

Stanovení obsahu cholesterolu ve zvěřině divokých prasat

Bc. Antonín Rychlík

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Antonín Rychlík**

Osobní číslo: **T12570**

Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Stanovení obsahu cholesterolu ve zvěřině divokých prasat**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Černá zvěř v českých honitbách
2. Charakteristika cholesterolu
3. Vybraná metoda stanovení a její popis – GC/FID

II. Praktická část

1. Metodika stanovení cholesterolu
2. Stanovení cholesterolu ve vybraných vzorcích zvěřiny divokých prasat

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. VELÍŠEK, J., CEJPEK, K. Biosynthesis of Food Components, OSSIS, 2008
2. FOREJTEK, P., et al. Správné ošetření a zdravotní posouzení ulovené zvěře, VFU Brno, 2009
3. OTLES, S., et al. Handbook of Food Analysis Instruments, CRC Press, 2008
4. POOLE. C., et al. Gas Chromatography, Elsevier, 2012
5. SALES. J., KOTRBA. R. Meat from wild boar (*Sus scrofa* L.), Meat Science 94, 2013

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Robert Gál, Ph.D.
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

24. dubna 2015

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Rychlík Antonín

Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

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 ¹⁾;
- 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ 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 ³⁾ 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 24. 4. 2015

.....Rychlík Antonín.....

¹⁾ 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 nevydělečně 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.

²⁾ 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).

³⁾ 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). Odpírá-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.

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na stanovení obsahu cholesterolu ve zvěřině divokých prasat. V teoretické části je popsán stav černé zvěře v českých honitbách. Dále je charakterizován cholesterol a jeho obsah v potravinách. Popsány jsou běžně používané analytické metody využívané pro stanovení cholesterolu se zaměřením na metodu GC. Experimentální část je zaměřena na stanovení obsahu cholesterolu plynovou chromatografií s plamenovým ionizačním detektorem (GC/FID) ve vybraných vzorcích selat, dospělých samic a sameců divokých prasat.

Klíčová slova:

cholesterol, divoké prase, plynová chromatografie, GC/FID

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the determination of cholesterol in venison wild boars. The theoretical part describes the situation in the czech boar hunting grounds. Furthermore, there is characterized cholesterol and its content in foods. Conventional analytical methods used for the determination of cholesterol with a focus on the GC method are also described. The experimental part focuses on the determination of cholesterol by gas chromatography with flame ionization detector (GC/FID) in selected samples of piglets, adult males and females boars.

Keywords:

cholesterol, wild boars, gas chromatography, GC/FID

Tímto bych rád poděkoval Ing. Robertovi Gálovi, Ph.D. svému vedoucímu diplomové práce za rady, připomínky a pomoc při zajištění analyzovaných vzorků a nesmírně vstřícný a přátelský přístup při vedení mé diplomové práce.

Rovněž děkuji Ing. Lence Fojtíkové za její odbornou pomoc v laboratoři.

Rád bych také poděkoval doc. Ing. Heleně Čížkové, Ph.D. z Vysoké školy chemicko-technologické v Praze za podrobné seznámení s optimalizovanou metodou stanovení cholesterolu a umožnění provedení analýzy GC/FID.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 DIVOKÉ PRASE V ČESKÝCH HONITBÁCH	12
1.1 PRASE DIVOKÉ (<i>SUS SCROFA</i>)	12
1.1.1 Charakteristika divokého prasete	13
1.1.2 Životní prostředí divokého prasete.....	16
1.2 LOV DIVOKÝCH PRASAT.....	16
1.2.1 Zásadní etické požadavky na lov divokých prasat	17
1.2.2 Biologická hodnota masa divokých prasat	18
1.2.3 Černá zvěř na českém trhu	18
2 CHOLESTEROL	20
2.1 METABOLISMUS	22
2.2 FUNKCE CHOLESTEROLU	24
2.2.1 Žlučové kyseliny	24
2.2.2 Steroidní hormony.....	25
2.2.3 Lipoproteiny krevního séra.....	25
2.3 CHOLESTEROL V POTRAVINÁCH.....	26
2.3.1 Cholesterol ve zvěřině divokých prasat.....	27
2.4 CHOLESTEROL VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA.....	29
2.4.1 Oxysteroly	31
3 METODY STANOVENÍ CHOLESTEROLU	32
3.1 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (HPLC).....	33
3.2 PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE S PLAMENOVÝM IONIZAČNÍM DETEKTOREM (GC/FID)	35
3.2.1 Základní části plynového chromatografu	35
3.2.2 Plamenový ionizační detektor (FID)	36
3.2.3 Vyhodnocení plynové chromatografie	37
3.2.4 Metoda vnitřního standardu	38
II PRAKTICKÁ ČÁST	39
4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	40
5 MATERIÁL A POUŽITÉ PŘÍSTROJE	41
5.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ	43
5.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	44
5.2.1 Chemikálie	44
5.2.2 Pomůcky.....	44
5.2.3 Přístroje a zařízení.....	45

6	METODIKA STANOVENÍ CHOLESTEROLU	46
6.1	EXTRAKCE CHOLESTEROLU	47
6.2	STANOVENÍ CHOLESTEROLU NA GC/FID.....	47
6.2.1	Podmínky GC/FID stanovení	47
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	51
7.1	HODNOCENÍ PH VZORKŮ ZVĚŘINY DIVOKÝCH PRASAT	51
7.2	OBSAHU TUKU VE VZORCÍCH ZVĚŘINY DIVOKÝCH PRASAT	52
7.3	STANOVENÍ OBSAHU CHOLESTEROLU VE VYBRANÝCH VZORCÍCH ZVĚŘINY DIVOKÝCH PRASAT	54
7.3.1	Stanovení obsahu cholesterolu u vzorků selat.....	54
7.3.2	Stanovení obsahu cholesterolu u vzorků lončáků	58
7.3.3	Stanovení obsahu cholesterolu u vzorků kňourů.....	62
7.3.4	Stanovení obsahu cholesterolu u vzorků bachyní	66
7.3.5	Stanovení obsahu cholesterolu v lyofilizovaných vzorcích selete divokých prasat.....	70
7.4	OBSAH CHOLESTEROLU VE VZORCÍCH ZVĚŘINY DIVOKÝCH PRASAT	71
	ZÁVĚR	77
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	79
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	85
	SEZNAM OBRÁZKŮ	86
	SEZNAM TABULEK	88

ÚVOD

Prase divoké v myslivosti označované jako černá zvěř bylo vždy významným prvkem a součástí krajiny podporujícím především obnovu lesních porostů i jako významná lovná zvěř. Černá zvěř je v současné době velmi rozšířena na celém území naší republiky. Po úbytku drobné zvěře v honitbách se černá zvěř díky svojí adaptabilitě a vysoké reprodukční schopnosti dostala na první místo v produkci zvěřiny. Prudký nárůst jejich početních stavů přináší celou řadu negativních aspektů.

Cholesterol je typickým produktem živočišného metabolismu a vyskytuje se proto v potravinách živočišného původu jako jsou maso, játra, vaječný žloutek, sádlo, mléko, máslo, sýry a další potraviny. Zvláště bohatým zdrojem jsou nervové orgány, především mozek. Cholesterol si získal mimořádnou pozornost nejen lékařů, ale také i povědomí široké veřejnosti, především v souvislosti mezi hladinou cholesterolu v krvi člověka a četností úmrtí na srdečně cévní onemocnění.

Už méně se hovoří o velkém významu cholesterolu pro lidský organismus, jako součástí buněčných membrán nezbytných pro život. Je zároveň prekurzor a výchozí sloučenina významných molekul.

Existuje řada možností stanovení cholesterolu. Pro analýzu cholesterolu v potravinách se nejčastěji používá plynové, nebo kapalinové chromatografie, které jsou vysoce specifické a přesné.

Problematice analytického stanovení a samotné diskuse o obsahu cholesterolu ve zvěřině divokých prasat se v České republice věnuje jen malý počet vědeckých prací. Z veřejných zdrojů lze informace o obsahu cholesterolu ve zvěřině divokých prasat nalézt pouze okrajově a velmi obecně v literatuře a v národní databázi nutričních hodnot.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 DIVOKÉ PRASE V ČESKÝCH HONITBÁCH

Divoké prase je nedílnou součástí naší přírody a díky své vitalitě a otužilosti žije ve střední Evropě od nepaměti. Je významným prvkem a součástí krajiny podporujícím především obnovu lesních porostů narušováním půdního pokryvu a jako všežravec plní i celou řadu významných funkcí v přírodě, včetně sanitární. Je významnou lovnou zvěří [1].

1.1 Prase divoké (*Sus scrofa*)

Prase divoké je velký sudokopytník z čeledi prasatovití. Obývá značnou část Evropy a Asie na jih od 55-60. rovnoběžky, dále severní Afriku, Japonsko, Sumatru a Jávu. Bylo vysazeno i na několika místech USA a Argentiny [2].

Taxonomické zařazení

Říše: živočichové (*Animalia*)

Kmen: strunatci (*Chordata*)

Třída: savci (*Mammalia*)

Řád: sudokopytníci (*Artiodactyla*)

Podřád: nepřežvýkaví (*Nonruminantia*)

Čeleď: prasatovití (*Suidae*)

Podčeleď: pravá prasata (*Suinae*)

Rod: prase (*Sus*)

Druh: prase divoké (*Sus scrofa*) [2,3]

Prase divoké je velmi plastický živočich s širokou ekologickou valencí, dobře se přizpůsobující různým životním podmínkám. Je autochtonním druhem, jehož populační hustota byla i přes velmi vysokou reprodukční schopnost v původním, přirozeném ekosystému pod vlivem účinných regulačních faktorů udržována na přiměřené výši. Teprve postupnými změnami životního prostředí v důsledku rozšířeného zemědělského využívání krajiny a intenzivního hospodaření v lesích, jakož i vyhubením velkých šelem vznikly velmi příznivé podmínky pro černou zvěř. Odborníci se liší v počtu evropských poddruhů [3,4].



Obr. 1. Prase divoké (*Sus scrofa*) [4].

1.1.1 Charakteristika divokého prasete

Názvosloví pro mysliveckou praxi

Myslivecký název: černá zvěř

Lidový název: divočák, štětinač, kudrnáč

Samec: kňour

Samice: bachyně

Mládě: sele, markazín

Vyspělejší mládě: letošňák, do jednoho roku věku

Samčí mládě: lončák, ve druhém roce

Samičí mládě ve druhém roce: bachyňka

Ve třetím roce: kňourek, slabý kňour, kalhotáč, sekáč [3,4].

Dospělí samci dorůstají délky 120 – 180 cm a v kohoutku měří 55 – 100 cm. Jejich hmotnost je značně různorodá a v jednotlivých oblastech se viditelně liší, v průměru však činí 50 – 90 kg. Ve Francii byl v roce 1999 zastřelen samec vážící celých 277 kg, v Rumunsku a Rusku byli zaznamenáni i samci s hmotností téměř 300 kg [4].

Vzhledem k poměru těla má prase divoké nápadně velkou hlavu a relativně krátké končetiny. Jeho srst je tvořená hustými štětiniemi, které ho chrání před nepříznivými vlivy. Její zbarvení kolísá mezi tmavošedou přes hnědou až k černé. Během zimy je srst výrazněji

hustší a tmavší. Selata jsou zpočátku hnědá a světle pruhovaná. V této fázi života se selata nazývají markazíni [5].

Mezi další nápadné znaky prasete divokého patří jeho čtyři výrazné trojhranné špičáky, jež se při dorůstání zahýbají vzhůru. Slouží hlavně jako účinná zbraň při soubojích. U samců dorůstají obvykle 20 cm, ve výjimečných případech však mohou dorůst až do délky 30 cm. Spodní špičáky kňourů myslivci nazývají páráky a menší horní špičáky klektáky. U samic jsou viditelně menší a směřují směrem nahoru výrazně mírněji, navíc pouze u starších jedinců [2,5].

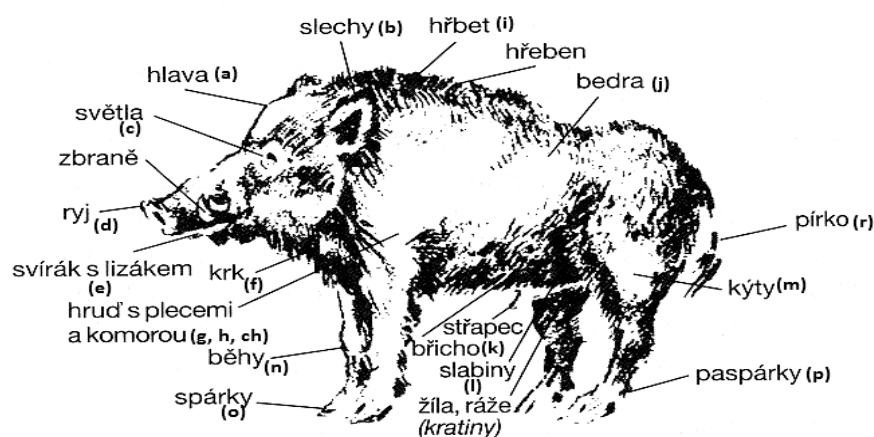
Prase divoké má skvěle vyvinutý čich a sluch, jeho nejhůře vyvinutým smyslem je zrak. Nejenže je prase divoké daleko nejrozšířenějším zástupcem celé své čeledi, ale navíc patří díky zásahu člověka i mezi nejrozšířenější pozemské savce [3].



Obr. 2. Prase divoké-bachyně se selaty [3].

Prase divoké je aktivní zejména v noci, den tráví většinou odpočinkem. Jedná se o skrytě žijící tvory, kteří se díky svým dokonale vyvinutým smyslům většinou velmi účinně vyhýbají přítomnosti člověka. Jejich přítomnost v lese však často můžeme zaznamenat díky jejich bahenním koupelím, ve kterých je bahno v loužích rozválené na velké ploše. Žijí obvykle ve skupinách, které průměrně čítají 20, vzácně až 50 jedinců. Výjimkou jsou pouze staří samci, kteří žijí samotářsky. Jsou schopni vyvinout v běhu rychlost 48 km/h [5].

Samice prasat divokých pohlavně dospívají v 8. až 10. měsíci života, samci přibližně ve věku 2 let. Doba páření je značně ovlivněna klimatickými podmínkami, ve střední Evropě však většinou probíhá v rozmezí od listopadu do ledna. Samice je březí 114 - 118 dnů. Ve střední Evropě vychází většina vrhů na období od března do května. Počet mláďat ve vrhu se pohybuje od 3 do 12. Bachyně může být však oplodněna kdykoliv a u neoplozené se říje opakuje po třech týdnech. Těsně před vrhem se samice odpojuje od své skupiny a zpět se k ní připojuje až v době, kdy jsou již selata odrostlá. Během péče je přitom velmi ostražitá a v případě bezprostředního ohrožení může potenciálního predátora napadnout [6].



Obr. 3. Popis těla: prase divoké [2].

hlava (a), slechy (b), slechy (c), rýj (d), svírák (e) s lizákem a chrupem (špičáky kňoura v horní čelisti – klektáky, v dolní části páráky, společný název – zbraně, špičáky bachyně – háky), krk (f), hrud' (g) s plecemi (h) a komorou (ch), hřbet (i), štětiny na hřbetě tvoří hřeben, bedra (j), břicho (k) se slabiny (l), kýtý (m), běhy (n) se spárky (o) a paspárky (p), pířko (r). Pokrývka těla (srst): štětiny a osiny. Ztluštělá kůže na přední části těla kňoura: krunýř, kyrys, štít. Obnova srsti: línání, přebarvování. Prase má kůži – škáru.

Selata neboli markazíni se vyznačují podélně pruhovaným ochranným zbarvením, které ztrácejí koncem prvního roku života. Markazín se stává podle vžitého názvosloví letošákem. Má zpravidla hnědavější zbarvení, zejména na bocích a kýtách [1,4].

V září dosahují selata většinou hmotnosti 12 - 14 kg, ale silná selata od dospělých bachyní i 20 kg. Koncem roku mívají kolem 40 kg, ale i 50 kg. Lončáci přecházejí do této kategorie datem 1. dubna. Znamená to, že lončák může být v této době starý 14 měsíců (od února) nebo jen 6 (od září). Na tom samozřejmě závisí i jeho vzhled: může vážit méně než 20 kg (častá zakrslost v zimě), nebo i 80 kg. Situaci komplikuje i to, že v našich poměrech

dochází k oplodnění 30 - 60 % letošáků ve věku 7 - 11 měsíců, při úrodě žaludů dokonce 80 % , takže bachyňka - lončák může být nejen plná, ale i vodící [5,6].

Divoké prase je společensky žijící druh s pevnými sociálními vazbami. Pouze kňouři a přestárlé bachyně jsou samotáři. Bachyně v reprodukčním věku žijí společně se svým potomstvem v tlupách, které mají pevně stanovený organizační řád. Základní organizační jednotku přitom tvoří vždy rodinné tlupy, skládající se zpravidla z bachyně a jejich potomků z posledního i předposledního vrhu (selata, lončáci) [4,6].

1.1.2 Životní prostředí divokého prasete

Původním životním prostředím divokého prasete byly nížinné prosvětlené teplé listnaté lesy, především dubové a lužní s porosty vodních rostlin, zejména rákosu. Postupně se velmi dobře přizpůsobila i smíšeným lesům jehličnato-listnatým a i lesům jehličnatým, zejména pokud je v nich alespoň minimální zastoupení plodících listnáčů, popřípadě bylinného podrostu, a nebo je z nich dobrý přístup do polí. V lese však potřebuje divoké prase i zastoupení hustých mlazin, kde přes den zaléhá a nachází zde klid a úkryt před nepřízní počasí. V zimě vyhledává jehličnaté houštiny, které ji chrání před ledovými větry a je v nich teplo i když napadne sníh [7].

Důležitým činitelem ovlivňujícím život, rozšíření a populační hustotu divokého prasete je nadmořská výška, délka trvání sněhové pokrývky a délka mrazového období. V našich podmínkách jí nejvíce vyhovují nejnižší polohy [8].

Pro divoké prase je velmi výhodný brzký nástup jara a co nejdelší trvání vegetační doby, protože pak má vysoké přírůstky a selata rychle rostou. Vlhčí podnebí s vyššími srážkami okolo 600 až 800 mm ročně jí vyhovují lépe než suché, protože ve vlhké půdě si může snadněji vyrývat potravu [9].

Pro život divokého prasete je důležitá i voda, neznamená to však, že by celý biotop měl být zamokřený. K zaléhání si vybírá suchá stanoviště a vodu vyhledává, jen když se chce napít nebo kalištit [8,9].

1.2 Lov divokých prasat

Zvěř je obnovitelné přírodní bohatství, představované populacemi volně žijících živočichů. Výkonem myslivosti je využíván přirozený produkční nadbytek obnovitelných přírodních

zdrojů. Lov zvěře má své opodstatnění, neboť bez odebrání části jejího populačního přírůstku by u ní docházelo ke zvýšeným ztrátám v rámci tzv. kompenzační úmrtnosti. Skutečnost, že je přitom získávána hodnotná potravina, je důležitým argumentem, který je stažen do popředí při zdůrazňování významu a poslání současné i budoucí myslivosti [9].

Lov probíhá na území, které je označováno jako honitba. V rámci myslivosti se lov zvěře dělí podle počtu lovců na lov osamělý nebo lov společný nebo podle cíle (lov odchytem, lov odstřelem). Mezi osamělé způsoby lovu zvěře odstřelem patří čekaná, šoulačka a vábení. Společný lov zvěře odstřelem lze rozdělit na nátlačku, naháňku a nadháňku s množstvím variací dle terénu, počtu lovců a druhu lovené zvěře. Většinou se loví postupně v různých částech honitby označovaných jako leče. Společné naháňky na divoké prasata lze akceptovat pouze v těch honitbách, ve kterých není dlouhodobě možné dosáhnout snížení stavů individuálním způsobem lovu [9,10].

Obecně se posuzuje divoké prase při lovu velmi těžko. Jednak se s ní dá setkat většinou za velmi špatného světla, a jednak samotná velikost není spolehlivým vodítkem, už pro značné rozmezí možných vrhů, prakticky od ledna až do podzimu [11].

V České republice se v roce 2014 myslivecky hospodařilo v 5 750 honitbách na celkové výměře honební plochy 6 868 908 ha, z toho je 192 obor s celkovou výměrou 46 375 ha a 291 bažantnic s celkovou výměrou 96 910 ha. Průměrná výměra honitby je 1 369 ha. [6].

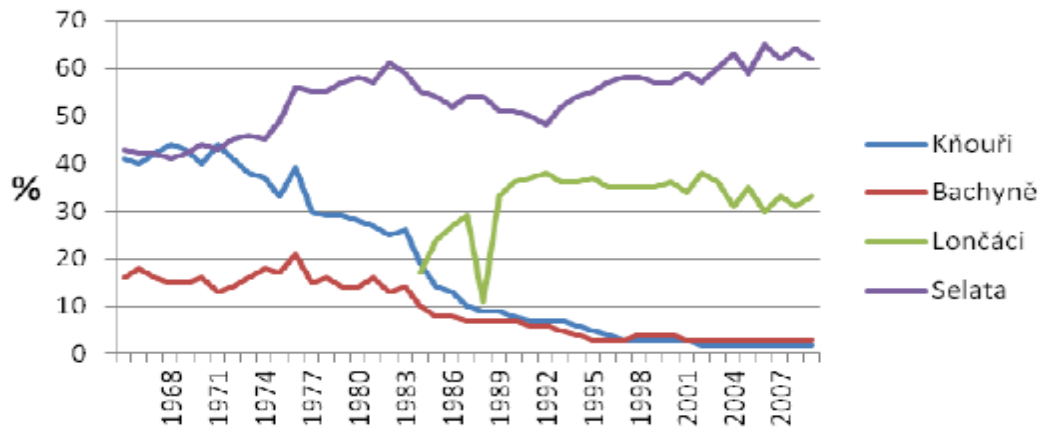
Stejně jako na území České republiky došlo v uplynulých desetiletích také v ostatních zemích střední Evropy k velmi prudkému nárůstu početních stavů divokých prasat [11].

1.2.1 Zásadní etické požadavky na lov divokých prasat

Základním etickým požadavkem na lov divokých prasat je rychlé a podle možnosti bezbolestné usmrcení loveného zvířete střelou. Současný výběr loveckých zbraní a široký sortiment střeliva umožňuje zvolit pro lov vhodnou ráži kulové zbraně i odpovídající druh náboje. V myslivecké praxi jsou oblíbené i tzv. univerzální ráže, které jsou vhodné k lovu více druhů zvěře (např. ráže 7x57) [9].

I přes velmi široké možnosti výběru zbraní a střeliva zůstává stále nejdůležitější podmínkou pro správný zásah černé zvěře zkušenost a odpovědnost lovce. Ten musí vždy správně vyhodnotit, zda jsou splněny všechny podmínky, umožňující zasáhnout divoké prase tak, aby bylo rychle a podle možnosti bezbolestně usmrceno [9,10].

Zásadní podmínkou dobrého zásahu je správné umístění zásahu. Všechna tato kritéria u divokých prasat splňuje tzv. zásah na komoru, teda zásah dutiny hrudní resp. zásahy krku v oblasti průběhu páteře a velkých cév. Ve většině případů je nutné mířit těsně před ryj běžícího kusu [12].



Obr. 4. Procentuální podíl odstřelu jednotlivých kategorií černé zvěře [12].

1.2.2 Biologická hodnota masa divokých prasat

Zvěřina bývala původně hlavním zdrojem výživy člověka. S postupujícím vývojem lidské společnosti se však stávala čím dál tím více jen pochoutkou, která jako velmi kvalitní potravina znamená příjemné zpestření jídelníčku. Průměrná spotřeba zvěřiny činí podle oficiálních statistik v České republice zhruba jeden kilogram na osobu a rok [1,8].

Maso divokých prasat má vysoký obsah bílkovin, nízký obsah tuku, příznivý poměr esenciálních a nasycených mastných kyselin, vysoký obsah thiaminu, riboflavinu a kyseliny pantothenové, kterým předčí maso hospodářských zvířat. Její kvalita závisí na více faktorech, především věk, tělesná kondice a zdravotní stav uloveného kusu zvěře. Z hygienického hlediska je ale v první řadě rozhodující způsob ulovení zvěře a její následné ošetření [10,12].

1.2.3 Černá zvěř na českém trhu

Po ulovení je zvěř přepravována do sběrného, nebo sběrného a prohlížecího místa nebo do podniku na zpracování zvěřiny. Ve sběrném místě se zvěř uchovává před další přepravou max. 12 hodin. Na prohlížecím místě se provádí veterinární prohlídka, zchlazuje se maso

na 7 °C. Pro podnik na zpracování zvěřiny platí stejné hygienické předpisy jako na zpracovatelské podniky jatečného masa. Zde se maso prohlíží, bourá a dále zpracovává [10].

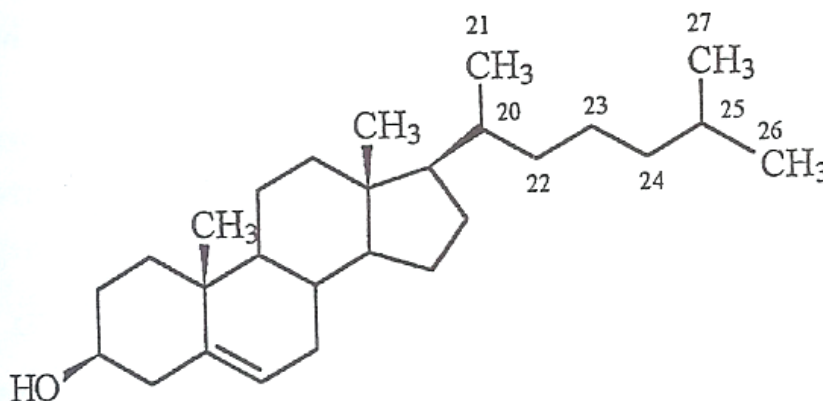
Do veřejného stravování může být dodána pouze a výhradně zvěřina, která byla posouzena úředním veterinárním lékařem během veterinární prohlídky ve schváleném a registrovaném zařízení pro nakládání se zvěřinou s věrohodným doložením původu zvěřiny. Tím je splněn základní požadavek potravinového práva na dosledovatelnost surovin a potravin uváděných do oběhu [10,11].

Na trh se dostává černá zvěř jak chlazená, vakuově balená, tak i mražená. Pro distributory je okrajovým segmentem, a tak řada firem preferuje dodávat ji na trh ve zmraženém stavu a snížit tak možná rizika [11,12].

Dělení, neboli porcování je v principu podobné u veškeré spárkaté zvěře, ale může mít drobné místní odchylky. Základní díly jsou: hlava, krk, žebra se svalovinou břicha. Dbáme, aby žebra byla odseknuta dostatečně daleko od páteře a nebyly narušeny svaly hřbetu, kýty se vykloubí v kyčelním kloubu a odříznou od pánve. Přední a zadní hřbet se oddělí před posledním žebrem tak, aby zůstaly vcelku podlouhlé svaly tzv. „pravé svíčkové“. U větších kusů černé zvěře se místy vžilo, podle vzoru domácích zabíjaček, podélné rozpůlení hřbetu středem páteře. Pokud to provádí odborník řeznickou sekerou, může být výsledek uspokojivý, ale u zvěřiny to obvykle není, protože běžně dochází k přílišnému roztříštění obratlů s množstvím kostních odštěpků a k obnažení míšního kanálu, odkud začínají rozkladné procesy. Přední část hřbetu se může podle potřeby rozsekávat příčně na příslušný počet dílů. Zadní hřbet by měl zůstat vcelku, nanejvýš se příčně pŕlí tak, aby u obou dílů zůstala stejná část svalů „svíčkové“. Páneve je u divokého prasete silně osvalena a zpravidla tvoří samostatný díl. Bývá zvykem, že jednotlivé díly se pro přehlednost kladou na čistý rub stažené škáry [10,11].

2 CHOLESTEROL

Cholesterol byl poprvé izolován ze žluče už v roce 1788 A. Greenem a jeho syntézu provedli R. Robinson a R. B. Woodward v roce 1951. První izolaci látky, se připisuje Francouzům Poulletierovi de la Salle roku 1769 a A. F. de Fourcroy roku 1789. Oba badatelé popisovali izolovaný produkt jako krystalickou substanci ze žlučových kamenů. M. E. Chevreul navrhl pro tuto látku roku 1816 termín „cholesterine“; řecky „chole“ znamená žluč a „stereos“ je pevný. Po zjištění, že cholesterol obsahuje alkoholovou hydroxyskupinu, navrhl francouzský chemik M. Berthelot roku 1859 změnu názvu sloučeniny na „cholesterol“ (Obr.5) [13].



Obr. 5. Cholesterol [13].

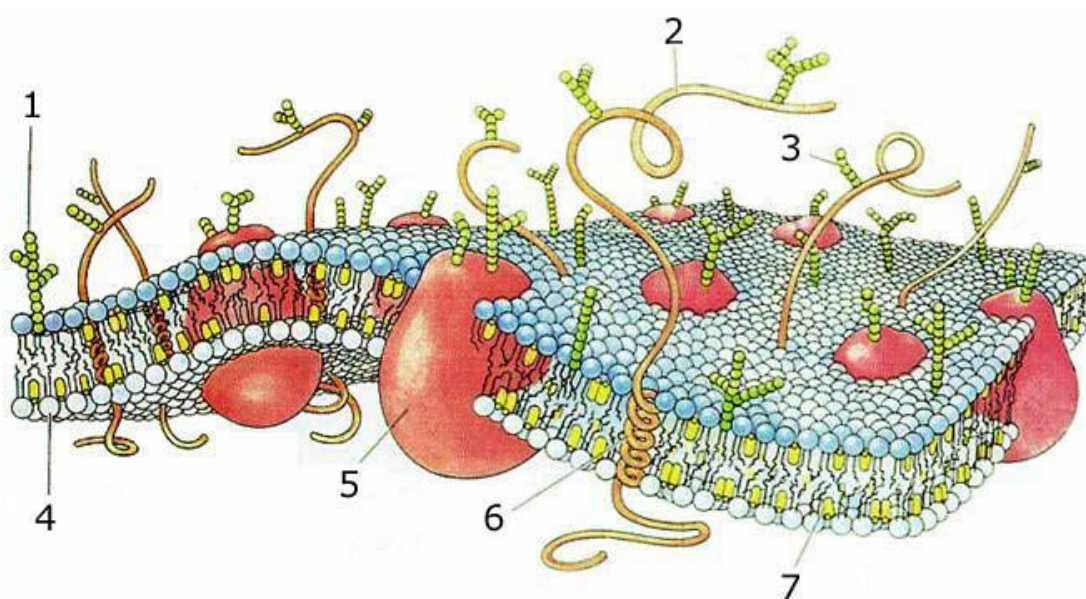
Význam a fyziologické působení cholesterolu sahá daleko do historie. Britský chemik a filosof R. Boyle, zjistil v roce 1665, že po jídle se krev zvířat mléčně zakalí. Až o celé století později si Henson všiml, že z této „mléčné tekutiny“ lze získat tuk (1774). Druhá polovina minulého století přinesla poznatky o metabolismu cholesterolu na molekulární úrovni [13,14].

Cholesterol je nejznámější, a také jeden z nejdůležitějších sterolů, podskupiny steroidů obsahujících nezaměnitelnou strukturu cyklopentanofenantrenu a hydroxylskupinu na uhlíku 3. Označuje se jako 3-hydroxy-5,6-cholesten. Svou délkou odpovídá molekula cholesterolu délce řetězců mastných kyselin [15].

Cholesterol je látka lipidové povahy. Při izolaci lipidů přechází vzhledem ke své nízké polaritě z matrice do lipidové frakce, z analytického hlediska se tedy řadí mezi doprovodné látky lipidů, které bývají velmi často označovány termínem „lipoidy“ [16].

Doprovodné látky jsou důležité také proto, že jejich složení je pro každý materiál charakteristické, a jejich analýzou lze tedy úspěšně identifikovat zdroj tuku (i ve směsi) [17].

Společným znakem tzv. vyšších sterolů je jejich univerzální přítomnost v eukaryontních plazmatických membránách (cholesterol v živočišných buňkách) a naopak nepřítomnost v buňkách prokaryontních. I když má jednu hydroxylovou skupinu, je dosti hydrofobní a ve vodě prakticky nerozpustný. Tato fyzikální vlastnost jej předurčila k jeho úloze v organismu. Je to stavba buněčných membrán, které jsou tvořeny převážně cholesterolem a fosfolipidy a které oddělují od sebe vodné prostředí jednotlivých buněk [18,19].



Obr. 6. Schéma plasmatické membrány [20].

(1. glykolipid, 2. protein, 3. oligosacharidový boční řetězec, 4. fosfolipid,
5. globulární protein, 6. protein, 7. cholesterol)

Plasmatické membrány jsou viskosní, plastické, polopropustné struktury, které zajišťují výměnu látek buňky s jejím okolím. Změny ve struktuře membrány mohou ovlivnit vodní rovnováhu a tok iontů. Cholesterol má jedinečnou schopnost zvyšovat uspořádanost lipidové dvojvrstvy buněčné membrány při současném udržování její fluidity a rychlosti difuze (Obr. 6). Fluidita membrány významně ovlivňuje její funkce [17,18].

Efektivní interakce mezi cholesterolem a fosfolipidy v buněčné membráně mimo jiné zabraňuje úniku sodných iontů, což ve svém důsledku šetří energetické rezervy buňky. Speciﬁcké deﬁciencie nebo změny některých membránových komponent vedou k řadě

onemocnění. Jedním z nich je i porušená endocytosa nízkohustotních lipoproteinů, která má za následek sklon k hypercholesterolémii a onemocnění věnčitých tepen. V nervových tkáních je cholesterol součástí myelinových pochev. V menší míře byl nalezen v mitochondriích, Golgiho aparátu a jaderné membráně [19].

2.1 Metabolismus

Cholesterol je významný a nezbytný pro lidský organismus v kterém se ve značné míře syntetizuje. Při zvýšení příjmu cholesterolu z potravy se jeho hladina v lidském organismu vyrovnává poklesem jeho syntézy [21,22].

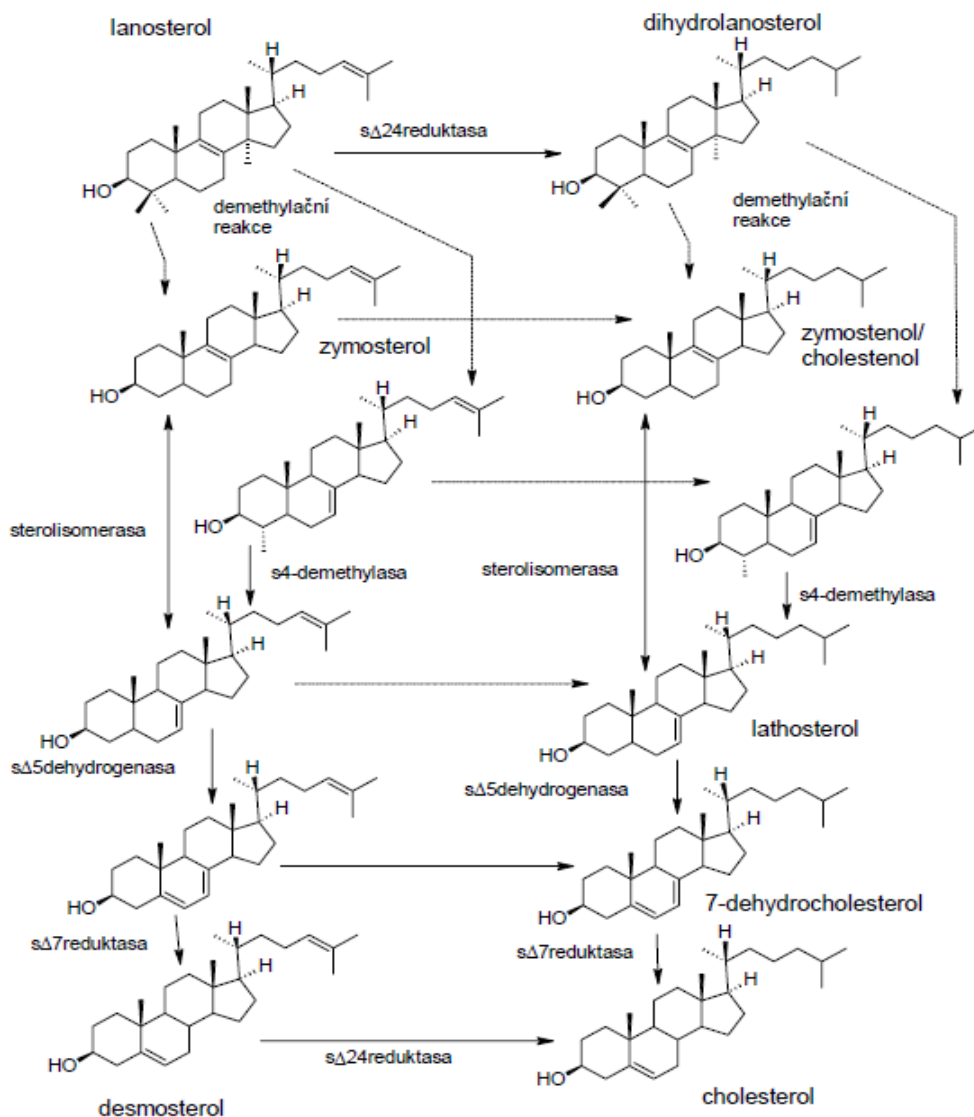
Cholesterol se do organismu dostává buď zvenčí – je vstřebáván ze zažívacího traktu, nebo je syntetizován *de novo* z acetyl-CoA, kde vzniká přes mevalonát a skvalen. Bez sloučeniny cholesterolu není možný život. Je tak důležitá, že si ji tělo dokáže vyrobit i z cukrů a aminokyselin a je výchozí látkou pro tvorbu velké části sloučenin obsažených v těle [23].

Biosyntézu cholesterolu tvoří složitý a náročný řetězec více než 20 chemických reakcí, které je schopna realizovat každá buňka (s výjimkou bezjaderných erytrocytů). Syntéza cholesterolu probíhá ve všech tkáních, ale nejvíce ho vznikne v játrech, v distální části tenkého střeva a kůži. Výchozím metabolitem je acetyl-CoA, klíčovým enzymem regulujícím syntézu cholesterolu je β -hydroxy- β -metyl-glutaryl-CoA-reduktáza (HMG-CoA reduktáza). Vzniká mevalonát a dvojitá redukce karboxylové skupiny na primární alkoholovou. Tato fáze určuje rychlost syntézy cholesterolu [24,25].

V posledním stupni biosyntézy cholesterolu se nejprve vytvoří ze skvalenu lanosterol a to oxygenací s následnou cyklizací. Cholesterol vzniká postupně z lanosterolu po aerobním odbourání tří metylových skupin ve formě CO_2 a postupným přesunem dvojně vazby v steroidním skeletu. Možných metabolických drah je zde více (Obr.7). Některé meziprodukty biosyntézy cholesterolu (desmosterol, lanosterol, kyselina mevalonová) jsou v analytické praxi využívány pro stanovení úrovně biosyntézy cholesterolu [18,22].

Touto cestou vzniká v těle přibližně 1500 až 1700 mg cholesterolu denně, zatímco potravou přijímáme průměrně 300 - 500 mg, při stravě bohaté na tuky až 800 mg. Tělo však vytváří podmínky pro zachování rovnováhy mezi potřebou cholesterolu a množstvím vyloučeným z těla ven. Za normálních podmínek se žlučí vyloučí přibližně 1000 mg přímo

jako cholesterol, přibližně stejné množství se vyloučí ve formě žlučových kyselin. Denní potřeba je tedy udávána kolem 2000 mg. Při zvýšení příjmu cholesterolu se automaticky sníží endogenní syntéza a naopak [21,23].



Obr. 7. Biosyntéza cholesterolu z lanosterolu [25].

(s - steroidní, Δn poloha dvojné vazby, kde probíhá redukční reakce)

Metabolismus cholesterolu na molekulární úrovni dostává v poslední době nový pohled. Cholesterol je vnímán nejen jako součást buněčných membrán, ale i jako látka schopná kovalentní interakce s některými proteiny a také jako ligand pro bílkovinné domény. Regulace biosyntézy a příjmu cholesterolu ve stravě probíhá složitými mechanismy zasahujícími jak extracelulární, tak vnitrobuněčné pochody. Nové poznatky o těchto pochodech dovolily účinnější boj se zvýšenou hladinou cholesterolu, kterou se vědci snaží snížit inhibicí jak

biosyntézy, tak i absorpcí cholesterolu. Některé otázky metabolismu cholesterolu zůstávají stále nevyřešeny. Např. role v neurodegenerativních poruchách a úloha meziproductů biosyntézy cholesterolu [21,24].

2.2 Funkce cholesterolu

- Představuje výchozí sloučeninu pro biosyntézu významných signálních molekul – steroidních hormonů, které řídí celou řadu procesů. Regulují metabolismus minerálů a vody, glukoneogenezi, srdeční glykosidy, zajišťují pohlavní diferenciaci, reprodukční funkce a odpověď organismu na stresové reakce.
- Je součástí lipidové dvouvrstvy biologických cytoplazmatických membrán a lipoproteinů krevní plasmy.
- Cholesterol je látka v lidském organismu nezbytná pro glukoneogenezi, srdeční glykosidy, zajišťují pohlavní diferenciaci, reprodukční funkce a odpověď pro správnou funkci buněčných membrán.
- V lidském těle je prekurzorem žlučových kyselin, které pomáhají při absorpci živin. Kvantitativně nejvýznamnějším orgánem syntézy cholesterolu jsou játra.
- Cholesterol je výchozí látkou pro syntézu fytosterolu sitosterolu.
- Prekurzorem cholekalciferolu (vitaminu D₃), který se uplatňuje v řízení kalcium-fosfátového metabolismu je 7-dehydrocholesterol, meziproduct biosyntézy cholesterolu.
- Je nezbytný pro správný růst organismu i pro obnovu tkání organismu dospělého. Nedávno byla objevena důležitá úloha cholesterolu v lidské embryogenezi a byla identifikována řada dědičných metabolických poruch biosyntézy cholesterolu.
- Cholesterol je také výchozí surovinou v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, kdy se používá jako emulgátor nebo pro syntézu steroidních hormonů. Průmyslově se získává izolací z míchy jatečných zvířat a z tuku ovčí vlny [17,18,21,25].

2.2.1 Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny vznikají z cholesterolu v játrech. Po chemické stránce se jedná o hydroxyderiváty kyseliny cholové. Jednotlivé žlučové kyseliny se liší počtem a polohou hydroxy-

lových skupin. Základními žlučovými kyselinami jsou kyseliny cholová, deoxycholová, lithocholová a chenodeoxycholová. Z jater se vylučují jako soli konjugátů (glykocholát, taurocholát) do žlučníku a odtud do tenkého střeva. Jejich alkalické soli emulgují tuky v tenkém střevě a tak umožňují jejich vstřebávání střevní sliznicí jako součást enterohepatálního oběhu. Aktivují také pankreatickou lipasu, která je nezbytná pro štěpení triacylglycerolů [16,24].

2.2.2 Steroidní hormony

Podle místa, kde tyto hormony vznikají se klasifikují na hormony kůry nadledvin – kortikoidy a na pohlavní hormony – mužské androgeny a ženské estrogeny a gestageny. Jejich společným prekurzorem je cholesterol [25].

2.2.3 Lipoproteiny krevního séra

V roce 1950 J. W. Gofman a jeho kolegové identifikovali pomocí ultracentrifugace lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoprotein, LDL) a lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoprotein, HDL). Dále popsali pozitivní korelaci mezi zvýšeným zastoupením LDL částic a infarktem myokardu u mužů a také inverzní vztah mezi HDL a rizikem koronární aterosklerózy [24,25].

Cholesterol díky svému složení není rozpustný v krvi. Aby došel k cílovému orgánu musí být vázán na bílkoviny, které jsou pro něj nosičem. Tímto spojením vznikají lipoproteiny. Jsou složeny z proteinů a nekovalentně asociovaných lipidů. Proteinové složky lipoproteinů jsou obecně známy pod názvem apoproteiny. Molekuly lipoproteinů mají většinou kulovitý tvar. Jejich úloha spočívá v transportu triacylglycerolů a cholesterolu [18,25].

Když má lipoprotein více lipidů než bílkovin, má nižší hustotu než voda a označujeme jej LDL. Obsahuje-li více bílkovin než lipidů, má vyšší hustotu než voda a označujeme jej HDL. Podle toho, na který lipoprotein se cholesterol naváže, pak hovoříme o LDL cholesterolu a HDL cholesterolu [22].

Lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL) přinášejí do periferních tkání asi 80 % cholesterolu. Mají tedy úzkou souvislost s ukládáním cholesterolu na cévních stěnách a s výskytem kardiovaskulárních onemocnění [25].

Lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL), které přenášejí asi 20 % cholesterolu, mají opačný efekt - cholesterol z tkání odbourávají a je transportován do jater, aby zde byl přeměněn na žlučové kyseliny, resp. jejich soli [23].

Uvádí se ještě skupina VHDL – lipoproteiny o velmi vysoké hustotě s vyšší hustotou než HDL a IDL – lipoproteiny o střední hustotě, jejichž prekurzorem jsou lipoproteiny s velmi nízkou hustotou VLDL a samy IDL jsou prekurzorem pro vznik lipoproteinů s nízkou hustotou LDL. U zdravého organismu se vyskytují jen ve velmi malých množstvích. Jejich biologický poločas je jen několik minut [17,25].

2.3 Cholesterol v potravinách

Cholesterol je rozšířen ve všech buňkách. Je typickým produktem živočišného metabolismu a vyskytuje se proto v potravinách živočišného původu jako jsou maso, játra, vaječný žloutek, sádlo, mléko, máslo, sýry a další potraviny. Zvláště bohatým zdrojem jsou nervové orgány, především mozek [18].

Obsah cholesterolu v živočišných produktech kolísá v poměrně širokém rozmezí. Značný rozsah hodnot je možno vysvětlit množstvím faktorů, které obsah cholesterolu ovlivňují. Především jde o vliv živočišného druhu a dané tkáně, doba výkrmu, věk zvířete, šlechtění plemen a aplikací farmak do krmných směsí [21,23].

Ve vyspělých zemích existují národní databáze nutričních hodnot, jejichž součástí je i uvedení obsahu cholesterolu v potravinách. Centrum pro databázi složení potravin ČR sleduje zatím 298 potravin a spolupracuje s mezinárodní organizací EuroFIR jako přidružený člen. EuroFIR je financován EU a jeho cílem je standardizovat proces sběru a dokumentace dat, tak aby vytvořil nástroje pro transfer dat a vybudování sítě databází složení potravin v Evropě. Databáze nutričního složení potravin Státního zdravotního ústavu ČR obsahuje 530 položek podle spotřebního koše [26].

Obsah cholesterolu v masě jatečných zvířat je ve svalovině, i v tukové tkáni přibližně stejný. Vyplývá to z funkcí cholesterolu v živočišných organismech. Nejnižší obsah vykazuje maso vepřové (50–60 mg/100 g) a hovězí (60-70 mg/100 g). Vyšší obsahy jsou v masě drůbeže (v podkožním tuku a kůži). Zvýšený obsah cholesterolu je také uváděn zejména ve vnitřnostech. U ryb se obsah cholesterolu pohybuje v rozmezí 40-150 mg/100g jedlého podílu [21,22].

Potravinami s nejvyšším množstvím cholesterolu jsou vejce a máslo. Obsah cholesterolu je v konzumních vejcích velmi variabilní a kolísá v širokém rozsahu podle plemene (těžká plemena mají vyšší obsah), stáří nosnice (stářím klesá), způsobu chovu aj. [18].

Ve žloutku slepičích vajec je udáván obsah cholesterolu 840 - 1914 mg/100 g, zatímco v jedlém podílu 170-550 mg/100 g. Vaječný žloutek je sám emulzí a zároveň je schopen emulze tvořit. Cholesterol, který je lipofilní, tvoří emulzi typu voda v oleji [19].

V řadě databází lze najít značné rozdíly hodnot cholesterolu také u klasického másla, ačkoliv je vyrobeno ze stejných složek a stejnou technologií dle české vyhlášky. Máslo obsahuje cholesterolu přibližně 200-300 mg/100 g. Obsah cholesterolu v kravském mléce je poměrně nízký. Množství cholesterolu v mléce je závislé na obsahu tuku [24].

2.3.1 Cholesterol ve zvěřině divokých prasat

Velké množství dostupné literatury zabývající se zvěřinou přináší široké spektrum informací o jednotlivých druzích zvěřiny, lovu, myslivosti, mikrobiologii, problematice legislativní a hygieny. V problematice obsahu cholesterolu se počet zdrojů značně zužuje. Informace se omezují na všeobecné konstatování, že maso divoké zvěře, které bylo uloveno ve volné přírodě je obvykle libové s nízkým obsahem tuku, nižším zastoupením cholesterolu a na druhé straně zvláště příznivým poměrem esenciálních a nasycených mastných kyselin.

Většina literatury uvádí obsah cholesterolu ve zvěřině všeobecně v rozmezí 60-110 mg/100 g jedlého podílu. V omezeném množství je uveden obsahu cholesterolu v jednotlivých druzích zvěřiny. Nejméně informací je u uvedení množství v jednotlivých partiích, nejčastěji hřbet a kýta. Téměř úplně chybí u uvedených obsahů cholesterolu podrobnější informace o pohlaví, věku, doby lovu nebo analytické metody.

V národních databázích nutričních hodnot je k tématu obsahu cholesterolu ve zvěřině divokých prasat více informací než v knižních titulech. Přesto je zde ke zvěřině přistupováno jako minoritní potravině, s omezeným výběrem jednotlivých partií. Nejčastěji hřbet, svíčková, kýta, intramuskulární tuk. Nejvíce informací lze vyhledat v databázích Švýcarska, Belgie a Spojených států amerických. V některých zemích jsou také uváděny obsahy v tepelně upravených výrobcích a pokrmech (např. guláš, ragú, paštika). Rozmezí obsahu

cholesterolu v mase zvěřiny zobrazuje tab.1. Většinou však nenalezneme podrobnější informace o pohlaví, věku, doby lovu nebo analytické metody.

Největším zdrojem informací k tématu jsou vědecké články a vysokoškolské práce publikované v mezinárodních časopisech. V databázích lze vyhledat především zahraniční studie s detailními informacemi o věku, pohlaví, době a místu lovu, odběru vzorků, použité analytické metodě, diskuse a srovnání s daty známými z minulosti. V jednotlivých partiích masa se většina prací zužuje na nejžádanější části (kýta, hřbet). Většina prací se primárně nezabývá samotným obsahem cholesterolu, ale přesto tyto informace poskytují. Jde především o články zabývající se celkovou biologickou hodnotou zvěřiny, kvantifikací celkové hladiny lipidů, podílem nenasycených mastných kyselin a vitamínu E u jednotlivých druhů, porovnání jednotlivých věkových kategorií a ovlivnění stravy. Obsah cholesterolu má průměrné hodnoty v libových částech 45,3 - 77 mg/100 g masa [26,27,28,29,30,31,32].

Významná část prací se zabývá problematikou mikrobiologie (trichinelózou) a cizorodých látek. Studie prokazují, že některé hodnoty biochemických parametrů mj. cholesterolu výrazně ovlivňují živočišné bioindikátory stavu životního prostředí.

Tab. 1. Obsah cholesterolu v mase zvěřiny [26,27,28,29,30,31,32].

POTRAVINA	CHOLESTEROL <i>mg/100g jedlého podílu</i>
Zvěřina všeobecně	60 - 110
Srnčí	53 - 91
Jelen	50 - 85
Daněk	60 - 90
Divoká kačena	60-71
Divoký králík	80-123
Bažant	60-71
Divoké prase	45 - 77

2.4 Cholesterol ve výživě člověka

Exogenní příjem cholesterolu je dnes značně různorodý v závislosti na dietních zvyklostech daného jedince. Doporučený denní příjem cholesterolu je max. 300 mg za den (s optimem 100 mg na 1000 kcal, včetně dětské populace) reálný denní příjem u nás se odhaduje na 400 až 600 mg [15,21,25].

Vysoká hladina cholesterolu (hypercholesterolemie), zvláště pak nadbytek LDL frakce, je považován za hlavní příčinu aterosklerózy. Ateroskleróza je onemocnění, které je v rozvinutých zemích vedoucí příčinou úmrtnosti v populaci. Tím si získal cholesterol mimořádnou pozornost nejen lékařů, ale také farmakologického a genetického výzkumu a vešel i do povědomí široké veřejnosti. Přestože mnozí pacienti mají hladinu cholesterolu pod dnes doporučeným limitem, rozvine se u nich kardiovaskulární onemocnění. Proto je především důležitější než celková hladina cholesterolu, poměr celkového cholesterolu k HDL cholesterolu, který by měl být nižší než 5:1 [33,34].

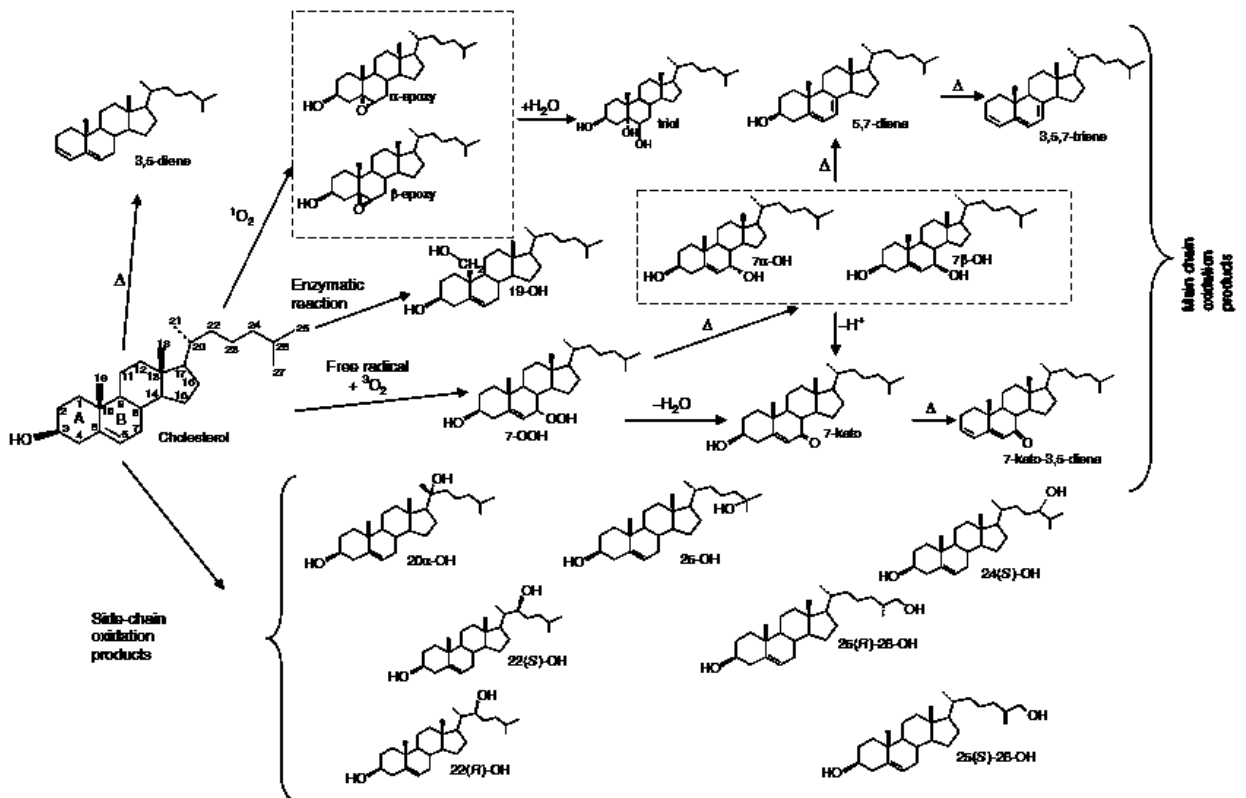
Tab. 2. Doporučené hodnoty krevních lipidů [33].

	Fyziologická hodnota [mmol. l⁻¹krve]	Riziková hodnota [mmol. l⁻¹krve]
Celkový cholesterol	< 5,2	5,2 – 6,2
LDL- cholesterol	< 3,4	3,4 – 4,1
HDL- cholesterol	> 1,2	< 0,9

Cholesterol je přirozenou složkou potravin. Vzhledem k jeho účinkům na zdraví se hledají postupy vedoucí ke snížení cholesterolu v potravinách. Metody odstraňování cholesterolu z potravin lze rozdělit na fyzikálně-chemické, enzymové a využívající mikroorganismy. Ačkoliv jsou známy různé metody, tak se této možnosti u nás dosud průmyslově nevyužívá. To je dáno především tím, že není vědecky podepřeno, že příjem potravin se sníženým množstvím cholesterolu bude mít významný vliv na koncentraci cholesterolu v krvi a omezí se tak nebezpečí srdečních chorob. U většiny lidí nárůst potravou přijímaného cholesterolu nemá efekt na plasmové lipidy a má jen malý vliv na krevní cholesterol. Tento efekt je ovlivněn řadou dalších faktorů, jako je typ přijímaného tuku, konkrétně poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin. Omezení příjmu cholesterolu proto zdaleka není nutné u

široké veřejnosti, ale pouze u osob s hypercholesterolemií ovlivnitelnou příjmem cholesterolu. Navíc vlastní syntéza cholesterolu lidským organismem podléhá přísné regulaci a je pod zpětnou kontrolou. Navíc prevence vedoucí k nižším koncentracím cholesterolu vedou k nárůstu úmrtnosti z jiných důvodů [34,35].

Hypercholesterolemie je jedním z mnoha rizikových faktorů způsobujících srdečně cévní onemocnění, není však jejich příčinou. Poukazuje na celkový stav, změny a poruchy v metabolismu. Omezit nebezpečí aterosklerózy lze, spíše než odstraněním cholesterolu z potravy, vyváženou stravou, řadou esenciálních faktorů, vitaminů a mastných kyselin a rozumným množstvím stravy. Hladinu cholesterolu v krvi ovlivňuje kromě stravy, dědičnost, tělesná hmotnost, fyzická aktivita, věk a pohlaví, alkohol a stres. Větší toxicitu vůči buňkám cévní stěny vykazují oxidační produkty cholesterolu [33].



Obr. 8. Oxidační produkty cholesterolu [25].

2.4.1 Oxysteroly

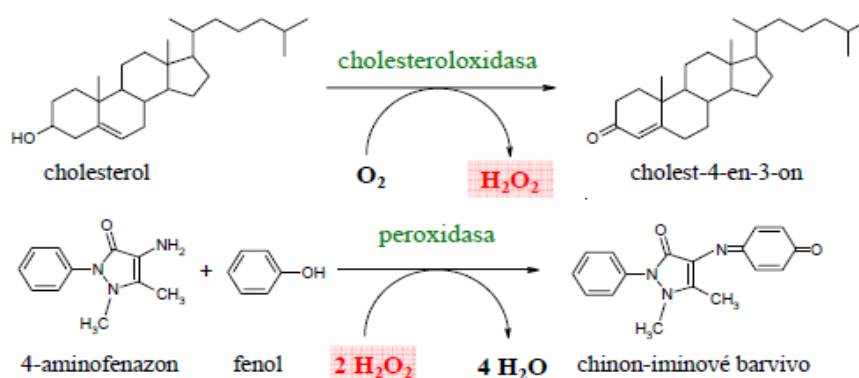
Při technologické a kulinární úpravě potravin se cholesterol a jeho estery mění, i když jde jinak o sloučeniny dosti stabilní. Při intenzivním záhřevu se z molekuly cholesterolu odštěpuje voda a vznikají uhlovodíky. Při záhřevu (smažení, pečení) v tukovém prostředí se může cholesterol také oxidovat. Tím vznikají tzv. oxysteroly, což je skupina hydroperoxidů, epoxidů, ketonů a trihydroxyderivátů odvozených od cholesterolu (Obr. 8). Tyto látky snadno tvoří nerozpustné produkty s bílkovinami krevní plasmy a představují podstatně větší riziko pro lidské zdraví nežli produkty oxidace mastných kyselin. Oxysteroly působí na cévní stěnu toxicky, zánětlivě a následně aterogenně. Kromě toho se podílejí i na zvýšení rizika onkogenese. Tuto teorii také podporuje snížení rizika aterosklerózy s příjmem různých antioxidantů jako je vitamín E, C, β -karoten a další [28,29].

3 METODY STANOVENÍ CHOLESTEROLU

Cholesterol je polycyklická steroidní hydroxysloučenina se 27 C-atomy, OH-skupinou v poloze 3- a nasyceným postranním řetězcem v molekule. Je přítomen ve všech živočišných tkáních jako hlavní stavební složka buněčných membrán. Cholesterol se v matrici vyskytuje ve volné formě i jako vázaný ve formě esterů s mastnými kyselinami. Při stanovení obsahu celkového cholesterolu musí být z těchto vazeb nejprve uvolněn. V širokém množství studií jsou používány různé metody extrakce do organických rozpouštědel. Možné je i použití extrakce kapalinou v nadkritickém stavu [36,37].

K vlastnímu stanovení cholesterolu se především v klinické laboratorní praxi používaly kolorimetrické metody a metoda enzymatická (za použití cholesterolesterázy a cholesteroxidázy se spektrofotometrickou nebo elektrochemickou detekcí vzniklého peroxidu vodíku). Enzymatické metody byly původně vyvinuty pro stanovení cholesterolu v krevním séru, pro stanovení v potravinách se ukázaly jako nedostatečné. Ještě méně často se volný cholesterol stanovuje po vysrážení s digitoninem (saponin ze semen náprsníku) nebo tomatinem gravimetricky [25,36].

Při spektrofotometrickém stanovení cholesterolu se tuk rozpuštěný v chloroformu míchá s acetanhydridem a koncentrovanou kyselinou sírovou. Za krátkou dobu (15 min) vzniká ve tmě modré až zelené zbarvení, které se měří při vlnové délce $\lambda = 660$ nm. Vzorek musí být bezvodý, jinak by se tvořila s chloroformem emulze, která zvyšuje chybu stanovení. (Liebermannova-Burchardova reakce) [36,38].



Obr. 9. Enzymové stanovení cholesterolu [39].

Při enzymovém spektrofotometrickém stanovení se vzorky, které nebyly předem zmýdelněny, obsahují estery cholesterolu. Z nich je třeba nejprve uvolnit cholesterol účinkem cholesterolesterasy. Reakce probíhá v pufovaném prostředí (pH 6,5-8) za přítomnosti cholátu sodného. Měří se absorbance při vlnové délce $\lambda = 500$ nm. K vyvolání zbarvení ($\lambda_{\max} = 540$ nm) lze využít také reakce H_2O_2 s triarylderiváty imidazolu [40].

Pro analýzu potravin je však nutné použít buď plynovou, nebo kapalinovou chromatografií, které jsou vysoce specifické a přesnější. Přímého srovnání hodnot obsahu cholesterolu v potravinách dosažených různými výše uvedenými metodami se ovšem provádí obtížně [36].

Nejpoužívanější instrumentální analytickou metodou pro stanovení cholesterolu ve zvěřině divokých prasat je plynová chromatografie s plameno-ionizační detekcí (GC-FID). Mezi další metody stanovení se řadí vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Porovnání množství cholesterolu zjištěné nezávislé pomocí těchto dvou chromatografických technik, ukazuje, že obě jsou schopné kvantifikace hladiny cholesterolu v potravinách. S ohledem na dobu analýzy, poměr nákladů a přínosu se jeví výhodnější plynová chromatografie [24,36].

Chromatografické analýzy se zpravidla používají pro dělení složité směsi látek, které mají navzájem dosti podobné chemické a fyzikální vlastnosti a které by se jinými metodami kvalitativně a kvantitativně analyzovaly jen velmi obtížně, pokud by to vůbec bylo možné.

Vlastnímu chromatografickému stanovení předchází saponifikace (alkalická hydrolyza, zmýdelnění) buďto přímá, eliminuje se extrakce lipidů, nebo saponifikace izolovaného tuku po extrakci celkových lipidů. Reakční směs po saponifikaci je extrahována do nepolárního rozpouštědla (hexan, petrolether) a analyzována plynovou chromatografií nebo kapalinovou chromatografií. Protože steroly vykazují slabou absorpci v UV oblasti, je tato metoda pro stanovení sterolů omezená. K absorpci v oblasti 200 – 214 nm dochází díky dvojně vazbě a hydroxylové funkční skupině, s maximem při 205 nm pro cholesterol [48].

3.1 Kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) je fyzikálněchemická separační technika, užívaná pro dělení a analýzu směsí látek. Jejím základním principem je rozdělování složek směsi mezi dvěma fázemi, mobilní a stacionární, na zá-

kladě jejich chemických a fyzikálně chemických vlastností a vzájemných interakcí. Stacionární fázi je modifikovaný sorbent, mobilní fázi tvoří kapalina, rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel, která se v chromatografickém systému pohybuje. Pro separaci je rozhodující afinita analytu k těmto fázím [17,18].

Vysokoučinná kapalinová chromatografie existuje jako tzv. „normální“ a „reverzní“ fáze. U normálních fází jsou funkční skupiny stacionární fáze polární, mobilní fázi bývá nepolární rozpouštědlo (pentan, hexan). Chromatografie na tzv. systémech s obrácenými fázemi (RP, reversed-phase, asi v 80 % všech aplikací HPLC) používá chemicky vázanou nepolární stacionární fázi [18,25].

Kapalinová chromatografie, která je pro stanovení cholesterolu méně častá, využívá stanovení jak na normální, tak na reverzní fázi s UV/PDA detekcí (detektor s diodovým polem) nebo detekcí pomocí detektoru rozptýleného světla ELSD [25].

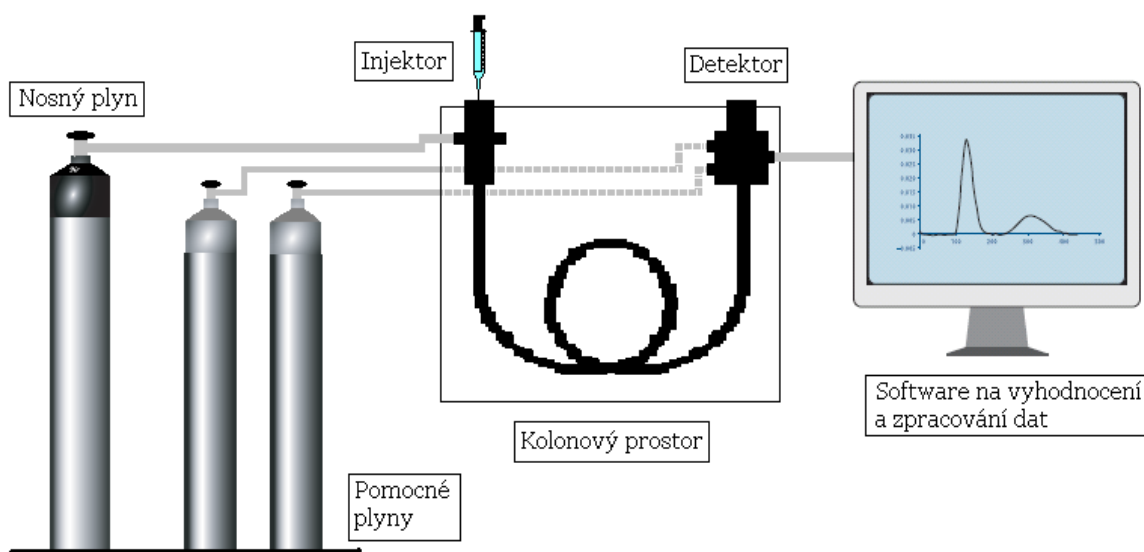
Pro stanovení celkového obsahu cholesterolů je třeba je uvolnit z esterifikované formy, proto finálnímu stanovení obvykle předchází saponifikace vzorku. Izolace ze vzorku spočívá v saponifikaci tukového podílu methanolickým roztokem KOH, následovaná extrakcí nesaponifikovatelného zbytku do nepolárního rozpouštědla, n-hexanu. Finální stanovení je prováděno kapalinovou chromatografií na reverzní fázi C8 s izokratickou elucí a detekcí v UV oblasti při 205 nm. [41].

Pracovní roztoky pro kapalinovou chromatografii jsou získány naředěním zásobního roztoku do methanolu. Pokud nejde o komplikovanou matici, nevyžaduje speciálních čistících postupů ani derivatizačních kroků před finálním stanovením. Stanovení na reversní fázi má oproti klasickému stanovení kapalinovou chromatografií na normální fázi tu výhodu, že používá polárnějších a tedy méně těkavých rozpouštědel, methanolu s asi 5 % vody a vykazuje lepší reprodukovatelnost retenčních charakteristik a dalších chromatografických parametrů. Parametry RP HPLC metody jsou v souladu s parametry paralelně prováděné kapilární GC, kde se ale pracuje metodou přímého nástřiku [42].

Vysokotlakou kapalinovou chromatografií lze použít pro simultánní stanovení cholesterolu i oxysterolů (včetně mastných kyselin) [43].

3.2 Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC/FID)

Tato separační analytická metoda umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu plynů i kapalin, které lze před separací převést na páry. Mobilní fází je vždy vhodný nosný plyn, stacionární fází je buď zakotvená kapalná fáze nebo tuhý sorbent umístěný v koloně [1].



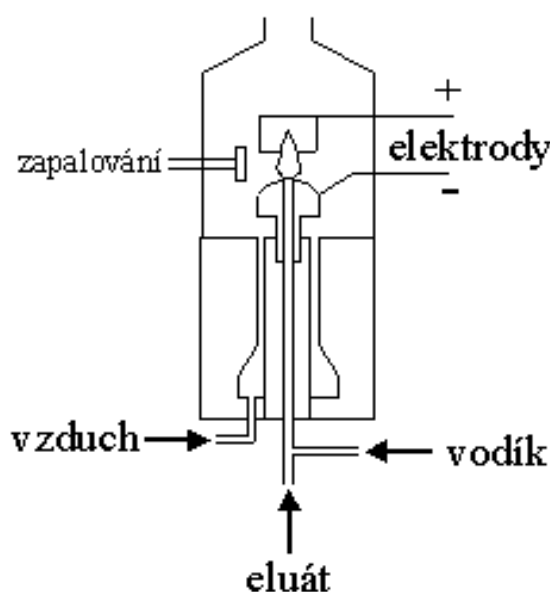
Obr. 10. Schéma zapojení plynové chromatografie [43].

3.2.1 Základní části plynového chromatografu

- Zásobník s nosným plynem – obvykle tlakové láhve s plynem, který transportuje jednotlivé složky vzorku kolonou. Nejčastěji se používají plyny, které jsou inertní k náplni kolony i k analyzovanému vzorku (např. vodík, dusík, helium).
- Zařízení na dávkování vzorku – dávkování se provádí do nástřikové hlavy opatřené septem, která je vyhřívána na zvolenou teplotu a proplachována nosným plynem. Plynný vzorek se dávkuje injekční stříkačkou o objemu 0,001 až 0,1 ml, kapalně 0,1 až 1 μ l a tuhý vzorek se nejprve rozpustí ve vhodném rozpouštědle. Dávkování se provádí pomocí děliče toku (split injection), které se používá u kapilárních kolon (na kolonu se přivádí jen část nastříkovaného vzorku). Nebo se dávkuje bez děliče toku (splitless injection). Zde se využívá zakoncentrování vzorku v kapalině

tvořící film v hlavě kolony. Zvýšením teploty se pak složky vzorku odpaří a převedou na kolonu.

- Chromatografická kolona – zde dochází k separaci látek. Kolony se vyrábí buď kovové nebo skleněné o průměru cca 0,1 – 0,5 mm a dosahují délky cca 25 – 100 m. Rozdělují se na náplňové nebo kapilární.
- Termostat - jednou z kritických veličin v plynové chromatografii je teplota, na ní závisí přesnost a reprodukovatelnost měřených údajů. Je nutno udržovat zvolený konstantní teplotní režim nástřiku, kolony, detektoru a regulátoru tlaku a průtoku.
- Detektor – neboli čidlo, které reaguje na přítomnost separovaných látek. Umisťuje se na výstupu z kolony v termostatovém prostoru. Ideální detektor pro všechny typy dělených látek, vysoce citlivý pro nízké koncentrace, avšak málo citlivý na změnu teploty v praxi neexistuje. K nejběžnějším detektorům patří plamenový ionizační detektor, FID - selektivní, destruktivní [25,42,43].



Obr. 11. Schéma FID [43].

3.2.2 Plamenový ionizační detektor (FID)

Je to detektor schopný detekovat téměř všechny organické látky a to v širokém rozmezí koncentrací. Pracuje na principu ionizace chromatografované látky v mikroplameni směsi vodíku a vzduchu za daných podmínek. Spalováním vznikají vodivé částice, které se vedou mezi elektrody, kde jsou příčinou vzniku ionizačního proudu. Jednou elektrodou je přímo tryska (katoda) a anodou je sběrná elektroda nad plamenem. Odezva detektoru je přímo

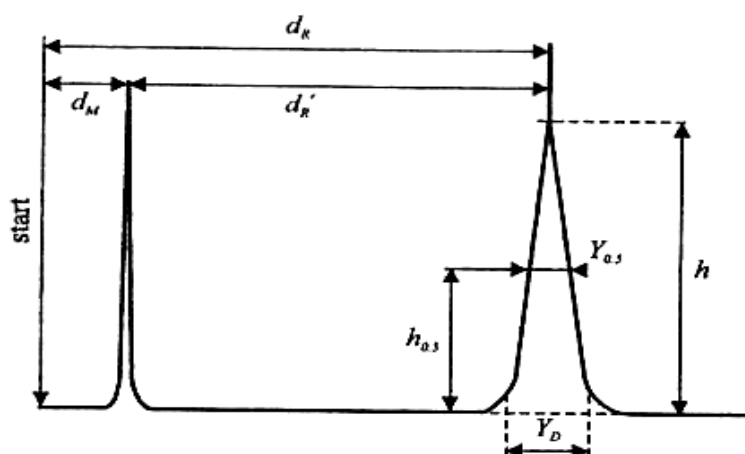
úměrná koncentraci stanovované látky v nosném plynu, závisí však na její struktuře. Schéma plamenového ionizačního detektoru je na obrázku (Obr. 11) [18,19].

3.2.3 Vyhodnocení plynové chromatografie

Výsledný grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase se nazývá chromatogram. Dojde-li na chromatografické koloně k rozdělení - separaci všech n -složek analyzovaného vzorku, obsahuje chromatogram n -elučních křivek - píků těchto složek. Podle polohy píku lze vyslovit předpoklad o identitě látky. Plocha píku je úměrná množství látky ve vzorku [42].

Identifikace složek ve vzorku; stejné látky mají za stejných podmínek dělení shodné retenční časy. Porovnáním s retenčními časy standardních roztoků lze určit kvalitativní složení vzorku. Podmínkou je dokonalé oddělení eluční vlny látky (píku) od ostatních píků nalezených v chromatogramu [43].

Množství složky ve vzorku ke zjištění koncentrace používá kalibrační křivku sestavenou ze známých koncentrací standardů téže látky. Jako závislost výšky nebo plochy píku na koncentraci. Vynesením výšky nebo plochy píku stanovované látky do kalibrační křivky odečteme odpovídající koncentraci. Vztah mezi plochou, resp. výškou píku a koncentrací (hmotností) složky lze vyjádřit obvykle lineární závislostí, která platí většinou v rozsahu několika řádů koncentrací stanovované látky [24].



Obr. 12. Retenční parametry [43].

U chromatogramu je na ose y zaznamenána odezva detektoru a na ose x délkové jednotky nebo čas. Z teorie chromatografické separace vyplývá, že chromatografický pík má tvar

Gaussovy křivky a je popsán třemi parametry: retenční vzdáleností d_R , výškou píku h a šířkou píku měřenou buď na základní linii Y_d nebo v polovině výšky píku $Y_{0.5}$ (Obr. 12) [18].

Vyhodnocení obsahu analyzované látky provádíme pomocí kalibrační přímky metodou vnějšího standardu, metodou vnitřního standardu nebo metodou standardního přídatku. Jako vnitřní standard se používají sloučeniny, které mají obdobnou strukturu a vlastnosti jako analyzovaná látka, ve výsledném chromatogramu jiný retenční čas, tj. nedochází ke koeluci píků a v analyzované matrici se přirozeně nevyskytují [18,19].

3.2.4 Metoda vnitřního standardu

Metoda vnitřního standardu je relativní (nepřímá) metoda, založená na přidání známého množství jedné látky – vnitřního standardu (IS) – ke vzorku. Jako vnitřní standard je volena látka, která neinterferuje s ostatními píky ve stanovovaném vzorku a má přibližně stejnou odezvu. Výhodou této metody je, že není nutno dávkovat do plynového chromatografu přesný objem vzorku.

Pro stanovovanou složku platí:

$$A_x = k_x \cdot m_x$$

a pro vnitřní standard:

$$A_s = k_s \cdot m_s$$

A_x , A_s – plochy píků složky a standardu, k_x , k_s – konstanty úměrnosti, m_x , m_s – hmotnosti složky a standardu.

Při kvantitativním stanovení složky ve vzorku metodou přímého srovnání se nejprve z analýzy kalibrační směsi o známé koncentraci (hmotnosti) vnitřního standardu a složky vypočítá hodnota poměru k_s/k_x , která se nazývá odezvový faktor a následně z analýzy vzorku s přidáním IS se vypočítá koncentrace (hmotnost) stanovované složky [24,25].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo stanovení obsahu cholesterolu ve vybraných vzorcích zvěřiny divokých prasat pomocí chromatografické metody GC/FID.

1. Formou literární rešerše popsat černou zvěř, její životní prostředí, sociální strukturu, populační dynamiku a způsob lovu nejen z etického pohledu, ale také z hlediska kvality a hygieny zvěřiny.
2. Charakteristika cholesterolu, jeho metabolismus a funkce v organismu. Dále popsat analytické metody běžně používané pro stanovení cholesterolu v potravinách.
3. Stanovení obsahu cholesterolu ve vybraných vzorcích zvěřiny divokých prasat. Analýzu provést instrumentální analytickou metodou, která byla optimalizována pro stanovení cholesterolu v mase za použití plynového chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID).
4. Provedení porovnání obsahu cholesterolu jak mezi jednotlivými vzorky, tak i s výsledky ve vědeckých publikacích.

5 MATERIÁL A POUŽITÉ PŘÍSTROJE

K analýze bylo použito 24 reprezentativních vzorků zvěřiny divokých prasat různého věku a uloveného různým způsobem ze školního lesního podniku Masarykův les Křtiny. Charakteristiky vzorků jsou uvedeny v tabulce č. 3, 4, 5, 6.

Školní lesní podnik Masarykův les Křtiny je organizační součástí Mendelovy univerzity v Brně (Obr.13). Lesní pozemky mají rozlohu 10 200 ha, vytvářejí souvislý komplex bezprostředně navazující na severní okraj jihomoravské metropole Brna, sahající až k městu Blansku. Lesy se nacházejí v nadmořské výšce 210 až 575 m a vyznačují se značnou pestrostí přírodních podmínek. Převládají smíšené porosty, ve kterých připadá 54 % na dřeviny listnaté. Průměrná roční teplota je 7,5 °C, roční srážky dosahují pouze 610 mm. Terén je velmi členitý, geologické podloží tvoří granodiorit, kulmské droby a vápenec. Třetina lesů se nachází v chráněné krajinné oblasti Moravský kras [44].



Obr. 13. Oblast školního lesního podniku Masarykův les Křtiny [44].

Divoká prasata byla zastřelena během ranního období s venkovní teplotou 6 °C. Byla provedena kontrola povrchu těla, přirozených tělních otvorů a výživného stavu. Ulovené kusy se otevřely a vyvrhly. Každý kus byl označen plombou.

Při veterinární kontrole byl odebrán vzorek svaloviny na trichineloskopické vyšetření. Vyšetření provedla tzv. proškolená osoba, která může provádět prvotní vyšetření kusu a vyda-

la osvědčení o tomto vyšetření. Povinné trichineloskopické vyšetření bylo provedeno trávičí metodou s negativním výsledkem.

Vzorky o hmotnosti cca. 300-400 g určené k analýze byly odebrány ihned po provedených kontrolách a přepraveny v chladícím zařízení (< 5 °C). Uchovávány v chladničce byly až do zpracování. Celková doba nepřesáhla 18 hodin od doby odběru vzorků. Vzorky masa byly senzorycky zhodnoceny.

Podstata senzoryckého hodnocení spočívala v subjektivním posouzení barvy, vzhledu, vůně, zastoupení mezisvalového tuku tzv. mramorování, vláknitosti, textury a konzistence. Zhodnocení se provedlo v osvětlené místnosti při teplotě 20 °C.

Barva masa zvěřiny divokých prasat byla tmavě červená. Vůně měla typické aroma, druho- vě specifické. Konzistence byla tuhá s jemnější svalovinou.

Dále byly vzorky masa zbaveny pojivové, tukové tkáně a krevní sraženiny, vakuově baleny a zmrazeny při -18 °C až do provedení analýzy.

Tab. 3. Vzorky selat určené k analýze.

Vzorek	Způsob lovu	Umístění zásahu	Věk	Partie
1	naháňka	na měkko / komora	sele	hřbet
2	naháňka	hřbet	sele	hřbet
6	naháňka	hlava	sele	hřbet
7	naháňka	komora	sele	hřbet
9	naháňka	hřbet	sele	hřbet
10	čekaná	komora	sele	hřbet
13	čekaná	hlava	sele	hřbet
14	čekaná	hlava	sele	hřbet
18	čekaná	komora	sele	hřbet

Tab. 4. Vzorky lončáků určené k analýze.

Vzorek	Způsob lovu	Umístění zásahu	Věk	Partie
3	naháňka	na měkko / hřbet	lončák	hřbet
5	naháňka	hlava	lončák	hřbet
8	naháňka	komora	lončák	hřbet
15	čekaná	na měkko + dostřel	lončák	hřbet
17	čekaná	komora	lončák	hřbet

Tab. 5. Vzorky kňourů určené k analýze.

Vzorek	Způsob lovu	Umístění zásahu	Věk	Partie
4	naháňka	komora	kňour	hřbet
12	naháňka	komora	kňour	hřbet
22	naháňka	komora	kňour	plec
23	naháňka	komora	kňour	kýta
24	naháňka	komora	kňour	hřbet

Tab. 6. Vzorky bachyně určené k analýze.

Vzorek	Způsob lovu	Umístění zásahu	Věk	Partie
11	naháňka	hlava	bachyně	hřbet
16	sraženo autem	hlava	bachyně	hřbet
19	naháňka	komora	bachyně	plec
20	naháňka	komora	bachyně	kýta
21	naháňka	komora	bachyně	hřbet

5.1 Příprava vzorků

Vzorky byly před analýzou rozmrazeny a opětovně sensoricky zhodnoceny. K vyloučení možnosti probíhajících autolytických nebo proteolytických procesů v mase byly kontrolně stanoveny parametry pH hodnot. Smyslové vyšetření rozmraženého masa zvěřiny divokých prasat se provedlo v osvětlené místnosti při teplotě 20 °C. Vzhled vzorků byl navlhlý, po

rozmražení maso měkké, barva měla tmavší odstín než u čerstvého (červenohnědá). Vůně typická pro druh, výrazná bez cizích pachů.

Na základě tohoto zhodnocení a kontrolně stanovenými hodnotami pH se rozhodlo o použití vzorků k dalšímu zpracování.

Následně byly vzorky homogenizovány v mixeru pro dosažení rovnoměrné velikosti částic do 1 mm. Rozmělněný vzorek byl uložen ve skleněných vzorkovnicích při teplotě 0-5 °C.

Pro účely možnosti ověření stanovení cholesterolu byly dva vzorky z tohoto uloženého zmrazeného masa lyofilizovány (- 55 °C) s použitím lyofilizátoru Edwards Modulyo. Během lyofilizace bylo dosaženo konzervačního efektu snížením aktivity vody bez působení tepla. Nutriční parametry zůstaly zachovány. Tlak vodní páry vzorku byl držen na 610,5 Pa.

5.2 Použité chemikálie, pomůcky a přístroje

5.2.1 Chemikálie

- Ethanol velejemný 96 % (Penta, ČR)
- KOH p. a. (Lachema, ČR)
- 5 α -cholestan (Sigma – Aldrich, Francie)
- n-hexan p. a. (Penta, ČR)
- Na₂SO₄ - bezvodý čistý p. a. (Lachema, ČR)
- Cholesterol (Sigma – Aldrich, Francie)

5.2.2 Pomůcky

- Běžné laboratorní pomůcky a sklo
- Vialky pro GC
- Mikropipety
- Filtrační papír (FILTRAK No.390, \varnothing 15 cm)
- Hliníková fólie

5.2.3 Přístroje a zařízení

- Plynový chromatograf (YL 6100GC, Anyang, Korea)
- Plamenový ionizační detektor - FID
- PC s vyhodnocovacím softwarovým programem YL 6100 GC
- Analytická váha (Explorer EP 214, Švýcarsko)
- Mixer (ETA Centrino, ČR)
- Odparka rotační vakuová (Laborota 4010 digital, Heidolph, Německo)
- Sušárna (Venticell 111 komfort, BMT, ČR)
- Lyofilizátor (Edwards High Vacuum International, West Sussex, UK).
- pH metr (Testo 205, Švýcarsko)
- Vodní lázeň (Memmert, UK)
- Laboratorní třepačka (Kavalier LT 2, ČR)
- Ultrazvuková lázeň (Powersonic, SR)
- Lednice (Liebherr, Německo)

6 METODIKA STANOVENÍ CHOLESTEROLU

Pro optimální a přesné stanovení obsahu cholesterolu ve vzorcích zvěřiny divokých prasat jsou použity metody z publikovaných vědeckých prací, ve kterých byly prozkoušeny různé podmínky stanovení. Jelikož zájem o přesná kvantitativní data o obsahu cholesterolu, jako nutričně významné doprovodné látky lipidů vzrůstá, jsou vyvíjeny nové, rychlé a přesné analytické metody.

Analýza byla provedena instrumentální analytickou metodou za použití plynového chromatografu s plameno-ionizační detekcí (GC-FID).

Zjednodušený postup stanovení je založen na saponifikaci vzorku s použitím metody vnitřního standardu a standardu cholesterolu. Ke vzorku zvěřiny divokých prasat je přidáváno určité množství α -cholestanu, který není ve vzorku přítomen a neinteraguje se složkami vzorku a tvoří samostatný pík v blízkosti stanovovaného cholesterolu. Díky této metodě není nutno znát objem nástřiku a navíc jsou eliminovány změny pracovních podmínek, protože vnitřní standard i stanovované složky vzorku jsou jimi ovlivněny stejně.

Metoda prokázala dobrou přesnost a vysokou produktivitu u metod posuzování autenticity potravin. Čížková, Voldřích a kol. [45,46] prokazovali touto metodou cholesterol jako marker vaječného podílu ve výrobcích s deklarovaným obsahem vajec.

Borkovcová a kol. [41] a Hwang a kol. [48] paralelně použili tuto metodu s ostatními analytickými metodami (spektrofotometrie, HPLC) s dobrou přesností, opakovatelností, rychlostí a reprodukovatelností aktualizovat údaje o obsahu cholesterolu.

Optimalizovanou metodu pro stanovení cholesterolu v mase a v masných výrobcích použili i autoři Quaresma [49], Dinh [50], Cygan-Szczegieliak [51], Chizzolini [52], Skewes, [53], Sales [54] a Stroher a kol. [55].

Thompson [56] tuto metodu prosadil jako referenční standardní metodu stanovení cholesterolu v mase pro publikované hodnoty v databázi nutričních hodnot Ministerstva zemědělství USA.

6.1 Extrakce cholesterolu

Před samotnou extrakcí cholesterolu byl připraven alkoholický roztok KOH (9 ml 96 % ethanolu a 1 ml 50 % KOH). Dále byl připraven roztok vnitřního standardu o koncentraci 1 mg/ml.

Z jednotlivých homogenizovaných vzorků masa divokých prasat bylo naváženo 2,5 g na analytických vahách s přesností na 0,1 mg. Ke vzorku masa v Erlenmayerově baňce bylo přidáno 10 ml alkoholického roztoku KOH a 0,4 ml roztoku vnitřního standardu α -cholestanu. Aby se zabránilo možným ztrátám a oxidačním procesům probíhala extrakce za nepřítomnosti denního světla. Baňka byla obalená hliníkovou fólií a uchovávána v temnu po dobu extrakce. Obsah byl promíchán a zmýdelňován na třepačce za stálého míchání 60 minut při 60 °C. Po ukončení zmýdelňování byla přidána destilovaná voda a hexan. Obsah byl intenzivně třepán 1 minutu. Po rozsazení obou fází byla horní hexanová vrstva odpipetována a přefiltrována přes vrstvu bezvodého síranu sodného do srdcové baňky. Ke spodní vodné vrstvě byl opět přidán hexan a obsah byl intenzivně třepán 1 minutu a hexanový extrakt přidán k předchozímu. Třepání bylo ještě jednou opakováno. Vrstva síranu sodného byla nakonec promyta hexanem.

Spojené hexanové vrstvy byly odpařeny dosucha na rotační vakuové odparce. Odparek byl rekonstituován v 2 ml 96 % ethanolu za pomoci ultrazvukové lázně a dávkován na kolonu plynového chromatografu.

6.2 Stanovení cholesterolu na GC/FID

Na plynovém chromatografu YL 6100GC s plamenově ionizačním detektorem (FID) byly měřeny použité standardy a příslušné vzorky zvěřiny divokých prasat. Vzorky byly proměřeny za stejných pracovních podmínek jako standardy. Každý vzorek byl analyzován nejméně ve dvou až čtyřech paralelních stanoveních.

6.2.1 Podmínky GC/FID stanovení

Na plynovém chromatografu YL 6100GC s plamenově ionizačním detektorem (FID) byla analýza vykonána za podmínek:

- Kapilární kolona křemenná s polyimidem DB-5 (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m)
- Průtok mobilní fáze (dusík) 0,6 ml/min

- Lineární rychlost 30,4 cm/s
- Nástřík s rozdělovačem toku (split 1:1)
- Nástřík 1 μ l
- Teplotní program: 50 °C (5 min) s gradientem 6 °C/min, od 140 °C s gradientem 30 °C/min, do 400 °C (1 min)
- Provozní teplota: 4 °C nad okolní teplotu do 400 °C
- Plamenově ionizační detektor (FID): Maximální teplota: 450 °C/ použitá 355 °C
- Detekční limit FID 10^{-13} g/s
- Čas analýzy: 7 min



Obr. 14. Plynový chromatograf YL 6100GC s FID detektorem [47].

Průběh separace cholesterolu plynovou chromatografií byl následující. Kolonou se stacionární fází procházel nosný plyn. Byl zvolen dusík, který vedl k vyšším odezvám detektoru.

Vzorek byl nastříknut do vyhřívané nástřikové komory (injektoru), kde se odpařil a ve formě par byl unášen dusíkem do kolony. Cholesterol ze vzorku se sorboval na začátku kolony ve stacionární fázi a pak desorboval čerstvým nosným plynem. Dusík unášel cholesterol a další složky vzorku postupně ke konci kolony a dělicí proces se neustále opakoval. Každá složka ze vzorku postupovala kolonou svou vlastní rychlostí závislou na distribuční konstantě složky $K_D = c_s/c_m$, kde c_s a c_m jsou rovnovážné koncentrace složky ve stacionární a v mobilní fázi.

Látky postupně vycházely z kolony v pořadí rostoucích hodnot distribučních konstant a vstupovaly do detektoru. Detektor identifikoval okamžitou koncentraci cholesterolu v nosném plynu. Signál detektoru byl upraven na výsledný grafický chromatogram. Pro identifikaci cholesterolu je podstatné umístění maxima píku v chromatogramu.

Pro identifikaci byl používán retenční čas, což je celkový čas, po který se cholesterol nacházel v separační koloně. Odezva detektoru byla úměrná hmotnosti složky procházející tryskou za jednotku času. U chromatogramu byla na ose y zaznamenána odezva detektoru a na ose x čas. Chromatografický pík měl tvar Gaussovy křivky a je popsán třemi parametry: retenční vzdáleností d_R , výškou píku h a šířkou píku měřenou na základní linii Y_d .

Při použití kvantitativní analýzy metodou vnitřního standardu platí pro stanovovanou složku $A_x = k_x \cdot m_x$ a pro vnitřní standard $A_s = k_s \cdot m_s$

Pro poměr ploch jejich píků

$$\frac{A_s}{A_x} = \frac{k_s \cdot m_s}{k_x \cdot m_x} = f \frac{m_s}{m_x} = f \frac{\rho_s V_s}{\rho_x V_x}$$

A_x, A_s – plochy píků složky a standardu, k_x, k_s – konstanty úměrnosti,

m_x, m_s – hmotnosti složky a standardu, ρ_x, ρ_s – hmotnostní koncentrace složky a standardu,

V_x, V_s – objemy roztoků složky a standardu.

Pomocí směrodatné odchylky, která je nejužívanější mírou variability jsme určili, jak daleko jsou čísla v souboru vzdálená od průměru, resp. hodnoty náhodné veličiny vzdálené od střední hodnoty a jak moc se od sebe navzájem liší typické případy v souboru zkoumaných výsledků obsahu cholesterolu.

Směrodatná odchylka σ , je definována jako odmocnina z rozptylu náhodné veličiny X , tzn.

$$\sigma = \sqrt{D(X)} = \sqrt{\text{var}(X)},$$

kde $D(X)$ označuje rozptyl náhodné veličiny X .

Směrodatná odchylka se vypočítá pomocí střední hodnoty $E(X)$ a $E(X^2)$.

$$\begin{aligned}\sigma &= \sqrt{E((X - E(X))^2)} \\ &= \sqrt{E(X^2) - (E(X))^2}\end{aligned}$$

Byly srovnávány retenční časy analyzovaného vzorku a standardu za stejných podmínek měření. Veškerá datová vyhodnocení o přítomnosti cholesterolu pomocí plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID) byla zaznamenána na PC s vyhodnocovacím softwarem YL 6100GC a zpracována do přehledných tabulek a grafů pomocí statistických metod v aplikaci Statistica 12.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Hodnocení pH vzorků zvěřiny divokých prasat

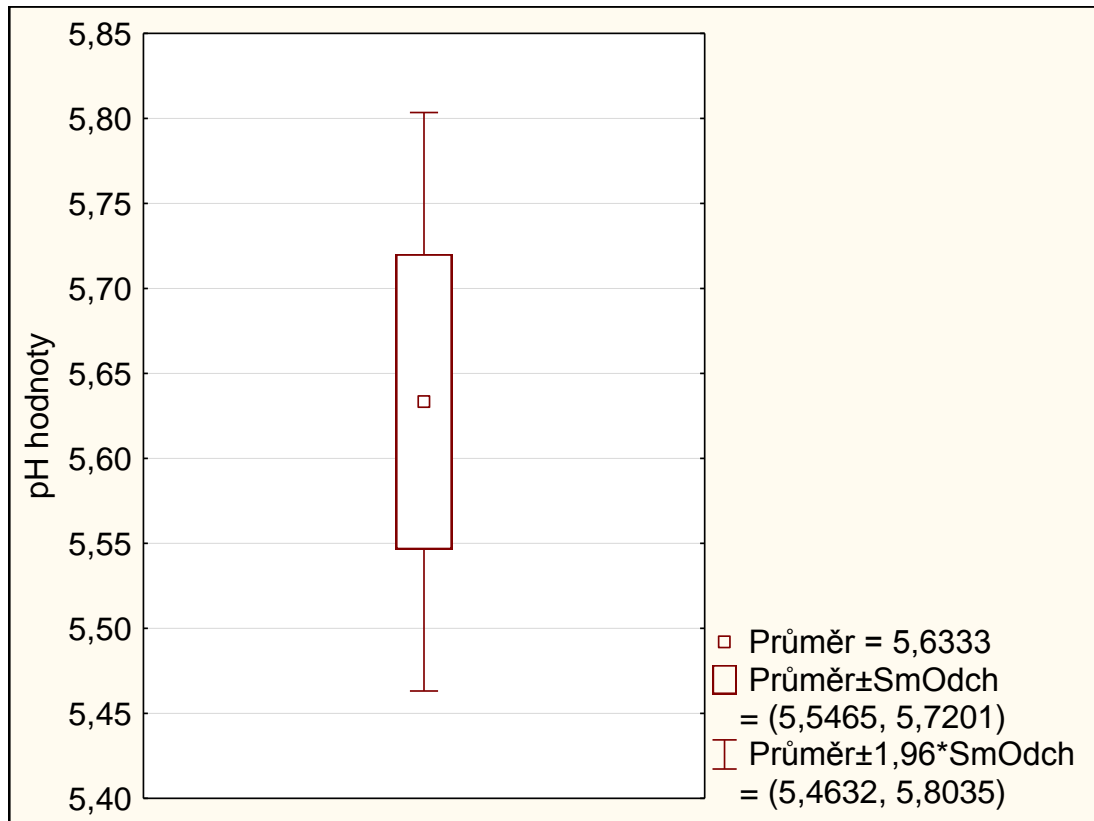
Hodnoty pH u jednotlivých vzorků divokých prasat jsou uvedeny v tabulce č. 7. Naměřené hodnoty pH ve 24 vzorcích zvěřiny divokých prasat byly v rozsahu 5,50 až 5,80. Nejnižší hodnoty pH 5,50 vykazovaly vzorky selat. Nejvyšší hodnoty pH 5,80 byly naměřeny u vzorků kňourů. Průměrná hodnota pH byla 5,63.

Tab. 7. Hodnoty pH u jednotlivých vzorků divokých prasat.

Vzorek	pH	Vzorek	pH
1	5,50	13	5,60
2	5,60	14	5,60
3	5,60	15	5,60
4	5,70	16	5,50
5	5,70	17	5,60
6	5,60	18	5,70
7	5,70	19	5,70
8	5,70	20	5,60
9	5,60	21	5,80
10	5,50	22	5,70
11	5,60	23	5,80
12	5,60	24	5,80

Podobné hodnoty pH u zvěřiny divokých prasat v rozmezí 5,4 až 5,9 uvádějí autoři Sales a kol. [54], Forejtek [10] a Hespeler [1]. Podle Veliška a Cejpeka [16,21] odpovídají tyto hodnoty pH u masa správnému zrajícímu procesu s vyloučením možnosti autolytických nebo proteolytických procesů.

Krabicový diagram box plot na obrázku č. 15 zachycuje minimální a maximální hodnotu pH, dolní kvartil, medián, horní kvartil a aritmetický průměr.



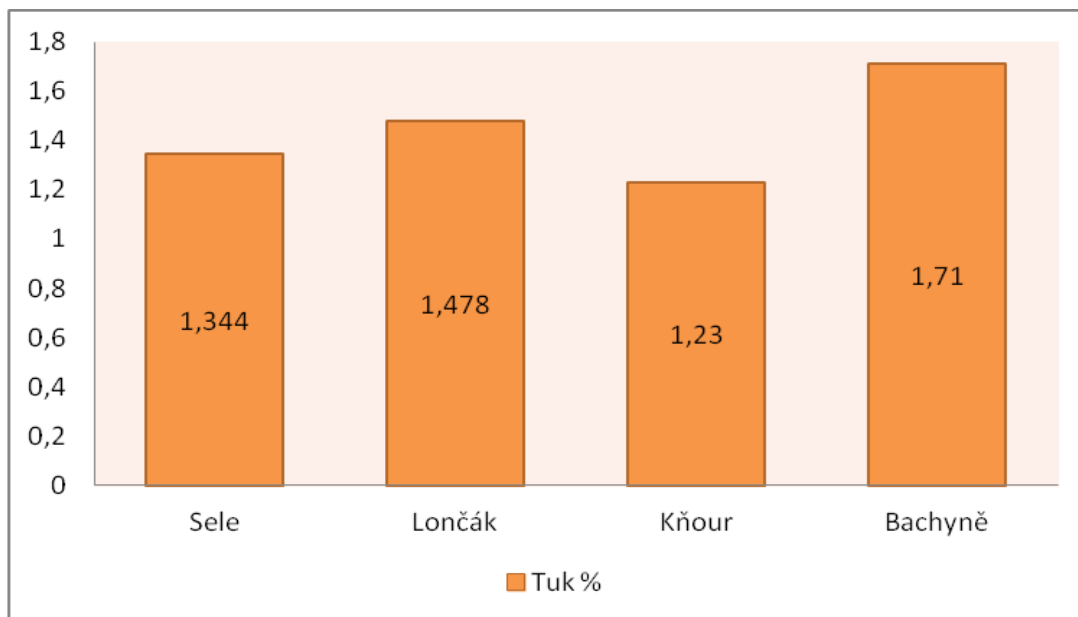
Obr. 15. Box plot naměřených pH hodnot vzorků divokých prasat.

7.2 Obsahu tuku ve vzorcích zvěřiny divokých prasat

Ze vzorků zvěřiny divokých prasat určených k analýze cholesterolu byla také v rámci jiné diplomové práce [58] provedena analýza obsahu tuku. Tuk byl stanoven gravimetricky po extrakci Soxhletovým extraktorem z vysušeného materiálu a jako rozpouštědlo byl použit hexan.

Výsledky obsahu tuku ve vzorcích zvěřiny divokých prasat, byly použity se souhlasem autorky práce ke zjištění vlivu obsahu tuku na obsah cholesterolu [58].

Průměrné hodnoty u jednotlivých druhů zvěřiny divokých prasat jsou zobrazeny na obrázku č. 16. Stanovená průměrná hodnota tuku u analyzovaných vzorků masa divokých prasat byla 1,41 %. Jednotlivé výsledky obsahu tuku ovšem vykazují poměrně velkou variabilitu mezi jednotlivými vzorky. Nejnižší hodnota obsahu tuku byla analyzována u vzorku lončáka 0,33 % a u vzorku selete 0,41 %. Nejvyšší hodnoty vykazovaly vzorky bachyně 2,93 %, ale také zároveň vzorek selete 2,91 %.



Obr. 16. Průměr výsledků analýzy tuku u zvěřiny divokých prasat.

Průměrný obsah tuku u masa zvěřiny divokých prasat - 1,41 %, je v souladu s informacemi z databází nutričních hodnot v zemích střední Evropy. Hodnoty 1,3 až 1,6 % tuku uvádějí databáze Německa [31], Rakouska [32] a Slovenska [28].

Sales [54] uvádí průměrnou hodnotu tuku 1,55 % u Italských divokých prasat. Dannenberger [59] u Německých divokých prasat uvádí obsah tuku 2,1 %. Studie zaměřená na analýzu lipidové frakce divokých prasat v Litvě uvádí hodnoty 2,82 % tuku u zvěřiny divokých prasat [42].

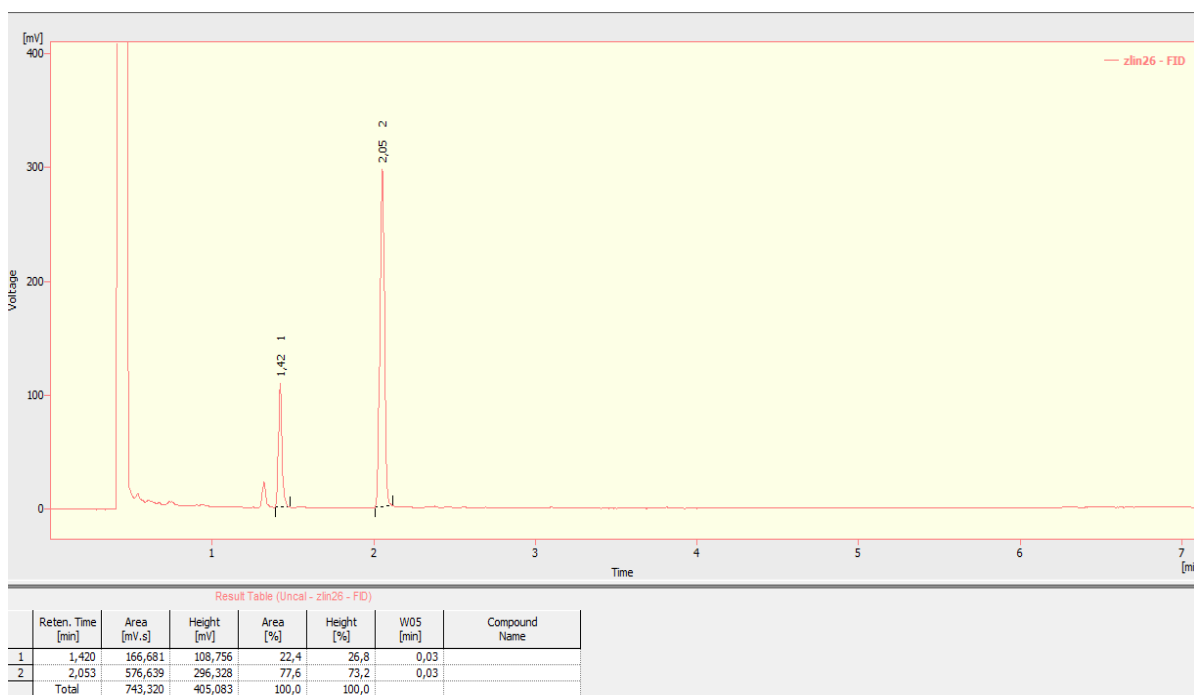
Na rozdíl od uvedených autorů, databází a našich výsledků stanovil hodnoty obsahu tuku Chizzolini [52] v Itálii u bachyní 4,55 % a u kňourů 4,75 %. Quaresma [49] v Portugalsku uvádí u bachyní 4,55 % a u kňourů 4,25 % tuku.

Autoři Drmota [3], Skewes [53], Quaresma a kol. [49], Erkens [60], Machioini a kol. [61], Dinh [50], Brodowski [62], Razmaitea [63] a Dahlan [64] zdůvodňují značný rozsah hodnot tuku ve zvěřině divokých prasat v odborné literatuře množstvím faktorů, které obsah tuku ovlivňuje a které je při výzkumu nutné zohlednit. Především jde o vliv druhů a dané tkáně, věk zvířete, pohlaví a oblast lovů.

7.3 Stanovení obsahu cholesterolu ve vybraných vzorcích zvěřiny divokých prasat

Cholesterol ve vzorcích zvěřiny divokých prasat byl extrahován a následně analyzován za podmínek uvedených v metodice postupu v kapitole 6.1 a 6.2. Stanovené hodnoty obsahů cholesterolu ve vybraných vzorcích zvěřiny divokých prasat byly vypočítány dle metodiky postupu v kapitole 6.2.1 a jsou uvedeny v tabulkách a grafech. Retenční čas u cholesterolu se pohyboval okolo 2,07 min. a u standardu α -cholestanu 1,44 min.

Vzorový chromatogram analýzy cholesterolu z hřbetu selete divokého prasete je zobrazen na obrázku č 17.



Obr. 17. Chromatogram analýzy cholesterolu z hřbetu selete divokého prasete.

7.3.1 Stanovení obsahu cholesterolu u vzorků selat

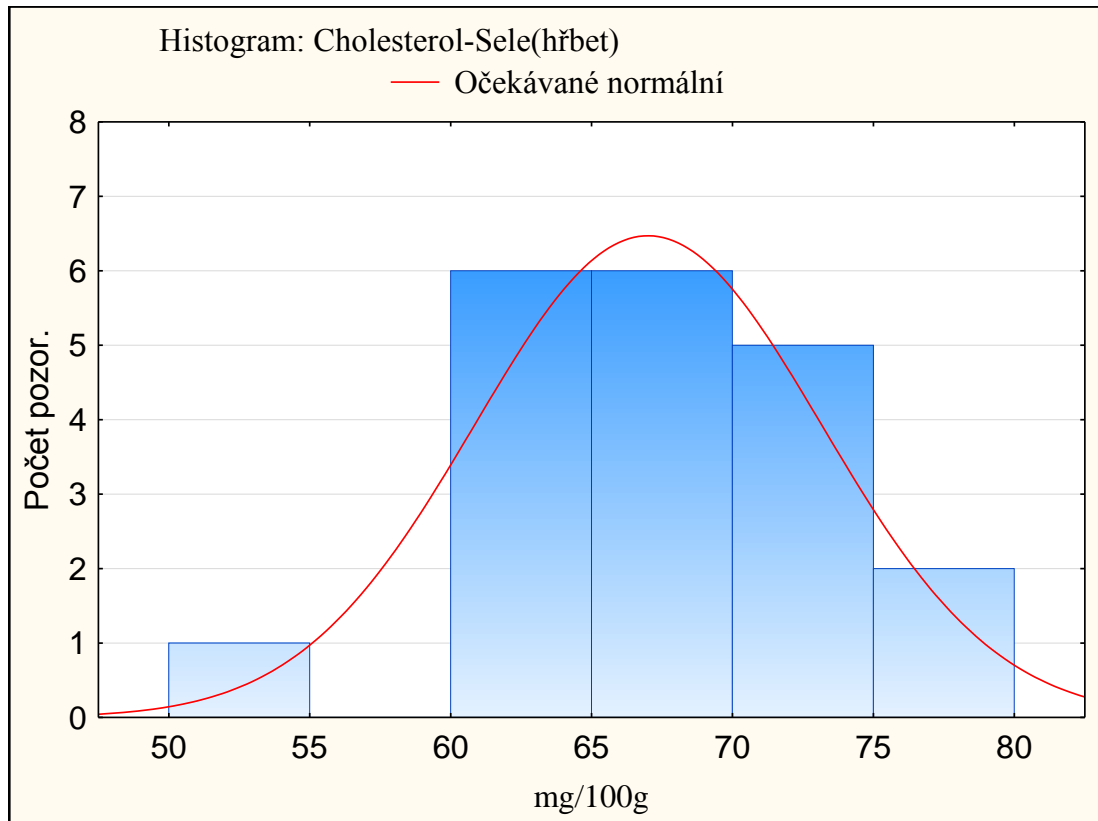
Výsledky analýz jsou uvedené v tabulce č. 8. Stanovená hodnota cholesterolu u vzorků selat divokých prasat se pohybovala v rozmezí 54,850 až 78,491 mg/100 g. Průměr hodnot cholesterolu u vzorků selat divokých prasat byl 67,007 mg/100 g. Medián výsledků měl hodnotu 66,830 mg/100 g a variační koeficient 9,2 %.

Statistické zpracování dat prokázalo, že paralelní analytické výsledky jsou zatíženy pouze malými náhodnými chybami. Z Gaussova rozdělení pravděpodobnosti na obrázku č. 18 a

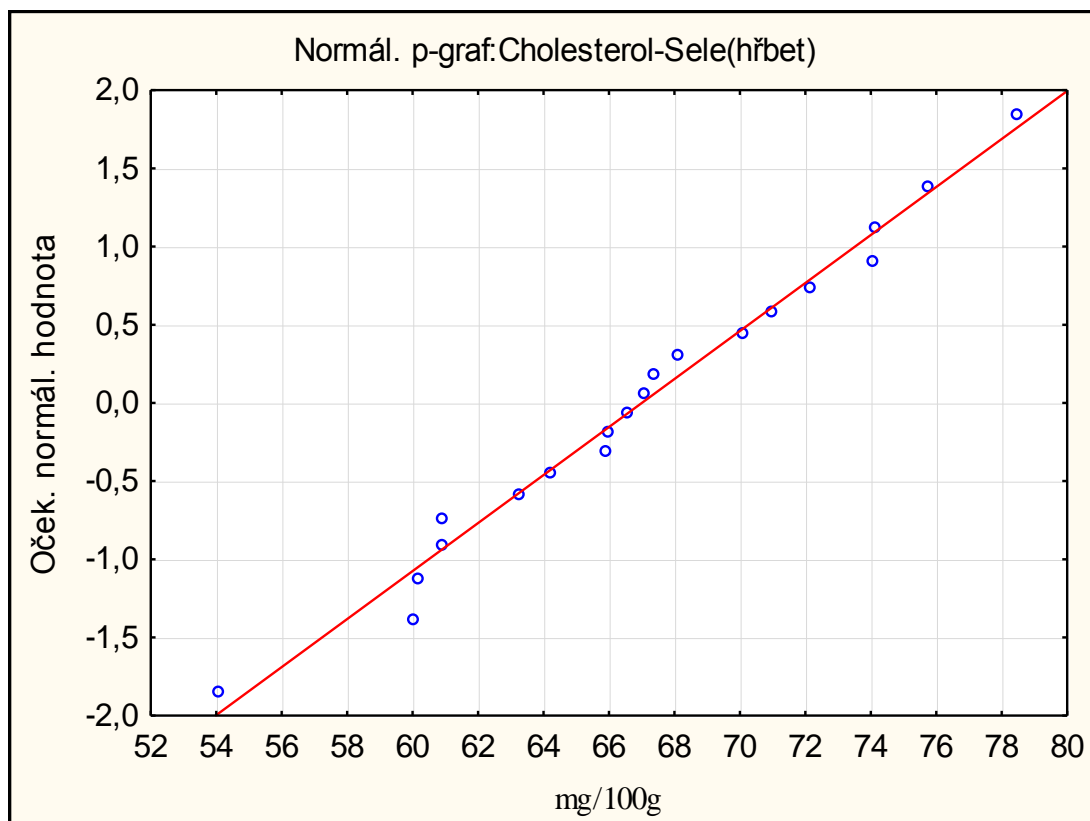
očekávaných hodnot v p-grafu na obrázku č. 19 lze experimentálně získané výsledky považovat za data pocházející z normálního rozdělení.

Tab. 8. Divoké prase: Sele (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.

Vzorek	Navážka (g)	Plocha píku α -cholestan (mV.s)	Plocha píku cholesterol (mV.s)	Obsah (mg/100g)	Průměr (mg/100g)	SMODCH
1	2,5068	141,9	429,5	65,902	67,105	1,346
	2,5025	150,6	463,3	67,097		
	2,5083	140,2	433,9	67,345		
	2,5075	160,8	502,9	68,076		
2	2,5295	156,9	442,9	60,910	60,539	0,867
	2,5014	144,3	397,9	60,168		
6	2,5021	120,7	434,3	78,491	76,322	4,019
	2,5108	123,8	422,3	74,153		
7	2,5279	130,1	397,7	66,002	64,624	3,015
	2,5084	133,9	389,2	63,246		
9	2,5020	147,5	434,1	64,202	62,560	3,712
	2,5099	151,0	423,0	60,918		
10	2,5208	166,7	583,0	75,724	74,893	1,569
	2,5135	169,0	576,4	74,063		
13	2,5046	129,9	429,8	72,104	71,550	1,096
	2,5007	136,9	445,3	70,995		
14	2,5186	151,2	418,9	60,040	57,062	7,380
	2,5078	160,0	397,6	54,085		
18	2,5048	149,2	479,6	70,045	68,307	3,598
	2,5080	152,9	467,7	66,569		



Obr. 18. Histogram divoké prase: Sele (hřbet)- výsledky analýzy cholesterolu.

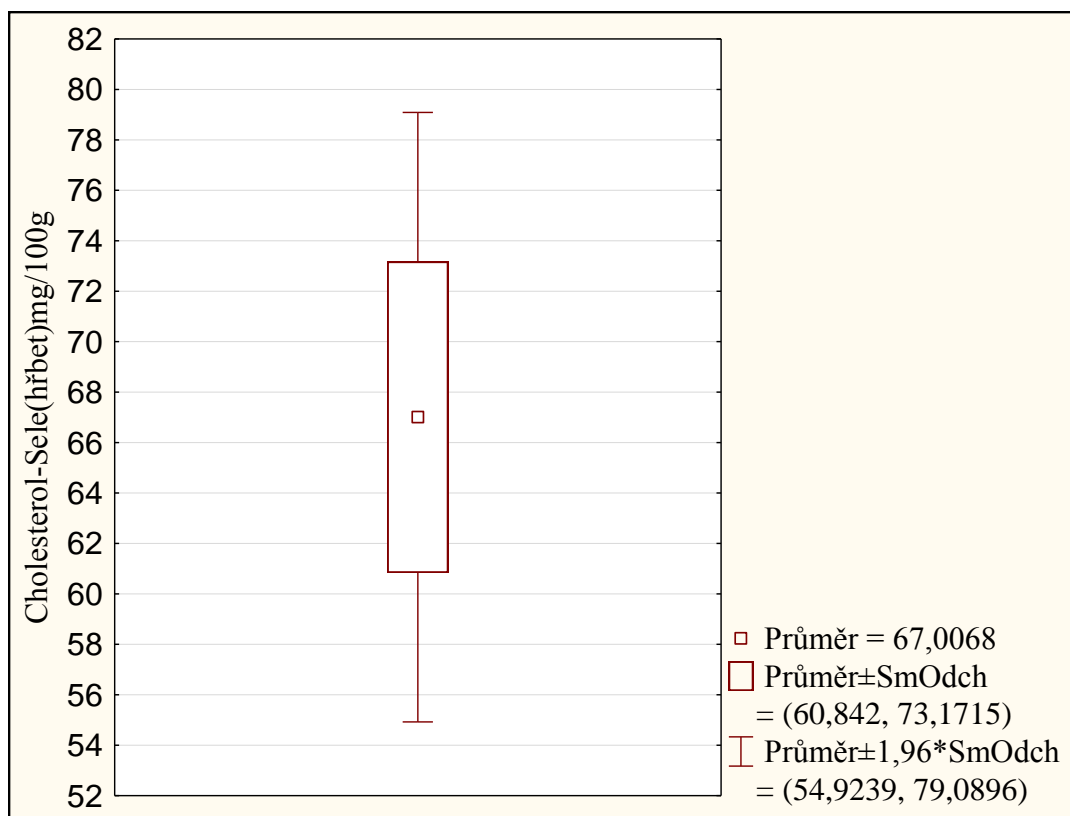


Obr. 19. P-graf divoké prase: Sele (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.

Experimentálně získané výsledky v rozmezí 54,850 až 78,491 mg/100 g s průměrnou hodnotou cholesterolu 67,007 mg/100 g u vzorků hřbetů selat divokých prasat pocházející z normálního rozdělení, ale jsou nepatrně vyšší než výsledné obsahy cholesterolu uvedené v odborné literatuře.

Chizzolini a kol. [52] uvádí průměrnou hodnotu cholesterolu u hřbetů selat divokých prasat v Itálii 56,9 mg/100 g s hodnotami v rozmezí 48,1 až 63,8 mg/100 g. Sales a kol. [54] uvádí hodnoty z Kanady 45,3 - 63,8 mg/100 g masa. Quaresma [49] v Portugalsku analyzoval cholesterol a stanovil hodnoty 46,4-56,9 mg/100 g. Nižší obsah cholesterolu u hřbetů selat v Srbsku - 44,94 mg/100 g masa publikoval Ivanovič a kol. [65].

Na obrázku č. 20 je zobrazena grafická vizualizace dat získaných analýzou cholesterolu ve vzorcích hřbetů selat divokých prasat pomocí jejich kvantilu.



Obr. 20. Box-plot divoké prase: Sele (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.

Průměrná hodnota tuku u hřbetů selat divokých prasat byla 1,34 %. Jednotlivé výsledky obsahu tuku a cholesterolu ovšem vykazují poměrně velkou variabilitu mezi jednotlivými vzorky. Nejnižší obsah tuku u vzorku hřbetu selete divokých prasat byl 0,44 % s obsahem

cholesterolu 71,550 mg/100 g. Nejvyšší obsah tuku byl 2,91 % s obsahem cholesterolu 76,322 mg/100 g.

K analyzovaným vzorkům selete divokých prasat (hřbet) byly k hodnotám obsahu cholesterolu přiřazeny hodnoty obsahu tuku v tabulce č. 9.

Tab. 9. Divoké prase: Sele (hřbet)-obsah tuku a cholesterolu.

Vzorek	Cholesterol (mg/100g)	Tuk (%)
1	67,105	1,78
2	60,539	1,34
6	76,322	2,91
7	64,624	2,04
9	62,560	1,35
10	74,893	0,75
13	71,550	0,44
14	57,062	0,68
18	68,307	0,81

Výsledky našich analýz naznačují, že v případě zvěřiny divokých prasat nezávisí obsah cholesterolu na celkovém množství tuku u selat – mase z hřbetu. Podobnou variabilitu výsledku mezi obsahem tuku a obsahem cholesterolu uvádějí autoři Drmota [3], Skewes [53], Quaresma a kol. [49], Erkens [60], Machioini a kol. [61], Dinh [50], Brodowski [62], Razmaitea [63] a Dahlan [64].

7.3.2 Stanovení obsahu cholesterolu u vzorků lončáků

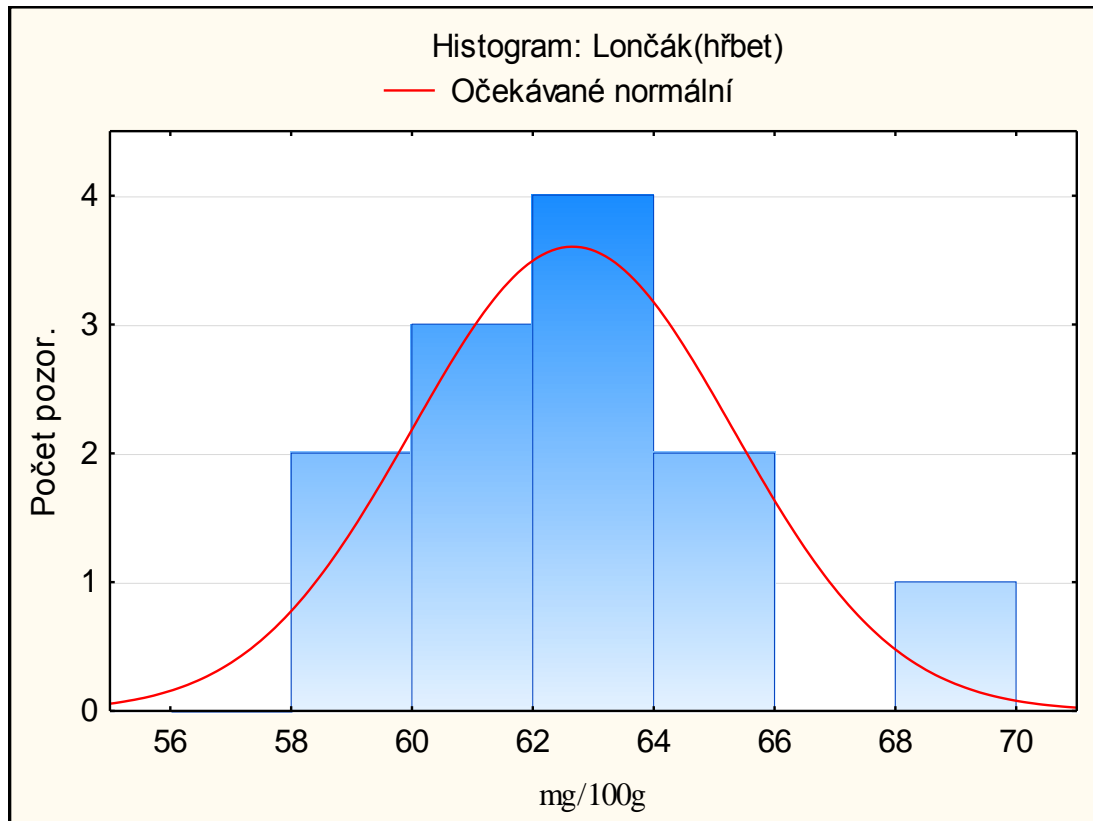
Výsledky analýz jsou uvedené v tabulce č. 10. Stanovená hodnota cholesterolu u vzorků hřbetů lončáků divokých prasat se pohybovala v rozmezí 58,967 až 68,994 mg/100 g. Průměr hodnot cholesterolu byl 62,658 mg/100 g. Medián 62,32 a variační koeficient 4,2 %. Maximální rozdíl mezi sledovanými vzorky činí 10 mg/100 g. Statistické zpracování dat, rozdělení pravděpodobnosti a očekávaných hodnot v p-grafu na obrázku č. 21 a 22 prokázalo,

že paralelní analytické výsledky jsou zatíženy pouze malými náhodnými chybami a lze je považovat za přesné bez extrémních nebo odlehlých hodnot. Experimentálně získané výsledky pocházejí z normálního rozdělení.

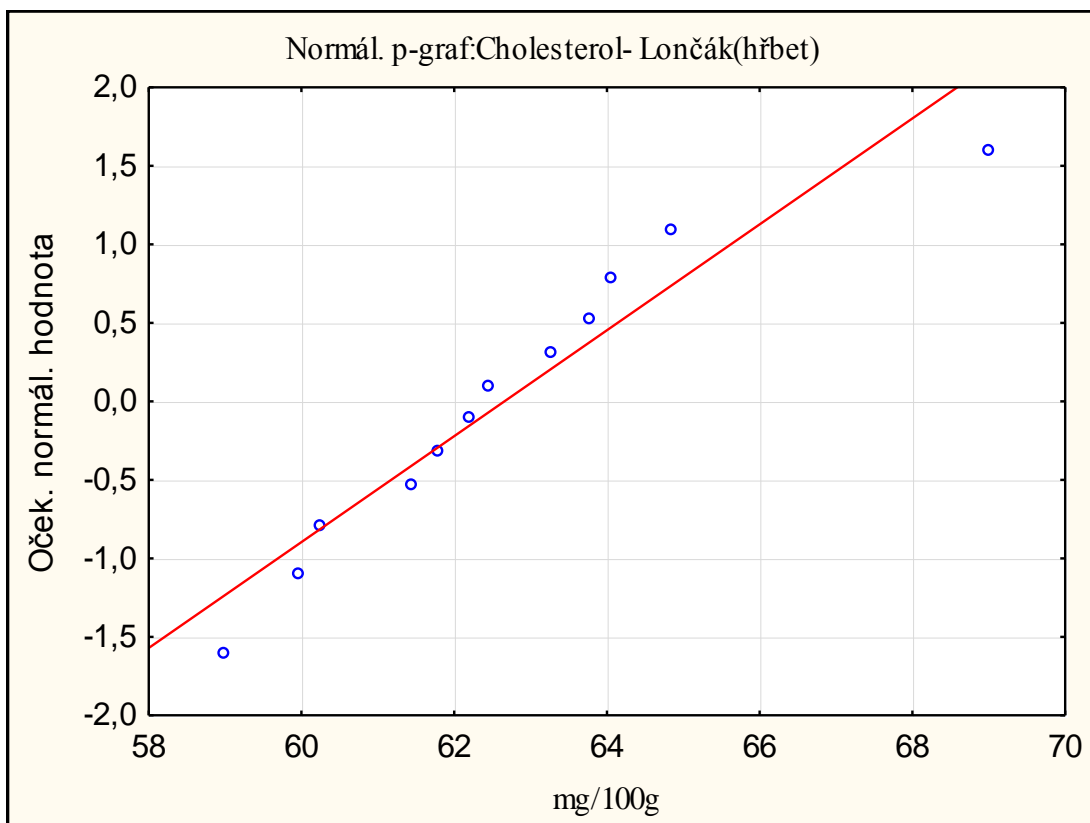
Tab. 10. Divoké prase: Lončák (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.

Vzorek	Navážka (g)	Plocha píku α -cholestan (mV.s)	Plocha píku cholesterol (mV.s)	Obsah (mg/100g)	Průměr (mg/100g)	SMODCH
3	2,5086	135,2	388,1	62,456	64,686	4,552
	2,5064	124,2	393,5	68,994		
	2,5055	149,7	440,1	64,044		
	2,5047	155,9	452,5	63,249		
5	2,5159	149,1	413,9	60,223	59,595	1,491
	2,5068	151,5	410,3	58,967		
8	2,5134	159,1	450,1	61,435	60,702	1,707
	2,5106	168,1	463,7	59,969		
15	2,5051	124,0	362,9	63,764	62,780	2,218
	2,5204	131,1	374,1	61,795		
17	2,5162	155,1	463,5	64,823	63,499	2,948
	2,5198	158,2	454,1	62,175		

Experimentálně získané výsledky jsou nepatrně vyšší než výsledné obsahy cholesterolu uvedené v odborné literatuře. Machioni a kol. [54] uvádí průměrnou hodnotu cholesterolu u hřbetů lončáků divokých prasat žijících v Itálii 57,2 mg/100 g s hodnotami v rozmezí 48,1 až 63,8 mg/100 g. Sales a kol. [54] z Kanady uvádí hodnoty 56,8 mg/100 g. Szcegielniak [51] analyzoval cholesterol u divokých prasat v Polsku a zjistil obsah 51,19 mg/100 g.

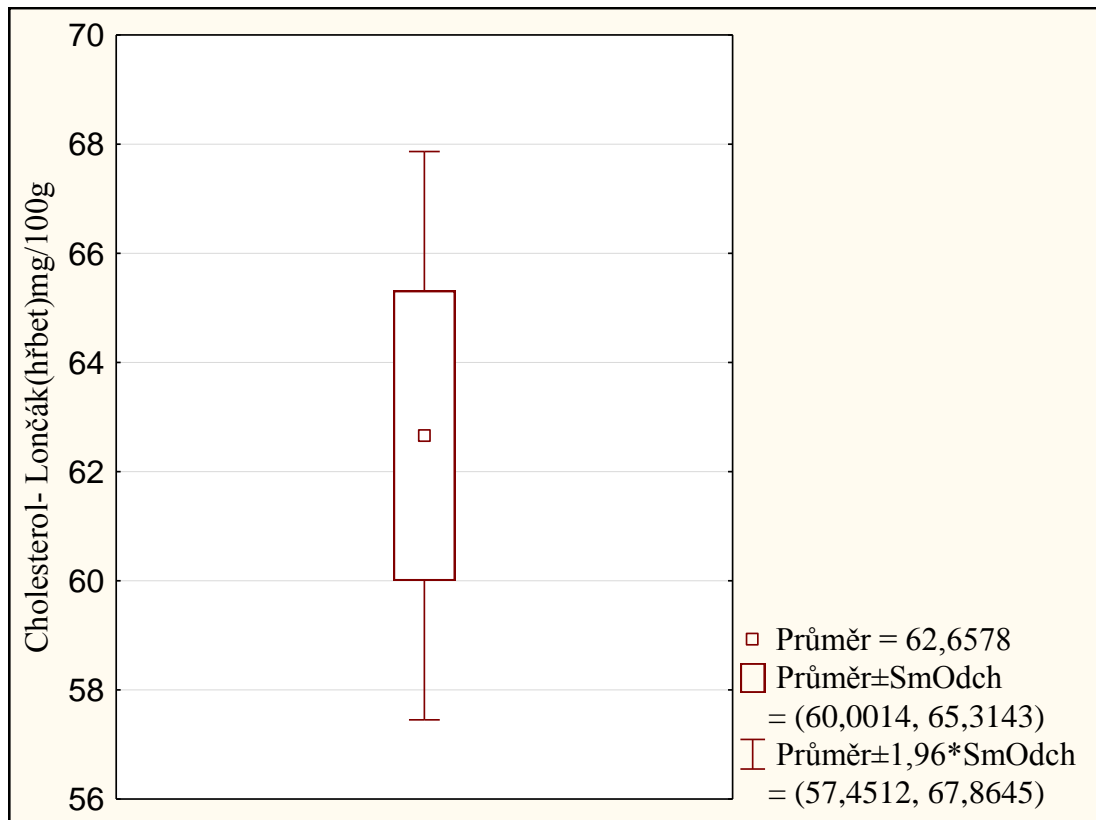


Obr. 21. Histogram divoké prase: Lončák (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.



Obr. 22. P- graf divoké prase: Lončák (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.

Průměr hodnot cholesterolu u vzorků hřbetů lončáků divokých prasat je zobrazen v krabicovém diagramu na obrázku č. 23. Graficky zobrazuje minimální a maximální hodnotu cholesterolu, dolní kvartil, medián, horní kvartil a aritmetický průměr.



Obr. 23. Box- plot divoké prase: Lončák (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.

Průměrná hodnota tuku u hřbetů lončáků divokých prasat byla 1,48 %. Jednotlivé výsledky obsahu tuku a cholesterolu vykazují tak jak u vzorků hřbetů selat divokých prasat poměrně velkou variabilitu mezi jednotlivými vzorky. Nejnížší obsah tuku u vzorků hřbetů lončáků divokých prasat byl 0,33 % s obsahem cholesterolu 62,780 mg/100g. Nejvyšší obsah tuku byl 2,46 % s obsahem cholesterolu 64,686 mg/100 g.

K analyzovaným vzorkům hřbetů lončáků divokých prasat byly k hodnotám obsahu cholesterolu v tabulce č. 11 přiřazeny hodnoty obsahu tuku.

Tab. 11. Divoké prasce: Lončák (hřbet)-obsah tuku a cholesterolu.

Vzorek	Cholesterol (mg/100g)	Tuk (%)
3	64,686	2,460
5	59,595	1,560
8	60,702	1,740
15	62,780	0,330
17	63,499	1,300

Tak jak u vzorků hřbetů selat divokých prasat výsledky analýz hřbetů lončáků naznačují, že v případě zvěřiny divokých prasat nezávisí obsah cholesterolu na celkovém množství tuku. Mnoho vědců [46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53,54] popisuje podobnou variabilitu výsledků mezi obsahem tuku a obsahem cholesterolu

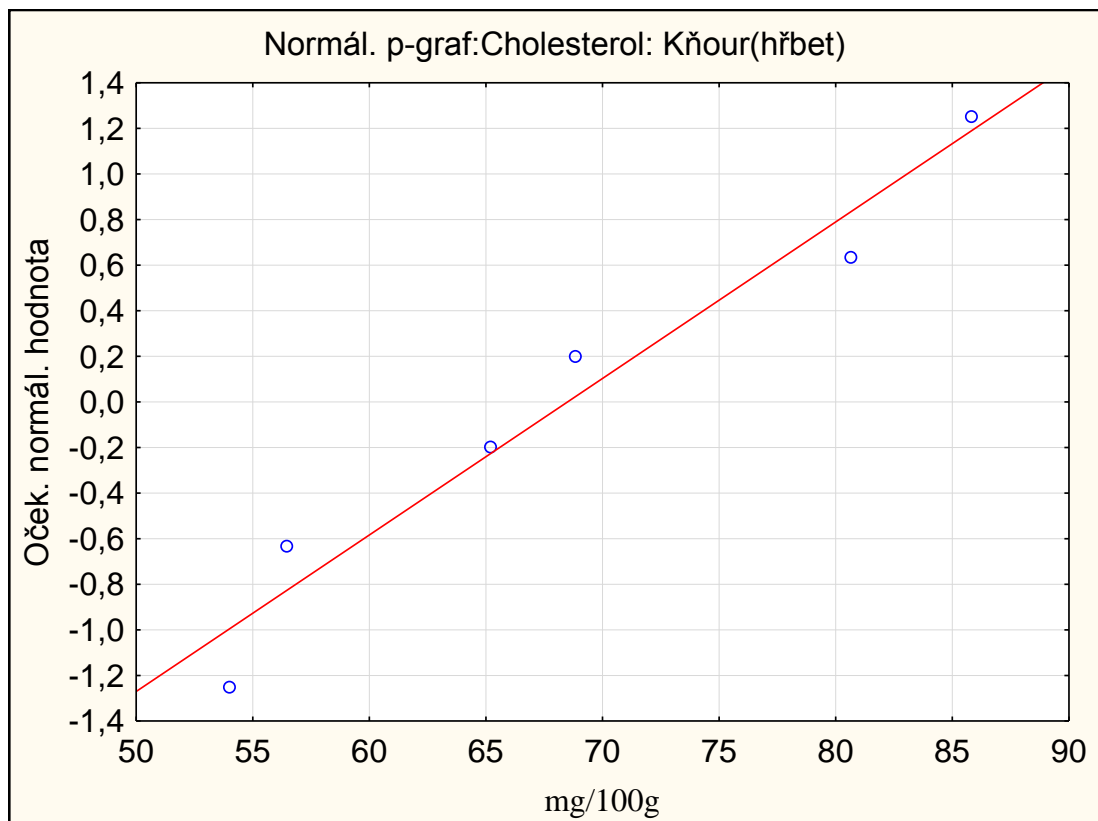
7.3.3 Stanovení obsahu cholesterolu u vzorků kňourů

Výsledky analýz obsahu cholesterolu u vzorků hřbetů kňourů divokých prasat jsou uvedené v tabulce č. 12. Statistický souhrn výsledků analýzy cholesterolu u hřbetů kňourů divokých prasat je zobrazen v p-grafu a krabicovém diagramu na obrázku č. 24 a 25.

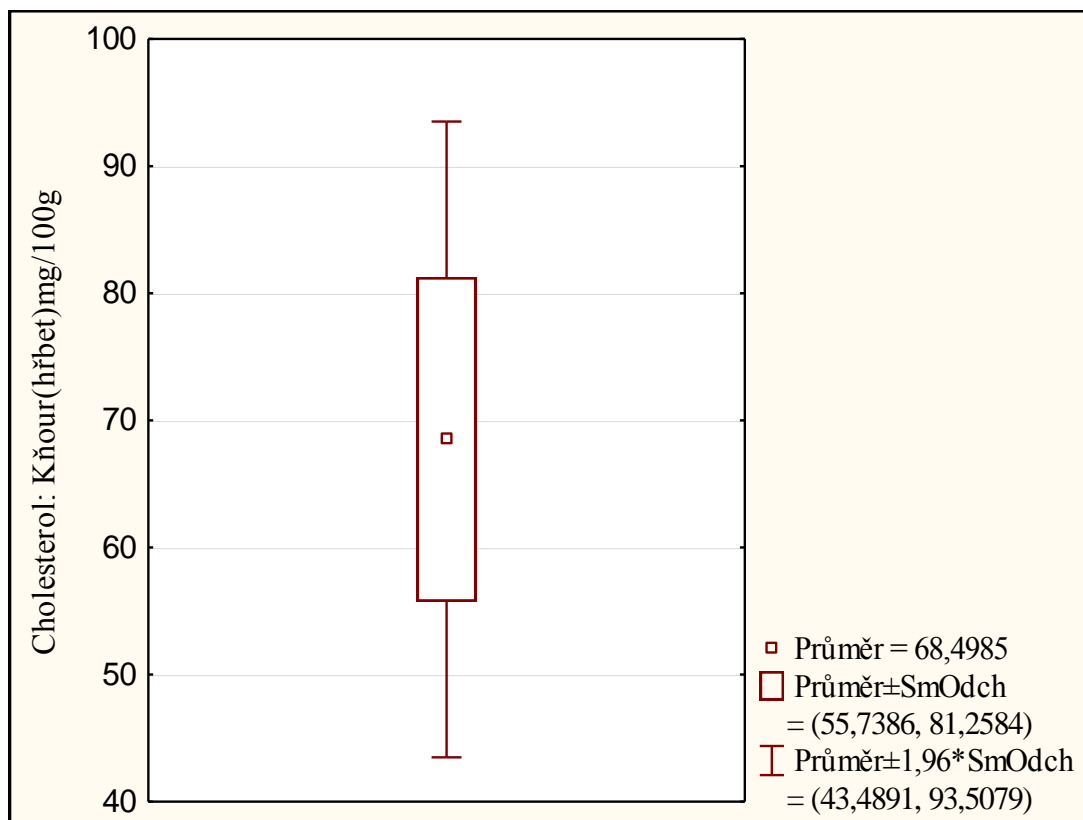
Stanovená hodnota cholesterolu u vzorků hřbetů kňourů divokých prasat byla dosti variabilní. Hodnoty obsahu cholesterolu byly v rozmezí 54,004 až 85,827 mg/100 g a vykazují relativně velké odchylky dat v analyzovaných vzorcích od střední hodnoty. Průměr hodnot cholesterolu u vzorků hřbetů kňourů divokých prasat byl 68,498 mg/100 g. Medián hodnot byl 67,02 mg/100 g a variační koeficient 18,6 %.

Tab. 12. Divoké prase: Kňour (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.

Vzorek	Navážka (g)	Plocha píku α -cholestan (mV.s)	Plocha píku cholesterol (mV.s)	Obsah (mg/100g)	Průměr (mg/100g)	SMODCH
4	2,532	159,9	418,8	56,459	55,231	3,143
	2,5141	164,7	409,7	54,004		
12	2,5106	123,0	389,5	68,843	67,023	3,840
	2,5126	123,4	370,4	65,203		
24	2,506	116,2	457,9	85,827	83,241	4,392
	2,5048	119,9	443,8	80,655		



Obr. 24. P- graf divoké prase: Kňour (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.



Obr. 25. Box-plot divoké prase: Kňour (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.

K dvěma analyzovaným vzorkům hřbetů kňourů divokých prasat byly k hodnotám obsahu cholesterolu přiřazeny hodnoty obsahu tuku v tabulce č. 13.

Tab. 13. Divoké prase: Kňour (hřbet)

- obsah tuku a cholesterolu.

Vzorek	Cholesterol (mg/100g)	Tuk (%)
4	55,231	0,990
12	67,023	1,470

Experimentálně získané výsledky obsahu cholesterolu u vzorků hřbetů kňourů divokých prasat v rozmezí 54,004 až 85,827 mg/100 g, s průměrnou hodnotou cholesterolu 68,498 mg/100 g, vykazaly největší variabilitu mezi všemi analyzovanými vzorky jednotlivých věkových kategorií a jednotlivými partiemi divokých prasat.

Při porovnání průměrného obsahu cholesterolu u hřbetů kňourů divokých prasat s hodnotou 68,498 mg/100g s obsahem cholesterolu u hřbetů selat s hodnotou 67,007 mg/100 g jsou výsledky i přes věkový rozdíl mezi jednotlivými vzorky téměř podobné. Nepatrně vyšší hodnoty obsahu cholesterolu u hřbetů kňourů divokých prasat jsou s porovnáním vzorků u lončáků divokých prasat, kde průměrná hodnota obsahu cholesterolu byla 62,658 mg/100 g. Průměrná hodnota tuku u hřbetů kňouru divokých prasat byla 1,23 % a je nepatrně nižší než u vzorku hřbetů z mladších kusů selat, kde průměrná hodnota obsahu tuku byla 1,36 % a u lončáků kde byla průměrná hodnota 1,48 %.

U kňourů divokých prasat se kromě vzorků hřbetů analyzoval i vzorek kýty a plece. Stanovená hodnota cholesterolu u vzorků kýty kňoura divokých prasat byla 76,421 mg/100 g a je uvedena v tabulce č. 14. U vzorků plece kňoura divokých prasat byla hodnota cholesterolu 81,668 mg/100 g a je uvedena v tabulce č. 15. Získané výsledky obsahu cholesterolu u kýty a plece kňourů divokých prasat vykazují vyšší hodnoty než průměrný obsah 68,498 mg/100 g cholesterolu u hřbetů kňourů.

Tab. 14. Divoké prase: Kňour (kýta)- výsledky analýzy cholesterolu.

Vzorek	Navážka (g)	Plocha píku α -cholestan (mV.s)	Plocha píku cholesterol (mV.s)	Obsah (mg/100g)	Průměr (mg/100g)	SMODH
23	2,5011	127,3	449,5	77,056	76,421	1,174
	2,5155	125,6	438,7	75,786		

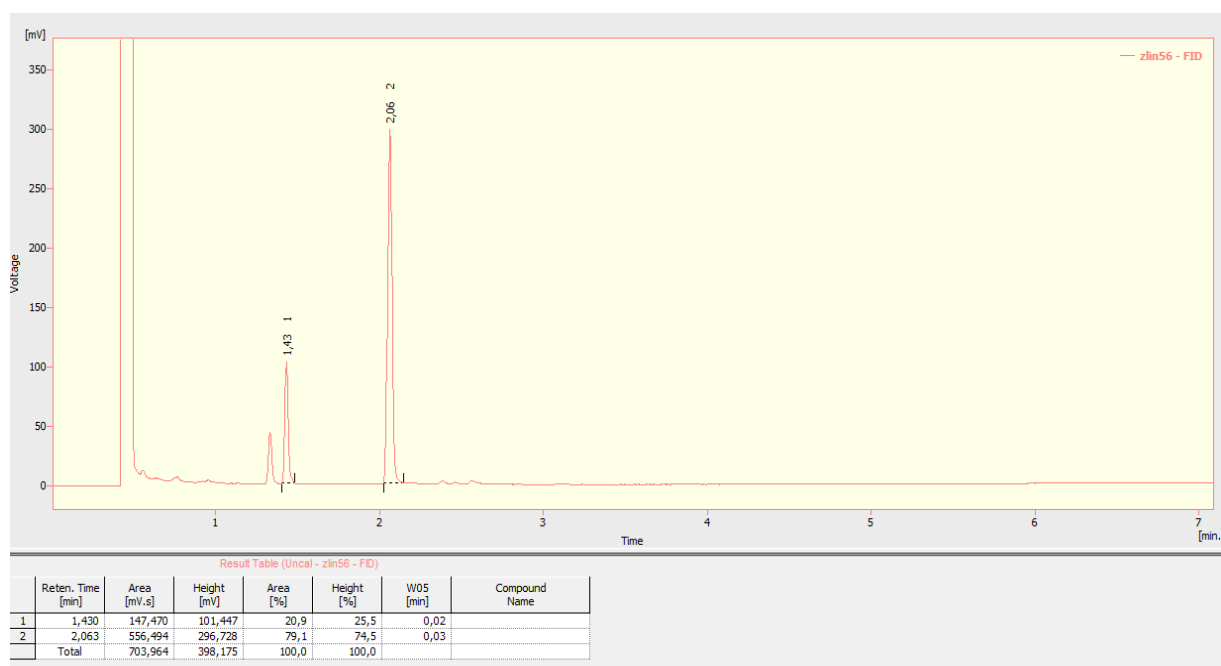
Tab. 15. Divoké prase: Kňour (plec)-výsledky analýzy cholesterolu.

Vzorek	Navážka (g)	Plocha píku α -cholestan (mV.s)	Plocha píku cholesterol (mV.s)	Obsah (mg/100g)	Průměr (mg/100g)	SMODH
22	2,5088	147,5	562,4	82,952	81,668	2,223
	2,5131	149,6	553,7	80,384		

Variabilní výsledky obsahu cholesterolu a tuku u divokých prasat - kňourů jsou uvedeny také v odborné literatuře. Dannenberger a kol. [59] z Německa uvádějí průměrnou hodnotu cholesterolu u hřbetů kňourů divokých prasat 63,8 mg/100g. Chizzolini [52] v Itálii uvádí průměrnou hodnotu cholesterolu u kňourů 56,9 mg/100g s vysokým obsahem tuku 4,75 %. Quaresma [49] v Portugalsku uvádí u kňourů také vyšší obsah tuku s hodnotou 4,25 %, a cholesterolem 58,7 mg/100 g. Nejvyšší hodnotu cholesterolu 95,07 mg/100 g s hodnotou obsahu tuku 1,33 % v mase z hřbetů kňourů divokých prasat publikoval Strazdina [66] z Litvy.

Razmaite [63], Dannenberger [59] a Erkens [60] uvádějí, že množství cholesterolu u divokých prasat bude pravděpodobně souviset nejen s obsahem tuku, ale především se samotným složením lipidové frakce a podílem nenasycených mastných kyselin a vitamínu E.

Vzorový chromatogram analýzy cholesterolu z plece kňoura divokého prasete je zobrazen na obrázku č. 26.



Obr. 26. Chromatogram analýzy cholesterolu z plece kňoura divokého prasete.

7.3.4 Stanovení obsahu cholesterolu u vzorků bachyní

Výsledky analýz jsou uvedené v tabulce č. 16. Stanovená hodnota cholesterolu u vzorků hřbetů bachyní divokých prasat se pohybovala v rozmezí 58,349 až 68,885 mg/100 g.

Statistické zpracování dat a očekávaných hodnot v p-grafu na obrázku č. 27 prokázalo, že paralelní analytické výsledky jsou zatíženy pouze malými náhodnými chybami bez extrémních nebo odlehlých hodnot. Experimentálně získané výsledky pocházejí z normálního rozdělení. Průměr hodnot cholesterolu u vzorků hřbetů bachyní divokých prasat zobrazuje krabicový diagram č. 28. Průměr hodnot cholesterolu u vzorků hřbetů bachyní byl 61,862 mg/100 g. Medián 60,95 mg/100 g a variační koeficient 4,2 %.

Tab. 16. Divoké prase: Bachyně (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.

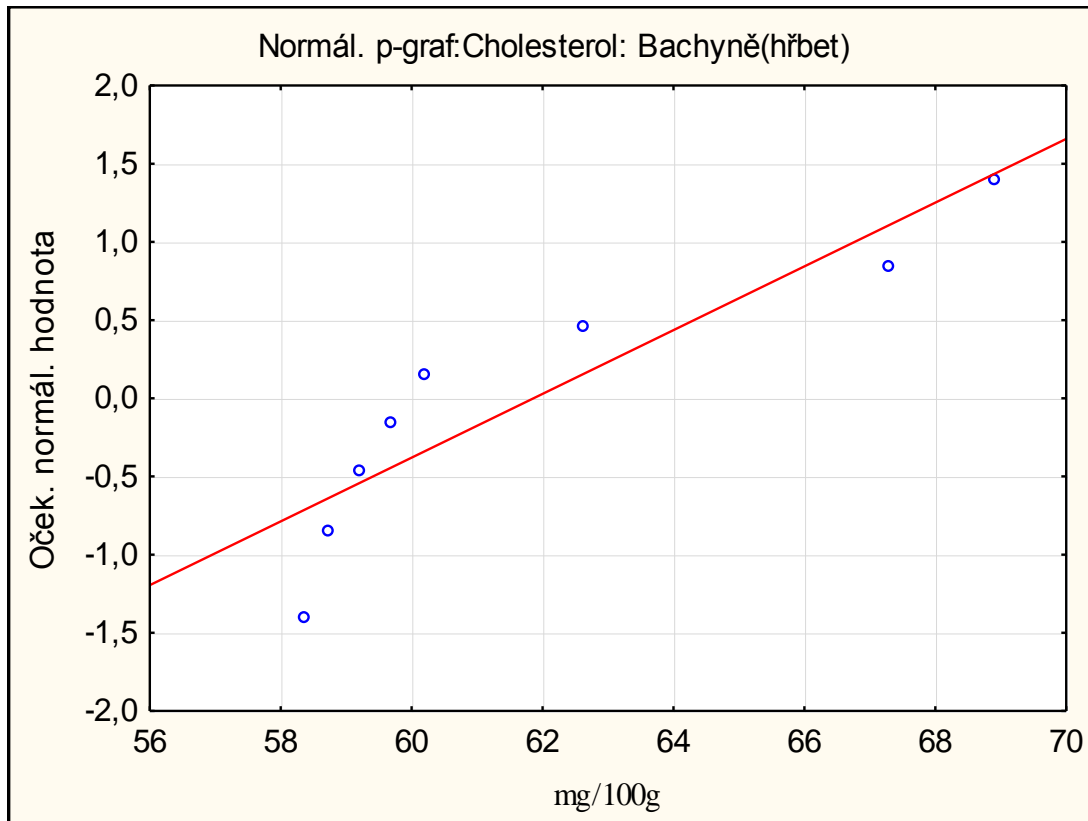
Vzorek	Navážka (g)	Plocha píku α -cholestan (mV.s)	Plocha píku cholesterol (mV.s)	Obsah (mg/100g)	Průměr (mg/100g)	SMODCH
11	2,5127	145,6	419,6	62,599	61,137	3,383
	2,5038	149,7	409,8	59,674		
16	2,5075	160	428,9	58,349	59,115	1,346
	2,5045	144,1	398	60,192		
	2,5083	150,2	405,4	58,732		
	2,5023	133,7	362,8	59,188		
21	2,5111	75,4	233,4	67,283	68,084	1,663
	2,5227	85,4	271,9	68,885		

K analyzovaným vzorkům hřbetů bachyně divokých prasat byly k hodnotám obsahu cholesterolu v tabulce č. 17 přiřazeny hodnoty obsahu tuku.

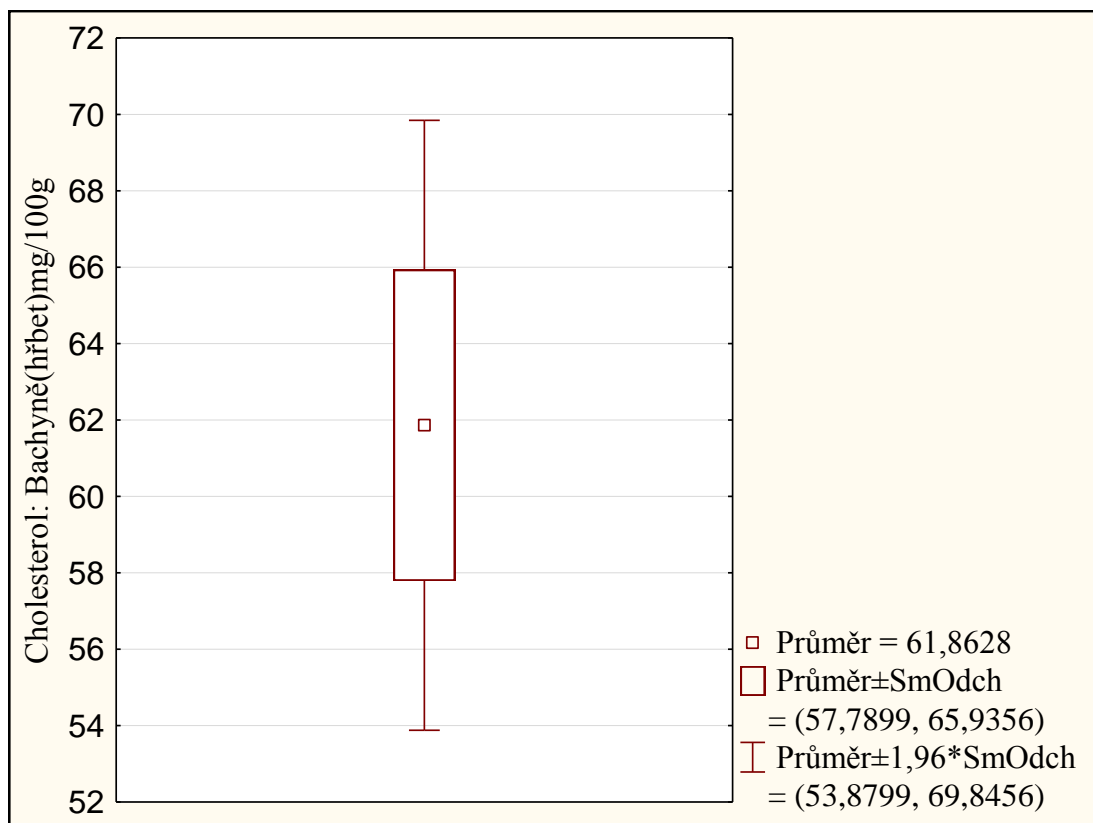
Tab. 17. Divoké prase: Bachyně (hřbet)

- obsah tuku a cholesterolu.

Vzorek	Cholesterol (mg/100g)	Tuk (%)
11	61,137	2,93
16	59,115	0,49



Obr. 27. P- graf divoké prase: Bachyně (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.



Obr. 28. Box-plot divoké prase: Bachyně (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.

U bachyní divokých prasat se kromě vzorků hřbetů analyzoval i vzorek kýty a plece. Stanovená hodnota cholesterolu u vzorků kýty bachyně divokých prasat byla 86,479 mg/100 g a je uvedena v tabulce č. 18. U vzorků plece bachyně divokých prasat byla hodnota cholesterolu 75,852 mg/100 g a je uvedena v tabulce č. 19. Získané výsledky obsahu cholesterolu u kýty a plece bachyně divokých prasat vykazují vyšší hodnoty než průměrný obsah 61,862 mg/100 g cholesterolu u hřbetů kňourů.

Tab. 18. Divoké prase: Bachyně (kýta)-výsledky analýzy.

Vzorek	Navážka (g)	Plocha píku α -cholestan (mV.s)	Plocha píku cholesterol (mV.s)	Obsah (mg/100g)	Průměr (mg/100g)	SMODCH
20	2,505	157,6	617,9	85,426	86,479	1,721
	2,5089	127,4	512,6	87,531		

Tab. 19. Divoké prase: Bachyně (plec) - výsledky analýzy.

Vzorek	Navážka (g)	Plocha píku α -cholestan (mV.s)	Plocha píku cholesterol (mV.s)	Obsah (mg/100g)	Průměr (mg/100g)	SMODH
19	2,5071	141,6	492,2	75,674	75,852	0,331
	2,5141	143,2	501,5	76,030		

Experimentálně získané výsledky v rozmezí 58,349 až 68,885 mg/100 g s průměrnou hodnotou cholesterolu 61,862 mg/100 g u vzorků hřbetů bachyní divokých prasat pocházejí z normálního rozdělení, ale jsou nepatrně vyšší než obsahy cholesterolu uváděné v odborné literatuře. Průměrná hodnota tuku u hřbetů bachyní divokých prasat byla 1,71 % a je nejvyšší ze všech analyzovaných věkových kategorií. Jednotlivé výsledky obsahu tuku a cholesterolu vykazují tak jak u vzorků hřbetů selat, lončáků a kňourů divokých prasat poměrně velkou variabilitu mezi jednotlivými vzorky. Nejnižší obsah tuku u vzorků hřbetů bachyní divokých prasat byl 0,49 % s obsahem cholesterolu 59,115 mg/100 g. Nejvyšší obsah tuku byl 2,93 % s obsahem cholesterolu 61,137 mg/100 g. Sales a kol. [54] uvádí průměrnou hodnotu cholesterolu u hřbetů bachyní divokých prasat z Itálie 58,9 mg/100 g. Szcegielniak [51] publikoval v Polsku hodnotu cholesterolu 80,680 mg/100 g. Quaresma [49] v Portugalsku analyzoval u hřbetů bachyní divokých prasat cholesterol a zjistil obsah 55,6 mg/100

g s vyšším obsahem tuku 4,55 %. Dannenberger [59] v Německu uvádí obsah tuku u bachyní 2,11 %.

Tak jak u vzorků hřbetů selat, lončáků a kňourů divokých prasat výsledky analýz hřbetů bachyní naznačují, že v případě zvěřiny divokých prasat nezávisí obsah cholesterolu pouze na celkovém množství tuku, ale především na samotném složení lipidové frakce a podílu nenasycených mastných kyselin a vitamínu E. Podobnou variabilitu výsledků mezi obsahem tuku a obsahem cholesterolu uvádějí i další autoři [62,63,65,66],

7.3.5 Stanovení obsahu cholesterolu v lyofilizovaných vzorcích selete divokých prasat

Pro účely možnosti ověření stanovení cholesterolu u zvěřiny divokých prasat v lyofilizovaných vzorcích byly analyzovány vzorky č. 1 a č. 10 (sele- hřbet) i v lyofilizovaném stavu. Úprava vzorků a provedení lyofilizace je popsáno v kapitole 5.1. Výsledky analýzy jsou zobrazeny v tabulce č. 20.

Tab. 20. Divoké prase : Sele (hřbet) - lyofilizované vzorky.

Vzorek	Navážka (g)	Plocha píku α -cholestan (mV.s)	Plocha píku cholesterol (mV.s)	Sušina (%)	Průměr real.vzorek (mg/100g)	Průměr bez lyof. (mg/100g)
1	1,0567	128,7	421,8	42,27	68,610	67,105
	1,0569	123,4	371,4			
10	1,1100	122,9	419,7	44,40	73,917	74,893
	1,1109	146,2	501,9			

Zjištěná hodnota obsahu cholesterolu vzorku č. 1 (sele hřbet) bez lyofilizace byla 67,105 mg/100 g, výsledná hodnota cholesterolu lyofilizovaného vzorku byla po přepočtu na reálný vzorek 68,610 mg/100 g (42,27 % sušiny). Variační koeficient 1,6 %.

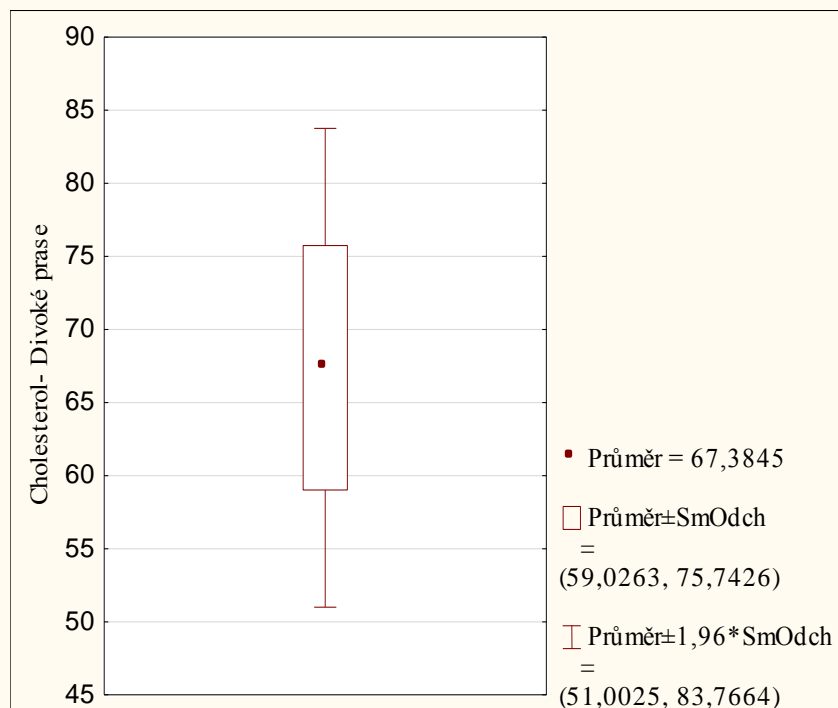
Zjištěná hodnota obsahu cholesterolu vzorku č. 10 (sele hřbet) bez lyofilizace byla 74,893 mg/100 g, výsledná hodnota cholesterolu lyofilizovaného vzorku byla po přepočtu na reálný vzorek 73,917 mg/100 g (44,40 % sušiny). Variační koeficient 2,2 %.

Porovnání výsledků hodnot obsahu cholesterolu u dvou lyofilizovaných vzorků a vzorků bez lyofilizace hřbetů selat divokých prasat s malým variačním koeficientem naznačují možnost provedení analýzy stanovení obsahu cholesterolu i v lyofilizovaných vzorcích na GC/FID s dobrou přesností.

7.4 Obsah cholesterolu ve vzorcích zvěřiny divokých prasat

Z výsledků všech analyzovaných vzorků zvěřiny divokých prasat byla vypočtena průměrná hodnota cholesterolu - 67,384 mg/100 g. Stanovená hodnota cholesterolu se pohybovala v rozmezí 54,004 až 87,531 mg/100 g. Souhrn celkových výsledků analýzy cholesterolu ve zvěřině divokých prasat je zobrazen na obrázku č. 29. Krabicový diagram box-plot zachycuje minimální a maximální hodnotu cholesterolu, dolní kvartil, medián, horní kvartil, aritmetický průměr a průměrné hodnoty směrodatné odchylky. Je velmi pravděpodobné, že graf reprezentuje data z normálního rozložení nejen díky svojí symetrii, ale také polohou medianu, která leží takřka v úplném prostředku obdélníku..

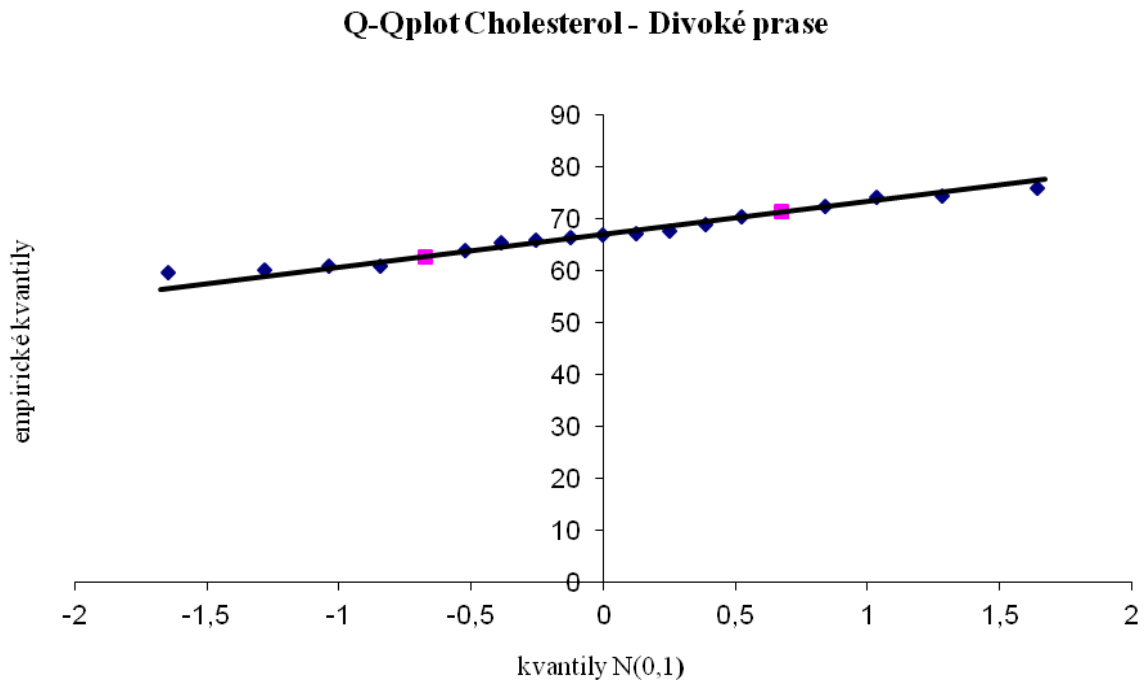
Souhrn: Cholesterol - Divoké prase



Obr. 29. Box - plot. Souhrn výsledků analýzy cholesterolu-celkový průměr.

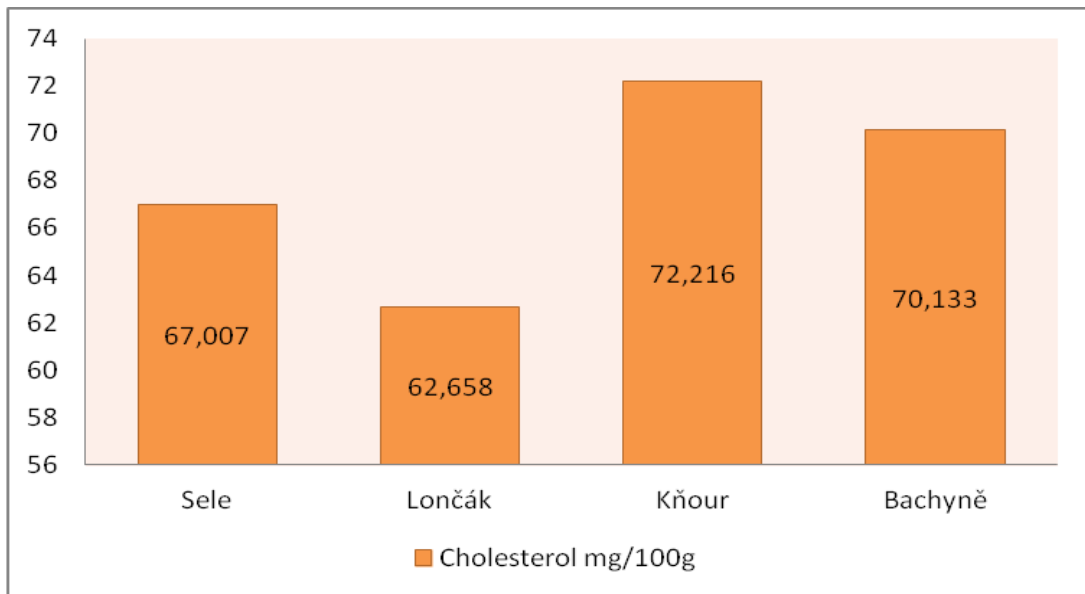
Graf Q-Qplot na obrázku č. 30 porovnává teoretické kvantily normovaného rozdělení $N(0,1)$ s empirickými kvantily určených z dat výsledků analýzy cholesterolu ve zvěřině divokých prasat. Z tvaru Q-Q grafu se dá posoudit symetrie, normalita, špičatost a homogenita analyzovaných hodnot.

Z Q-Qplot grafu výsledků analýzy obsahu cholesterolu ve zvěřině divokých prasat je patrné, že empirické kvantily se blíží teoretickým kvantilům, kdy body v grafu jsou blízko přímce. Experimentálně získané výsledky mohou být považovány za data pocházející z normálního rozdělení.



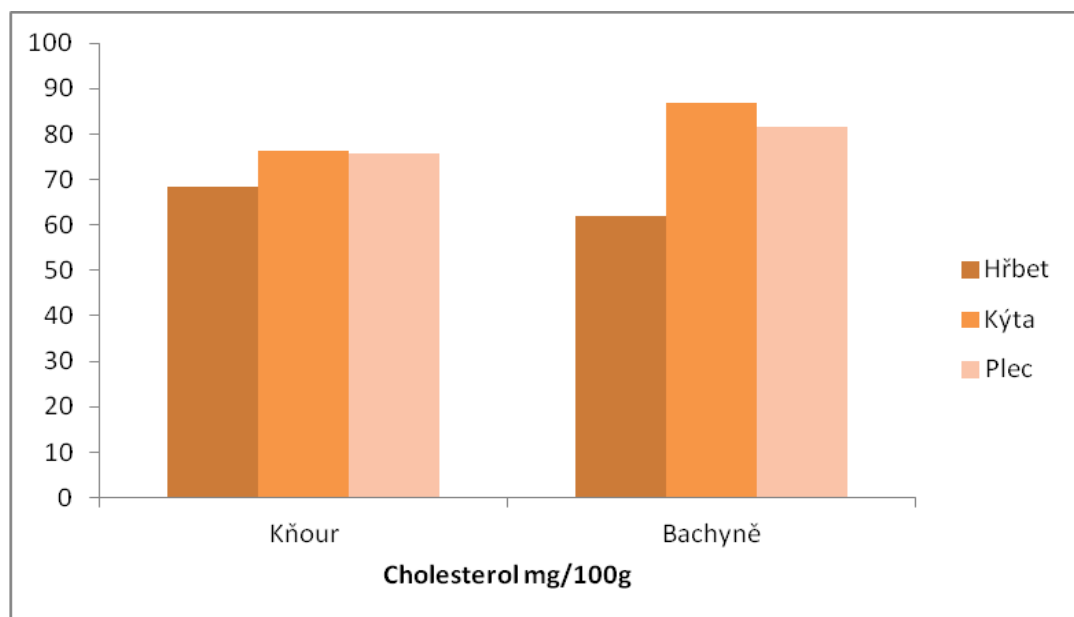
Obr. 30. Q-Qplot graf výsledků analýzy cholesterolu-celkový průměr.

Nejvyšší obsah cholesterolu 87,531 mg/100 g vykazoval vzorek kýty bachyně divokého prasete a vzorek části plece kňoura divokého prasete s hodnotou cholesterolu 82,952 mg/100 g. Nejmenší obsah cholesterolu vykazoval vzorek hřbetu kňoura divokého prasete s hodnotou 54,004 mg/100 g a vzorek hřbetu selete divokého prasete s hodnotou cholesterolu 54,085 mg/100 g. Průměrné hodnoty obsahu cholesterolu u jednotlivých věkových kategorií jsou uvedeny na obrázku č. 31. U vzorků selat a lončáků divokých prasat byly analyzovány vzorky hřbetů. U vzorků kňourů a bachyní divokých prasat byla možnost provést analýzu i na vzorcích části kýty a plece.



Obr. 31. Průměrné hodnoty obsahu cholesterolu.

Nejvyšší průměrnou hodnotu cholesterolu u hřbetů divokých prasat vykazovaly vzorky kňourů s hodnotou 68,498 mg/100 g a vzorky hřbetů selete s hodnotou 67,007 mg/100 g. Nejnižší obsah cholesterolu měly vzorky hřbetů bachyní s hodnotou 61,862 mg/100 g a vzorky hřbetů lončáků s hodnotou 62,658 mg/100 g. Vzorky kýty a plece divokých prasat vykazovaly vyšší hodnoty obsahu cholesterolu jak oproti průměrným hodnotám cholesterolu u hřbetů, tak i celkovému průměru. Rozdíl v hodnotách obsahu cholesterolu v jednotlivých partiích u kňourů a bachyní je uveden na obrázku č. 32.

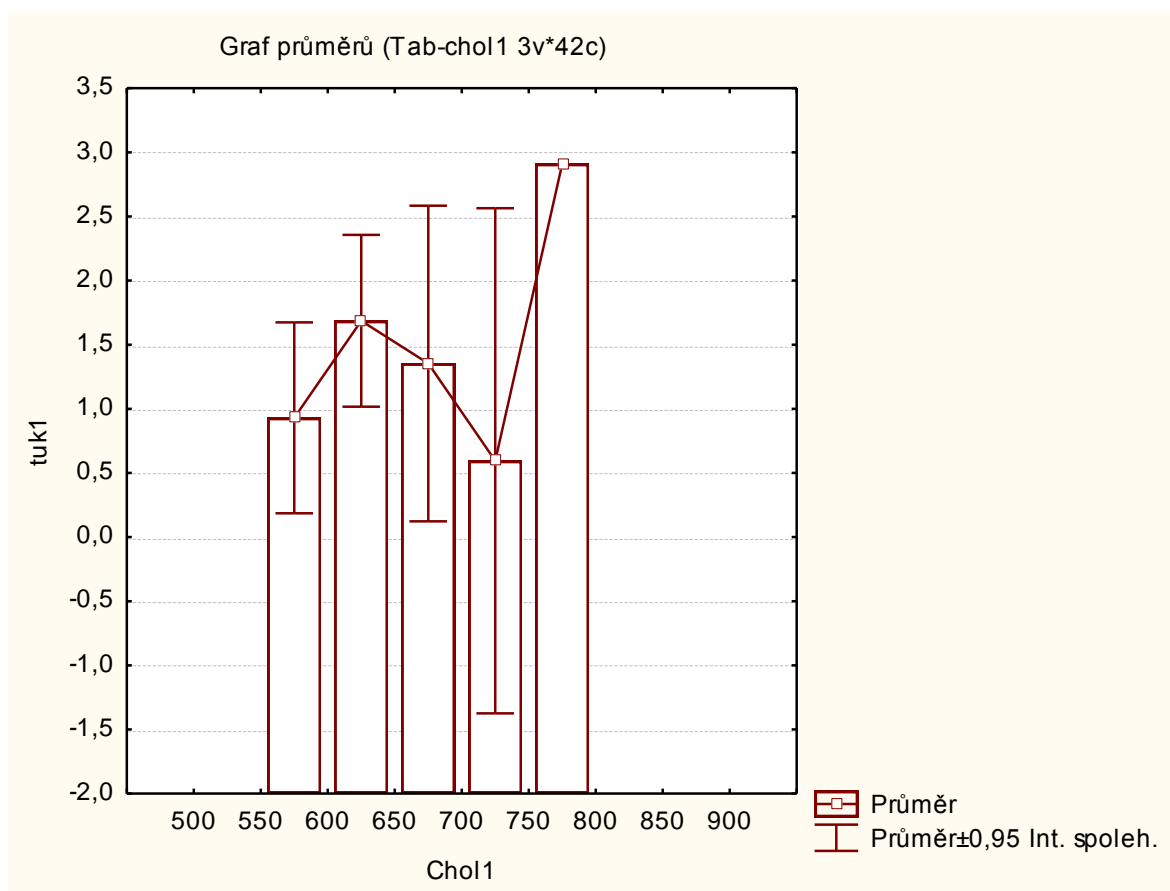


Obr. 32. Průměrné hodnoty obsahu cholesterolu u jednotlivých partií.

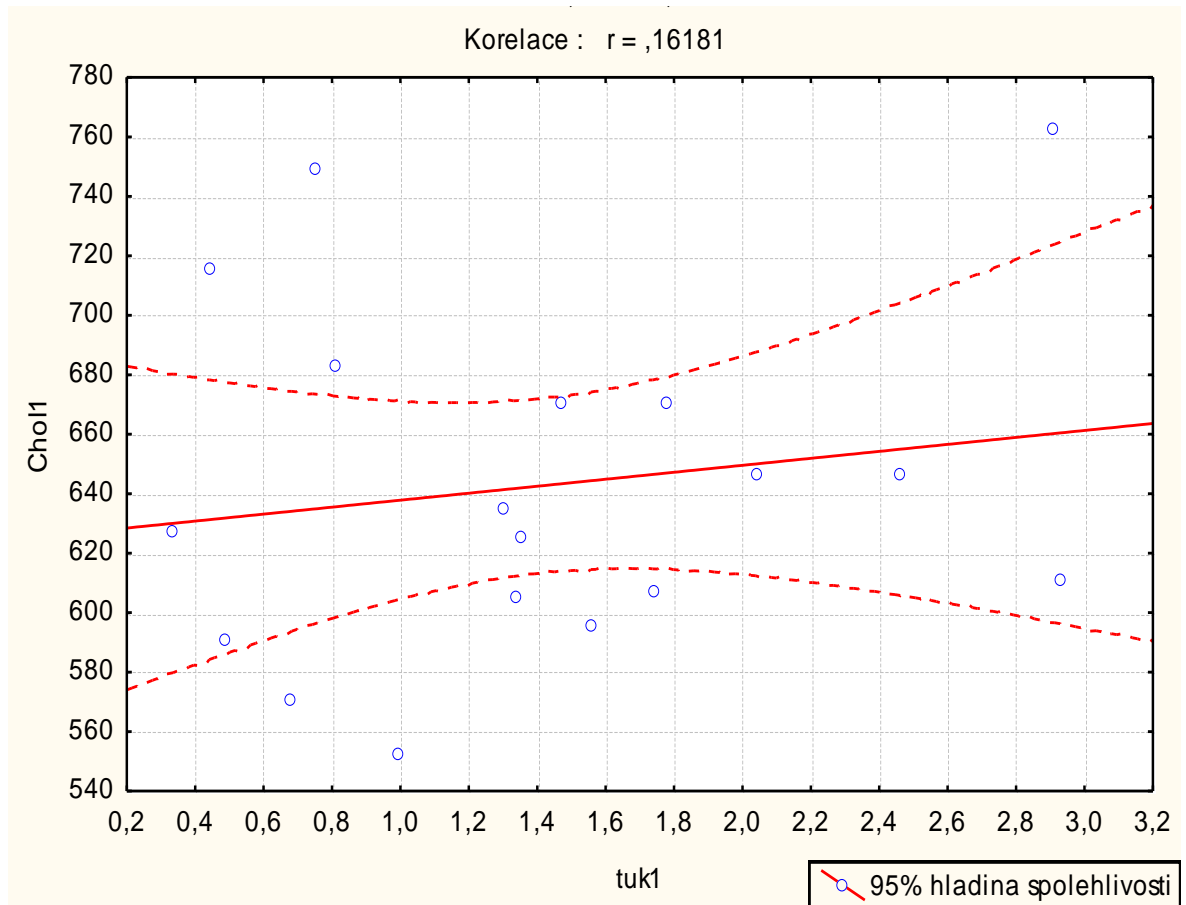
Průměrný obsah tuku vzorků divokého prasete byl 1,41 %. Při porovnání výsledků obsahů tuku a cholesterolu vykazovaly hodnoty poměrně velkou variabilitu mezi jednotlivými vzorky. Rozdíl byl jak u všech věkových kategorií divokých prasat, tak i u jednotlivých partií. Příkladem je nejnižší obsah tuku u vzorků hřbetu lončáka divokého prasete s hodnotou 0,33 % a obsahem cholesterolu 62,780 mg/100 g a nejvyšší obsah tuku u vzorků hřbetu lončáka 2,46 % s obsahem cholesterolu téměř totožným - 64,686 mg/100 g.

Výsledky našich analýz naznačují, že v případě zvěřiny divokých prasat nezávisí obsah cholesterolu na celkovém množství tuku.

Na obrázku č. 33 a 34 je graficky znázorněn vztah mezi cholesterolem a tukem v analyzovaných vzorcích divokého prasete. Jednotlivé hodnoty cholesterolu nemají tendenci se vyskytovat společně s danými hodnotami tuku. Zjištěná korelace 0,1618 naznačuje velmi malou, až zanedbatelnou míru stupně asociace cholesterolu a tuku s velkou variabilitou mezi jednotlivými vzorky divokých prasat.



Obr. 33. Krabicový graf výsledků analýzy tuku a cholesterolu-průměr.



Obr. 34. Korelační graf výsledků analýzy tuku a cholesterolu

Stanovená průměrná hodnota cholesterolu u všech analyzovaných vzorků divokých prasat 67,384 mg/100 g v rozmezí 54,004 až 87,531 mg/100 g je převážně v souladu s výsledky zveřejněnými ve vědeckých publikacích a s údaji uvedenými v odborné literatuře. V databázích výživových hodnot se obsah cholesterolu v mase divokých prasat pohybuje v rozmezí průměrných hodnot 45,3 až 77 mg/100 g. Nejvyšší obsahy cholesterolu 77 mg/100 g jsou uvedeny v národní výživové databázi Francie [32]. Databáze Chile [31] publikovala hodnotu cholesterolu 62,6 mg/100 g. Databáze Německa [31] uvádí 64,3 mg/100 g a Rakouská národní databáze nutričních hodnot uvádí průměrnou hodnotu cholesterolu ve zvěřině divokých prasat 62,1 mg/100 g [31].

Námi zjištěné průměrné výsledky jsou nepatrně vyšší než obsahy cholesterolu, které uvádí Chizzolini a kol.[52] v Itálii s průměrnou hodnotou cholesterolu 56,9 mg/100 g a s vysokým obsahem tuku 4,75 %. Brodowski. [62] udává obsah cholesterolu ve vzorcích divokých prasat z Německa - 56,8 mg/100 g. Szcegielniak [51] analýzou vzorků zvěřiny divokých

prasat v Polsku zjistil průměrnou hodnotu cholesterolu 51,19 mg/100 g. Nejvyšší hodnotu cholesterolu 95,07 mg/100g s hodnotou obsahu tuku 1,33 % u divokých prasat publikoval Strazdina v Litvě [66]. Quaresma [49] z Portugalska publikoval zjištěný vyšší obsah tuku 4,25 %, s obsahem cholesterolu s nižší hodnotou 58,7 mg/100 g. Nízký obsah cholesterolu 44,94 mg/100 g masa u zvěřiny divokých prasat uvádí Ivanovič a kol. [65] v Srbsku.

Průměrný obsah cholesterolu v našich analyzovaných vzorcích jednotlivých částí divokých prasat je v souladu s rozsáhlou studií, kterou provedl Cygan-Szczegieliak [51] o vlivu věku a pohlaví na obsah cholesterolu u divokých prasat v Polsku. Potvrzuje trend rozdílů u každé skupiny divokých prasat a nárůstu obsahu cholesterolu u starších kusů, v rozmezí 51,110 mg/100g u selat až 80,680 mg/100 g cholesterolu u kňourů.

Podobnou variabilitu výsledků mezi obsahem tuku a obsahem cholesterolu v případě zvěřiny divokých prasat uvádějí autoři Skewes [53], Machioini a kol. [61], Dinh [50], Brodowski [62]. Značný rozsah hodnot cholesterolu a tuku ve zvěřině divokých prasat je zdůvodněn množstvím faktorů, které obsah cholesterolu ovlivňují a které je při výzkumu nutné zohlednit. Především jde o vliv druhu a dané tkáně, věk zvířete, pohlaví a oblast lovu.

Razmaitea [63], Dahlan [64], Sales [54], Dannenberger [XX] a Erkens [48] uvádí, že množství cholesterolu v mase divokých prasat bude pravděpodobně souviset především se samotným složením lipidové frakce a podílem nenasycených mastných kyselin a vitamínu E.

ZÁVĚR

Cholesterol je látka lipidové povahy, která je nezbytná pro lidský organismus. Je součástí obalů nervových vláken a výchozí sloučeninou při biosyntéze žlučových kyselin, steroidních hormonů a vitamínu D. Cholesterol je typickým produktem živočišného metabolismu a vyskytuje se proto v potravinách živočišného původu. Vysoká hladina cholesterolu v krvi (hypercholesterolemie), zvláště pak nadbytek LDL frakce, je považován za hlavní příčinu aterosklerózy.

Při izolaci lipidů přechází cholesterol vzhledem ke své nízké polaritě z matrice do lipidové frakce. Z analytického hlediska se tedy řadí mezi doprovodné látky lipidů. I když má jednu hydroxylovou skupinu, je dosti hydrofobní a ve vodě prakticky nerozpustný.

Prase divoké (*Sus scrofa*) je typickým evropským druhem vyskytující se na celém území Evropy. Stalo se významným prvkem a součástí krajiny. Prase divoké patří mezi tzv. konzumenty (predátory) a jeho specifickou vlastností je všežravost umožňující využívat široké spektrum potravy. V posledních letech došlo ke značnému nárůstu početních stavů černé zvěře, především v oblastech s intenzivním využíváním půdy pro pěstování obilnin, kukuřice, řepky a brambor. Prase divoké reaguje velmi citlivě na potravní zdroje a na jakékoliv zvýšení potravní nabídky reaguje zvýšeným rozmnožením a následně i spotřebou uvedených zemědělských plodin.

Cílem diplomové práce bylo stanovení obsahu cholesterolu ve vybraných vzorcích zvěřiny divokých prasat optimalizovanou instrumentální metodou pro stanovení cholesterolu v mase s využitím plynového chromatografu s plameno-ionizační detekcí (GC-FID).

K analýze bylo použito 24 reprezentativních vzorků zvěřiny divokých prasat různého věku (sele, lončák, kňour, bachyně) a uloveného různým způsobem ze školního lesního podniku Masarykův les Křtiny. K analýze byly použity vzorky hřbetu, kýty a plece.

Zjednodušený postup analýzy cholesterolu byl založen na saponifikaci vzorku s použitím metody vnitřního standardu. Stanovená hodnota cholesterolu u všech analyzovaných vzorků zvěřiny divokých prasat se pohybovala v rozmezí 54,004 až 87,531 mg/100 g, průměrná hodnota cholesterolu vzorků divokých prasat byla 67,384 mg/100 g. Průměr hodnot obsahu cholesterolu u vzorků selat divokých prasat byl 67,007 mg/100 g a u lončáků 62,658 mg/100g. Průměr hodnot cholesterolu u vzorků kňourů divokých prasat byl 68,498 mg/100g a u bachyni 61,862 mg/100g.

Nejmenší obsah cholesterolu vykazoval vzorek hřbetu kňoura divokého prasete s hodnotou 54,004 mg/100g a vzorek hřbetu selete divokého prasete s hodnotou cholesterolu 54,085 mg/100g. Nejvyšší obsah cholesterolu 87,531 mg/100 g vykazoval vzorek kýty bachyně divokého prasete a vzorek části plece kňoura divokého prasete s hodnotou cholesterolu 82,952 mg/100 g.

K faktorům ovlivňujících rozsah hodnot cholesterolu ve zvěřině divokých prasat patří vliv druhu a dané tkáně, věk zvířete, pohlaví a oblast lovu. Přesto stanovené obsahy cholesterolu jsou převážně v souladu s údaji uvedenými v odborné literatuře a databázích jednotlivých zemí.

Při porovnání výsledků obsahů cholesterolu a tuku vykazovaly hodnoty poměrně velkou variabilitu mezi jednotlivými vzorky. Rozdíl byl jak u všech věkových kategorií divokých prasat, tak i u jednotlivých partií. Hodnota korelace mezi těmito parametry (0,1618) potvrdila velmi malou míru stupně asociace cholesterolu a tuku s velkou variabilitou mezi jednotlivými vzorky divokých prasat. To potvrzuje i předpoklad, že množství cholesterolu u divokých prasat pravděpodobně souvisí nejen s obsahem tuku, ale především se samotným složením lipidové frakce a podílem nenasycených mastných kyselin a vitamínu E.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HESPELER, B. *Černá zvěř: způsob života, omezování škod, posuzování, způsoby lovu, využití zvěřiny*. Praha: Grada, 2007. 127 s. ISBN 978-80-247-1931-3
- [2] ČERVENÝ, J., et al. *Myslivost: Ottova encyklopedie*. Vyd. 2. Praha: Ottovo nakladatelství, 2010. 591 s. ISBN 978-80-7360-895-8
- [3] DRMOTA, J. *Lov zvěře v našich honitbách*. Praha: Grada, 2011. 357 s. ISBN 978-80-247-3644-0
- [4] WOLF, R. *Rukověť chovu a lovu černé zvěře*. Písek: Matice lesnická, 2000. 154 s. ISBN 80-86271-03-X
- [5] HESPELER, B. *Mladý nebo starý?: určování věku spárkaté zvěře*. Praha : Grada, 2007. 130 s. ISBN 978-80-247-1930-6
- [6] KŘIVÁNEK, J. *Lovecká ohlednutí*. Praha: Knižní klub, 2013. 221 s. ISBN 978-80-242-3646
- [7] KVAPIL, M., et al. *Myslivost v Olomouckém kraji*. Olomouc: Olomoucký kraj, 2012. 56 s. ISBN 978-80-87535-58-5
- [8] MARADA, P., et al. *Zvyšování přírodní hodnoty polních honiteb: analýza polních honiteb včetně zdravotního stavu zvěře, postupy při obnově a péči o krajinné prvky, dotace na realizaci jednotlivých opatření*. Praha: Grada, 2011. 151 s. ISBN 978-80-247-3885-7
- [9] DURANTEK, P., et al. *Myslivost : [encyklopedie lovu, zbraní, zvěře a loveckých psů]* Vyd. 2. Praha: Fragment, 2013. 285 s. ISBN 978-80-253-1970-3
- [10] FOREJTEK, P., et al. *Správné ošetření a zdravotní posouzení ulovené zvěře: příručka pro mysliveckou praxi*. Brno: Středoevropský institut ekologie zvěře: Institut ekologie zvěře VFU Brno. 2009. 168 s. ISBN 978-80-7305-055-9
- [11] VODŇANSKÝ, M., et al. *Hygiena zvěřiny: příručka pro mysliveckou praxi*. Vyd. 2. Brno: Středoevropský institut ekologie zvěře: Institut ekologie zvěře VFU, 2009. 176 s. ISBN 978-80-7305-073-3
- [12] MOCKOVÁ, K. *Černá zvěř - stále aktuální problém: odborný seminář*. Brno: Středoevropský institut ekologie zvěře, 2011. 163 s. ISBN 978-80-260-1001-2

- [13] MCNAMARA, J. R., WARNICK, G. R., COOPER, G. R. *A brief history of lipid and lipoprotein measurements and their contribution to clinical chemistry*. Clinica Chimica Acta. Volume 369, 158-167 (2006)
- [14] *The 1964 Nobel Prize for the discovery of the biosynthesis of cholesterol*. Acta Paediatrica. Volume 98, 1223–1227 (2009)
- [15] HOZA, I., et al. *Potravinářská biochemie 1*. Vyd. 2. UTB Zlín, 2011. 167 s. ISBN 978-80-7318-936-5
- [16] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin 1*. Vyd. 3. Tábor: OSSIS, 2009. 602 s. ISBN 978-80-86659-15-2
- [17] BELITZ, D., et al. *Food Chemistry*. Vyd. 4. Springer, 2009. 1070 s. ISBN 978-35-4069-933-0. Dostupné na WWW:
http://books.google.cz/books?id=xteiARU46SQC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- [18] GARRET, R. H., GRISHAM, CH. M. *Biochemistry*. Vyd. 4. Boston: Cengage Learning, 2010. 1059 s. ISBN 978-04-9510-935-8. Dostupné na WWW:
http://books.google.cz/books?id=iGPsen3fSOIC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- [19] VANCE, E. D., VANCE, E. J. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Vyd. 5. Elsevier Science, 2008. 624 s. ISBN 978-0-444-53219-0. Dostupné na WWW:
http://books.google.cz/books?id=LZprTsjcvIMC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- [20] Obrázek. *Schéma plazmatické membrány*. [online]. [2015-02-20]. Dostupné na WWW: <http://world-of-angie.mypage.cz/menu/vitej/biochemie>
- [21] VELÍŠEK, J., CEJPEK, K. *Biosynthesis of Food Components*. Tábor: OSSIS, 2008. ISBN 978-80-86659-12-1.
- [22] MOURITSEN, G. O., ZUCKERMANN, J. M. *What's so special about cholesterol?* Lipids. Volume 39, 1101-1113 (2004)
- [23] T. KOMPRDA, T. *Cholesterol a jeho oxidační produkty v potravinách*. Ústav technologie potravin, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Veterinářství č. 56, 121-125 (2006)
- [24] MURRAY, R. K. *Harperova Biochemie*. Vyd. 2. české (dotisk). H+H Vyšehradská, s. r. o., 2010. 872s. ISBN 80-7319-003-6

- [25] CHRISTE, W. W. *The Lipid Library*. [online]. [2011-10-14]. Dostupné na WWW: <http://lipidlibrary.aocs.org/index.html>
- [26] *Databáze složení potravin ČR, verze 2.11*. Centrum pro databázi složení potravin Ústavu zemědělské ekonomiky a informací a Výzkumného ústavu potravinářského Praha, v. v. i. [online]. [2015-09-01]. Dostupné na WWW: <http://www.czfcdb.cz/>
- [27] *Databáze nutričního složení potravin SZÚ*. Státní zdravotní ústav. Centrum hygieny potravinových řetězců v Brně. [online]. [2015-09-01]. Dostupné na WWW: <http://www.chpr.szu.cz/>
- [28] *Potravinová banka dat Slovenské republiky*. [online]. [2011-09-15]. Dostupné na WWW: <http://www.pbd-online.sk>
- [29] *Cholesterol v potravinách*. Výzkumný ústav potravinářský Slovenské republiky. [online]. [2015-09-01]. Dostupné na WWW: <http://www.vup.sk/index.php?start&mainID=1&navID=41>
- [30] *Národní nutriční databáze potravin Spojených států amerických*. [online]. [2015-09-01]. Dostupné na WWW: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>
- [31] *International Network of Food Data Systems (FAO/INFOODS)*. [online]. [2015-09-01]. Dostupné na WWW: <http://www.fao.org/infoods/infoods/tables-and-databases/faoinfoods-databases/en/>
- [32] *EuroFIR Food composition databases*. [online]. [2015-09-01]. Dostupné na WWW: http://www.eurofir.org/?page_id=96
- [33] ŠPINAR, J., VÍTOVEC, J. *Jak dobře žít s nemocným srdcem*. Praha: Grada, 2007. 254 s. ISBN 978-80-247-1822-4
- [34] BREWER, S., SIPLE, M. *Low-Cholesterol Cookbook For Dummies*. John Wiley & Sons, 2011. 388 s. ISBN 978-07-645-7160-2
- [35] NATOW, A. *The cholesterol counter*. 7th edition published by pocket books, 2007. 800 s. ISBN 978-14-165-0985-1
- [36] OTLES, S. *Handbook of Food Analysis Instruments*. New York: CRC Press, 2008. ISBN 978-1-4200-4566-6
- [37] MIGUELHERRERO, H., MENDIOLA, J. *Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications*. Journal of Chromatography A. Volume 1217, 2495-2511 (2010)

- [38] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. VŠCHT Praha, 2006. 258 s. ISBN 80-7080-586-2
- [39] Obrázek *Schéma stanovení celkového cholesterolu*. [online]. [2011-10-15]. Dostupné na WWW: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Stanoven%C3%AD_cholesterolu.png#fileliks
- [40] ŠKOP, V. *Možnosti enzymové úpravy hladiny cholesterolu v potravinách*. VŠCH Praha. Biopropect 2, 29–33 (2008)
- [41] BORKOVCOVÁ, I., et al. *Možnost stanovení cholesterolu, stigmasterolu a sitosterolu v rostlinných a živočišných tucích metodou hplc*. Acta fytotechnica et zootechnika Mimoriadne číslo. 64-68 (2009). Dostupné také z WWW: www.fem.uniag.sk/acta/download.php?id=546
- [42] STROHER, G., RODRIGUES, A., et al. *Comparative Analysis and Validation Methodologies of GC and HPLC for Analysis of Cholesterol in Meat Products*. American Journal of Analytical Chemistry, Volume 3, 306-311 (2012)
- [43] POOLE, C. *Gas Chromatography*, Oxford: Elsevier, 2012. ISBN 978-0-12-385540-4.
- [44] *Školní lesní podnik Masarykův les Křtiny Mendelovy univerzity v Brně* [online]. [2015-09-01]. Dostupné na WWW: <http://www.slpkrtiny.cz/>
- [45] ČÍŽKOVÁ, H., PROKORÁTOVÁ, V., VOLDŘICH, M. *Determination of egg content in pasta*. Czech Journal of Food Sciences, Volume 22, 197-203 (2004)
- [46] ČÍŽKOVÁ, H., VOLDŘICH, M. *Determination of egg yolk content in egg liqueurs*. Czech Journal of Food Sciences, Volume 22, 9-16 (2004)
- [47] Fotografie: *Plynový chromatograf YL 6100GC s FID detektorem*. VŠCHT Praha.
- [48] HWANG, A., et al. *A simplified method for the quantification of total cholesterol in lipids using gas chromatography*. Journal of Food Composition and Analysis. Volume 2, 169–178 (2003)
- [49] QUARESMA, M., et al. *Nutritional evaluation of the lipid fraction of feral wild boar (Sus scrofa scrofa) meat*. Meat Science, Volume 89, No 4, 457–461 (2011)
- [50] DINH, T., BLANTON, J., et al. *A Simplified Method for Cholesterol Determination in Meat and Meat Products*. Journal of Food Composition and Analysis. Volume 21. No. 4, 2008, 306-314 (2008)

- [51] CYGAN-SZCZEGIELNIAK, D., JANICKI, B. *Remove from marked records. Influence of age and sex on the cholesterol content in roe deer's meat.* Medycyna Wetnaryjna. Volume 65, 179-180 (2009)
- [52] CHIZZOLINI, R. *Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meat and meat products - Antioxidants and Atherosclerotic.* Food Science and Technology. Volume 10, 119-128 (1999)
- [53] O. SKEWES, et al. *Carcass and meat quality traits of wild boar (*Sus scrofa* s. L.) with $2n = 36$ karyotype compared to those of phenotypically similar crossbreeds ($2n = 37$ and $2n = 38$) raised under the same farming conditions 2: Fatty acid profile and cholesterol.* Meat Science, Volume 83, No. 2, 195–200 (2009)
- [54] SALES, J., KOTRBA, R. *Meat from wild boar (*Sus scrofa* L.): A review Review.* Article Meat Science. Volume 94, 187-201 (2013)
- [55] STROHER, G., RODRIGUES, A., et al. *Comparative Analysis and Validation Methodologies of GC and HPLC for Analysis of Cholesterol in Meat Products.* American Journal of Analytical Chemistry, Volume 3, 306-311 (2012)
- [56] THOMPSON, T. *Determination of Total Cholesterol in Meat and Poultry by Gas Chromatography: Single-Laboratory Validation.* Journal of AOAC International. Volume 95, 472-488 (2012)
- [57] RAZMAITĖ, V. *Pork Fat Composition of Male Hybrids from Lithuanian Indigenous Wattle Pigs and Wild Boar Intercross.* Food Science & Technology International. Volume 3, 251-257 (2008)
- [58] NIVNICKÁ, E. *Porovnanie akostných zmien zveriny divokých prasiat.* Zlín, 2011. Diplomová práce. UTB ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [59] DANNENBERGER, D., G. NUERNBERG, K. NUERNBERG a E. HAGEMANN. *The effects of gender, age and region on macro- and micronutrient contents and fatty acid profiles in the muscles of roe deer and wild boar in Mecklenburg-Western Pomerania (Germany).* Meat Science. Volume 1, 39-46 (2001)
- [60] TROY, D., BUCKLEY, J., et al. *Game and venison – meat for the modern consumer.* 52nd International Congress of Meat Science and Technology. Meat Science, Volume 74, No.1, 197–208 (2006)

- [61] MARCHIORI A. *Qualify of wild boar meat and commercial pork*. Scientia Agricola. Volume 60, 1-5 (2013)
- [62] BRODOWSKI, G. *Untersuchungen zur Qualität von Wildbret unter Berücksichtigung von Körperentwicklung, Wildverhalten, Schußgüte und Jagdart - eine Studie a Dam-, Reh-, Schwarz- und Rotwild aus des östlichen Region Sachsen-Anhalts Inaugural-Dissertation*. Berlin: Freie Universität, 1997. 128 s.
- [63] RAZMAITĚ, V. *Comparison of fatty acid composition in different pig tissues*. Veterinarija ir Zootechnika. Volume 8, 77-82 (2012)
- [64] DAHLAN, I., et al. *Fatty acid profiles and cholesterol composition of venison fr farmed deer*. Journal of animal and veterinary advances. Volume 6, No. 5, 650-657 (2007)
- [65] IVANOVIĆ, D., et al. *Meat quality characteristics of DurocxYorkshire, Durocx orkshirexwild boar and wild boar*. Hemijska industrija, Volume 6, 999-1006 (2013)
- [66] STRAZDINA, V. *Fatty Acids Composition of Elk, Deer, Roe Deer and Wild Board Meat Hunted in Latvia*. Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology. Volume 69, 840-843 (2010)

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ELSD	Detekce pomocí detektoru rozptýleného světla
EUROFIR	European Food Information Resource
GC-FID	Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HDL	Lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoproteins)
HMG-CoA reductáza	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductáza
LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins)
UV/PDA	Detekce pomocí detektoru s diodovým polem
VHDL	Lipoprotein o velmi nízké hustotě

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Prase divoké (<i>Sus scrofa</i>).....	13
Obr. 2. Prase divoké-bachyně se selaty.....	14
Obr. 3. Popis těla: prase divoké.....	15
Obr. 4. Procentuální podíl odstřelu jednotlivých kategorií černé zvěře.....	18
Obr. 5. Cholesterol.....	20
Obr. 6. Schéma plasmatické membrány.....	21
Obr. 7. Biosyntéza cholesterolu z lanosterolu.....	23
Obr. 8. Oxidační produkty cholesterolu.....	30
Obr. 9. Enzymové stanovení cholesterolu.....	32
Obr. 10. Schéma zapojení plynové chromatografie.....	35
Obr. 11. Schéma FID.....	36
Obr. 12. Retenční parametry.....	37
Obr. 13. Oblast školního lesního podniku Masarykův les Křtiny.....	41
Obr. 14. Plynový chromatograf YL 6100GC s FID detektorem.....	48
Obr. 15. Box plot naměřených pH hodnot vzorků divokých prasat.....	52
Obr. 16. Průměr výsledku analýzy tuku u jednotlivých druhů zvěřiny divokých prasat.....	53
Obr. 17. Chromatogram analýzy cholesterolu z hřbetu selete divokého prasete.....	54
Obr. 18. Histogram divoké prase : Sele (hřbet) - výsledky analýzy cholesterolu.....	56
Obr. 19. P-graf divoké prase : Sele (hřbet) - výsledky analýzy cholesterolu.....	56
Obr. 20. Box- plot divoké prase : Sele (hřbet) - výsledky analýzy cholesterolu.....	57

Obr. 21. Histogram divoké prase : Lončák (hřbet) - výsledky analýzy cholesterolu.....	60
Obr. 22. P- graf divoké prase : Lončák (hřbet) - výsledky analýzy cholesterolu.....	60
Obr. 23. Box- plot divoké prase : Lončák (hřbet) - výsledky analýzy cholesterolu.....	61
Obr. 24. P- graf divoké prase : Kňour (hřbet) - výsledky analýzy cholesterolu.....	63
Obr. 25. Box- plot divoké prase : Kňour (hřbet) - výsledky analýzy cholesterolu.....	64
Obr. 26. Chromatogram z analýzy standardu α -cholestanu a cholesterolu.....	66
Divoké prase : Kňour (plec), Vzorek č. 22	
Obr. 27. P- graf divoké prase : Bachyně (hřbet) - výsledky analýzy cholesterolu.....	68
Obr. 28. Box-plot divoké prase : Bachyně (hřbet) - výsledky analýzy cholesterolu.....	68
Obr.29. Box - plot. Souhrn výsledků analýzy cholesterolu - celkový průměr.....	71
Obr. 30. Q-Qplot graf výsledků analýzy cholesterolu - celkový průměr.....	72
Obr. 31. Průměrné hodnoty obsahu cholesterolu.....	73
Obr. 32. Průměrné hodnoty obsahu cholesterolu u jednotlivých partií.....	73
Obr. 33. Bodový graf výsledků analýzy tuku a cholesterolu.....	74
Obr. 34. Krabicový graf výsledků analýzy tuku a cholesterolu - průměr.....	75

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Obsah cholesterolu v mase zvěřiny.....	28
Tab. 2. Doporučené hodnoty krevních lipidů.....	29
Tab. 3. Vzorky selat určené k analýze.....	42
Tab. 4. Vzorky lončáků určené k analýze.....	43
Tab. 5. Vzorky kňourů určené k analýze.....	43
Tab. 6. Vzorky bachynů určené k analýze.....	43
Tab. 7. Hodnoty pH u jednotlivých vzorků divokých prasat.....	51
Tab. 8. Divoké prase: Sele (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.....	55
Tab. 9. Divoké prase: Sele (hřbet)-obsah tuku a cholesterolu.....	58
Tab. 10. Divoké prase: Lončák (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.....	59
Tab. 11. Divoké prase: Lončák (hřbet)-obsah tuku a cholesterolu.....	62
Tab. 12. Divoké prase: Kňour (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.....	63
Tab. 13. Divoké prase: Kňour (hřbet) - obsah tuku a cholesterolu.....	64
Tab. 14. Divoké prase: Kňour (kýta)- výsledky analýzy cholesterolu.....	65
Tab. 15. Divoké prase: Kňour (plec)-výsledky analýzy cholesterolu.....	65
Tab. 16. Divoké prase: Bachyně (hřbet)-výsledky analýzy cholesterolu.....	67
Tab. 17. Divoké prase: Bachyně (hřbet)- obsah tuku a cholesterolu.....	67
Tab. 18. Divoké prase: Bachyně (kýta)-výsledky analýzy.....	69
Tab. 19. Divoké prase: Bachyně (plec) - výsledky analýzy.....	69
Tab. 20. Divoké prase : Sele (hřbet) - lyofilizované vzorky.....	70