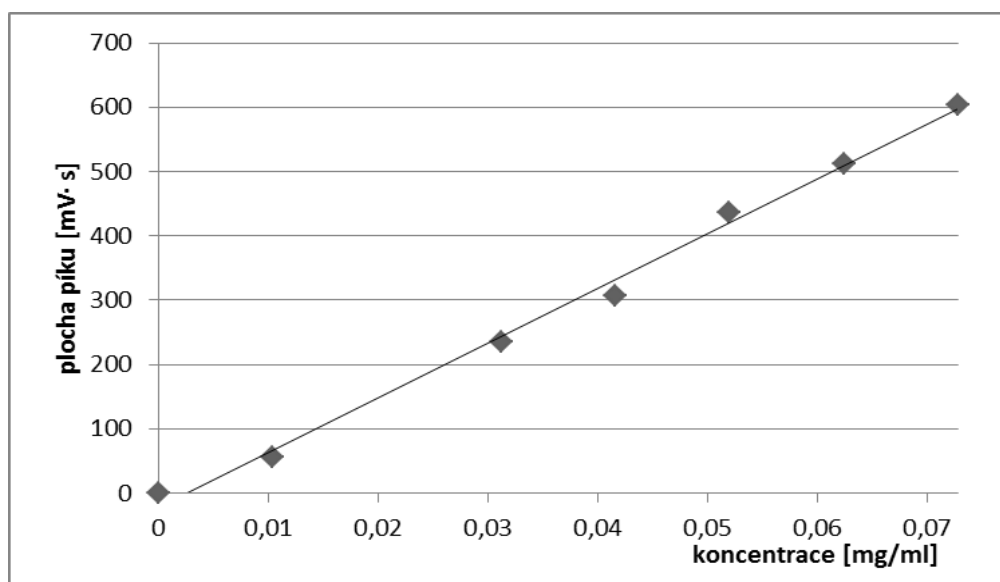


*Obr. 15: Chromatogram standardů MAG kyseliny laurové, chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20  $\mu$ l, nastavení ELSD detektoru viz kapitola 9.7.2.*

Vzniklé grafické závislosti ploch píků na koncentraci roztoků a jimi proložené regresní přímky, tedy kalibrační přímky jsou znázorněny pro MAG kyseliny laurové na Obr. 16 a pro MAG kyseliny palmitové na Obr. 17.



Obr. 16: Kalibrační přímka pro MAG kyseliny laurové – ELSD detektor.



Obr. 17: Kalibrační přímka pro MAG kyseliny palmitové – ELSD detektor.

Rovnice kalibračních přímek a jejich korelační faktory jsou následující:

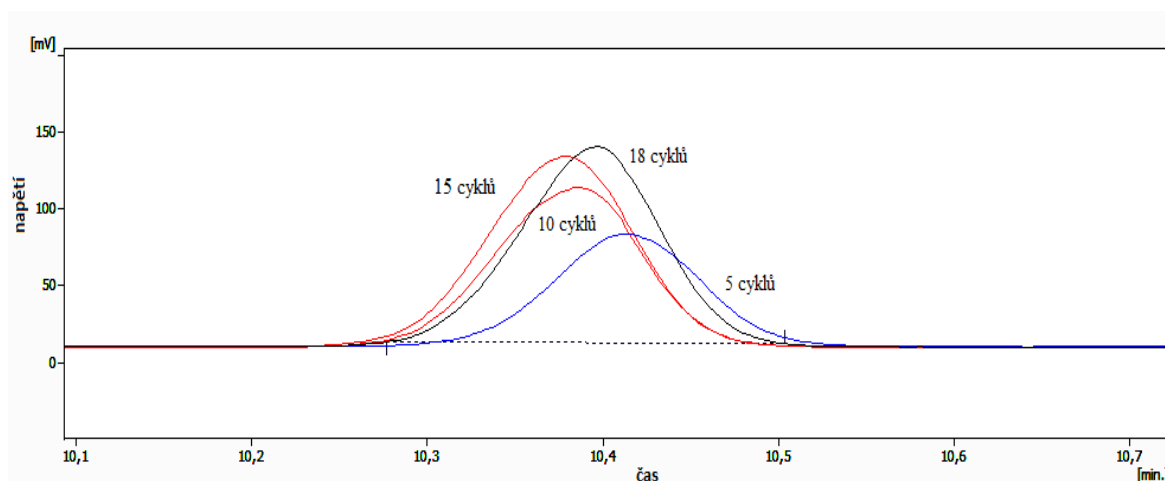
- MAG kyseliny laurové
  - $y = 13893,16993x - 40,23131$
  - $R^2 = 0,99$
- MAG kyseliny palmitové
  - $y = 8494,53108x - 21,23203$
  - $R^2 = 0,99$

Hodnoty korelačních koeficientů kalibračních přímek (0,99) opět vypovídají o vysoké přesnosti provedeného měření a shodě hodnot naměřených a vypočtených. Dále vypovídají o lineárním průběhu vzniklých kalibračních přímek a o jejich vhodnosti pro výpočty v následujících částech experimentu.

Po provedení kalibrace systému bylo přistoupeno k extrakci připravených vzorků pečiva (kapitola 9.5). Nejdříve musel být stanoven počet cyklů pro bezpečnou extrakci MAG ze vzorků.

## 10.4 Stanovení počtu cyklů pro extrakci

Stanovení počtu cyklů extrakce bylo provedeno postupem popsáním v kapitole 9.6.1. Z níže uvedeného chromatogramu (Obr. 18) a ze zaznamenaných hodnot vyplývá, že mezi velikostí plochy píku po 15. a 18. cyklu není významný rozdíl. Plochy píků vypočtené integrátorem systému nabývaly hodnot pro pík po 15. cyklu 717,97 mV·s a pro pík po 18. cyklu 720, 81 mV·s. Koncentrace ethanolom vyextrahovaného MAG po 15. cyklu byla 0,09 mg/ml a po 18. cyklu 0,09 mg/ml. Z těchto zjištěných hodnot vyplývá, že pro extrakci je bezpečné použít 20 cyklů, které zaručí vyextrahování maximálního možného množství MAG. Další zvyšování počtu cyklů by bylo časově náročné bez významného efektu v podobě nárůstu množství vyextrahovaného množství MAG.



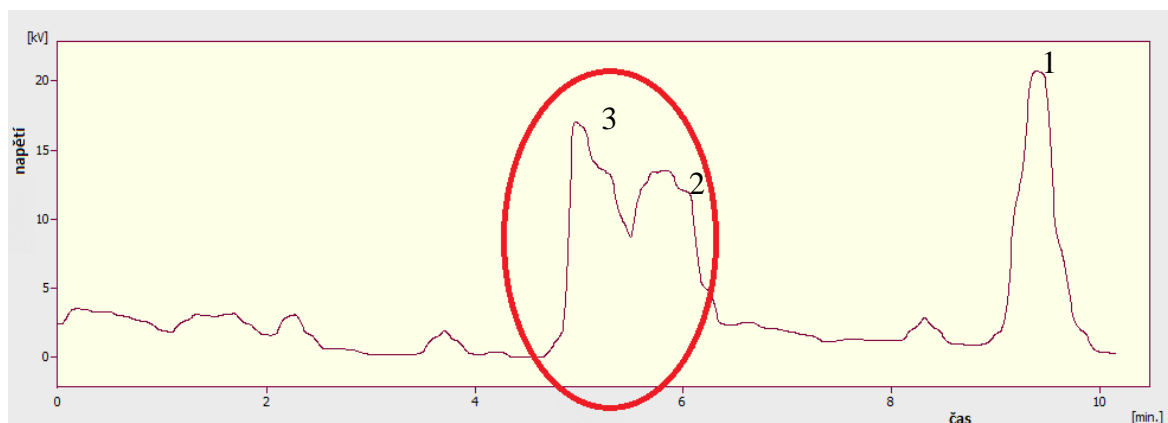
Obr. 18: Závislost velikosti píků v jednotlivých cyklech na retenčním času. Chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20  $\mu$ l.

## 10.5 Analýza vzorků a stanovení „recovery“

Po provedené extrakci ethanolom byly vzorky podrobeny analýze. Nejprve byl použit UV detektor, pomocí kterého byla provedena jen analýza vzorků s obsahem MAG kyseliny laurové. Poté co byl k dispozici, byl UV detektor nahrazen detektorem ELSD, kterým byly analyzovány jak vzorky s obsahem MAG kyseliny laurové tak i ty, pro jejichž přípravu byl použit MAG kyseliny palmitové.

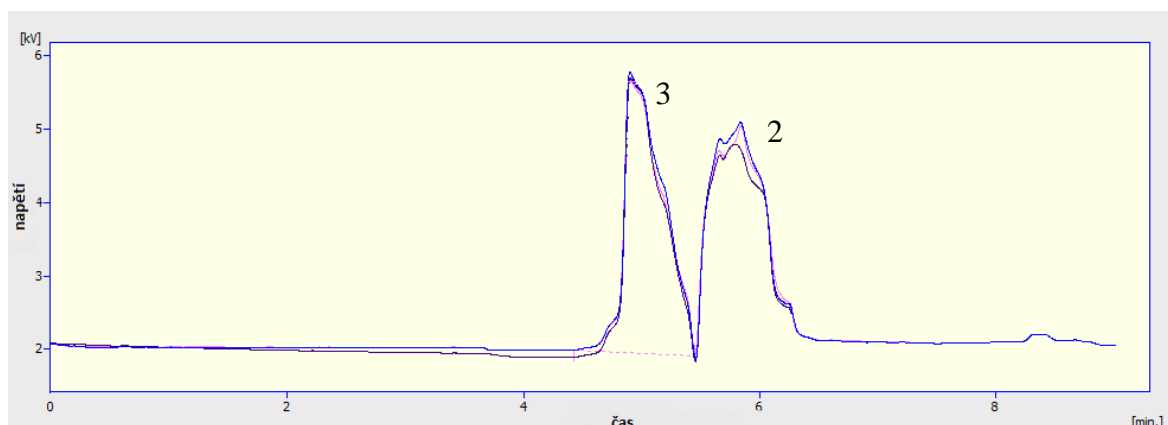
### 10.5.1 Analýza vzorků pomocí UV detektoru

Vzorky s obsahem MAG kyseliny laurové pro UV detekci byly připraveny k analýze dvojitým způsobem. Hlavní rozdíl mezi těmito dvěma způsoby je vytřepání do n-hexanu v případě druhého způsobu. Tento postup byl zvolen proto, že bylo třeba oddělit polární a nepolární podíly, jak je vidět na chromatogramu na Obr. 19.



Obr. 19: Chromatogram MAG kyseliny laurové získaný při prvním způsobu přípravy vzorků – bez vytřepávání, chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20  $\mu$ l.

Vytřepáním do n-hexanu se vzorek zbavil části nepolárních látek. Byl eliminován pík číslo 1 s retenčním časem 9,5 minut, který patrně odpovídal nepolárním acylglycerolům z oleje. Dále došlo k lepší separaci píků 2 a 3. Tato separace je zaznamenána na chromatogramu na Obr. 20.



Obr. 20: Chromatogram získaný druhým způsobem přípravy – vytřepání do n-hexanu, chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20  $\mu$ l.

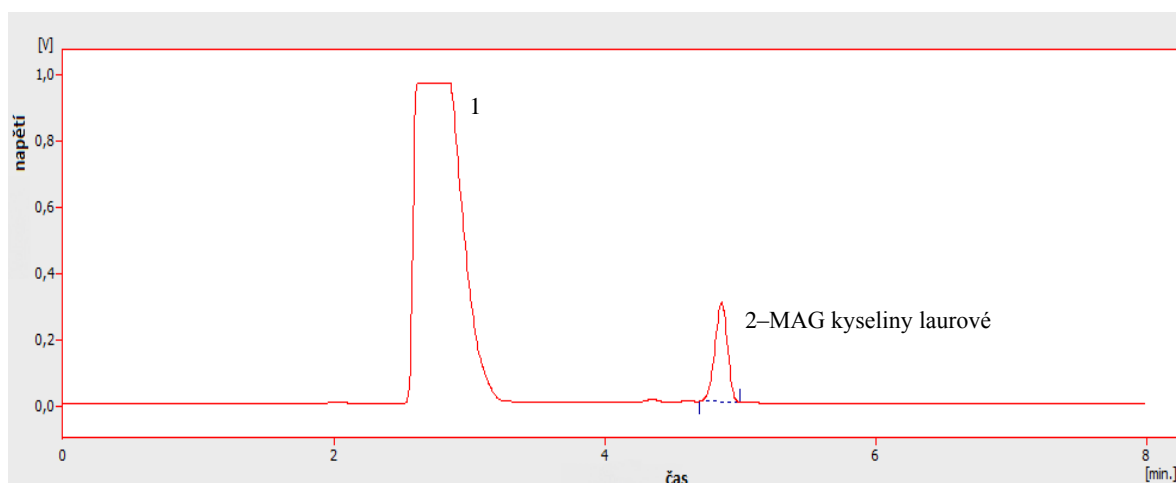
Tímto způsobem byl získán pík MAG kyseliny laurové (3), z jehož výšky bylo možné vypočítat koncentraci analytu a následně „recovery“. Od analýzy na UV detektoru však bylo nakonec upuštěno ihned, jak byl k dispozici ELSD detektor. Hlavní výhodou použití tohoto detektoru je jeho citlivost. Díky ní není třeba vyextrahované vzorky podrobovat dalším úpravám, čímž se zabrání možným ztrátám při manipulaci.

### 10.5.2 Analýza vzorků pomocí ELSD detektoru a stanovení „recovery“

ELSD detektorem byly analyzovány vzorky připravované při teplotě 70 °C i 170 °C s obsahem MAG kyseliny laurové i palmitové. Teplota 70 °C byla zvolena pro ověření, zda při záhřevu na teplotu pečení 170 °C nedochází k dekompozici vzorku MAG, resp. interakcím se složkami systému důsledkem zahřívání. Analýza vzorků s obsahem MAG kyseliny laurové se od analýzy vzorků s obsahem kyseliny palmitové lišila tím, že pro analýzu vzorků s MAG kyseliny laurové byla použita isokratická eluce a pro MAG kyselina palmitové bylo nutno použít eluci gradientovou.

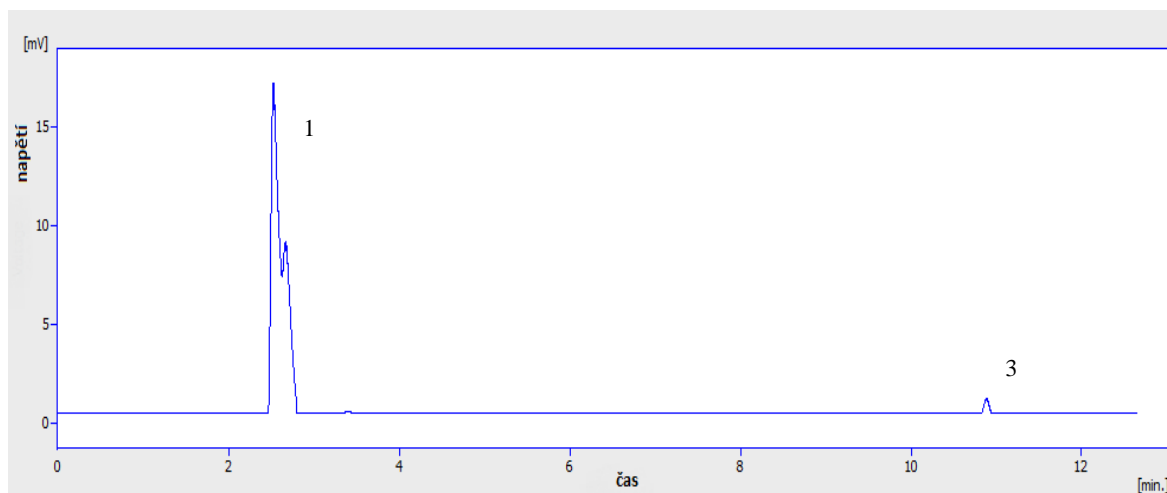
### 10.5.3 Analýza reálných vzorků s MAG kyseliny laurové a stanovení „recovery“

Pro analýzu bylo použito 8 vzorků o stejné hmotnosti připravovaných při teplotě 170 °C, která se běžně využívá při výrobě pečiva, a každý byl analyzován dvakrát. Na získaných chromatogramech, vzorový je uveden na Obr. 21, lze vidět dva píky.



Obr. 21: Příklad chromatogramu vzorku s obsahem MAG kyseliny laurové, chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20 µl, nastavení detektoru viz kapitola

Pík číslo 2 v retenčním čase 4,9 minut patří MAG kyseliny laurové. Pro ověření a identifikaci píku číslo 1 s retenčním časem 2,6 minut, o kterém se předpokládalo, že patří polárním frakcím mouky, byla mouka podrobena extrakci a následné analýze. Získaný chromatogram je na Obr. 22.



Obr. 22: Chromatogram vzorku mouky, chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1 ml/min, nástřik 20  $\mu$ l, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2.

S určitou dávkou opatrnosti lze skutečně pík přiřadit polární složce mouky. Pík číslo 3 s retenčním časem 11 minut pravděpodobně odpovídá zbytkovým tukovitým podílům mouky.

Ze získaných chromatogramů byly odečteny plochy píků monoacylglycerolu kyseliny laurové a z kalibrační rovnice byla následně dle vztahu (4) vypočítána koncentrace MAG ve vzorku. Z koncentrací bylo následně vypočteno „recovery“. Pro výpočet byla použita teoretická koncentrace pro jeden vzorek, která byla získána následující úvahou. Pro přípravu vzorků bylo použito 462,60 mg MAG. Vzniklé těsto bylo rozděleno na 19 kusů o stejné hmotnosti, v každém kusu tedy bylo 24,35 mg MAG. Pro extrakci byl použit 1 kus vzorku a 130 ml ethanolu, teoretická koncentrace MAG v extraktu tedy byla 0,19 mg/ml. Dosazením této teoretické koncentrace a koncentrací získaných z analýzy do rovnice (5) bylo vypočteno „recovery“ (ve výpočtu se zohlednilo ředění při přípravě vzorků). Pro každý vzorek, protože byl analyzován dvakrát, byly získány dva výsledky. Dle vztahu (1) byl z výsledků vypočten aritmetický průměr a výsledné „recovery“ bylo získáno vypočtením aritmetického průměru z výsledků osmi HPLC analyzovaných vzorků. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 13).



Tab. 13: Stanovení „recovery“ pro MAG kyseliny laurové – 170 °C.

Vzorek	Plocha píku [mV.s]		Koncentrace MAG [mg/ml]		Recovery [%]		
	1. stanovení	2. stanovení	1. stanovení	2. stanovení	1. stanovení	2. stanovení	průměr
1	389,32	398,43	0,14	0,15	75,3	77,0	76,1
2	432,00	442,69	0,16	0,16	83,4	85,4	84,4
3	436,80	430,85	0,16	0,16	84,3	83,1	83,7
4	418,81	417,45	0,15	0,15	80,9	80,6	80,7
5	391,23	393,63	0,14	0,14	75,6	76,1	75,9
6	410,54	400,82	0,15	0,15	79,3	77,4	78,4
7	388,13	401,24	0,14	0,15	75,0	77,5	76,3
8	397,25	422,59	0,15	0,15	76,8	81,6	79,2
						<b>průměr</b>	<b>79,3</b>

Z tabulky je patrné, že výsledné „recovery“ bylo stanovené, na 79,3 %. Rozptyl ve výsledcích (asi 8 %) je přijatelný. Je dán patrně tím, že při přípravě vzorků nebylo možné dosáhnout dokonalé homogenizace MAG v těstě, protože nebyl k dispozici hnětač, který by toto zajistil. Po následném rozdělení na jednotlivé kusy se tedy koncentrace MAG v jednotlivých vzorcích mohla lišit, přestože byly stejné hmotnosti.

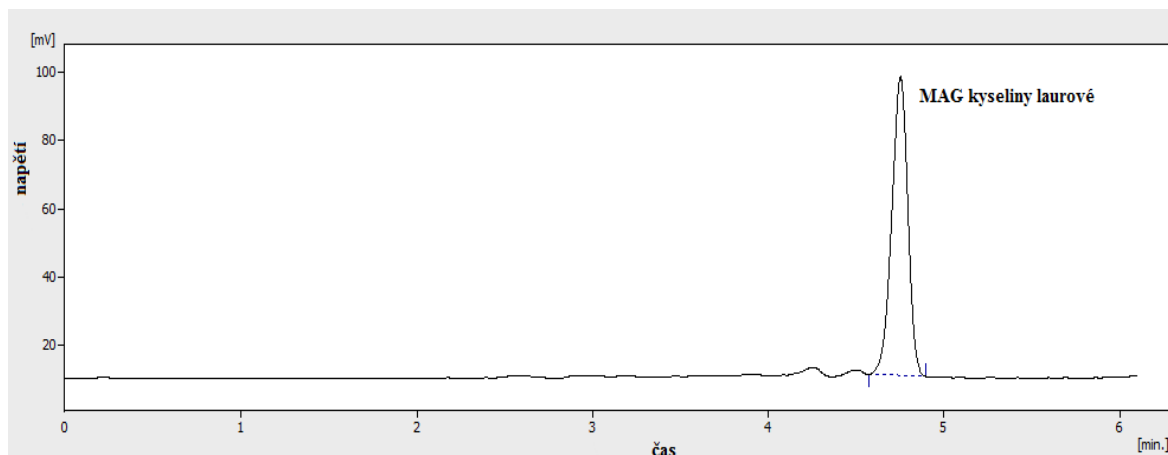
Zjištěné „recovery“ bylo tedy 79,3 %. Asi 20 % použitých MAG se tedy nepodařilo získat zpět. Důvodem by mohla být tvorba komplexů s amylosou nebo se složkami oleje, ztráty při pečení nebo při manipulaci. Zaměřili jsme se proto na zjištění, k jakým ztrátám MAG dochází během procesu pečení a na interakci oleje s MAG.

#### 10.5.3.1 Úbytek MAG kyseliny laurové během pečení

Velikost ztráty MAG během pečení byla zjišťována pomocí vážkové metody, jak je popsáno v kapitole 9.8. Hmotnost naváženého MAG byla 0,5495 g, po podrobení teplotě 170 °C po dobu 20 minut byla hmotnost MAG 0,5339 g. Rozdíl mezi hmotnostmi činí 0,0156 g, tedy 2,8 %, což je zanedbatelné. Z toho vyplývá, že při pečení dochází k minimálním ztrátám MAG kyseliny laurové účinkem tepelného namáhání a převážná část z množství, které se nepodařilo získat extrakcí zpět, se pravděpodobně podílí na tvorbě komplexů s amylosou nebo se složkami oleje. Proto byla dále ověřena interakce olej–MAG.

### 10.5.3.2 Interakce oleje s MAG kyseliny laurové

Jak je uvedeno v kapitole 9.9, pro zjištění, zda dochází k vzájemnému působení složek oleje a MAG, byly připraveny dva roztoky oleje a MAG v ethanolu. Jeden z nich byl zahříván 20 minut při teplotě 170 °C, aby se simuloval proces pečení. Poté byly oba roztoky analyzovány pomocí HPLC a bylo stanoveno „recovery“. Příklad získaného chromatogramu je na Obr. 23.



Obr. 23: Chromatogram roztoku oleje a MAG kyseliny laurové v ethanolu, chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20 µl, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2.

Každý roztok byl analyzován dvakrát a způsobem popsaným v kapitole 10.5.3 byla z navážek pro přípravu roztoků (kapitola 9.9, Tab. 6) vypočtena návratnost MAG. Ze získaných hodnot byla vytvořena tabulka (Tab. 14).

Tab. 14: Hodnoty „recovery“ pro analýzu interakce olej–MAG kyseliny laurové.

Vzorek	Plocha píku [mV.s]		Koncentrace MAG [mg/ml]		Recovery [%]		
	1. stanovení	2. stanovení	1. stanovení	2. stanovení	1. stanovení	2. stanovení	průměr
nezahřátý	483,84	480,52	0,04	0,04	100,0	100,0	<b>100,0</b>
zahřátý	543,17	552,78	0,04	0,04	80,0	80,0	<b>80,0</b>

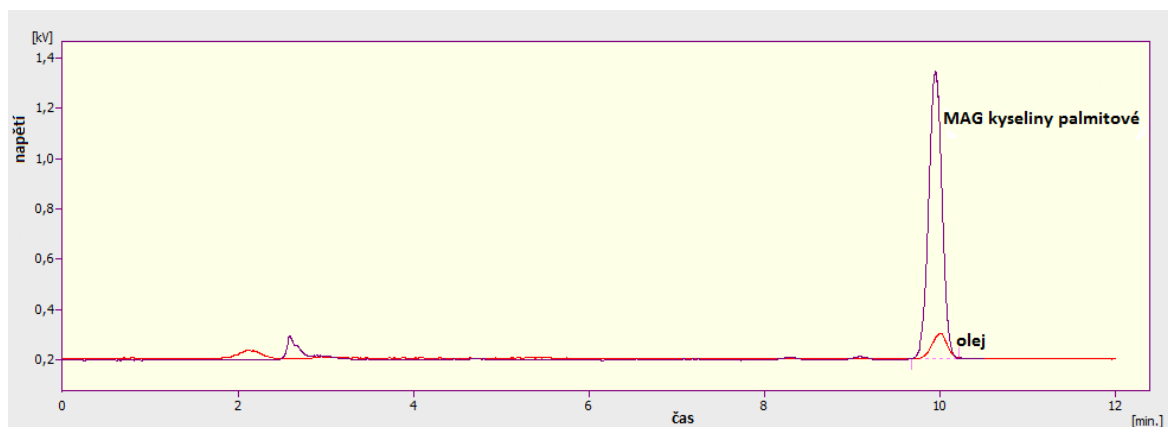
Z výše uvedené tabulky vyplývá, že pokud roztok nebyl před analýzou zahříván, byla návratnost MAG stoprocentní. Pokud byl však roztok zahříván, bylo zjištěné „recovery“

80,0 %. Pokud tuto hodnotu porovnáme s výslednou hodnotou z Tab. 15 (79,3 %) zjistíme, že tyto hodnoty jsou téměř identické.

Z těchto zjištění vyplývá, že množství MAG, které se nepodařilo získat zpět z přípravných reálných vzorků (asi 20 %) se pravděpodobně podílí na interakcích se složkami oleje. Komplexy s amylosou, které během pečení vznikají, se pomocí extrakčního činidla ethanolu podařilo rozrušit a MAG podílející se na jejich tvorbě vyextrahovat.

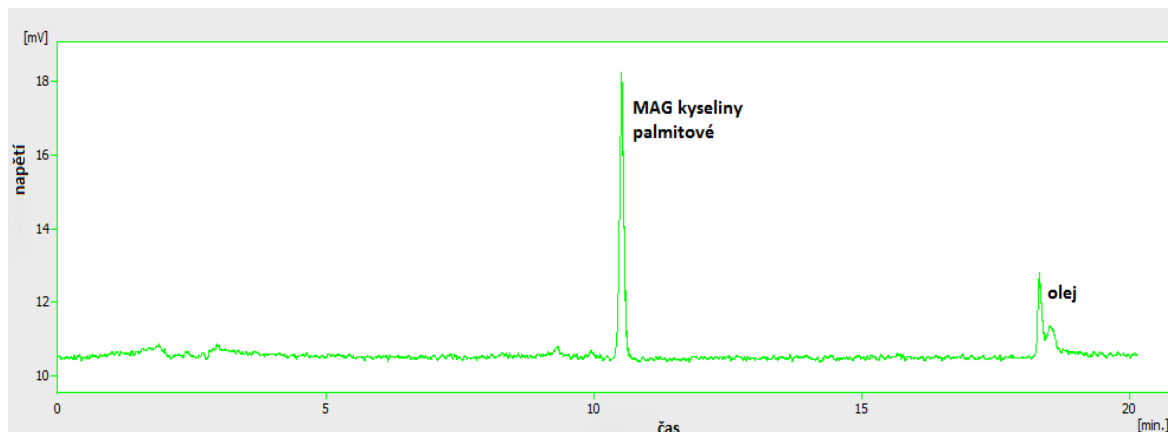
#### 10.5.4 Analýza reálných vzorků s MAG kyseliny palmitové a stanovení „recovery“

Analýza vzorků s obsahem MAG kyseliny palmitové probíhala nejprve isokratickou elucí, stejně jako u MAG kyseliny laurové. Pro kontrolu, zda nedochází k interferenci složek vzorku, byl připraven roztok oleje v ethanolu, který byl následně analyzován. Ze získaných chromatografů (Obr. 24) bylo zjištěno, že retenční čas oleje se shoduje s retenčním časem MAG kyseliny palmitové, čili že v použitém chromatografickém systému nedochází k řádné separaci.



Obr. 24: Chromatogram oleje a MAG kyseliny palmitové v isokratické eluci, chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20  $\mu$ l, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2.

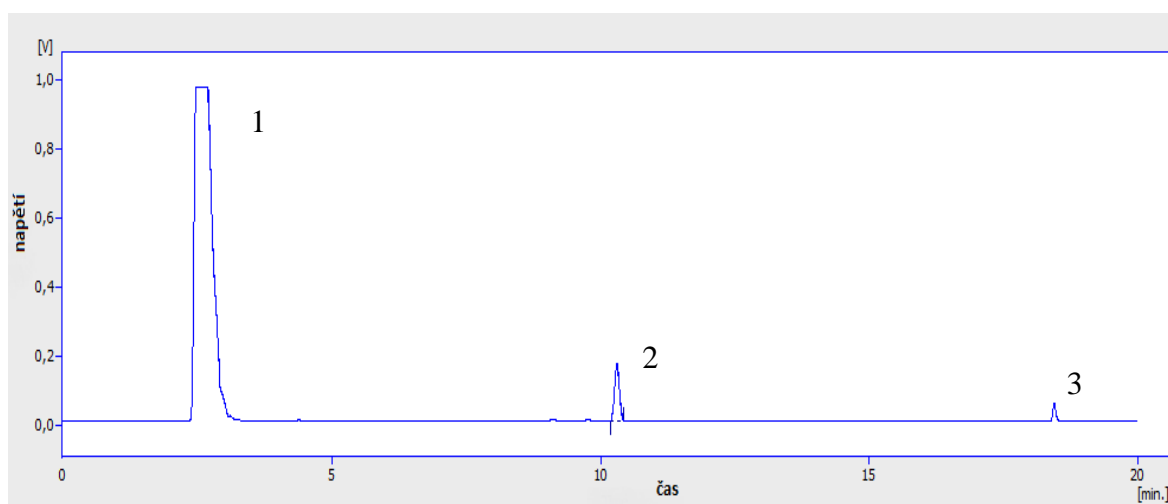
Z výše uvedeného důvodu bylo přistoupeno k eluci gradientové, jejíž parametry jsou popsány v kapitole 9.7.2.2. Pro ověření, že píky již nemají stejný retenční čas a dochází k jejich separaci, byl připraven modelový směsný vzorek složený z oleje a MAG kyseliny palmitové v ethanolu a byl podroben analýze.



Obr. 25: Chromatogram směsného vzorku oleje a MAG kyseliny palmitové, chromatografické podmínky: gradientová eluce, podmínky gradientu viz kapitola 9.7.2.2, průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20  $\mu$ l, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2.

Na Obr. 25 lze vidět, že tímto postupem došlo k separaci píku MAG kyseliny palmitové a složek oleje a je tedy možné použít tento režim pro analýzu samotných vzorků.

Jak je uvedeno v kapitole pojednávající o analýze vzorků s obsahem MAG kyseliny laurové, bylo analyzováno 8 vzorků připravených při teplotě 170  $^{\circ}$ C a každý vždy dvakrát. Na získaných chromatogramech (Obr. 26) lze vidět pík mouky (1), který byl identifikován z chromatogramu na Obr. 22, dále pík MAG kyseliny palmitové (2), v retenčním čase 10,5 minut., a jako poslední pík oleje (3).



Obr. 26: Příklad chromatogramu získaného analýzou vzorku s MAG kyseliny palmitové, chromatografické podmínky: gradientová eluce, podmínky gradientu viz kapitola 9.7.2.2, průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20  $\mu$ l, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2.

Z ploch píků získaných z chromatogramů byla vypočtena koncentrace MAG a následně „recovery“. Tento výpočet je taktéž popsán v předchozí kapitole. Za teoretickou koncentrací MAG ve vzorku byla vypočtena hodnota 0,19 mg/ml, která byla získána kalkulací z navážky MAG pro přípravu vzorků, způsobem popsaným výše. Výsledky byly opět zpracovány do tabulky (Tab. 15).

Tab. 15: Stanovení „recovery“ pro MAG kyselina palmitové – 170 °C.

Vzorek	Plocha píku [mV.s]		Koncentrace MAG [mg/ml]		Recovery [%]		
	1. stanovení	2. stanovení	1. stanovení	2. stanovení	1. stanovení	2. stanovení	průměr
1	186,32	174,10	0,11	0,11	59,1	55,3	57,2
2	174,30	170,47	0,11	0,10	55,3	54,1	54,7
3	153,10	139,20	0,09	0,08	48,7	44,4	46,6
4	200,21	197,92	0,12	0,12	63,3	62,6	63,0
5	153,82	140,06	0,09	0,08	48,9	44,7	46,8
6	166,33	145,07	0,10	0,09	52,8	46,3	49,6
7	168,13	170,87	0,10	0,10	53,4	54,3	53,8
8	122,92	134,34	0,07	0,08	39,4	42,9	41,2
						<b>průměr</b>	<b>51,6</b>

Jak je vidět z hodnot v tabulce Tab. 15, výsledné „recovery“ pro MAG kyseliny palmitové je 51,6 %. Vyšších hodnot „recovery“ by bylo pravděpodobně možné dosáhnout pomocí použití rozpouštědla s nižší polaritou, než má ethanol, nebo rozrušením vzniklých komplexů, které zmiňuje ve své práci Frederike Tufvesson [50, s. 61–71], [51, s. 359-365]. Ten zjistil, že na tvorbu stabilních krystalických komplexů MAG–amylosa má významný vliv teplota spolu s délkou a nasyceností zbytku řetězce mastné kyseliny navázaného v monoacylglycerolu. Zatímco pro MAG, které obsahují kratší řetězec zbytku mastné kyseliny, tedy i MAG kyseliny laurové, je pro tvorbu komplexů celkem dostačující i teplota 70 °C, pro MAG které mají ve své molekule navázaný delší řetězec zbytku mastné kyseliny, nebo je tento řetězec nenasycený, potřebují teploty vyšší, nebo při nižších teplotách podstatně delší výdrž než u MAG s krátkým řetězcem. V následující kapitole 10.5.5 bylo však dokázáno, že ethanol je vhodně zvoleným rozpouštědlem, které je schopno výše popsané komplexy rozrušit.

Z Tab. 15 vyplývá, že asi 48 % použitých MAG nebylo získáno zpět. Jak je uvedeno v kapitole 10.4.2.1, může se podílet toto množství na tvorbě komplexů s amylosou

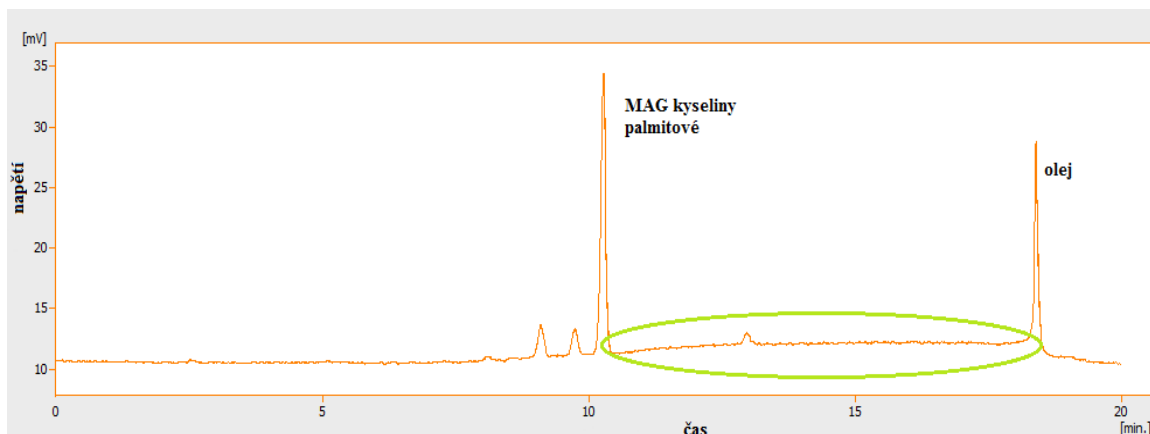
či s olejem, nebo mohlo dojít ke ztrátám během pečení nebo manipulace. Stejně jako při analýze reálných vzorků s obsahem MAG kyseliny laurové jsme se i při analýze vzorků obsahující MAG kyseliny palmitové zaměřili na ztráty, které mohou vzniknout během pečení a na možnou interakci olej–MAG. Tyto možné příčiny bylo nutno prozkoumat. V první fázi jsme zjišťovali, zda nedojde ke ztrátám hmotnosti MAG působením teploty.

#### 10.5.4.1 Úbytek MAG kyseliny palmitové během pečení

Stanovení úbytku MAG během pečení bylo provedeno opět pomocí vážkové metody, kdy bylo naváženo 0,5380 g a po podrobení teplotě 170 °C a vychladnutí byla zjištěna hmotnost 0,5284 g. Rozdíl mezi hmotnostmi je zanedbatelných 0,0096 g, což je procentuálně vyjádřeno 1,8 %. Ze zjištěných hodnot vyplývá, že většina MAG, které se nepodařilo získat pomocí extrakce zpět, by se mohla podílet na tvorbě komplexů s hlavními složkami pečiva amylosou nebo s olejem. Proto jsme se při analýze vzorků s MAG kyseliny palmitové zaměřili opět na analýzu vzniku komplexů MAG se složkami oleje. To je samozřejmě jednodušší, než zjišťovat interakce v pevné fázi mouky.

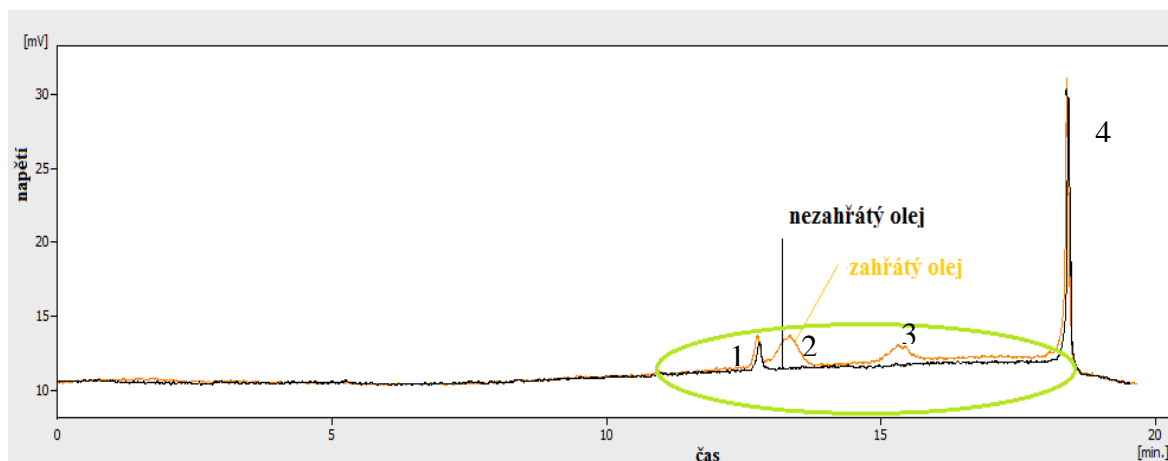
#### 10.5.4.2 Interakce oleje s MAG kyseliny palmitové

Pro zjištění zda dochází k vzájemnému působení složek oleje a MAG, byly opět připraveny dva roztoky oleje a MAG v ethanolu a jeden z nich byl zahříván 20 minut při teplotě 170 °C. Poté byly oba roztoky podrobeny HPLC analýze a bylo stanoveno „recovery“. Příklad získaného chromatogramu je na Obr. 27.



Obr. 27: Chromatogram roztoku oleje a MAG kyseliny palmitové v ethanolu, chromatografické podmínky: gradientová eluce, podmínky gradientu viz kapitola 9.7.2.2, průtok mobilní fáze: 1 ml/min, nástřik 20  $\mu$ l, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2.

Na chromatogramu na Obr. 27 lze vidět, že dochází k mírnému vybočení základní linie směrem vzhůru (označeno zeleně) a výskytu malého píku s retenčním časem cca 13 minut. To nabízí myšlenku, že by se mohlo jednat o řadu oxidačních produktů nenasycených mastných kyselin z oleje. Proto byly dále podrobeny analýze dva roztoky samotného oleje v ethanolu. Jeden byl zahříván při 170 °C 20 minut a druhý byl připraven při laboratorní teplotě. Získaný překryv chromatogramů je na Obr. 28.



Obr. 28: Chromatogram roztoků oleje v ethanolu (zahřátý i nezahřátý), chromatografické podmínky: gradientová eluce, podmínky gradientu viz kapitola 9.7.2.2, průtok mobilní fáze: 1 ml/min, nástržik 20  $\mu$ l, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2.

Je zřejmé, že zahříváním vznikly další látky (viz píky 2 a 3), což lze přičíst tvorbě oxidačních produktů zahříváním mastných kyselin obsažených v oleji (oranžová křivka). U obou vzorků, jak za tepla tak studena připravených, pak byl detekován pík s retenčním časem 13 minut. Ten patří patrně oxidačnímu produktu, jenž vznikl stárnutím oleje po dobu jeho uskladnění. Reálné vzorky pečiva byly připraveny dříve, než proběhla tato analýza, v době, kdy byl olej čerstvý. Proto se pík nevyskytuje např. u chromatogramů na Obr. 25, 26. Použitý slunečnicový olej obsahuje vysoký obsah nenasycených mastných kyselin, které snadněji podléhají oxidaci než kyseliny nenasycené.

Roztoky oleje a MAG byly analyzovány každý dvakrát. Ze získaných ploch píků byla způsobem popsaným v kapitole 10.5.3 z navážek pro přípravu roztoků (kapitola 9.9, Tab. 6) vypočtená návratnost MAG a zjištěné hodnoty byly zaznamenány do tabulky (Tab. 16).

Tab. 16: Hodnoty „recovery“ pro analýzu interakce olej–MAG kyseliny palmitové.

Vzorek	Plocha píku [mV.s]		Koncentrace MAG [mg/ml]		Recovery [%]		
	1. stanovení	2. stanovení	1. stanovení	2. stanovení	1. stanovení	2. stanovení	průměr
nezahřátý	517,63	519,12	0,06	0,06	100	100	100
zahřátý	201,03	200,98	0,03	0,03	52,3	52,3	52,3

Z hodnot v tabulce (Tab. 16) vyplývá, že ve vzorcích, které nebyly zahřívány nevznikají žádné produkty olej–MAG. Analýzou bylo vyizolováno 100 % MAG. Naopak po zahřátí bylo zjištěno, že v roztoku je 52,3 % MAG, které byly původně pro přípravu použity. Tato hodnota je shodná s hodnotami získanými při analýze reálných vzorků. Z toho vyplývá, že množství MAG, které se nepodařilo z reálných vzorků získat zpět, se podílí na tvorbě produktů se složkami oleje.

### 10.5.5 Analýza reálných vzorků pečiva s obsahem MAG kyseliny laurové a MAG kyseliny palmitové připravených při teplotě 70 °C

Další částí experimentu bylo stanovení „recovery“ ze vzorků, které se připravovaly při nižší teplotě. Analýza byla pro oba vzorky provedena třikrát a výpočet „recovery“ byl proveden způsobem popsáním v kapitole 10.5.3. Teoretická koncentrace MAG kyseliny laurové ve vzorku byla 0,20 mg/ml. V Tab. 17 jsou zaznamenány zjištěné hodnoty.

Tab. 17: „Recovery“ pro vzorek MAG kyseliny laurové – 70 °C.

	plocha píku [mV.s]	koncentrace MAG [mg/ml]	Recovery [%]
1. stanovení	2141,65	0,16	78,5
2. stanovení	2276,49	0,17	83,4
3. stanovení	2185,13	0,16	80,1
		průměr	80,7

Zjištěná hodnota „recovery“ 80,7 % je blízká hodnotě (79,3 %) zjištěné u vzorků připravených při 170 °C. Rozdíl mezi hodnotami mohou činit ztráty, které vzniknou během pečení při vyšší teplotě. V kapitole 10.5.4.1 bylo zjištěno, že množství MAG nezískané extrakcí zpět tvoří pravděpodobně komplexy se složkami oleje, totéž lze říci i v tomto případě.



Stejný experiment byl proveden i pro MAG kyseliny palmitové. Vzorek připravený při teplotě 70 °C byl analyzován třikrát a následně byla z ploch píků vypočtena koncentrace vzorku a „recovery“. Pro výpočet byla jako teoretická koncentrace MAG ve vzorku vzata hodnota 0,20 mg/ml, zjištěná výpočtem z navážky MAG pro přípravu vzorku 0,2320 g. Zjištěné hodnoty byly zpracovány do následující tabulky (Tab. 18).

Tab. 18: „Recovery“ pro vzorek MAG kyseliny palmitové – 70 °C.

	plocha píku [mV.s]	koncentrace MAG [mg/ml]	Recovery [%]
<b>1. stanovení</b>	1550,48	0,19	92,5
<b>2. stanovení</b>	1410,03	0,17	84,2
<b>3. stanovení</b>	1620,89	0,19	96,7
		<b>průměr</b>	<b>91,1</b>

Zjištěná hodnota 91,1 % je výrazně vyšší, než hodnota „recovery“ zjištěná u vzorků připravených za vyšší teploty i než u obou typů vzorků s obsahem MAG kyseliny laurové. Avšak ze zjištění získaných z analýzy roztoků oleje a MAG vyplývá, že komplexy amylo-sa-MAG se extrakcí ethanolem rozruší a ta část MAG, která se nepodaří vyextrahovat se podílí na tvorbě komplexu olej-MAG. Proto i kdyby MAG kyseliny palmitové tvořil za teploty 70 °C komplex s amylosou, byl by extrakcí rozrušen. Porovnáním hodnot získaných analýzou vzorků připravených při teplotě 170 °C a vzorků připravených při 70 °C lze říct, že MAG kyseliny palmitové při teplotě 70 °C se složkami oleje neinteraguje.

## ZÁVĚR

Z literární rešerše vyplynulo, že MAG jsou nejběžněji používané emulgátory v pekařství, kde se používají pro oddálení stárnutí a tvrdnutí pečiva. Mezi efektivní způsoby přípravy MAG patří adice mastné kyseliny na glycidol. Touto reakcí jsou dosahovány vysoké stupně konverze (99 %).

Pro stanovení monoacylglycerolů v různých systémech nelze vytvořit unifikovaný způsob, protože každý systém obsahuje různé látky, které mohou s MAG interferovat a stanovení tak ovlivňovat.

Cílem této diplomové práce bylo proto vytvořit metodiku stanovení MAG v reálných potravinářských systémech. Součástí byla příprava MAG, jejich aplikace do pečiva, zpětná izolace a analýza pomocí HPLC.

Pro tento experiment byly vytvořeny modelové vzorky pečiva, připravené při teplotě 70 °C a 170 °C. Připravené vzorky obsahovaly MAG kyseliny laurové i palmitové, které byly syntetizovány adiční reakcí příslušné mastné kyseliny s glycidolem. Během přípravy bylo zjištěno, že pomocí reakčních parametrů zvolených dle Janiše [31] nelze dosáhnout dostatečně vysoké konverze. Jejich úpravou (poměr kyseliny a glycidolu 1:1,5 a 0,5 % hm. vysušeného katalyzátoru) a následné purifikaci dvojnásobnou rekrystalizací dosáhla konverze pro MAG kyseliny laurové 98,9 % a pro MAG kyseliny palmitové 99,4 %. Takto purifikované MAG byly použity jako analytické standardy pro kalibraci HPLC systému.

Pro kalibraci HPLC systému s detekcí UV a ELSD byly připraveny ethanolické roztoky MAG. Regresní rovnice vypočtených kalibračních přímek vykazovaly vysoké hodnoty korelačních faktorů a byly následně použity pro další výpočty.

Pro extrakci MAG z modelových vzorků pečiva byl zvolen ethanol a 20 cyklů stanoveno jako bezpečný počet zaručující vyextrahování maximálního množství MAG. Navýšení cyklů bylo bez efektivního účinku. Vzorky byly podrobeny extrakci a získaný extrakt byl analyzován HPLC systémem. Nejprve byl použit UV detektor, kterým byla provedena analýza vzorků s obsahem MAG kyseliny laurové. Vzorky však musely být, pro nižší citlivost detektoru, dále upravovány zahušťováním a vytřepáváním s n-hexanem. To se ukázalo být nevýhodným s ohledem na přesnost postupu. Proto byl následně uveden do provozu ELSD detektor, který ve srovnání s UV je řádově 1000x citlivější a vzorky tak nemusely být složitě upravovány.

Pomocí ELSD detektoru byly analyzovány vzorky s obsahem MAG kyseliny laurové i palmitové, připravované při teplotě 170 °C a 70 °C. Návratnost pro MAG kyseliny laurové u vzorku zahřívání na 170 °C byla 79,3 % a při teplotě 70 °C 80,7%. Bylo tedy prokázáno, že k úbytku nedochází v důsledku působení teploty v daném intervalu. Ztráty lze přičíst interakci MAG se složkami použitého oleje, jelikož při zahřívání samotné směsi olej–MAG na 170 °C bylo docíleno stejného „recovery“ 80,0 %

Pro MAG kyseliny palmitové bylo stanoveno „recovery“ 51,6 % při 170 °C. Obdobné hodnoty bylo dosaženo při analýze zahřívání systému oleje a MAG na stejnou teplotu. Při analýze vzorku pečiva připraveného při nižší teplotě (70 °C) byla však hodnota „recovery“ podstatně vyšší, než u vzorků pečených při 170 °C. Návratnost byla 91,1 %.

Analýzou roztoků obou MAG a oleje, které byly smíchány za studena, byla zjištěna návratnost 100 %. To značí, že teplota významněji ovlivňuje zejména interakci MAG kyseliny palmitové se složkami oleje. U MAG kyseliny laurové je teplota významná jen do 70 °C. Je to patrně způsobeno délkou uhlíkatého řetězce zbytku kyseliny.

Zahříváním samotných MAG obou kyselin na 170 °C po dobu 20 minut, což byla doba pečení, nedošlo k signifikantním hmotnostním úbytkům (cca 2%).

Ze zjištěných hodnot tedy vyplývá, že MAG, které se nepodařilo ze vzorků vyextrahovat, se nejspíše podílejí na interakcích se složkami oleje a že komplexy amylosa–MAG, které během pečení vznikají, jsou extrakcí ethanolem rozrušovány.

Závěrem lze konstatovat, že byla vyvinuta a otestována metodika stanovení MAG v reálných systémech, což bylo cílem této DP.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] O'BRIEN, Richard D. *Fats and oils: formulating and processing for applications*. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c2004, s. 147, 298. ISBN 08-493-1599-9.
- [2] SAWA, K., S. INOUE, E. LYSENKO, N.M. EDWARDS a K.R. PRESTON. Effects of purified monoglycerides on Canadian short process and sponge and dough mixing properties, bread quality and crumb firmness during storage. *Food Chemistry*. 2009, vol. 115, issue 3, s. 884–890. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.01.010.
- [3] Monoacylglycerols. *Cyberlipid center* [online]. 2001 [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://www.cyberlipid.org/glycer/glyc0002.htm>
- [4] AOCS. *AOCS Lipid Library* [online]. 2014 [cit. 2014-09-18]. Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/mg/index.htm>
- [5] MOONEN, Hans a Henny BAS. Mono- and diglycerides. In: WHITEHURST, Robert J. *Emulsifiers in food technology* [online]. Ames, Iowa: Blackwell Pub., c2004, s. 40–58 [cit. 2015-03-10]. ISBN 9781405118026-.
- [6] *Systematika povrchově aktivních látek* [Distanční text]. 2007. s. 34–35.
- [7] VANG SPARS<sup>√</sup>[], Flemming, Niels KROG. Food Emulsifiers: Their Chemical and Physical Properties. AL], Ed. by Stig E. Friberg ... [et]. *Food Emulsions* [online]. 4th ed. Hoboken: Marcel Dekker Inc, 2003 [cit. 2015-01-23]. ISBN 9780203913222.
- [8] BELITZ, H, W GROSCH a Peter SCHIEBERLE. *Food chemistry* [online]. 4th rev. and extended ed. Berlin: Springer, c2009 [cit. 2014-11-07]. s. 157 ISBN 9783540699347-.
- [9] POKORNÝ, Jan. Chemie tuků a jiných lipidů: Rozpustnost v organických rozpouštědlech, ve vodě a močovinné adukty. In: JAN, Pokorný, Dubská LUDMILA. *Technologie tuků*. 1985. vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1986, s. 41–42. ISBN 04-833-86.
- [10] STAMPFLI, L. a B. NERSTEN. Emulsifiers in bread making. *Food Chemistry*. 1995, vol. 52, issue 4, s. 353–360.

- [11] MAREŠ, Emil. Potravinářské emulgátory: Monoacylglycerolové emulgátory. In: JAN, Pokorný, Dubská LUDMILA. *Technologie tuků*. 1985. vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1986, s. 292–293. ISBN 04-833-86.
- [12] PAREYT, Bram, Sean M. FINNIE, Joke A. PUTSEYS a Jan A. DELCOUR. Lipids in bread making: Sources, interactions, and impact on bread quality. *Journal of Cereal Science* [online]. 2011, vol. 54, issue 3, s. 266–279 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1016/j.jcs.2011.08.011.
- [13] WHITEHURST, Robert J. *Emulsifiers in food technology*. Ames, Iowa: Blackwell Pub., c2004, s. 48. ISBN 9781405118026-.
- [14] GÓMEZ, Manuel, Silvia del REAL, Cristina M. ROSELL, Felicidad RONDA, Carlos A. BLANCO a Pedro A. CABALLERO. Functionality of different emulsifiers on the performance of breadmaking and wheat bread quality. *European Food Research and Technology* [online]. 2004, vol. 219, issue 2, s. 145–150 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1007/s00217-004-0937-y.
- [15] JOVANOVICH, G, M ANON a ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ ΡΑΦΑΗΛΙΔΗΣ. Amylose-lipid Complex, Physicochemical Properties and the Effects of Different Variables. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* [online]. 1999, vol. 32, issue 2, s. 95–101 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.12681/eadd/4112.
- [16] BUCHMANN, Stephan. Main cosmetic vehicles. In: *Handbook of cosmetic science and technology*. 2nd ed. New York: Taylor, 2006, s. 115–116. ISBN 1-57444-824-2.
- [17] ZOCCHI. Skin feel agents. In: *Handbook of cosmetic science and technology*. 2nd ed. New York: Taylor, 2006, s. 251–252. ISBN 1-57444-824-2
- [18] SUBRAMANYAN, Kumar a K.P. ANANTH. Skin care: Cleansing agents. In: BAUMANN, Leslie a Leslie BAUMANN. *Cosmetic dermatology and medicine: principles and practice*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, c2009, s. 279–280. ISBN 9780071641289.
- [19] DAVIDSON, P, John Nikolaos SOFOS a Alfred Larry BRANEN. *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Boca Raton: Taylor, 2005, 706 p. *Food science and technology* (Marcel Dekker, Inc.), 145. s. 332–333. ISBN 978-082-4740-375.

- [20] NAIR, M.K.M., J. JOY, P. VASUDEVAN, L. HINCKLEY, T.A. HOAGLAND a K.S. VENKITANARAYANAN. Antibacterial Effect of Caprylic Acid and Monocaprylin on Major Bacterial Mastitis Pathogens. *Journal of Dairy Science* [online]. 2005, vol. 88, issue 10, s. 3488–3495 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(05)73033-2.
- [21] DUFOUR, M., J. M. MANSON, P. J. BREMER, J.-P. DUFOUR, G. M. COOK a R. S. SIMMONDS. Characterization of Monolaurin Resistance in *Enterococcus faecalis*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2007, vol. 73, issue 17, s. 5507–5515 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1128/aem.01013-07.
- [22] BRANEN, Jill K. a P. Michael DAVIDSON. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2004, vol. 90, issue 1, s. 63–74 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00172-7.
- [23] ALTIERI, Clelia, Antonio BEVILACQUA, Daniela CARDILLO a Milena SINIGAGLIA. Effectiveness of fatty acids and their monoglycerides against gram-negative pathogens. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2009, vol. 44, issue 2, s. 359–366 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2008.01744.x.
- [24] RŮŽIČKA, Jan, Kateřina VELCLOVÁ, Rahula JANIŠ a Jiří KREJČÍ. Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. *European Food Research and Technology* [online]. 2003, vol. 217, issue 4, s. 329–331 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1007/s00217-003-0764-6.
- [25] DOLEŽÁLKOVÁ, Iva. *Účinky vybraných monoacylglycerolů na růst bakterií a mikroskopických vláknitých hub*. Brno, 2010. 98 l. Rigorózní práce. Masarykova univerzita. s. 12–15.
- [26] BUŇKOVÁ, Leona, Jiří KREJČÍ, Rahula JANIŠ, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Pavlína VLTAVSKÁ, Lucie KULEDOVÁ a František BUŇKA. Influence of monoacylglycerols on growth inhibition of micromycetes in vitro and on bread. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2010, vol. 112, issue 2 [cit. 2014-11-07]. s. 173–179 DOI: 10.1002/ejlt.200900070. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.200900070>

- [27] KENAR, J. A., F. D. GUNSTONE a G. KNOTHE. Chemical Properties: Hydrolysis, alcoholysis, esterification, and interesterification. In: John L. HARWOOD, Frank D. GUNSTONE a Albert J. DIJKSTRA. *The lipid handbook with CD-ROM* [online]. 3rd ed. Boca Raton: CRC/Taylor, 2007, s. 872–873 [cit. 2015-03-18]. ISBN 9781420009675.
- [28] VELÍŠEK, Jan. Fats, oils and other lipids: Reactions. In: VELÍŠEK, Jan. *The chemistry of food*. New York: John Wiley & Sons Inc, 2014, s. 145–198. ISBN 9781118383810.
- [29] SONNTAG, Norman O. V., E. OSTERBERG a Kathleen WARNER. Glycerolysis of fats and methyl esters — Status, review and critique. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1982, vol. 59, issue 10, s. 795A–802A. DOI: 10.1007/bf02634442.
- [30] HONG, Nanjing, Ling-Zhi CHEONG a Xuebing XU. Strategies to obtain high content of monoacylglycerols. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2014, vol. 116, issue 2, s. 97–107 [cit. 2014-07-02]. DOI: 10.1002/ejlt.201300336. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201300336>
- [31] JANIŠ, R., KREJČÍ, J., KLÁSEK, A. Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidol and fatty acids catalyzed by the chromium (III) fatty acid system. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2000, s. 351–354.
- [32] JANIS, RAHULA, ANTONIN KLASEK a JANA BOBALOVA. CHROMIUM (III) ACETATE HYDROXIDE – An efficient catalyst for preparation of 1-monoacylglycerols by the glycidol–fatty acid reaction. *Journal of Food Lipids* [online]. 2006, vol. 13, issue 2, s. 199–209 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1111/j.1745-4522.2006.00045.x.
- [33] OLMBERG, K., E. OSTERBERG a Kathleen WARNER. Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1988, vol. 65, issue 9, s. 1544–1548. DOI: 10.1007/bf02898325.
- [34] G. MARANGONI, Alejandro a Wendy M. WILLIS. Enzymatic interesterification. In: *Food lipids chemistry, nutrition, and biotechnology* [online]. Edited by

- Casimir C. Akoh and Min David B. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 2008, s. 808–834 [cit. 2015-03-18]. ISBN 9781439875551.
- [35] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, s. 10–26. ISBN 80-863-6907-2.
- [36] DOUŠA, Michal. ELSD - Detektor. *HPLC.cz* [online]. 2011 [cit. 2015-02-13]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/ELSD.htm#\\_top](http://www.hplc.cz/Teorie/ELSD.htm#_top)
- [37] SUMAN, M., G. SILVA, D. CATELLANI, U. BERSELLINI, V. CAFFARRA a M. CARERI. Determination of food emulsifiers in commercial additives and food products by liquid chromatography/atmospheric-pressure chemical ionisation mass spectrometry: česká technická norma. *Journal of Chromatography A*. 2009, vol. 1216, issue 18, s. 3758–3766.
- [38] SCHOENFELDER, Wolfgang. Monoglyceride content in glycerides by means of gas chromatography. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2002, vol. 104, issue 8, s. 530–532 [cit. 2014-10-30]. DOI: 10.1002/1438-9312(200208)104:8<530::aid-ejlt530>3.0.co;2-d.
- [39] NARVÁEZ-RIVAS, Mónica, Isabel M. VICARIO, E. Graciani CONSTANTE a Manuel LEÓN-CAMACHO. Changes in the Concentrations of Free Fatty Acid, Monoacylglycerol, and Diacylglycerol in the Subcutaneous Fat of Iberian Ham during the Dry-Curing Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, vol. 55, issue 26, s. 10953–10961.
- [40] NEFF, William E., Fred ELLER a Kathleen WARNER. Composition of oils extracted from potato chips by supercritical fluid extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2002, vol. 104, issue 12, s. 785–791. DOI: 10.1002/1438-9312(200212)104:12<785::aid-ejlt785>3.0.co;2-3.
- [41] GIL, Ji-Hye, Joo-Yeon HONG, Jee H. JUNG, Kang-Jin KIM a Jongki HONG. *Structural determination of monoacylglycerols extracted from marine sponge by fast atom bombardment tandem mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2007-04-15, vol. 21, issue 7, s. 1264–1270.
- [42] KHURT, N. H., E. A. WELCH, W. P. BLUM, E. S. PERRY a W. H. WEBER. The isolation of monoglycerides from lard and from bread. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1952, č. 7, s. 261–270.



- [43] BONDIOLI, Paolo, Laura DELLA BELLA a Gabriele RIVOLTA. Evaluation of total and saturated monoglyceride content in biodiesel at low concentration. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2013, vol. 115, issue 5, s. 576–582 [cit. 2014-11-18]. DOI: 10.1002/ejlt.201200309. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201200309>.
- [44] MARCATO, Bruno a Giuliano CECCHIN. Analysis of mixtures containing free fatty acids and mono-, di- and triglycerides by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light-scattering detection. *Journal of Chromatography A*. 1996, vol. 730, 1-2, s. 83–90. DOI: 10.1016/0021-9673(95)01108-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967395011080>.
- [45] YOSHIDA, Y., N. TAKADA a Y. KODA. Isolation and Identification of an Anti-Bolting Compound, Hexadecatrienoic Acid Monoglyceride, Responsible for Inhibition of Bolting and Maintenance of the Leaf Rosette in Radish Plants. *Plant and Cell Physiology* [online]. 2010-08-12, vol. 51, issue 8, s. 1341–1349 [cit. 2015-02-23]. DOI: 10.1093/pcp/pcq094. Dostupné z: <http://pcp.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/pcp/pcq094>.
- [46] CHANG, Hyeun Wook, Kyoung Hwa JANG, Doohyun LEE, Hee Ryong KANG, Tae-Yoon KIM, Bong Ho LEE, Byoung Wook CHOI, Sanghee KIM a Jongheon SHIN. Monoglycerides from the brown alga *Sargassum sagamianum*: Isolation, synthesis, and biological activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2008, vol. 18, issue 12, s. 3589–3592 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.05.008.
- [47] SPYROS, Apostolos a Photis DAIS. Application of <sup>31</sup>P NMR Spectroscopy in Food Analysis. 1. Quantitative Determination of the Mono- and Diglyceride Composition of Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2000, vol. 48, issue 3, s. 802–805 [cit. 2015-03-13]. DOI: 10.1021/jf9910990.
- [48] DAYRIT, Fabian M., Olivia Erin M. BUENAFE, Edward T. CHAINANI a Ian Mitchell S. de VERA. Analysis of Monoglycerides, Diglycerides, Sterols, and Free Fatty Acids in Coconut (*Cocos nucifera* L.) Oil by <sup>31</sup>P NMR

Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008, vol. 56, issue 14, s. 5765–5769 [cit. 2015-03-13]. DOI: 10.1021/jf8005432.

- [49] PLANK, Christina a Eberhard LORBEER. Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 1995, vol. 697, 1-2, s. 461–468 [cit. 2015-03-13]. DOI: 10.1016/0021-9673(94)00867-9.
- [50] TUFVESSON, Fredrik, Marie WAHLGREN a Ann-Charlotte ELIASSON. Formation of Amylose-Lipid Complexes and Effects of Temperature Treatment. Part 1. Monoglycerides. *Starch - Stärke* [online]. 2003, vol. 55, issue 2, s. 61–71 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1002/star.200390018.
- [51] TUFVESSON, F. a A.-C. ELIASSON. Formation and crystallization of amylose–monoglyceride complex in a starch matrix. *Carbohydrate Polymers*[online]. 2000, vol. 43, issue 4, s. 359-365 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/s0144-8617(00)00179-x.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

MAG	Monoacylglycerol
Např.	Na příklad
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha
FAB-MS	Bombardování rychlými atomy – hmotnostní spektrometrie
SPE	Extrakce na pevné fázi
TLC	Tenkovrstvá kapalinová chromatografie
ELSD	Evaporační detektor rozptylu světla
NMR	Nukleární magnetická resonance
Tj.	To je

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Struktura molekuly monoacylglycerolu [3].</i>	15
<i>Obr. 2: Struktura monoacylglycerolů ve vodě [6, s. 34–35].</i>	16
<i>Obr. 3: Mechanismus pečení a stárnutí chleba [13, s. 48]</i>	19
<i>Obr. 4: Výroba MAG glycerolýzou [27, s. 419-425].</i>	25
<i>Obr. 5: Příprava 1–monoacylglycerolů z glycidolu [30, s. 97–107].</i>	26
<i>Obr. 6: Enzymatická výroba MAG [33, s. 1544-1548].</i>	27
<i>Obr. 7: Kapalinový chromatograf – schéma [35, s. 10–26].</i>	28
<i>Obr. 8: Fotometrický detektor s diodovým polem [35, s. 10–26].</i>	29
<i>Obr. 9: MAG vyizolované z mořské houby [41, s. 1264–1270].</i>	34
<i>Obr. 10: Typické spektrum získané <sup>31</sup>P NMR analýzou olivového oleje [47, s. 802–805].</i>	38
<i>Obr. 11: Chromatografické desky TLC analýzy MAG kyseliny laurové a MAG kyseliny palmitové (vyvíjecí soustava–chloroform/voda/kyselina octová: 95/4,5/0,5).</i>	63
<i>Obr. 12: Kalibrační přímka při použití mobilní fáze jako rozpouštědla MAG kyseliny laurové.</i>	64
<i>Obr. 13: Kalibrační přímka při použití ethanolu jako rozpouštědla MAG kyseliny laurové – UV detektor.</i>	65
<i>Obr. 14: Kalibrační přímka pro MAG kyseliny palmitové – UV detektor.</i>	65
<i>Obr. 15: Chromatogram standardů MAG kyseliny laurové, chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20 µl, nastavení ELSD detektoru viz kapitola 9.7.2.</i>	66
<i>Obr. 16: Kalibrační přímka pro MAG kyseliny laurové – ELSD detektor.</i>	67
<i>Obr. 17: Kalibrační přímka pro MAG kyseliny palmitové – ELSD detektor.</i>	67
<i>Obr. 18: Závislost velikosti píků v jednotlivých cyklech na retenčním času. Chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20 µl.</i>	69
<i>Obr. 19: Chromatogram MAG kyseliny laurové získaný při prvním způsobu přípravy vzorků – bez vytřepávání, chromatografické podmínky: isokratická eluce,</i>	

- mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20 µl..... 70*
- Obr. 20: Chromatogram získaný druhým způsobem přípravy – vytřepání do n-hexanu, chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20 µl..... 70*
- Obr. 21: Příklad chromatogramu vzorku s obsahem MAG kyseliny laurové, chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20 µl, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2..... 71*
- Obr. 22: Chromatogram vzorku mouky, chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20 µl, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2. .... 72*
- Obr. 23: Chromatogram roztoku oleje a MAG kyseliny laurové v ethanolu, chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20 µl, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2..... 74*
- Obr. 24: Chromatogram oleje a MAG kyseliny palmitové v isokratické eluci, chromatografické podmínky: isokratická eluce, mobilní fáze: acetonitril:voda:kyselina octová (90:10:0,1), průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20 µl, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2..... 75*
- Obr. 25: Chromatogram směšného vzorku oleje a MAG kyseliny palmitové, chromatografické podmínky: gradientová eluce, podmínky gradientu viz kapitola 9.7.2.2, průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20 µl, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2. .... 76*
- Obr. 26: Příklad chromatogramu získaného analýzou vzorku s MAG kyseliny palmitové, chromatografické podmínky: gradientová eluce, podmínky gradientu viz kapitola 9.7.2.2, průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20 µl, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2. .... 76*
- Obr. 27: Chromatogram roztoku oleje a MAG kyseliny palmitové v ethanolu, chromatografické podmínky: gradientová eluce, podmínky gradientu viz kapitola 9.7.2.2, průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20 µl, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2. .... 78*

*Obr. 28: Chromatogram roztoků oleje v etanolu (zahřátý i nezahřátý), chromatografické podmínky: gradientová eluce, podmínky gradientu viz kapitola 9.7.2.2, průtok mobilní fáze: 1ml/min, nástřik 20 µl, nastavení detektoru viz kapitola 9.7.2. .... 79*

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1: Povolené množství monoacylglycerolů v potravinách [6, s. 33–34].</i>	17
<i>Tab. 2: Navážky reaktantů pro přípravu MAG kyseliny laurové pro experiment.</i>	47
<i>Tab. 3: Navážky reaktantů pro přípravu MAG kyseliny palmitové pro experiment.</i>	48
<i>Tab. 4: Složení reálných vzorků.</i>	52
<i>Tab. 5: Složení mobilní fáze pro gradientovou eluci.</i>	56
<i>Tab. 6: Koncentrace roztoků pro ověření interakce MAG–olej.</i>	57
<i>Tab. 7: Stupně konverze pro testovací vzorek MAG kyseliny laurové (kyselina:glycidol = 1:1,2).</i>	60
<i>Tab. 8: Stupně konverze pro testovací vzorek MAG kyseliny laurové (kyselina:glycidol = 1:1,5).</i>	61
<i>Tab. 9: Stupně konverze pro MAG kyseliny laurové pro experiment.</i>	61
<i>Tab. 10: Stupně konverze pro testovací vzorek MAG kyseliny palmitové.</i>	61
<i>Tab. 11: Stupně konverze pro MAG kyseliny palmitové pro experiment.</i>	62
<i>Tab. 12: Stupně konverze MAG po purifikaci.</i>	63
<i>Tab. 13: Stanovení „recovery“ pro MAG kyseliny laurové – 170 °C.</i>	73
<i>Tab. 14: Hodnoty „recovery“ pro analýzu interakce olej–MAG kyseliny laurové.</i>	74
<i>Tab. 15: Stanovení „recovery“ pro MAG kyselina palmitové – 170 °C.</i>	77
<i>Tab. 16: Hodnoty „recovery“ pro analýzu interakce olej–MAG kyseliny palmitové.</i>	80
<i>Tab. 17: „Recovery“ pro vzorek MAG kyseliny laurové – 70 °C.</i>	80
<i>Tab. 18: „Recovery“ pro vzorek MAG kyseliny palmitové – 70 °C.</i>	81