

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Analýza mastných kyselin a tokoferolů v olejích pomocí GC-MS

Bc. Michaela Kamenická

Diplomová práce

2020

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Kamenická**  
Osobní číslo: **C18437**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Analýza mastných kyselin a tokoferolů v olejích pomocí GC-MS**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování

1. V teoretické části popište analytickou techniku GC-MS a zaměřte se na možnosti jejího využití k analýze mastných kyselin a tokoferolů. Popište tyto dvě skupiny látek a vypracujte rešerši na jejich stanovení v rostlinných olejích.
2. V experimentální části proveďte vlastní analýzu mastných kyselin a vybraných tokoferolů. Na základě prostudované literatury navrhnete nejvhodnější postupy při stanovení obou analyzovaných skupin látek. Optimalizujte konkrétní pracovní postupy, zahrnující přípravu vzorku, derivatizaci i chromatografickou separaci.
3. Získané poznatky a dosažené výsledky komentujte, diskutujte o nich a porovnejte je s výsledky publikovanými v odborné literatuře.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Blanka Švecová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2020**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**



L.S.



---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2020

Michaela Kamenická

Poděkování:

Mé poděkování patří Ing. Blance Švecové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za odborné vedení, cenné rady, ochotu a trpělivost. Dále také děkuji mé rodině, Martinovi Dolanskému a blízkým za podporu během mého studia.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu mastných kyselin a tokoferolů v rostlinných olejích pomocí analytické techniky GC-MS. V teoretické části jsou charakterizovány tyto dvě skupiny látek spolu s principy plynové chromatografie, hmotnostní spektrometrie a jejich spojení. Rovněž je vypracována rešerše týkající se stanovení mastných kyselin a tokoferolů v olejích. V experimentální části práce bylo provedeno stanovení mastných kyselin a tokoferolů v reálných vzorcích rostlinných olejů. Tyto látky byly stanoveny po jejich převedení na methylestery (mastné kyseliny) a trimethylsilyl deriváty (tokoferoly). K chromatografické analýze byly použity optimalizované podmínky.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Mastné kyseliny, tokoferoly, rostlinné oleje, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

## **TITLE**

Analysis of fatty acids and tocopherols in oils using GC-MS

## **ANOTATION**

This thesis is focused on the analysis of fatty acids and tocopherols in vegetable oils using the analytical technique GC-MS. These two groups of compounds together with the principles of gas chromatography, mass spectrometry and their connection are characterized in the theoretical part. The literary research regarding the determination of fatty acids and tocopherols in oils is performed, too. In the experimental part of the thesis, the determination of fatty acids and tocopherols in real samples of vegetable oil was performed. These compounds were determined after their conversion to methylesters (fatty acids) and trimethylsilyl derivatives (tocopherols). The optimized conditions were used for the chromatographic analysis.

## **KEYWORDS**

Fatty acids; Tocopherols; Vegetable oils; Gas chromatography; Mass spectrometry

# Obsah

Seznam ilustrací a tabulek .....	9
Seznam zkratek .....	11
Úvod.....	12
1 Teoretická část .....	13
1.1 Lipidy .....	13
1.2 Mastné kyseliny .....	13
1.2.1 Klasifikace mastných kyselin .....	14
1.2.2 Esenciální mastné kyseliny .....	17
1.2.3 Trans nenasycené mastné kyseliny .....	17
1.2.4 Úloha mastných kyselin ve výživě člověka .....	17
1.3 Doprovodné látky lipidů .....	18
1.3.1 Vitamín E .....	19
1.4 Plynová chromatografie .....	20
1.4.1 Instrumentace v plynové chromatografii .....	20
1.5 Hmotnostní spektrometrie .....	23
1.5.1 Instrumentace v hmotnostní spektrometrii .....	23
1.6 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie .....	25
1.7 Analýza mastných kyselin plynovou chromatografií .....	26
1.7.1 Příklady stanovení mastných kyselin v potravinách .....	28
1.8 Analýza tokoferolů plynovou chromatografií .....	30
1.8.1 Příklady stanovení tokoferolů v potravinách .....	32
2 Experimentální část .....	34
2.1 Přístroje a zařízení .....	34
2.1.1 Plynový chromatograf .....	34
2.1.2 Další zařízení .....	34

2.2	Chemikálie a standardní látky.....	34
2.2.1	Chemikálie.....	34
2.2.2	Standardní látky.....	35
2.3	Vzorky.....	35
2.4	Pracovní postupy.....	37
2.4.1	Chromatografická analýza methylesterů mastných kyselin.....	37
2.4.2	Chromatografická analýza tokoferolů.....	38
3	Výsledky a diskuze.....	41
3.1	Chromatografická analýza mastných kyselin.....	41
3.1.1	Optimalizace chromatografické metody.....	41
3.1.2	Chromatografické charakteristiky methylesterů mastných kyselin.....	46
3.1.3	Obsah mastných kyselin ve vzorcích.....	48
3.2	Chromatografická analýza tokoferolů.....	56
3.2.1	Optimalizace derivatizace.....	56
3.2.2	Chromatografické podmínky pro analýzu tokoferolů.....	57
3.2.3	Obsah tokoferolů ve vzorcích.....	58
4	Závěr.....	62
	Seznam použité literatury.....	63
	Přílohy.....	71



## Seznam ilustrací a tabulek

Obr. 1: Struktura kyseliny palmitové.....	14
Obr. 2: Struktura kyseliny olejové.....	15
Obr. 3: Struktura kyseliny linolové .....	16
Obr. 4: Struktura kyseliny elaidové .....	17
Obr. 5: Strukturní vzorec tokoferolů a tokotrienolů .....	19
Obr. 6: Schéma plynového chromatografu .....	21
Obr. 7: Typy kapilárních kolon.....	22
Obr. 8: Struktura polysiloxanu a polyethylenglykolu.....	22
Obr. 9: Schéma hmotnostního spektrometru .....	23
Obr. 10: Uspořádání GC-MS .....	25
Obr. 11: Separace methylesterů při optimalizaci teplotního programu .....	42
Obr. 12: Separace methylesterů při optimalizaci průtoku .....	43
Obr. 13: Separace methylesterů při optimalizaci dávkování .....	44
Obr. 14: Separace methylesterů při použití optimalizovaných podmínek.....	45
Obr. 15: Typický chromatogram olivového oleje.....	48
Obr. 16: Profil mastných kyselin v olivovém oleji .....	49
Obr. 17: Diskriminační analýza olivových olejů .....	51
Obr. 18: Profil mastných kyselin v řepkovém oleji .....	52
Obr. 19: Profil mastných kyselin ve slunečnicovém oleji .....	53
Obr. 20: Profil mastných kyselin ve lněném oleji .....	54
Obr. 21: Profil mastných kyselin v kokosovém oleji .....	55
Obr. 22: Srovnání derivatizačních činidel a podmínek derivatizace pro $\delta$ -tokoferol .....	56
Obr. 23: Separace trimethylsilyl derivátů tokoferolů .....	57
Obr. 24: Chromatogram řepkového oleje – analýza tokoferolů .....	59

Tab. 1: Přehled nasycených mastných kyselin .....	14
Tab. 2: Přehled mononenasycených mastných kyselin .....	15
Tab. 3: Přehled polynenasycených mastných kyselin .....	16
Tab. 4: Seznam vzorků olejů .....	36
Tab. 5: Podmínky chromatografické analýzy methylesterů mastných kyselin .....	38
Tab. 6: Podmínky chromatografické analýzy trimethylsilyl derivátů tokoferolů.....	40
Tab. 7: Teplotní gradienty při optimalizaci teplotního programu .....	42
Tab. 8: Charakteristiky methylesterů mastných kyselin ve standardní směsi .....	47
Tab. 9: Obsah majoritních mastných kyselin ve vzorcích olivového oleje .....	50
Tab. 10: Rovnice regrese s koeficientem determinace, limitem detekce a limitem stanovitelnosti pro jednotlivé tokoferoly .....	58
Tab. 11: Obsah tokoferolů ve vzorcích olejů.....	60

## Seznam zkratek

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric-Pressure Chemical Ionization)
BHT	bytulovalý hydroxytoluen (Butylated HydroxyToluene)
BSA	N, O-bis(trimethylsilyl)acetamid
BSTFA	bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CI	chemická ionizace (Chemical Ionization)
ECD	detektor elektronového záchytu (Electron Capture Detector)
EI	elektronová ionizace (Electron Ionization)
ESI	ionizace elektrosprejem (ElectroSpray Ionization)
FAMES	methylestery mastných kyselin (Fatty Acid Methyl Esters)
FID	plamenově ionizační detektor (Flame Ionization Detector)
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier-Transform InfraRed spectroscopy)
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
HDL	vysokodenzitní lipoprotein (High Density Lipoproteins)
HFBCF	heptafluorobutylformiát
HMDS	hexamethyldisilazan (HexaMethylDiSilazane)
LDL	nízkodenzitní lipoprotein (Low Density Lipoproteins)
MCT	masné kyseliny s krátkým řetězcem (Medium Chain Triglycerids)
MK	masná kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MSTFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
MUFA	mononenasyčené masné kyseliny (MonoUnsaturated Fatty Acids)
NMR	nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance)
PCA	analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis)
PEG	polyethylenglykol (PolyEthylene Glycol)
PUFA	polynenasycené masné kyseliny (PolyUnaturated Fatty Acids)
RF	odezvový faktor (Response Factor)
SFA	nasyčené masné kyseliny (Saturated Fatty Acids)
SFE	superkritická fluidní extrakce (Supercritical Fluid Extraction)
SPE	extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction)
TAG	triacylglyceroly (Triacylglycerols)
TCD	tepelně vodivostní detektor (Thermal Conductivity Detector)
TFA	trans nenasycené masné kyseliny (Trans Fatty Acids)
TMCS	trimethylchlorsilan
TMS	trimethylsilyl ether
TSI	ionizace termosprejem (ThermoSpray Ionization)
UFA	nenasyčené masné kyseliny (Unsaturated Fatty Acids)

## Úvod

Rostlinné oleje jsou důležitou složkou potravy. Skládají se především z triacylglycerolů, obsahují tedy řadu různých mastných kyselin, jejichž profil se liší na základě druhu oleje. Mastné kyseliny se dělí na nasycené, mononenasycené a polynenasycené. Člověk by měl přijímat především mononenasycené a polynenasycené mastné kyseliny, které jsou právě ve velkém množství přítomny ve většině rostlinných olejů.

Olivový olej, přezdíváný také jako tekuté zlato, je vzácnou komoditou. Je vyhledávaný nejen ke konzumaci, ale také ve farmacii, kosmetickém průmyslu a léčitelství. Kromě svých charakteristických sensorických vlastností má příznivé zdravotní účinky na lidský organismus, což je spojováno s vysokým obsahem mononenasycených mastných kyselin. Uplatňuje se v prevenci chronických onemocnění, především kardiovaskulárního onemocnění. Olivový olej je nedílnou součástí středomořské stravy, jeho oblíbenost však sahá daleko za oblast Středomoří. Dle poměru mastných kyselin lze usuzovat na původ olivového oleje, protože poměr se mění v závislosti na zemi původu a klimatických podmínkách. Profil mastných kyselin lze stanovit pomocí různých analytických technik, nejčastěji je však používána plynová chromatografie po převedení mastných kyselin na methylestery.

V rostlinných olejích je také významný obsah lipofilních vitamínů, především vitamínu E, který je známý pro své antioxidační účinky. Vitamín E v olejích, resp. tokoferoly a tokotrienoly, lze po zmýdelnění a převedení na trimethylsilyl deriváty rovněž stanovit pomocí plynové chromatografie. Stanovení mastných kyselin a tokoferolů v rostlinných olejích je cílem této práce. K experimentu bylo vybráno dvacet olivových olejů, dále řepkový, slunečnicový, lněný a kokosový olej.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Lipidy

Lipidy jsou definovány na základě rozpustných vlastností, nikoli primárně dle jejich chemické struktury. Představují velmi různorodou skupinu látek, jejíž společnou fyzikálně-chemickou vlastností je hydrofobnost neboli nerozpustnost ve vodě a rozpustnost ve vodných rozpouštědlech. Za lipidy se považují mastné kyseliny a jejich deriváty, které jsou odvozené biochemicky a funkčně. V potravinářství se rozeznávají tuky, oleje, mastné kyseliny, vosky a lecitin, jelikož tyto složky mají průmyslový význam [1, 2].

Podle chemického složení se lipidy dělí na homolipidy, heterolipidy a komplexní lipidy. Homolipidy jsou sloučeniny mastných kyselin a alkoholů a dále se dělí dle struktury vázaného alkoholu. Heterolipidy obsahují ještě další kovalentně vázané sloučeniny, např. kyselinu fosforečnou ve fosfolipidech. V komplexních lipidech se nacházejí homolipidy i heterolipidy, ale také složky vázané různými fyzikálními vazbami, např. vodíkovými.

Podle struktury se lipidy dělí do osmi kategorií:

- mastné kyseliny
- glycerolipidy
- glycerofosfolipidy
- sfingolipidy
- steroidní lipidy
- prenoidní lipidy
- sacharolipidy
- polyketidy [1].

## 1.2 Mastné kyseliny

Dle názvosloví organické chemie se mastné kyseliny (MK) označují jako karboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem. Tato definice však úplně nekoriguje s tím, jaké MK jsou vázány v lipidech, jelikož existují MK, které definici splňují a v lipidech vázány nejsou (kyselina octová), a naopak některé MK, které jsou v lipidech vázány tuto definici nesplňují (alicyklické a aromatické). Struktura MK se běžně označuje systematickým názvem odvozeným od odpovídajícího uhlovodíku, dále také triviálním názvem nebo zkrácenými zápisy ve formě N:M, kde N je počet uhlíků v molekule a M počet dvojných vazeb [1, 3].

### 1.2.1 Klasifikace mastných kyselin

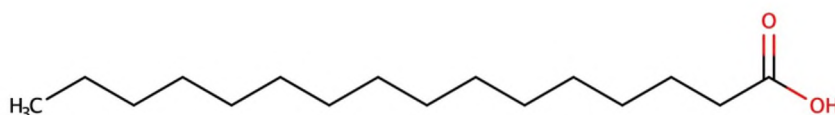
Mastné kyseliny lze rozdělit podle typu vazby v uhlovodíkovém řetězci na nasycené a nenasycené. Nenasycené mastné kyseliny se dále dělí na mononenasycené a polynenasycené MK [1, 4].

**Nasycené mastné kyseliny (SFA)** mají veškeré uhlíky spojené jednoduchou vazbou. Běžně obsahují 4–38 atomů uhlíku (nejčastěji o sudém počtu), a zpravidla mají lineární, nerozvětvený řetězec. Ve většině lipidů tvoří 10–40 % z celkových mastných kyselin. Nasycené MK si lidský organismus dokáže sám syntetizovat [1, 5]. Nasycené MK vyskytující se v lipidech jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Přehled nasycených mastných kyselin [1]

systematický název	počet atomů uhlíku	triviální název	systematický název	počet atomů uhlíku	triviální název
butanová	4	máselná	eikosanová	20	arachidonová
hexanová	6	kapronová	dokosanová	22	behenová
oktanová	8	kaprylová	tetrakosanová	24	lignocerová
dekanová	10	kaprinová	hexakosanová	26	cerotová
dodekanová	12	laurová	oktakosanová	28	montanová
tetradekanová	14	myristová	triakontanová	30	melisová
hexadekanová	16	palmitová	dotriakontanová	32	lakcerová
oktadekanová	18	stearová	tetratriakontanová	34	gheddová

V lipidech potravin převládá obsah kyseliny myristové, palmitové a stearové [1, 3]. Struktura kyseliny palmitové, resp. hexadekanové, je zobrazena na Obr. 1.



Obr. 1: Struktura kyseliny palmitové

**Nenasycené mastné kyseliny (UFA)** obsahují jednu nebo více násobných vazeb – dvojných nebo trojných. Dle počtu dvojných vazeb se nenasycené mastné kyseliny dělí na mononenasycené a polynenasycené [1, 6].

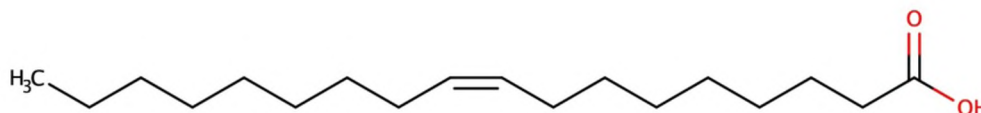
Jako **mononenasycené mastné kyseliny (MUFA)** se označují mastné kyseliny obsahující pouze jednu dvojnou vazbu v řetězci. Navzájem se liší počtem atomů uhlíku,

polohou dvojn  vazby a prostorovou konfigurací [1, 4]. Vybran  mononenasyacen  mastn  kyseliny jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Přehled mononenasyacen ch mastných kyselin [1]

systematick� n�zev	po�et atom� uhl�ku	poloha dvojn� vazby	izomerie	trivi�ln� n�zev
decenov�	10	4	<i>cis</i>	obtusilov�
		9	<i>cis</i>	kaprolejov�
dodecenov�	12	4	<i>cis</i>	linderov�
		9	<i>cis</i>	laurolejov�
tetradecenov�	14	9	<i>cis</i>	myristolejov�
hexadecenov�	16	9	<i>cis</i>	palmitolejov�
			<i>trans</i>	palmitoelaidov�
oktadecenov�	18	6	<i>cis</i>	petroselinov�
			<i>trans</i>	petroselaidov�
		9	<i>cis</i>	olejov�
			<i>trans</i>	elaidov�
eikosenov�	20	9	<i>cis</i>	gadolejov�
		11	<i>cis</i>	gondoov�
dokosenov�	22	13	<i>cis</i>	erukov�
			<i>trans</i>	brassidov�
tetrakosenov�	24	15	<i>cis</i>	nervonov�
hexakosenov�	26	17	<i>cis</i>	ximenov�
triakontenov�	30	21	<i>cis</i>	limekvov�

Mezi nejzastoupenj  MUFAs v potravinách pat  kyselina olejov , jej z struktura je zobrazena na Obr. 2 [1].



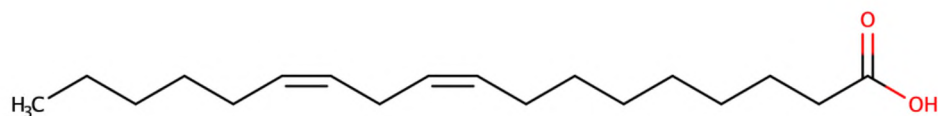
Obr. 2: Struktura kyseliny olejov 

Jako **polynenasycené mastné kyseliny** (PUFA) se označují mastné kyseliny, které obsahují v molekule více než jednu dvojnou vazbu, resp. dvě až šest [4, 6, 7]. Vybrané polynenasycené mastné kyseliny jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Přehled polynenasycených mastných kyselin [1, 7]

skupina PUFA	systematický název	počet atomů uhlíku	poloha dvojných vazeb	isomerie	triviální název
dienové	oktadekadienová	18	9,12	<i>cis, cis</i>	linolová (LA)
trienové	oktadekatrienová	18	9,12,15	<i>all-cis</i>	$\alpha$ -linolenová (ALA)
	eikosatrienová	20	5,8,11	<i>all-cis</i>	Meadsova
tetraenové	oktadekatetraenová	18	6,9,12,15	<i>all-cis</i>	stearidonová
	eikosatetraenová	20	5,8,11,14	<i>all-cis</i>	arachidonová (ARA)
	dokosatetraenová	22	7,10,13,16	<i>all-cis</i>	adrenová
pentaenové	eikosapentaenová	20	5,8,11,14,17	<i>all-cis</i>	timnodonová (EPA)
	dokosapentaenová	22	7,10,13,16,19	<i>all-cis</i>	klupadonová (DPA)
hexaenové	dokosahexaenová	22	4,7,10,13,16,19	<i>all-cis</i>	cervonová (DHA)
	tetrakosahexaenová	24	6,9,12,15,18,21	<i>all-cis</i>	nisinová

Z hlediska výživy jsou důležité tzv. dienové mastné kyseliny, tedy kyseliny s dvěma dvojnými vazbami. V přírodních lipidech se jich vyskytuje ve významném množství pouze několik. Nejvýznamnější z nich je kyselina linolová, jejíž struktura je zobrazena na Obr. 3. Z trienových kyselin je nejvýznamnější kyselina  $\alpha$ -linolenová [1].



Obr. 3: Struktura kyseliny linolové

Polynenasycené mastné kyseliny se dále rozdělují do dvou skupin,  $\omega$ -6 a  $\omega$ -3. Tento zápis je odvozený od polohy první dvojně vazby od methylového konce, tzn. MK řady  $\omega$ -6 mají první dvojnou vazbu na 6. uhlíku od methylu. Mezi  $\omega$ -6 mastné kyseliny patří kyselina linolová a kyselina arachidonová. Mezi  $\omega$ -3 se řadí kyselina  $\alpha$ -linolenová, kyselina eikosapentaenová a kyselina dokosahexaenová [1, 3, 6, 7].

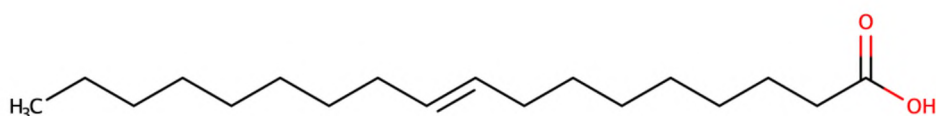


### 1.2.2 Esenciální mastné kyseliny

Esenciální živina je látka, kterou si lidský organismus nedokáže syntetizovat a je tedy nutné tuto živinu přijímat potravou. Organismus všech savců si nedokáže vytvořit mastné kyseliny s dvojnými vazbami za devátým uhlíkem od karboxylového konce, proto mezi esenciální MK patří kyselina linolová ( $\omega$ -6) a  $\alpha$ -linolenová ( $\omega$ -3). Esenciální MK pomáhají předcházet ekzému, lupénce, vypadávání vlasů, narušení imunitních funkcí a neurologickým dysbalancím. Také mají vliv na zdravý oběhové, rozmnožovací a kožní soustavy, snížit LDL cholesterol a podporují růst a vývoj plodu. Tyto fyziologické účinky mají esenciální MK pouze v *cis*- konfiguraci, při izomeraci se účinky ztrácí [3, 4, 6].

### 1.2.3 Trans nenasycené mastné kyseliny

Nenasycené MK mohou mít dvojnou vazbu v konfiguraci *cis*- (*Z*) nebo *trans*- (*E*). Konfigurace *cis*- znamená, že vodíky atomů jsou na stejné straně, u konfigurace *trans*- je tomu naopak, vodíky jsou na opačných stranách molekuly. Většina nenasycených MK má dvojnou vazbu v *cis*-konfiguraci, pouze malé procento v konfiguraci *trans*-. Trans nenasycené MK (TFA) vznikají v potravinách přirozenými nebo průmyslovými procesy, např. biohydrogenací v batoru přežvýkavců, při klasické hydrogenaci (ztužování olejů pomocí vodíku) nebo při úpravě tuků za vysokých teplot (smažení). TFA se proto vyskytují v mléčných výrobcích, mase přežvýkavců a průmyslově zpracovaných potravinách, např. v margarínech, pečivu, cukrářských a čokoládových výrobcích. Jedná se například o kyselinu elaidovou, jejíž struktura je zobrazena na Obr. 4. Trans MK mají nepříznivé zdravotní účinky na lidský organismus, jelikož zvyšují hladinu LDL cholesterolu v krvi a také zvyšují inzulínovou rezistenci. Dle nejnovějších studií je jejich vliv až desetkrát horší, než je vliv SFA [1, 3, 6, 8–10].



Obr. 4: Struktura kyseliny elaidové

### 1.2.4 Úloha mastných kyselin ve výživě člověka

Mastné kyseliny jsou jedním z hlavních energetických zdrojů. Podílejí se na řadě fyziologických procesů. Dodávají buňce energii a působí jako substráty při syntéze tuků, lipoproteinů, lipopolysacharidů a eikosanoidů. Výživová doporučení tvrdí, že je zdravé přijímat různé druhy mastných kyselin SFA : MUFA : PUFA v poměru 1 : 1 : 1. Pro sportovce a osoby s pravidelnou fyzickou zátěží může být tento poměr otočený ve prospěch nasycených mastných

kyselin, tj. 2 : 1 : 1. Obecně lze říci, že nasycené MK jsou primárně zdrojem energie, kdežto nenasyčené MK mají svůj význam ve strukturální funkci při tvorbě buněčných membrán. U polynenasycených MK není důležité zajistit pouze jejich dostatečný příjem, ale dodržovat i správný poměr MK řady  $\omega$ -6 a  $\omega$ -3, který by měl být menší než 5 : 1 (ideálně 2 : 1 až 3 : 1). Mastné kyseliny řady  $\omega$ -3 MK totiž snižují celkovou hladinu triacylglycerolů (TAG) a cholesterolu, a pomáhají tak v prevenci kardiovaskulárního onemocnění [4, 5, 11].

Mastné kyseliny známé pod zkratkou MCT jsou oblíbené především u sportovců ve formě doplňků stravy. MCT podporují vytrvalostní výkon, šetří glykogen, chrání svalovou hmotu a podporují spalování tuků. Jedná se o MK se středně dlouhým řetězcem, tj. 8 až 12 uhlíků v řetězci, a řadí se mezi ně kyselina kaprylová (C8:0), kyselina kaprinová (C10:0) a kyselina laurová (C12:0). Tyto mastné kyseliny se nachází především v kokosovém oleji a částečně i v oleji palmovém a v mléčném tuku [5].

### 1.3 Doprovodné látky lipidů

V potravinách se kromě lipidů nacházejí netěkavé lipofilní látky (lipoidy), které doprovázejí vlastní lipidy, a proto se nazývají doprovodné látky lipidů. Při izolaci lipidů přecházejí z materiálu do lipidové frakce vzhledem ke své nízké polaritě. Mezi doprovodné látky lipidů se řadí vyšší uhlovodíky, vyšší primární a sekundární alkoholy, ketony a diketony, steroidy, lipofilní barviva, lipofilní vitamíny a další lipofilní sloučeniny [1].

#### Lipofilní vitamíny

Obecně jsou vitamíny organické nízkomolekulární sloučeniny. Jedná se o exogenní esenciální biokatalyzátory. Lidský organismus je získává jako exogenní látky potravou, některé z nich prostřednictvím střevní mikroflóry. Jsou nezbytné pro látkovou přeměnu a regulaci metabolismu člověka. Nejsou zdrojem energie, ani stavebním materiálem, ale bývají součástí katalyzátorů biochemických reakcí [1].

Vitamíny se dělí podle společných fyzikálních vlastností, konkrétně podle rozpustnosti ve vodě a v tucích, na dvě skupiny:

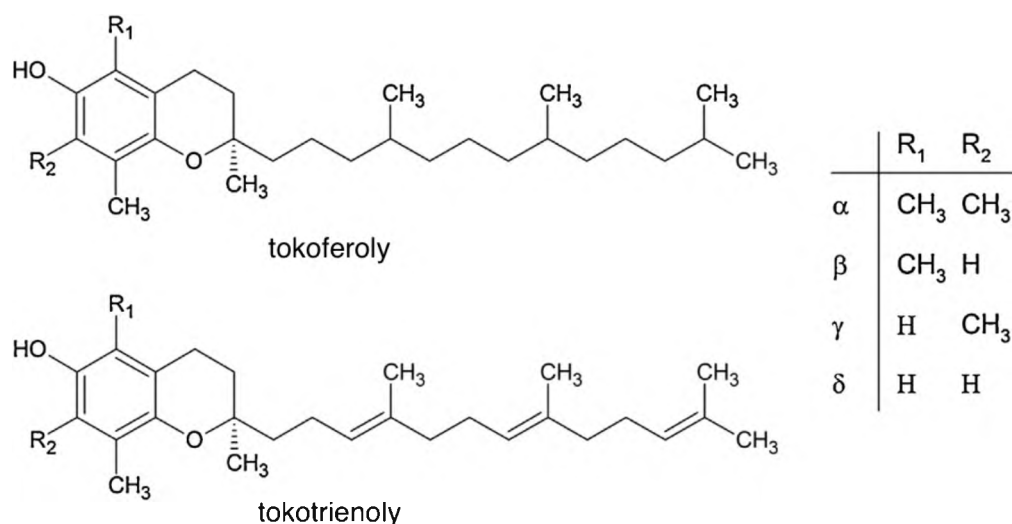
- vitamíny rozpustné ve vodě (hydrofilní)
- vitamíny rozpustné v tucích (lipofilní)

Hydrofilní vitamíny zahrnují vitamíny skupiny B a vitamín C. Vitamíny rozpustné v tucích jsou vitamíny A, D, E a K. Vitamíny rozpustné ve vodě mají katalytickou funkci, vitamíny rozpustné v tucích mají různé funkce. Přebytek hydrofilních vitamínů bývá vylučován

moči, v organismu tedy nejsou skladovány oproti lipofilním vitamínům, které bývají skladovány převážně v játrech [1, 12].

### 1.3.1 Vitamín E

Vitamín E byl identifikován v roce 1922 jako specifický vitamín plodnosti. Aktivitu vitamínu E vykazují osm základních strukturně příbuzných derivátů chromanolu (vitageny E), jejichž společným základem jsou tokol a tokotrienol. Čtyři formy s nasyceným terpenoidním postranním řetězcem odvozené od tokolu se nazývají tokoferoly (z řeckého tocos = porod a pheros = přinést), čtyři formy s nenasyceným řetězcem odvozené od tokotrienolu se nazývají tokotrienoly. Tokoferoly a tokotrienoly se dále dělí na jednotlivé sloučeniny, které se liší počtem a polohou methylových skupin na chromanolovém kruhu (viz Obr. 5) a rovněž biologickou aktivitou [1, 2, 13].



Obr. 5: Strukturní vzorec tokoferolů a tokotrienolů [14]

Biologická aktivita vitamínu E souvisí s antioxidačními účinky. Vitamín E se u eukaryotických buněk uplatňuje jako ochrana nenasycených lipidů před poškozením volnými radikály. Oxidaci lipidů brání tím, že reaguje s volnými peroxylovými radikály a tím přerušuje řetězovou reakci. Za nejúčinnější antioxidant se považuje α-tokoferol. β-tokoferol vykazuje poloviční aktivitu α-tokoferolu, γ-tokoferol asi 10% a δ-tokoferol zhruba 3% aktivitu [1, 12].

Vitamín E se vyskytuje především v potravinách rostlinného původu, ve větším množství bývá přítomen α-tokotrienol, β-tokotrienol a všechny čtyři formy tokoferolů. Oleje z obilných klíčků obsahují více vitamínu E než rostlinné oleje. Panenské oleje jsou rovněž

bohatší na obsah vitamínu E v porovnání s rafinovanými oleji. V potravinách antioxidační aktivita tokoferolů a tokotrienolů závisí na řadě faktorů, nejvýznamněji na složení nenasycených mastných kyselin. V živočišných tucích, kde je hlavní mastnou kyselinou kyselina olejová, jsou tokoferoly účinnějšími antioxidanty ve srovnání s rostlinnými oleji, kde převažuje kyselina linolová [1].

Při přípravě, zpracování a skladování potravin dochází k destrukci vitamínu E, stejně jako u ostatních vitamínů rozpustných v tucích. V nepřítomnosti kyslíku a peroxidů jsou tokoferoly vysoce odolné vůči zahřívání do 200 °C. Také jsou stabilní ve slabě kyselém pH. Při opatrném zahřívání dochází k mírným ztrátám tokoferolů (okolo 10 %). K největším ztrátám dochází během smažení, pečení a dušení. Při opakovaném zahřívání olejů na smažení jsou zničeny téměř všechny tokoferoly. Ve zmražených potravinách, jsou-li přítomny nenasycené mastné kyseliny, obsah tokoferolů postupně klesá [12, 15].

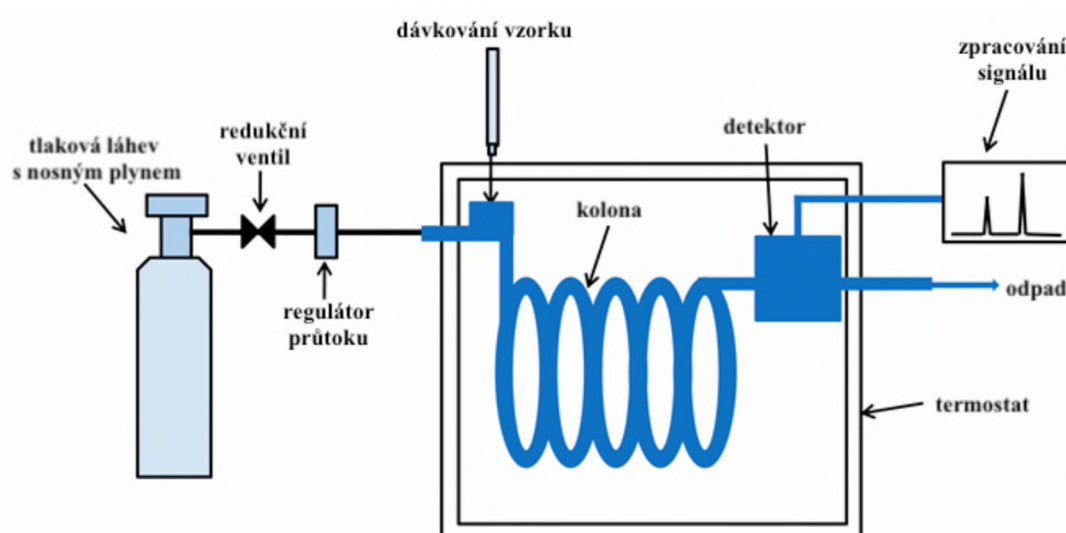
Vitamín E se uplatňuje při prevenci kardiovaskulárních chorob a onkogeneze. Nedostatek vitamínu E byl pozorován u předčasně narozených dětí v důsledku nízkého obsahu podkožního tuku a u patologických stavů jako je těžká malabsorpce (cystická fibróza, chronické onemocnění jater, intestinální resekce) [1, 2].

#### **1.4 Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie (GC) je fyzikálně-chemická separační technika, která je založena na distribuci látek mezi dvě heterogenní fáze. Jedna z těchto fází je vždy nepohyblivá, tzv. stacionární, a druhá je naopak pohyblivá, tzv. mobilní. Stacionární fázi je nejčastěji kapalina zakotvená na inertním nosiči, méně často povrchově aktivní adsorbent. Mobilní fáze je zpravidla inertní plyn. Interakce mezi molekulou plynu a stacionární fází je dána difúzí a určitým druhem intermolekulárních sil – adsorpcí, rozpouštěním [16, 17].

##### **1.4.1 Instrumentace v plynové chromatografii**

Plynový chromatograf se skládá z několika částí, které jsou vyobrazeny a popsány na Obr. 6 [16].



Obr. 6: Schéma plynového chromatografu [18]

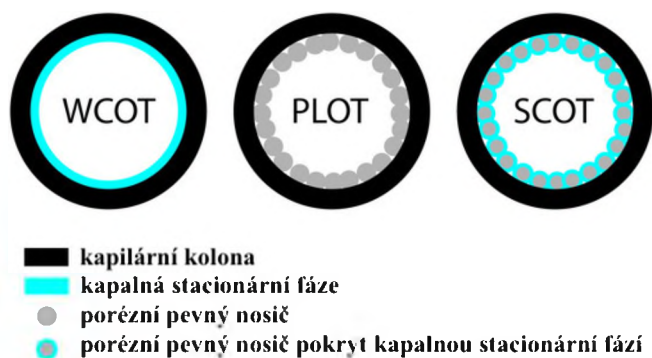
Nosný plyn prochází regulačním ventilem do chromatografické kolony. V blízkosti přívodu plynu je prostor pro zavedení vzorku – dávkovací systém. Analyzovaná směs je separována na koloně a v ideálním případě jsou složky odděleně eluovány nosným plynem v různých časových intervalech. Chromatografická kolona a některé detektory musí být termostaticky řízené. Signál z detektoru je zpracován a zaznamenán ve formě chromatogramu, což je závislost signálu na elučním čase nebo elučním objemu [19].

Mobilní fázi v plynové chromatografii je tzv. **nosný plyn**, který by měl být inertní vůči chromatografické koloně a vůči analytům ve vzorku. Pro správnou analytickou práci je nezbytné, aby nosný plyn protékal rovnoměrně skrz kolonu a detektor, protože průtok ovlivňuje jak kvalitativní, tak i kvantitativní analýzu. Jako mobilní fáze se využívají tyto nosné plyny: helium, dusík, vodík a argon [16, 17, 19].

Úlohou **dávkovače** je rychle a reprodukovatelně dávkovat do kolony plynný nebo kapalný vzorek. Je nutné, aby zplyněný vzorek byl ihned přiveden na začátek kolony. Dalším důležitým parametrem je teplota nástřiku, která by měla být o 50 °C vyšší, než je bod varu nejvýše vroucí složky analyzované směsi. Vzorky se mohou dávkovat injekčními mikrostřikačkami nebo dávkovacími ventily s možností volby dávkovaného objemu. U kapilárních kolon se využívá dávkování s děličem toku, které je založeno na principu rozdělení celkového objemu vzorku v určitém poměru na dvě části, toto dávkování je nazváno split [14, 15, 17, 18].

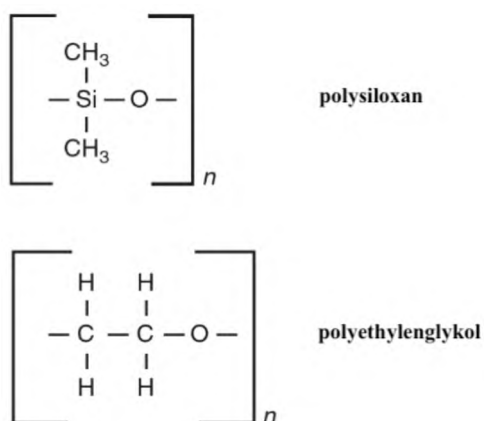
Separace látek probíhá v náplňové nebo kapilární **chromatografické koloně**. V současnosti se využívají především kapilární kolony, aplikace náplňových kolon se dramaticky snížila v počátcích 80. let minulého století. Kapilární kolony se zhotovují

z taveného křemene, který je potažen tenkou vrstvou polyamidu. Délka kapilárních kolon se pohybuje od 10 do 60 m a vnitřní průměr od 0,1 do 0,53 mm. Čím je vnitřní průměr menší, tím je vyšší rozlišení a kratší doba analýzy. Podle způsobu uložení stacionární fáze se rozlišují tři základní typy kapilárních kolon, jejichž schéma je znázorněno na Obr. 7. Typ WCOT má vnitřní stěnu potaženou tenkým filmem kapalné stacionární fáze, zatímco typ PLOT má na vnitřní stěně porézní vrstvu pevného nosiče. Kolona SCOT je variací typu PLOT, kde porézní vrstva je pokryta kapalnou stacionární fází [20, 21].



Obr. 7: Typy kapilárních kolon [22]

Nejběžněji využívané stacionární fáze v plynové chromatografii jsou polysiloxany a polyethylenglykoly, jejichž struktura je zobrazena na Obr. 8. Polysiloxany jsou buď 100% substituovány methylovou skupinou nebo část methylu je nahrazena jinou funkční skupinou např. fenylovou, čímž roste polarita stacionární fáze. Polyethylenglykoly jsou oblíbené kvůli své jedinečné selektivitě a vysoké polaritě, jejich nevýhodou však je jejich nízká termální stabilita [20, 23].



Obr. 8: Struktura polysiloxanu a polyethylenglykolu [21]

**Detektor** je zařízení, jehož úkolem je detekovat v nosném plynu složky, které opouštějí chromatografickou kolonu. Funkcí detektoru je převedení analytických vlastností analyzované látky na hodnoty, které lze registrovat. Vhodnou analytickou vlastností látky je jakákoliv

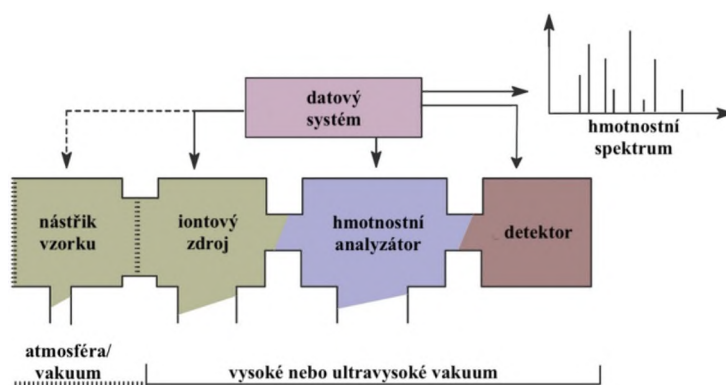
vlastnost látky, která je v přesně definovaném vztahu ke kvalitě a množství látky. Působením analytické vlastnosti na detektor, který je schopen registrovat tuto vlastnost, vzniká signál. Dle dějů probíhající při detekci lze detektory rozdělit na nedestruktivní a destruktivní. V nedestruktivních detektorech analyzovaná látka prochází a chemicky se nemění. Do této skupiny detektorů patří např. tepelně vodivostní detektor (TCD) nebo detektor elektronového záchytu (ECD). Při průchodu látky destruktivním detektorem se látka nevratně změní. Mezi destruktivní detektory patří například plamenový ionizační detektor (FID) a hmotnostní spektrometr [16, 17].

## 1.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je citlivá analytická technika, která slouží k převedení atomů a molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a následné detekci intenzit jednotlivých iontů [24–26].

### 1.5.1 Instrumentace v hmotnostní spektrometrii

Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Schéma hmotnostního spektrometru je zobrazeno na Obr. 9. V iontovém zdroji dochází k ionizaci molekul a k urychlení iontů před vstupem do analyzátoru. V analyzátoru, což je iontově-optické zařízení, dochází k separaci iontů v plynném skupenství podle jejich efektivních hmotností  $m/z$ . V detektoru dochází k detekci a separaci separovaných iontů. Každý hmotnostní spektrometr musí být také vybaven systémem pro zavádění vzorků do iontového zdroje a vakuovou aparaturou pro dosažení nízkého pracovního tlaku v hmotnostním analyzátoru [27].



Obr. 9: Schéma hmotnostního spektrometru [28]

**Iontový zdroj** je místo, kde dochází k ionizaci vzorku. Odštěpením valenčních elektronů z molekul vznikají nevratným způsobem ionty. Způsob ionizace se volí podle typu analyzovaných látek a požadavků kladených na analýzu. Jednotlivé způsoby ionizace se liší

tzv. tvrdostí, tedy množstvím energie, které na molekulu při ionizaci působí. Pro látky v plynném stavu se používá ionizace elektronová a chemická. Látky v kapalném médiu lze ionizovat metodami pracujícími za atmosférického tlaku – elektrosprejem (ESI), termosprejem (TSI) nebo chemicky (např. APCI).

Při **elektronové ionizaci** (EI) dochází k ionizaci vzorku nárazem elektronů. Molekuly vzorku se vstupní štěrbinou zavádí do evakuované ionizační komůrky, kde se dostávají mezi anodu a katodu do proudu elektronů a dochází k jejich ionizaci. Vzniklé molekulové ionty mají charakter radikalkationtu ( $M^+\bullet$ ) a zbavují se přebytečné vnitřní energie fragmentací, tj. postupným rozpadem na kladné ionty a radikály s nižší energií. Molekulové a fragmentové ionty jsou z iontového zdroje vypuzovány vytěšňovací elektrodou a systémem dalších elektrod jsou urychlovány a fokusovány na vstupní štěrbinu analyzátoru. V datových databázích se standardně uvádějí EI hmotnostní spektra kladných iontů při ionizační energii 70 eV.

Při **chemické ionizaci** (CI) se do iontového zdroje zavádí reakční plyn, např. methan, isobutan, vodík, dusík atd. Nejprve se proudem elektronů ionizují molekuly reakčního plynu. Vzniklé ionty reakčního plynu poté při srážkách ionizují molekuly analyzované látky. Často se také na molekulu látky adují. Vznikají jak kladné, tak i záporné ionty. Chemická ionizace probíhá při nižší energii než u EI, jedná se tedy o šetrnější způsob ionizace. Výsledkem je tedy menší fragmentace molekul vzorku, proto CI hmotnostní spektra mají intenzivnější píky molekulových iontů, případně iontů molekulových aduktů [16, 27].

**Hmotnostní analyzátor** je základní částí hmotnostního spektrometru a slouží k rozdělení iontů s různými hmotnostmi. Určuje typ přístroje, jeho kvalitu a cenu. Hmotnostní analyzátor lze rozdělit do různých typů provozních režimů: kontinuální režim (sektorový, kvadrupólový), pulzní režim (průletový) a režim zachycení iontů (iontová past, iontová cyklotronová rezonance, orbitrap). V dnešní době patří mezi nejčastěji využívané hmotnostní analyzátor kvadrupólový a orbitální past [24, 27].

**Kvadrupólový analyzátor** k separaci iontů využívá vysokofrekvenční pole. Skládá se ze čtyř tyčí kruhového průřezu délky 20–30 cm. Na protilehlou dvojici tyčí je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbývající dvojici záporné stejnosměrné napětí. Urychlené ionty vstupují do středu osy kvadrupólu, kde oscilují mezi elektrodami opačné polarity. Při určité hodnotě radiofrekvence dosáhnou ionty o určité hmotnosti stabilních oscilací, zatímco ionty s odlišnou hmotností oscilují s rostoucí amplitudou a jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Mění-li se postupně stejnosměrné i střídavé napětí, kvadrupól propouští postupně všechny ionty



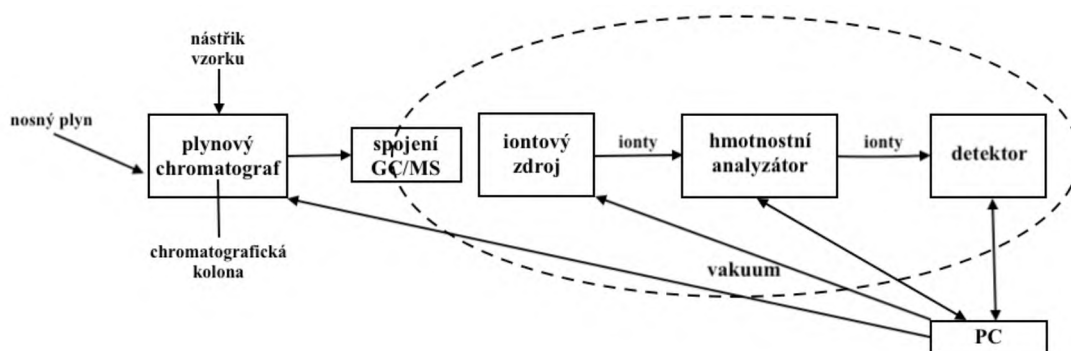
o vzrůstajícím  $m/z$ , které se detekují a registrují. Jeho výhodou je jednoduchá konstrukce, nedostatkem je nízká rozlišovací schopnost [27, 29].

**Orbitální past**, také nazývaná jako **orbitrap**, slouží k zachycení iontů elektrostatickým polem, jedná se v podstatě o elektrostatickou iontovou past. Orbitrap se skládá z vnější a středové vřetenové elektrody. Ionty rotují kolem a podél středové elektrody, jejich výsledná trajektorie připomíná rotující elipsu. Ionty indukují proud, který je měřen na vnější elektrodě. Hmotnostní spektrum je získáno Fourierovou transformací [24, 26, 30, 31].

K **detekci** iontů se používá elektronový násobič, fotonásobič nebo Faradayův pohár. V případě elektronásobiče, resp. fotonásobiče, kladný iont po dopadu na první dynodu uvolní jeden až dva elektrony, resp. fotony, které jsou urychleny k další dynodě, kde po jejich dopadu jsou uvolněny další elektrony. Vytvořená kaskáda elektronů vytváří měřitelný proud na konci detektoru, který je detekován jako signál. Faradayův pohár se skládá z detekční destičky a elektroměru. Při nárazu iontu na destičku se indukuje proud, který je měřen elektroměrem [16, 24, 25, 32].

## 1.6 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) je analytická technika sloužící k identifikaci a stanovení organických látek v komplexních maticích. Plynový chromatograf rozděljuje složky směsi v čase a hmotnostní spektrometr poskytuje informace o struktuře jednotlivých složek [21]. Celkové uspořádání této techniky je zobrazeno na Obr. 10.



Obr. 10: Uspořádání GC-MS [21]

Technika GC-MS je limitována pro analyty, které jsou těkavé, tudíž tuto techniku nelze použít pro méně těkavé sloučeniny bez jejich chemické derivatizace [21, 33].

Nejpoužívanější ionizačním způsobem pro GC-MS je EI, kde vznikají pozitivně nabitě ionty ( $M^{\bullet+}$ ). Většina vzniklých iontů má náboj roven jedné. Ve spojení s plynovou chromatografií se nejčastěji využívá kvadrupólového a sektorového hmotnostního analyzátoru.

Pro spojení plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru se používá tzv. interface, což je zařízení skládající se z vyhřívané trubice, která je vybavena regulátorem teploty. Jeho funkcí je přenášet eluát z kolony plynového chromatografu do hmotnostního spektrometru. To musí být provedeno tak, aby analyt před vstupem do iontového zdroje nekondenzoval ani se nerozkládal. U kapilárních kolon je možné zavedení konce kolony přímo do iontového zdroje, protože čerpací systém hmotnostního spektrometru za normálních podmínek dokáže zpracovávat celý objem eluátu vycházející z kolony [21, 34].

### 1.7 Analýza mastných kyselin plynovou chromatografií

Klasické kroky při stanovení mastných kyselin zahrnují jejich extrakci organickými rozpouštědly, dále jejich esterifikaci za vzniku methylesterů (FAMES) a následně separaci FAMES pomocí GC. Přesné stanovení profilu MK závisí na celkové extrakci různých MK vázaných na matici [35]. Stanovení MK pomocí plynové chromatografie je běžnou metodou pro charakterizaci tuků a olejů [36].

Při **přípravě** vzorku je klíčovým krokem účinná a selektivní extrakce lipidových složek [11]. Extrakce lipidů se nejčastěji provádí pomocí rozpouštědel. Účinnost extrakce silně závisí na polaritě rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel [37]. Extrakci lze provést Soxhletovou extrakcí, při které dochází k opakované extrakci stále čistým rozpouštědlem, petroletherem, diethylem [35] nebo hexanem [38, 39]. K extrakci podle Folche a podle Blighe a Dyera se využívá kombinace nepolárních a polárních rozpouštědel, nejčastěji směsi chloroform/methanol [35, 40]. Pro extrakci lze také využít méně toxický dichlormethan (ve směsi s methanolem) [41] nebo také směs hexan/2-propanol [7]. Extrakce tuhou fází (SPE) je další možností, jak extrahovat lipidickou složku z matrice. Jedná se o rychlou a pohodlnou techniku, která vyžaduje malé množství vzorku i rozpouštědel, zahrnuje extrakci, čištění a obohacení. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) se pro extrakci MK uplatňuje zřídka [11, 42].

Alternativou k běžným extrakčním metodám je superkritická fluidní extrakce (SFE) oxidem uhličitým [38]. Výhodou této metody je nízká viskozita a vysoká difuzivita  $CO_2$ , tudíž toto extrakční rozpouštědlo proniká efektivněji do pórů matrice, což má za následek zkrácení doby extrakce z hodin až dnů na několik desítek minut. Pro zvýšení výtěžku extrakce lze aplikovat modifikátor, např. ethanol [43].

Mastné kyseliny nejsou těkavé, proto je nelze analyzovat přímo. Je tedy nutné je **derivatizovat** [36]. Derivatizovat je třeba karboxylovou skupinu nebo v případě nenasycených MK dvojnou vazbu. Derivatizace karboxylové skupiny, konkrétně její převedení na ester, tzv. esterifikace, je nejvíce využívaná reakce při analýze MK. Nejvíce využívanými deriváty jsou methylestery (FAMES). Derivatizací se zvýší odezvvový faktor a také nedochází k vazbě analytu na sklo či jiné aktivní povrchy [36, 44].

Pro získání FAMES se využívá tzv. methylace. K tomu slouží esterifikační činidla, která převádí triacylglyceroly a transesterifikační činidla, která převádí volné mastné kyseliny. Dle povahy použitého katalyzátoru se činidla dělí do dvou kategorií, a to: činidla katalyzovaná zásadou a činidla katalyzovaná kyselinou. Pro bazicky katalyzovanou transesterifikaci se hojně využívá methoxid sodný rozpuštěný v methanolu, především pro vzorky rafinovaných olejů. Reakce je rychlá a není potřeba použít antioxidanty, jelikož probíhá za laboratorní teploty.  $\text{CH}_3\text{ONa}$  však není vhodný pro vzorky s velkým množstvím volných MK a pro stanovení MK s krátkým řetězcem (kyselina máselná a kapronová v mléčném tuku). Před GC analýzou je doporučeno vzorek promýt roztokem  $\text{NaCl}$  z důvodu možné interference činidla. Pro bazickou katalýzu lze také využít hydroxid draselný nebo guanidin v methanolu. Kvartérních amoniových solí se využívá zředka.

Pro kyselou katalýzu lze použít kyselinu chlorovodíkovou, sírovou, acetylchlorid, trifluorid boritý nebo chlorid hlinitý v methanolu. Esterifikaci triacylglycerolů a volných MK trifluoridem boritým předchází zmýdelnění TAG methanolickým roztokem  $\text{KOH}$ . Reakce je rychlá, nicméně je nepoužitelná pro esterifikaci MK s neobvyklými funkčními skupinami např. epoxy-, cyklopropyl-. Navíc  $\text{BF}_3$  je drahý a má omezenou trvanlivost, zejména pokud není uchovávan v chladu. Pro zabránění oxidace PUFA se derivatizace provádí v prostředí butylovaného hydroxytoluenu (BHT), který slouží jako antioxidant. V omezených případech jako esterifikační činidlo lze využít velmi toxický diazomethan. Pro derivatizaci MK se též využívá silylace pomocí silylačních činidel, např. bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA). V případě nenasycených MK lze derivatizovat násobné vazby, např. 4-methyl-1,2,4-triazolin-3,5-dionem (MTAD) za získání heterocyklických derivátů MK [11, 45].

Deriváty mastných kyselin jsou dávkovány do plynového chromatografu s nástřikem zpravidla do 1  $\mu\text{l}$  [46–48] s děličem toku [48–50] nebo v režimu splitless [46] a následně jsou **separovány** na kapilárních kolonách. Separaci MK lze provést na nepolárních stacionárních fázích, nejčastěji se využívají dimethylpolysilikonové a fenylpolysilikonové fáze, např. HP-1 [51] nebo HP-5 [52]. Ze středně polárních fází se využívají například DB-23 [7] nebo CP-Sil 88

[35, 46, 53]. Vysoce polární fáze z polyethylenglykolu (PEG) např. Innowax [42] se využívají pro dělení *cis*- a *trans*- izomerů mastných kyselin [11]. Mobilní fází bývá nejčastěji helium [35, 46, 48–51], méně často dusík [42] a zřídka vodík [53, 54]. Průtoky nosného plynu bývají od 0,85 do 1,82 ml/min [35, 54].

Pro **detekci** mastných kyselin, resp. jejich derivátů, se nejčastěji využívá FID [7, 47, 48, 53]. Jeho detekční limit pro FAMES je na úrovni ng/ml. Jeho předností je také široký lineární rozsah a velmi vysoká přesnost. Pro získání informací o chemické struktuře analyzovaných mastných kyselin se využívá hmotnostní spektrometr [46, 48–51, 54], jehož detekční limit je na úrovni jednotek ng/ml. Z důvodu širšího rozsahu linearit a vyšší přesnosti při stanovení mastných kyselin se více využívá kvadrupólového analyzátoru než iontové pasti. Detektor elektronového záchytu, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR) nebo nukleární magnetická rezonance (NMR) se pro detekci mastných kyselin příliš nevyužívá [11].

### 1.7.1 Příklady stanovení mastných kyselin v potravinách

Skupina brazilských vědců [55] porovnávala **přípravek určený k léčbě ran a rostlinné oleje** na základě profilu mastných kyselin. Referenční léčebný přípravek obsahoval kyselinu kaprylovou, kaprinovou, laurovou, palmitovou, stearovou, olejovou ( $\omega$ -9), linolovou ( $\omega$ -6) a  $\alpha$ -linolenovou ( $\omega$ -3). Vědci zjistili, že testované oleje měly podobné složení mastných kyselin jako léčebný přípravek. Nejvíce  $\omega$ -9 měl olivový olej (75,8 %). Bohatý na obsah  $\omega$ -6 (64,1 %) byl slunečnicový olej, zatímco nejvíce  $\omega$ -3 (46,5 %) obsahoval olej lněný. Výsledky této studie mohou podpořit vývoj nového produktu využívajícího rostlinné oleje s vyváženým složením mastných kyselin pro alternativní léčbu ran. V této studii bylo také zjištěno, že **kyselinu ricinolejovou** obsahoval pouze ricinový olej (83,7 %). Yamamoto, Kinoshita a Shibahara [56] však metodou optimalizovanou na stanovení stopového množství této kyseliny prokázali, že kyselina ricinoolejová se nachází ve všech deseti jimi testovaných rostlinných olejích. Nejvíce ricinolejové kyseliny obsahoval bavlníkový olej (2 688 ppm), nejméně olivový olej (31 ppm).

**Panenský arganový olej** se vyrábí především v severozápadním Maroku z plodů argánie trnité (*Argania spinosa*) a představuje důležitý zdroj tuků v oblasti Maghrebu. Cílem studie z roku 2014 [57] bylo plně charakterizovat profil mastných kyselin arganového oleje a jedenácti dalších olejů. Pro studium vztahu mezi jednotlivými oleji byla na získaná data aplikována diskriminační analýza. Na základě podobnosti profilů mastných kyselin byl arganový, mandlový, avokádový a olivový olej zařazen do skupiny MUFA. Arganový olej

byl ale také podobný olejům spadajícím do skupiny PUFA, tj. oleji sezamovému a slunečnicovému s vysokým obsahem kyseliny olejové. Blízký vztah byl také prokázán mezi lískooříškovým, grepovým a dýňovým olejem. Lněný olej se svým složením mastných kyselin lišil od všech testovaných olejů.

Plody z řečíku pistáciového (*Pistacia vera*), neboli **pistácie**, obsahují mastné kyseliny, které jsou prospěšné pro lidské zdraví. Na farmaceutické fakultě v Ankaře [50] hodnotili obsah tuku a mastných kyselin v semenech pistácií ze tří různých lokalit. Pistácie byly v nezralém i zralém stavu a ve fázi zpracování. GC-MS analýza neukázala korelaci mezi obsahem mastných kyselin a zralostí. Pistácie z Íránu měly větší nutriční hodnotu než pistácie z Turecka, jelikož obsahovaly více kyseliny linolové (22,24 %). Rozdílné složení mastných kyselin může být způsobeno podnebím, podmínkami skladování semen, ale také genetickými faktory a způsobem zpracování.

V posledních letech se **rakytníkový olej** stal populárním doplňkem stravy. Profesor Dulf [58] se zabýval složením mastných kyselin olejů získaných z různých částí bobulí *Hippophae rhamnoides* spp. *carpatica*, což je nejběžněji pěstovaný poddruh rakytníku řešetlákového v Rumunsku. Obsah mastných kyselin v oleji získaném ze slupky, dužniny a celých bobulí se značně lišil od obsahu v oleji ze semen. V oleji ze slupky, dužniny a celých bobulí dominovala kyselina palmitová, olejová a palmitoolejová, kdežto v oleji ze semen převládaly polynenasycené mastné kyseliny, konkrétně linolová a  $\alpha$ -linolenová kyselina. Pozoruhodnou vlastností semenného oleje byl nízký obsah kyseliny palmitoolejové, a to 0,1–0,5 %.

Metodu GC-MS lze využít nejenom ke stanovení obsahu mastných kyselin v nejrůznějších plodinách, ale také k odhalení falšování potravin. V oblasti mlékárenství je problém v **ověřování autentičnosti sýrů s chráněným zeměpisným označením**. Jedná se o sýry s vysokou kvalitou, a tudíž i cenou, jelikož pro jejich výrobu platí několik striktních pravidel. Například pro sýr Parmigiano Reggiano, Fontina, Comté a Gruyère je zakázáno použití mléka od dojníc, které byly krmeny silážovým krmivem. Toto pravidlo však neplatí pro sýr Grana Padano. Kyselina laktobacilová a dihydrosterkulová jsou mastné kyseliny s cyklopropanovým kruhem (CPFA). Na italské univerzitě při jejich výzkumu [59] zjistili, že se tyto kyseliny vyskytovaly v mléce a mléčných výrobcích od krav krmených siláží. Této informace využili ve své další studii z roku 2016 [60], kde klasifikovali 304 vzorků sýru na základě přítomnosti či nepřítomnosti CPFA. Vzorky sýru Grana Padano byly vždy pozitivní na přítomnost CPFA, kdežto vzorky sýru Parmigiano Reggiano, Fontina, Comté a Gruyère byly

vždy negativní. Byla tedy prokázána korelace mezi nepřítomností CPFA a pravostí sýrů s chráněným zeměpisným označením. CPFA lze tedy považovat za spolehlivé markery, kterých lze využít k ověření autentičnosti sýrů.

## 1.8 Analýza tokoferolů plynovou chromatografií

Chemické vlastnosti derivátů vitamínu E, jejich strukturální podobnost a variabilní koncentrace přináší řadu analytických problémů. Plynová chromatografie oproti kapalinové chromatografii vyžaduje předběžné zpracování vzorků včetně derivatizace [14].

Při **přípravě vzorků** je třeba dbát na to, že relativní množství tokoferolů ve vzorku může být velmi nízké, proto je často zapotřebí analyt zakoncentrovat a použít velmi citlivou metodu. Dalším úskalím je náchylnost vitamínu E k degradaci, která může být způsobena vysokou teplotou, UV světlem nebo oxidačními činidly. Proto se při zpracování vzorky chrání před světlem a během zmýdelnění je doporučený přídavek antioxidantů, např. BHT [61, 62], kyseliny askorbové, pyrogallolu [61, 63] nebo jejich kombinace.

Vzorek musí být před anebo během zmýdelnění či extrakce rozpuštěn v organickém rozpouštědle, které tak poskytne médium, ve kterém jsou analyty volně rozpustné, nejčastěji v ethanolu, případně v methanolu. Dále také dojde k narušení struktur, ke kterým může být vitamín E vázán (membrány, lipoproteiny, tukové kapičky) a odstraní se tak interferenty, které nejsou rozpustné v organických rozpouštědlech (bílkoviny, sacharidy). U vzorků obsahujících lipidové složky se před extrakcí vitamínu E využívá zmýdelnění, které se nejčastěji provádí zahříváním v ethanolickém nebo methanolickém roztoku KOH. Po zmýdelnění se nezmýdelnitelný podíl extrahuje do organického rozpouštědla, nejčastěji hexanu, zatímco soli MK, glyceroly a další zůstávají v alkalické vodné fázi. Následně se extrakční rozpouštědlo odpaří na požadovaný objem. Vitamín E není chemicky vázán na sacharidy, bílkoviny nebo lipidy, proto silné zmýdelnění pro jeho uvolnění není nezbytné, jelikož může dojít k jeho destrukci.

Deriváty tokolu lze extrahovat z kapalných nebo pevných matric organickými rozpouštědly nebo jejich směsmi. Rozpouštědlo musí účinně proniknout do matrice, proto se extrakce provádí silným třepáním či vortexováním. Lze také použít ultrazvuk, nesmí být však příliš intenzivní, jelikož vzorky se pak zahřívají a může dojít ke vzniku volných radikálů. Pro extrakci vitamínu E z matrice se nejčastěji využívá metoda extrakce podle Folche nebo Soxhletova extrakce. Jako extrakční činidlo se využívá chloroform/methanol (2:1), aceton či diethylether. Dále také hexan samotný nebo v kombinaci s ethanolem, ethylacetátem nebo

diisopropyletherem (max. 5 %). TLC a sloupcová chromatografie se používá k přečištění vzorku. V některých laboratořích využívají SFE jako alternativu k běžným extrakcím [14, 64].

Vzhledem k tepelné labilitě tokolů je nutný krok **derivatizace**, aby došlo ke zvýšení jejich stability a zvýšení citlivosti detekce. Během derivatizace je klíčové zajistit bezvodé prostředí, např. přidáním pyridinu, jelikož obsah vody brání chemické přeměně analytu a může vést k hydrolyze derivatizačních činidel. Široce používanou derivatizační technikou pro tokoferoly je silylace, zejména díky její jednoduchosti a relativně krátké době provedení. Aplikace silylačních činidel v pyridinu umožňuje získat stabilní nepolární deriváty, které mohou být stanoveny s vysokou reprodukovatelností. Jako silylační činidla se využívají deriváty trimethylsilyl etheru (TMS), např. N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA) [65, 66], hexamethyldisilazan (HMDS) v kombinaci s trimethylchlorsilanem (TMCS) [67], bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) nebo N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) [62]. Trimethylsilylace je zvláště kompatibilní s MS, protože zvyšuje citlivost metody. Dalším způsobem derivatizace je alkylace, která využívá činidel ze skupiny alkylformiátů jako je například trifluoroethylformiát (TFECF) nebo heptafluorobutylformiát (HFBCF) [14].

Kvůli lipofilním vlastnostem tokolů je nutná jejich **separace** na relativně nepolárních chromatografických stacionárních fázích (5 % fenylových a 95 % methylových skupin) např. DB-5 [68], DB-5MS [69], HP-5MS [70], CP-Sil 8 CB [61], SPB-5 [67]. Separaci derivátů lze také provést na nepolární fázi (100 % methylových skupin), např. DB-1HT [71], případně na středně polární fázi, např. TR50 (50 % methylových a 50 % fenylových skupin) [65]. Chromatografická separace může být provedena izotermálně nebo s programovanou teplotou. Jako nosný plyn se nejčastěji využívá helium [65–67, 71], případně dusík [62, 63, 66]. Eluční pořadí sloučenin je určeno jejich bodem varu. V případě separace na koloně s nepolární fází je první eluující formou  $\delta$ -tokoferol, poté se eluuje  $\beta$ -tokoferol, následně  $\gamma$ -tokoferol a nakonec  $\alpha$ -tokoferol [14].

Pro **detekci** derivátů tokoferolů se nejčastěji využívá FID [62, 66, 67] nebo hmotnostní spektrometr [65, 66, 68, 71, 72]. Co se týče MS, jednoznačně nejpoužívanější ionizační technikou je EI [65, 69, 72]. U trimethylsilylesterů tokoferolu jsou pozorovány podobné fragmentové ionty kromě molekulového iontu. Charakteristickým rysem je přítomnost fragmentového iontu  $m/z$  73 v hmotnostním spektru, která odpovídá molekulové hmotnosti trimethylsilylové skupiny. Díky elektronové ionizaci poskytují fragmentace ve zdroji strukturální informace odpovídající kvalitativní i kvantitativní analýze. Systém GC-MS pro

analýzu derivátů tokoferolů je nejčastěji vybaven kvadrupólovým analyzátozem [69, 72], dále iontovou pastí [70] nebo průletovým hmotnostním analyzátozem [66, 73].

### 1.8.1 Příklady stanovení tokoferolů v potravinách

**Olivový olej** je důležitou součástí středomořské stravy. Jeho kvalita a oxidační stabilita je spojena s obsahem minoritních složek, především vitamínu E. Obsah  $\alpha$ -tokoferolu, alifatických alkoholů, sterolů a skvalenu v olivovém oleji analyzovali pomocí GC-FID na lékařské fakultě v Chorvatsku [67]. Obsah  $\alpha$ -tokoferolu v jednom z testovaných olejů byl 2,73  $\mu\text{g/g}$ , výsledky dalších vzorků nebyly publikovány. Obsah  $\alpha$ -tokoferolu analyzovali také na univerzitě v Bari [73]. Vitamín E z olivového oleje izolovali pomocí mikroextrakce tuhou fází (SPME) a následně stanovovali jeho obsah technikou GC-MS. Nejvíce  $\alpha$ -tokoferolu (0,20 mg/g) obsahoval extra panenský olivový olej, zatímco panenský olivový olej obsahoval pouze 0,04 mg/g. Dále byla provedena analýza stability vitamínu E ve vzorku extra panenského olivového oleje, který byl vystaven světlu a teplotě 50 °C. Po 15 dnech byl zaznamenán významný pokles koncentrace  $\alpha$ -tokoferolu, a to o 76 %. U vzorků, které byly skladovány v temnu a při laboratorní teplotě, nedošlo k žádnému významnému úbytku. Tato studie potvrdila korelaci mezi obsahem  $\alpha$ -tokoferolu a podmínkami skladování. Správné skladování prodlužuje trvanlivost oleje, udržuje jeho vysokou nutriční hodnotu, zpomaluje autooxidaci způsobující nežádoucí pachy a zabraňuje tvorbě nebezpečných sloučenin, jako jsou aldehydy a ketony s krátkým řetězcem.

Olej získaný z pražených dýňových semen je jedinečným složením mastných kyselin, vitamínů (zejména vitamínu E), minerálů, fytosterolů, pigmentů, derivátů pyrazinu (aroma) a fenolických látek. Vědci ze Slovinska a Itálie [68] identifikovali v pražených **dýňových semenech** odrůdy „*Slovenska golica*“ kromě skvalenu, sterolů,  $\delta$ -tokoferolu a  $\gamma$ -tokoferolu dvě doposud neregistrované sloučeniny. Interpretací jejich MS spekter bylo zjištěno, že se jedná o „nové“ izomery vitamínu E, konkrétně o  $\alpha$ -tokomonoenol a  $\gamma$ -tokomonoenol s dvojnou vazbou v postranním řetězci mezi 11. a 12. uhlíkem. Jejich obsah i obsah dalších identifikovaných sloučenin byl stanoven metodou HPLC-MS. Obsah  $\gamma$ -tokoferolu byl podstatně vyšší (586  $\mu\text{g/g}$ ) než  $\alpha$ -tokoferolu (78  $\mu\text{g/g}$ ). Obsah nových izomerů vitamínu E,  $\alpha$ -tokomonoenolu a  $\gamma$ -tokomonoenolu, byl 17,6  $\mu\text{g/g}$  a 118,7  $\mu\text{g/g}$ .

Strom **mongongo** (*Schinziophyton rautanenii*) roste na území Namibie, Angoly, Jihoafrické republiky, Botswany a Zambie. **Ořechy** z tohoto stromu jsou důležitým zdrojem potravy pro část obyvatelstva afrického kontinentu. V publikaci z roku 2018 [72] autoři popisují



vliv extrakce na obsah tokoferolů. Nejvíce tokoferolů bylo získáno Soxhletovou extrakcí (206 mg/100 g), nejméně lisováním za studena (137 mg/100 g). Nejzastoupenější formou vitamínu E byl  $\gamma$ -tokoferol. Tato forma tokoferolu chrání ořechy a extrahovaný olej před oxidací.

Obsah tokoferolů lze analyzovat i v matricích, které nejsou bohaté na lipidy. Skupina vědců z Korejské republiky [66] aplikovala citlivou, přesnou, rychlou a robustní metodu GC-TOF-MS na analýzu 14 lipofilních složek (tokoferoly, tokotrienoly, steroly a polykosanoly) ve vzorcích černé, červené a bílé **rýže**. Nejvíce vitamínu E obsahovala černá rýže (22,5  $\mu\text{g/g}$ ). Nejzastoupenější formou ve všech kultivarech byl  $\alpha$ -tokoferol. Získaná data byla podrobena analýze hlavních komponent (PCA), kde byla prokázána korelace mezi obsahem vitamínu E a obsahem polykosanolů. Ve vzorcích barevné rýže (černé a červené) bylo více tokoferolů a méně polykosanolů, kdežto u bílé rýže tomu bylo naopak. Polykosanoly stejně jako tokoferoly snižují hladinu LDL cholesterolu v krvi a zvyšují hladinu HDL cholesterolu. Oktakosanol, nejhojněji zastoupený polykosanol, je pro svůj cytoprotektivní účinek považován za alternativu k aspirinu pro pacienty s podrážděním žaludku.

## 2 Experimentální část

### 2.1 Přístroje a zařízení

#### 2.1.1 Plynový chromatograf

Stanovení mastných kyselin a tokoferolů bylo provedeno na plynovém chromatografu Agilent Technologies 7890A, který byl vybaven hmotnostním spektrometrem Agilent Technologies 5977A MSD (vše Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s elektronovou ionizací a jednoduchým kvadrupólovým analyzátozem.

Pro separaci methylesterů mastných kyselin byla použita kapilární kolona TR-FAME se složením 70 % kyanopropyl polyfenylen-siloxan (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Thermo Scientific, Bellefonte, PA, USA). Pro separaci trimethylsilylesterů tokoferolů byla použita kapilární kolona SLB<sup>®</sup>-5MS s polysiloxanovou stacionární fází s 5 % fenylových a 95 % methylových skupin (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm, Supelco, Bellefonte, PA, USA).

#### 2.1.2 Další zařízení

- analytické váhy KERN ABT 220-4M (Kern & Sohn, Balingen, Německo)
- ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex RK 52 (Bandelin, Berlín, Německo)
- minitřepačka VORTEX 1 (IKA, Staufen, Německo)
- odstředivka NF 400 (Nüve, Ankara, Turecko)
- sušárna Memmert UM300 (Memmert, Schwabach, Německo)
- blokový termostat IKA 1 (IKA, Staufen, Německo)
- automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko)
- stříkačkové filtry, PTFE, průměr 25 mm, pórovitost 0,45 μm (Labicom, Olomouc, ČR)
- běžné laboratorní sklo a pomůcky

### 2.2 Chemikálie a standardní látky

#### 2.2.1 Chemikálie

- helium 5.0 (Linde Gas, Praha, Česká republika)
- destilovaná voda filtrovaná (Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR)
- *n*-hexan ≥ 98 % (Merck, Darmstadt, Německo)
- methanol ≥ 99,9 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- ethanol, 96 % (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- hydroxid draselný, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

- chlorid sodný, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- methanolát sodný, 95 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- pyridin  $\geq 99,5$  % (Penta, Praha, ČR)
- BHT  $\geq 99$  % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- BSTFA  $\geq 99$  % (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- BSA  $\geq 98,5$  % (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

### 2.2.2 Standardní látky

Ke stanovení mastných kyselin byl použit směsný standard Supelco 37 Component FAME Mix 10 mg/ml (Supelco, Bellefonte, PA, USA), který obsahoval 37 methylesterů těchto mastných kyselin: máselná (C4:0), kapronová (C6:0), kaprylová (C8:0), kaprinová (C10:0), undekanová (C11:0), laurová (C12:0), tridekanová (C13:0), myristová (C14:0), myristoolejová (C14:1), pentadekanová (C15:0), pentadecenová (C15:1), palmitová (C16:0), palmitoolejová (C16:1), heptadekanová (C17:0), heptadecenová (C17:1), stearová (C18:0), olejová (C18:1), elaidová (C18:1), linolová (C18:2), linolelaidová (C18:2),  $\gamma$ -linolenová (C18:3),  $\alpha$ -linolenová (C18:3), arachová (C20:0), gadolejová (C20:1), eikosadienová (C20:2), homo- $\gamma$ -linolenová (C20:3), eikosatrienová (C20:3), arachidonová (C20:4), eikosapentaenová (C20:5), heneikosanová (C21:0), behenová (C22:0), eruková (C22:1), dokosadienová (C22:2), cervonová (C22:6), trikosanová (C23:0), lignocerová (C24:0), nervonová (C24:1).

Ke stanovení tokoferolů byly použity následující standardní látky tokoferolů: ( $\pm$ )- $\alpha$ -tokoferol  $\geq 96$  % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), *rac*- $\beta$ -tokoferol, roztok v hexanu, 50 mg/ml (Supelco, Bellefonte, PA, USA), (+)- $\gamma$ -tokoferol  $\geq 96$  % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), (+)- $\delta$ -tokoferol  $\geq 90$  % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).

### 2.3 Vzorky

V této práci bylo analyzováno 25 vzorků olejů (viz Tab. 4), z čehož 20 vzorků byly olivové oleje a 5 vzorků byly oleje různého druhu. Profil mastných kyselin byl stanoven ve všech 25 vzorcích. Pro stanovení obsahu tokoferolů bylo vybráno celkem 10 vzorků – 5 olivových olejů z rozdílných zemí původu (vzorky č. 7, 8, 11, 12 a 13) a 5 olejů různého druhu (vzorky č. 21–25).

Tab. 4: Seznam vzorků olejí

č.	druh oleje	značka	země původu	popis
1	olivový	FONT OLIVA	Španělsko	extra panenský
2	olivový	Sol&Mare	Španělsko	extra panenský
3	olivový	La Española	Španělsko	extra panenský
4	olivový	Seville Premium	Španělsko	extra panenský
5	olivový	Kaufland	Španělsko	extra panenský, BIO
6	olivový	Primadonna	Španělsko	extra panenský, BIO
7	olivový	Ondoliva	Španělsko	extra panenský
8	olivový	Terra Creta	Řecko	extra panenský
9	olivový	neznámá	Řecko	blíže nespecifikovaný
10	olivový	Kamarko	Řecko	extra panenský
11	olivový	Isnardi	Itálie	extra panenský
12	olivový	neznámá	Chorvatsko	blíže nespecifikovaný
13	olivový	Alnatura	Tunisko	extra panenský
14	olivový	Terra Delyssa	Tunisko	extra panenský
15	olivový	Due De Coeur	Řecko + Španělsko	extra panenský
16	olivový	Monini	směs ze zemí EU	extra panenský
17	olivový	Kaiser Franz Josef	směs ze zemí EU	extra panenský
18	olivový	Colavita	směs ze zemí EU	extra panenský
19	olivový	Costa d'Oro	směs (EU i mimo EU)	extra panenský
20	olivový	Giana	Španělsko (baleno)	z pokrutin, rafinovaný
21	řepkový	VitaD'or	neuvedeno	lisovaný za studena, BIO
22	řepkový	COOP Premium	neuvedeno	blíže nespecifikovaný
23	slunečnicový	VitaD'or	neuvedeno	rafinovaný
24	lněný	VitaD'or	mimo EU	lisovaný za studena, BIO
25	kokosový	Vitasia Thai	Srí Lanka	panenský, BIO

## 2.4 Pracovní postupy

### 2.4.1 Chromatografická analýza methylesterů mastných kyselin

#### Analýza směsi standardů

Komerčně dostupný směsný standard (10 mg/ml) byl analyzován 10x zředěný. Z ploch jednotlivých methylesterů byl pro každý z nich vypočítán odezvoový faktor:

$$RF = \frac{\sum A}{A_i} \cdot \frac{m_i}{\sum m}$$

kde  $\sum A$  – suma všech ploch píků v chromatogramu,  $A_i$  – plocha píku daného methylesteru,  $m_i$  – deklarovaná hmotnost daného methylesteru (2 – 6 %),  $\sum m$  – suma všech deklarovaných hmotností (100 %).

Odezvoový faktor byl použit k výpočtu relativního procentuálního zastoupení mastných kyselin ve vzorcích:

$$rel. \% = RF \cdot \frac{A_i}{\sum A} \cdot 100$$

#### Příprava 0,25M methanolického roztoku methanolátu sodného

1,35 g methanolátu sodného bylo rozpuštěno v methanolu. Tento roztok byl kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky, která poté byla doplněna po rysku.

#### Příprava nasyceného roztoku NaCl

36 g chloridu sodného bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody.

#### Příprava derivátů

Do vialky bylo naváženo 20 mg oleje a následně napipetováno 1,5 ml 0,25 M methanolického roztoku methanolátu sodného. Vialka byla uzavřena, protřepána a následně ponechána v sušárně při 65 °C po dobu 10 minut. Po vytemperování na laboratorní teplotu byl přidán 1 ml nasyceného roztoku chloridu sodného a 2 ml hexanu. Směs byla opět důkladně protřepána. Po oddělení dvou fází byla horní hexanová vrstva odpipetována a přefiltrována přes stříkačkový filtr do vialky pro GC-MS analýzu. Z každého vzorku byly připraveny dva deriváty a každý z nich byl dvakrát analyzován.

#### Chromatografické podmínky

Před vlastní analýzou vzorků byla provedena optimalizace metody. Optimální podmínky chromatografické analýzy methylesterů jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Podmínky chromatografické analýzy methylesterů mastných kyselin

<b>kolona</b>	TR-FAME (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm)		
<b>mobilní fáze a její průtok</b>	helium, 1,2 ml/min		
<b>objem nástřiku a splitovací poměr</b>	1 μl, 10:1		
<b>teplota nástřiku</b>	250 °C		
<b>teplotní program</b>	nárůst [°C/min]:	teplota [°C]:	zdržení [min]:
	0	70	3,5
	90	160	2
	5	200	1
	2,5	230	2
<b>podmínky MS s EI ionizací</b>	skenovací rozsah: $m/z$ 50 – 500 EI: 70 eV gain faktor: 15,00 izolační šířka: $m/z$ 0,1 frekvence skenování: 10,9 skenů/s teplota převodníku GC-MS: 235 °C teplota EI zdroje: 230 °C teplota kvadrupólu: 150 °C		

#### 2.4.2 Chromatografická analýza tokoferolů

##### Příprava zásobních roztoků standardů a kalibrační řady

Pro kvantitativní stanovení tokoferolů v olejích bylo použito metody kalibrační přímky, jejíž rozsah byl 5 – 100 μg/ml. Zásobní roztoky α-tokoferolu a δ-tokoferolu o koncentraci 10 mg/ml byly připraveny navážením 100 mg příslušného standardu do 10ml odměrné baňky, rozpuštěním v hexanu a doplněním odměrné baňky po rysku. Zásobní roztok γ-tokoferolu o koncentraci 10 mg/ml byl připraven rozpuštěním 25 mg standardu ve 2,5 ml hexanu a zásobní roztok β-tokoferolu o koncentraci 500 μg/ml byl připraven napipetováním 100 μl standardního roztoku (50 mg/ml) do 10ml odměrné baňky a doplněním baňky po rysku.

Ze zásobních roztoků byl připraven směsný pracovní roztok o koncentraci 100 µg/ml, který byl zároveň nejvyšším bodem kalibrační řady. Postupným ředění tohoto pracovního roztoku bylo připraveno dalších 5 roztoků kalibrační řady.

#### Derivatizace směsi standardů

1 ml roztoku každého bodu kalibrační řady byl převeden do tmavé vialky o objemu 1,5 ml a následně bylo přidáno 50 µl pyridinu a 50 µl derivatizačního činidla BSTFA. Derivatizační směs byla ponechána v sušárně při 60 °C po dobu 30 minut. Každý bod kalibrační řady byl dvakrát derivatizován a každý derivát byl dvakrát analyzován.

#### Příprava 2M ethanolického roztoku KOH s 1 % BHT

22,44 g hydroxidu draselného a 2 g BHT bylo rozpuštěno v ethanolu s pomocí ultrazvukové lázně. Vzniklý roztok byl kvantitativně převeden do 200ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

#### Příprava vzorků

Do plastové zkumavky o objemu 15 ml byly napipetovány 2 ml oleje, které dále byly smíseny s 10 ml 2M ethanolického roztoku KOH s 1 % BHT (zmýdelňovací roztok). Zkumavka byla vortexována 1 minutu a následně ponechána v sušárně při 50 °C 60 minut. Během procesu zmýdelnění byla směs protřepána každých 15 minut. K roztoku po zmýdelnění bylo přidáno 5 ml destilované filtrované vody a 5 ml hexanu. Vzniklá směs byla vortexována po dobu 3 minut a následně odstředěna (3 000 ot./min, 5 minut). Horní hexanová vrstva byla odebrána do vialky a ke zbytku bylo přidáno 5 ml hexanu. Celý proces byl ještě dvakrát opakován. Jednotlivé hexanové podíly byly smíseny a odpařeny do sucha v atmosféře dusíku při 40 °C. Odpařený extrakt byl rozpuštěn v 1 ml hexanu a derivatizován stejným postupem jako kalibrační řada standardů. Derivát byl přefiltrován přes stříkačkový filtr a analyzován pomocí GC-MS. Z každého vzorku byly připraveny dva deriváty a každý z nich byl dvakrát analyzován.

#### Chromatografické podmínky

Podmínky chromatografické analýzy trimethylsilyl (TMS) derivátů tokoferolů jsou souhrnně uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6: Podmínky chromatografické analýzy trimethylsilyl derivátů tokoferolů

<b>kolona</b>	SLB <sup>®</sup> -5MS (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm)		
<b>mobilní fáze a její průtok</b>	helium; 1 ml/min		
<b>objem nástřiku a splitovací poměr</b>	1 μl, 1:1		
<b>teplota nástřiku</b>	250 °C		
<b>teplotní program</b>	nárůst [°C/min]:	teplota [°C]:	zdržení [min]:
	0	200	0
	20	290	30
<b>podmínky MS s EI ionizací</b>	skenovací rozsah: $m/z$ 50 – 550 EI: 70 eV gain faktor: 15,00 izolační šířka: $m/z$ 0,1 frekvence skenování: 10,9 skenů/s teplota převodníku GC-MS: 300 °C teplota EI zdroje: 300 °C teplota kvadrupólu: 150 °C		



## 3 Výsledky a diskuze

### 3.1 Chromatografická analýza mastných kyselin

Plynová chromatografie je nejčastěji využívanou technikou pro přesné a spolehlivé stanovení mastných kyselin. Klíčovým krokem stanovení je převedení mastných kyselin na methylestery. Plamenově-ionizační detektor ve spojení s plynovou chromatografií je již po mnoho let běžně využívaným detektorem pro detekci methylesterů mastných kyselin. Jeho nevýhodou však je nedostatek informací o struktuře analyzované látky. Proto je značně výhodnější využít hmotnostního spektrometru, který kromě retenčních časů nabízí hmotnostní spektra, která po správné interpretaci slouží k identifikaci mastných kyselin ve vzorku. V této práci byly nejprve optimalizovány chromatografické podmínky, které následně byly aplikovány na 25 vzorků olejů.

#### 3.1.1 Optimalizace chromatografické metody

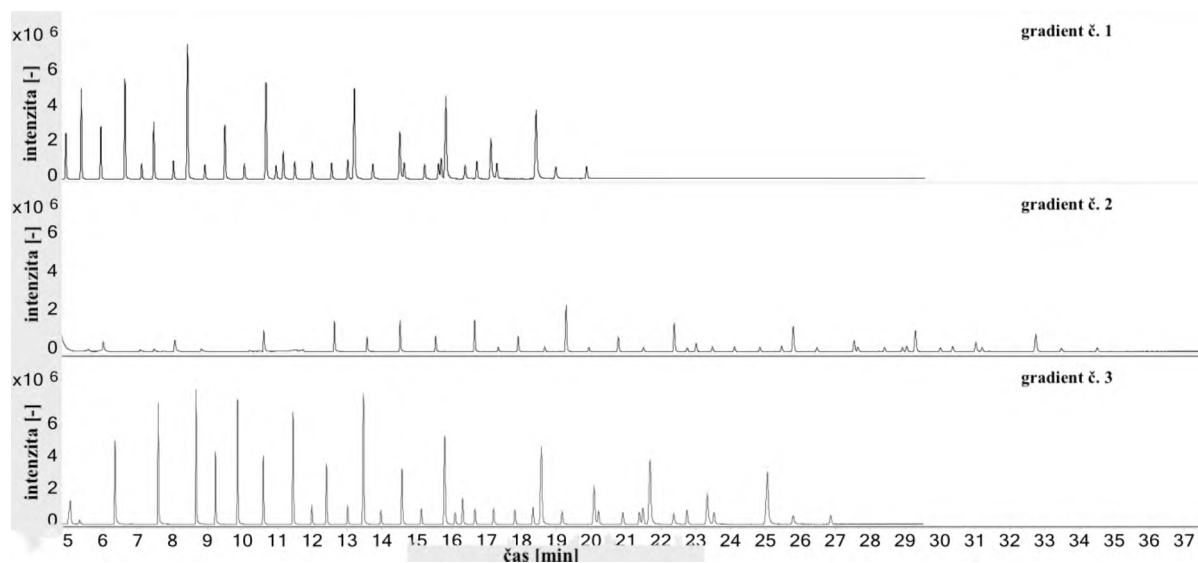
Optimalizace GC-MS metody pro stanovení mastných kyselin byla provedena s desetkrát zředěnou standardní směsí Supelco 37 Component FAME Mix, která obsahovala 37 methylesterů mastných kyselin o délce řetězce od 4 do 24 uhlíků s různým stupněm nenasycenosti. Byl optimalizován teplotní program separace, průtok mobilní fáze a splitovací poměr.

Při optimalizaci **teplotního programu** separace byl nejprve zvolen teplotní program (gradient č. 1) dle M. Hodese [74], který se ve své diplomové práci rovněž věnoval analýze methylesterů mastných kyselin pomocí techniky GC-MS. Aplikací tohoto gradientu však nebyla zajištěna úplná separace všech methylesterů. Porovnáním získaných hmotnostních spekter analyzovaných látek s knihovnou spekter NIST (National Institute of Standards and Technology) bylo zjištěno, že první eluovanou látkou byl methylester kyseliny undekanové, tudíž chyběly píky kyseliny máselné, kapronové, kaprylové a kaprinové. Z tohoto důvodu byl zvolen teplotní program s počáteční teplotou 70 °C (gradient č. 2). Při aplikaci tohoto gradientu bylo dostatečně separováno všech 37 methylesterů. Pro urychlení separace byl nakonec ještě vyzkoušen teplotní program (gradient č. 3) se čtyřmi kroky. Tento program se z hlediska doby analýzy jevil nejlépe, a proto byl zvolen pro analýzu standardů i vzorků. Hodnoty pro jednotlivé gradienty jsou uvedeny v Tab. 7, jejich grafické znázornění je v příloze.

Tab. 7: Teplotní gradienty při optimalizaci teplotního programu

	nárůst [°C/min]	teplota [°C]	zdržení [min]
<b>gradient č. 1</b>	0	160	0
	4	235	2
	50	250	8,5
<b>gradient č. 2</b>	0	70	5
	15	160	0
	3	240	0
<b>gradient č. 3</b>	0	70	3,5
	90	160	2
	5	200	1
	2,5	230	2

Porovnání vlivu jednotlivých teplotních gradientů na separaci methylesterů je zobrazeno na Obr. 11.

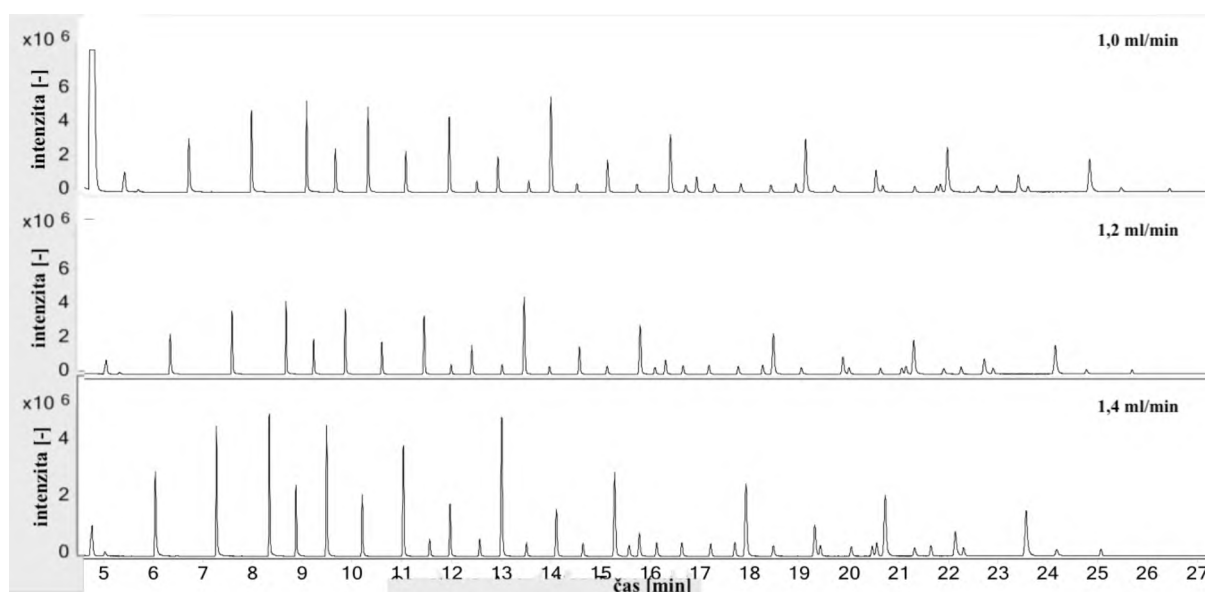


Obr. 11: Separace methylesterů při optimalizaci teplotního programu

Chromatografické podmínky – kolona TR-FAME (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1,2 ml/min, nástřik: 1 μl, splitovací poměr: 5:1 pro 1. a 3. chromatogram, 10:1 pro 2. chromatogram, teplota nástřiku: 250 °C, teplotní program: gradient č. 1 (160 – 250 °C), gradient č. 2 (70 – 240°C), gradient č. 3 (70 – 230°C), teplota EI zdroje: 230 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C.

Popsaná **optimalizace průtoku mobilní fáze** a dávkování probíhala při teplotním gradientu č. 3. Postupně byly aplikovány tyto hodnoty průtoku mobilní fáze: 1,0 ml/min, 1,2 ml/min a 1,4 ml/min. Již při průtoku 1,0 ml/min byly píky rozděleny uspokojivě, a to

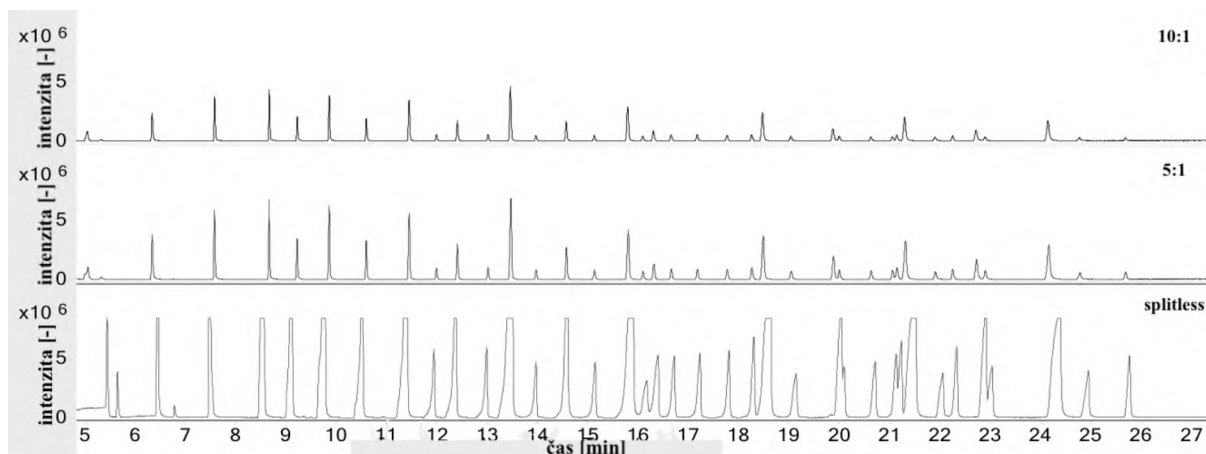
za zhruba 26,5 min. Při aplikaci průtoku 1,2 ml/min se píky rozdělily za 26 min a při navýšení průtoku na 1,4 ml/min již za 25 min. Z toho plyne, že čím vyšší průtok, tím kratší doba analýzy. Proto z hlediska zkrácení doby analýzy se jako nejlepší jevil průtok 1,4 ml/min. Při prostudování manuálu však bylo zjištěno, že průtoky helia vyšší než 1,3 ml/min nejsou vhodné pro použitou kolonu, proto byl zvolen průtok 1,2 ml/min. Porovnání vlivu průtoku na separaci je zobrazeno na Obr. 12.



Obr. 12: Separace methylesterů při optimalizaci průtoku

*Chromatografické podmínky – kolona TR-FAME (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1,0 ml/min, 1,2 ml/min, 1,4 ml/min, nástřik: 1 μl, splitovací poměr: 5:1, teplota nástřiku: 250 °C, teplotní program: 70–235 °C, teplota EI zdroje: 230 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C.*

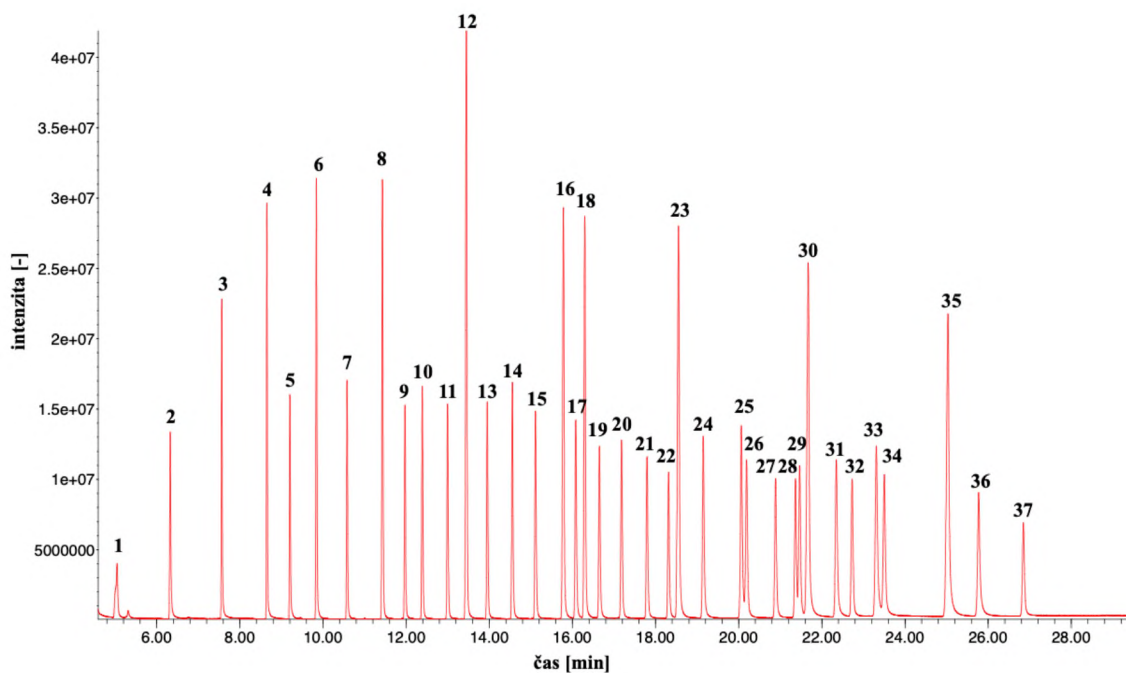
Pro **optimalizaci dávkování** byly také vyzkoušeny dva různé splitovací poměry, konkrétně 10:1 a 5:1. Bylo také vyzkoušeno dávkování v režimu splitless. U všech experimentů byl nastřikován objem 1 μl. Při srovnání chromatogramů (Obr. 13) je patrné, že snížením splitovacího poměru dochází ke zvětšení píků. U dávkování v režimu splitless došlo k přetížení kolony a detektoru, tudíž i k deformaci píků. Pro reálné vzorky byl rovněž nejprve aplikován splitovací poměr 10:1. Při tomto dávkování byly píky dostatečně rozděleny. Následně byl použit splitovací poměr 5:1, toto dávkování však nebylo vhodné, jelikož píky byly „useknuté“. Jako nejvhodnější proto bylo zvoleno dávkování se splitovacím poměrem 10:1, které bylo aplikováno pro separaci standardní směsi methylesterů a vzorků.



Obr. 13: Separace methylesterů při optimalizaci dávkování

*Chromatografické podmínky – kolona TR-FAME (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1,2 ml/min, nástřik: 1 μl, splitovací poměr: 10:1, 5:1, splitless, teplota nástřiku: 250 °C, teplotní program: 70 – 235 °C, teplota EI zdroje: 230 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C.*

Nejlépe se methylestery rozdělávaly při následujících podmínkách. Separace probíhala na koloně TR-FAME (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), mobilní fází bylo helium s průtokem 1,2 ml/min. Teplota nástřiku byla nastavena na 250 °C, dávkován byl 1 μl ve splitovacím poměru 10:1. Teplotní program se pohyboval od 70 do 230 °C, přičemž celková doba analýzy byla 27 min. Nastavené teploty hmotnostního detektoru byly nastaveny pro EI zdroj na 230 °C, pro převodník GC-MS na 235 °C a pro kvadrupól na 150 °C. Byly sledovány píky v rozsahu  $m/z$  50 – 500. Při použití těchto podmínek dochází k separaci methylesterů mastných kyselin, tak jak je uvedeno na následujícím Obr. 14, kdy první separovanou látkou byl methylester kyseliny máselné (pík č. 1), dále následují zbývající methylestery mastných kyselin. Pík rozpouštědla (hexanu) není v chromatogramu zobrazen, jelikož byla využita funkce solvent delay (4,5 min), která chrání vlákno (katodu) před účinky vysokých koncentrací par rozpouštědla v iontovém zdroji.



Obr. 14: Separace methylesterů při použití optimalizovaných podmínek

Chromatografické podmínky: kolona TR-FAME (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1,2 ml/min, nástřik: 1 μl, splitovací poměr: 10:1, teplota nástřiku: 250 °C, teplotní program: 70 – 230 °C, teplota EI zdroje: 230 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C.

Kyseliny: máselná (1), kapronová (2), kaprylová (3), kaprinová (4), undekanová (5), laurová (6), tridekanová (7), myristová (8), myristoolejová (9), pentadekanová (10), pentadecenová (11), palmitová (12), palmitoolejová (13), heptadekanová (14), heptadecenová (15), stearová (16), elaidová (17), olejová (18), linolelaidová (19), linolová (20), γ-linolenová (21), α-linolenová (22), arachová (23), gadolejová (24), heneikosanová (25), eikosadienová (26), homo-γ-linolenová (27), eikosatrienová (28), arachidonová (29), behenová (30), eruková (31), eikosapentaenová (32), trikosanová (33), dokosadienová (34), lignocerová (35), nervonová (36), cervonová (37).

### 3.1.2 Chromatografické charakteristiky methylesterů mastných kyselin

Pro jednotlivé methylestery byly stanoveny meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Tyto meze jsou závislé na citlivosti metody, tj. na strmosti kalibrační závislosti, a především na chybě měření. Chyba měření může být reprezentována směrodatnou odchylkou nebo šumem, což je časová fluktuace měřeného signálu v nepřítomnosti analytu [75]. Mez detekce je taková koncentrace analytu, která způsobí změnu měřeného signálu v rozsahu trojnásobku výšky šumu základní linie ( $h_{\xi}$ ):

$$LOD = 3 \cdot h_{\xi}$$

Mez stanovitelnosti je taková koncentrace analytu, která způsobí změnu měřeného signálu v rozsahu desetinásobku výšky šumu:

$$LOQ = 10 \cdot h_{\xi}$$

Dále byl také stanoven odezvový faktor (RF), což je poměrná hodnota mezi signálem produkovaným analytem a množstvím analytu, který produkuje signál. Odezvový faktor byl použit k výpočtu relativního procentuálního zastoupení mastných kyselin ve vzorku. Vzorec pro výpočet tohoto faktoru je uveden v kapitole 2.4.1.

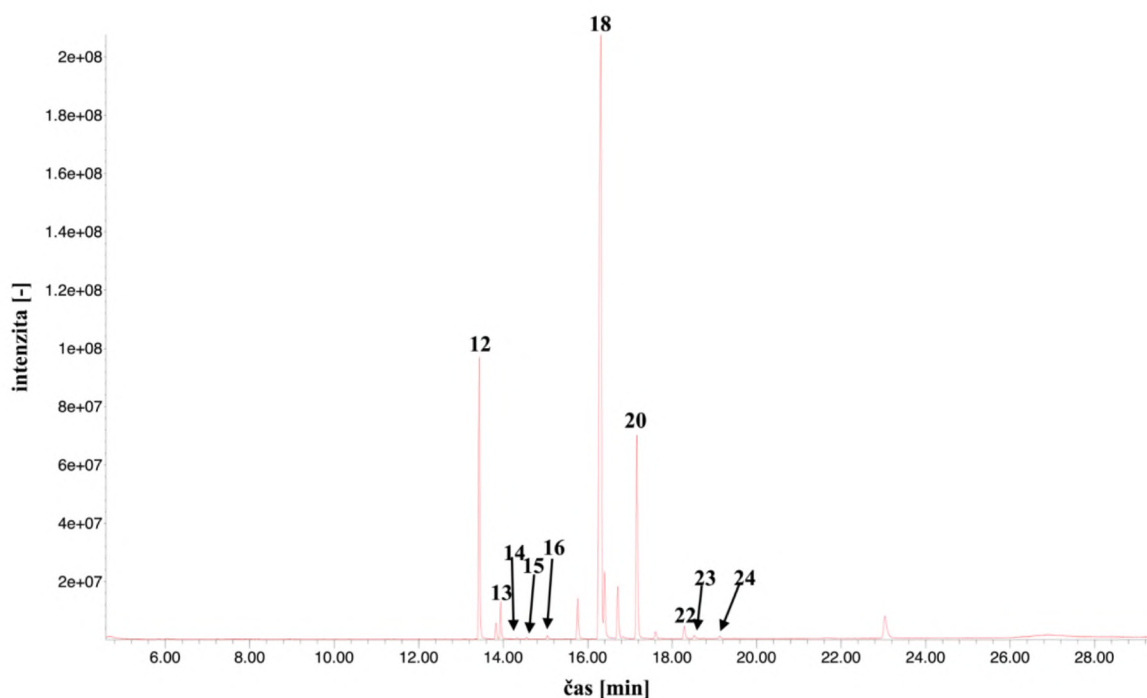
Seznam analyzovaných methylesterů příslušné mastné kyseliny spolu s retenčním časem ( $t_R$ ), sumárním vzorcem, molekulovou hmotností methylesteru ( $M_{FAME}$ ), odezovým faktorem (RF), mezí detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) jsou uvedeny v Tab. 8. Poslední pík, tj. methylester kyseliny cervonové, eluoval v retenčním čase 26,80 min, doba analýzy tedy byla do 27 minut. Hodnoty odezového faktoru byly kolem 1, výjimkou je však methylester kyseliny máselné, kterému náleží odezový faktor roven 4,67. To je také patrné z chromatogramu Obr. 14, kde pík tohoto methylesteru je podstatně nižší. Mez detekce byla nejvyšší pro kyselinu máselnou, a to 1,13  $\mu\text{g/ml}$ , což souvisí s hodnotou odezového faktoru. Pro ostatní methylestery byly hodnoty mezí detekce nižší, pohybovaly se od 0,25 do 0,63  $\mu\text{g/ml}$ .

Tab. 8: Charakteristiky methylesterů mastných kyselin ve standardní směsi

č. píku	t <sub>R</sub> [min]	vzorec	název	M <sub>FAME</sub>	RF	LOD [μg/ml]	LOQ [μg/ml]
1	5,02	C4:0	máselná	102	4,67	1,13	3,75
2	6,31	C6:0	kapronová	130	2,41	0,63	2,10
3	7,56	C8:0	kaprylová	158	1,69	0,37	1,23
4	8,64	C10:0	kaprinová	186	1,43	0,28	0,95
5	9,20	C11:0	undekanová	200	1,24	0,26	0,88
6	9,83	C12:0	laurová	214	1,22	0,27	0,89
7	10,57	C13:0	tridekanová	228	1,09	0,25	0,82
8	11,41	C14:0	myristová	242	1,10	0,27	0,90
9	11,96	C14:1	myristoolejová	240	1,10	0,28	0,92
10	12,37	C15:0	pentadekanová	256	0,99	0,25	0,85
11	12,98	C15:1	pentadecenová	254	1,06	0,27	0,91
12	13,42	C16:0	palmitová	270	1,01	0,30	0,99
13	13,94	C16:1	palmitoolejová	268	1,00	0,27	0,91
14	14,54	C17:0	heptadekanová	284	0,87	0,25	0,83
15	15,09	C17:1	heptadecenová	282	0,96	0,28	0,95
16	15,75	C18:0	stearová	298	0,85	0,29	0,96
17	16,05	C18:1	elaidová	296	0,91	0,30	0,99
18	16,26	C18:1	olejová	296	0,89	0,29	0,98
19	16,62	C18:2	linolelaidová	294	1,04	0,34	1,14
20	17,15	C18:2	linolová	294	0,98	0,33	1,10
21	17,77	C18:3	γ-linolenová	292	1,07	0,37	1,22
22	18,28	C18:3	α-linolenová	292	1,17	0,40	1,35
23	18,51	C20:0	arachová	326	0,71	0,30	1,00
24	19,11	C20:1	gadolejová	324	0,82	0,33	1,09
25	20,02	C21:0	heneikosanová	340	0,77	0,31	1,02
26	20,15	C20:2	eikosadienová	322	0,88	0,37	1,24
27	20,85	C20:3	homo-γ-linolenová	320	1,07	0,42	1,42
28	21,33	C20:3	eikosatrienová	320	1,15	0,42	1,41
29	21,43	C20:4	arachidonová	318	0,95	0,39	1,30
30	21,61	C22:0	bhenová	354	0,64	0,33	1,11
31	22,30	C22:1	eruková	352	0,81	0,38	1,25
32	22,69	C20:5	eikosapentaenová	316	1,00	0,43	1,43
33	23,26	C23:0	trikosanová	368	0,69	0,35	1,15
34	23,45	C22:2	dokosadienová	350	0,75	0,42	1,39
35	24,97	C24:0	lignocerová	382	0,66	0,39	1,31
36	25,72	C24:1	nervonová	380	0,84	0,48	1,59
37	26,80	C22:6	cervonová	342	1,34	0,63	2,11

### 3.1.3 Obsah mastných kyselin ve vzorcích

Mastné kyseliny byly analyzovány ve 25 vzorcích olejů, z čehož dvacet byly olivové oleje z různých zemí původu. Zbývajících pět vzorků byly oleje různého druhu, konkrétně dva řepkové, jeden slunečnicový, jeden lněný a jeden kokosový olej. Mastné kyseliny v olejích bylo nutné převést na methylestery. Postup přípravy derivátů je popsán v kapitole 2.4.1. Vzorky byly analyzovány za stejných chromatografických podmínek jako směs standardů. Methylestery byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů a dále také porovnáním hmotnostních spekter s knihovnou spekter NIST. Relativní procentuální zastoupení mastných kyselin ve vzorcích bylo vypočítáno pomocí příslušných odezvových faktorů. Chromatogramy všech vzorků olivového oleje byly v podstatě identické, typický chromatogram olivového oleje (vzorek č. 3) je zobrazen na Obr. 15. Chromatogramy řepkového, slunečnicového, lněného a kokosového oleje jsou uvedeny v příloze.



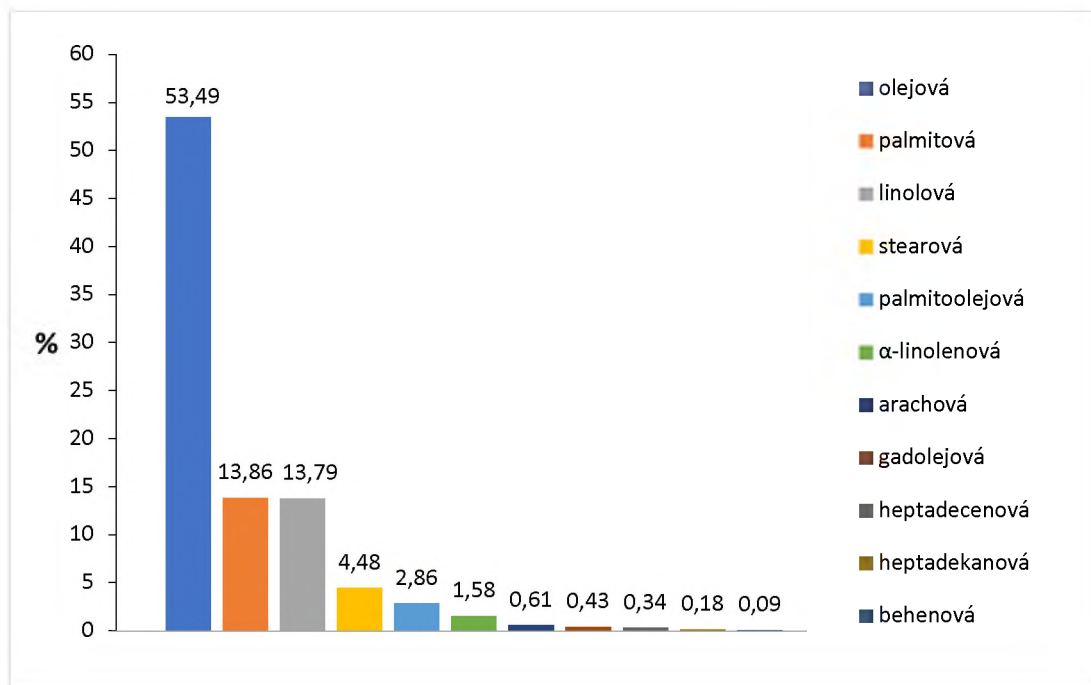
Obr. 15: Typický chromatogram olivového oleje

*Chromatografické podmínky: kolona TR-FAME (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1,2 ml/min, nástřik: 1 μl, splitovací poměr: 10:1, teplota nástřiku: 250 °C, teplotní program: 70 – 230 °C, teplota EI zdroje: 230 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C.*

*Kyseliny: palmitová (12), palmitolejová (13), heptadekanová (14), heptadecenová (15), stearová (16), olejová (18), linolová (20), α-linolenová (22), arachová (23), gadolejová (24).*



Ve vzorcích **olivového oleje** bylo nalezeno průměrně 10 různých mastných kyselin. Ve vzorku č. 1 původem ze Španělska bylo obsaženo celkem 17 mastných kyselin, což představovalo maximum. Šest z nich však bylo pod mezí stanovitelnosti, tudíž bylo stanoveno pouze jedenáct mastných kyselin (Obr. 16).



Obr. 16: Profil mastných kyselin v olivovém oleji

Nejzastoupenější mastnou kyselinou ve vzorcích olivového oleje byla kyselina olejová v rozmezí 46,50–65,81 %, což je mononenasyčená mastná kyselina. Vůbec nejvyšší obsah kyseliny olejové měl extra panenský olivový olej původem z Řecka (vzorek č. 8), naopak nejmenší obsah měl olej z Tuniska (vzorek č. 14). Oleje, v nichž je přítomna kyselina olejová, jsou oxidačně více stabilní než oleje obsahující vyšší množství polynenasycených mastných kyselin. Druhou nejzastoupenější kyselinou byla kyselina palmitová (12,80–19,53 %), což je naopak nasycená mastná kyselina. Z polynenasycených mastných kyselin většinu tvořila kyselina linolová (6,44–20,09 %), zatímco obsah kyseliny α-linolenové se pohyboval pouze od 0,92 do 1,65 %. Dalšími významně zastoupenými kyselinami byly nasycená kyselina stearová (2,22–5,04 %) a mononenasyčená kyselina palmitoolejová (0,73–3,80 %). Obsah ostatních mastných kyselin, tj. heptadekanové, heptadecenové, elaidové, arachové, gadoolejové a behenové byl zpravidla pod 1 %. Výsledky analýzy se shodují s výsledky uvedenými v odborné literatuře [76–78].

V Tab. 9 je uveden obsah vybraných mastných kyselin ve dvaceti vzorcích olivového oleje spolu s relativní směrodatnou odchylkou (RSD), která byla vypočtena ze 4 analýz. Tyto kyseliny byly vybrány na základě toho, že se jednalo o šest nejzastoupenějších mastných kyselin v olivovém oleji.

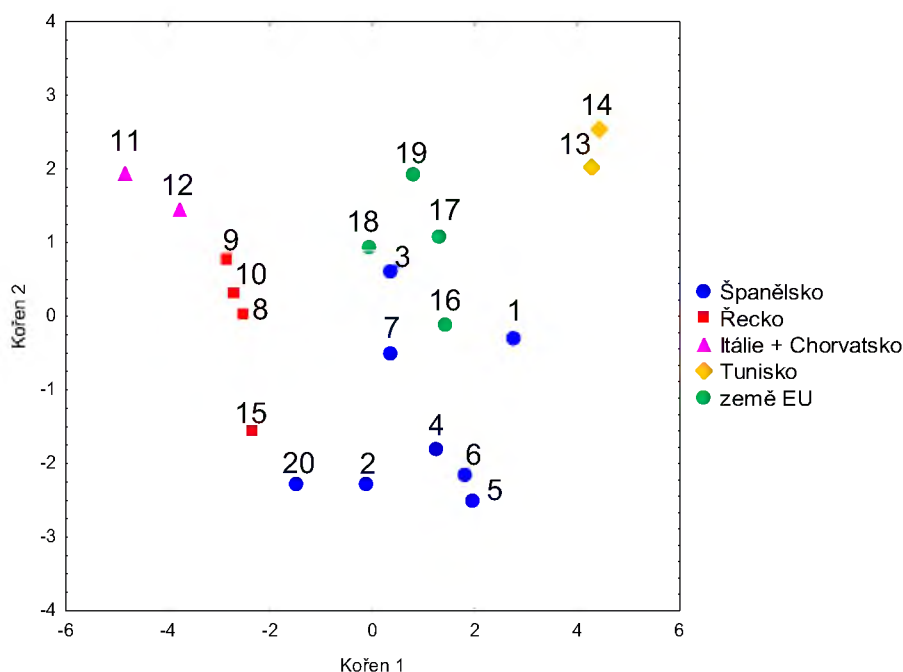
Tab. 9: Obsah majoritních mastných kyselin ve vzorcích olivového oleje

vzorek č.	olejová		palmitová		linolová		stearová		palmitoolejová		α-linolenová	
	obsah [%]	RSD [%]	obsah [%]	RSD [%]	obsah [%]	RSD [%]	obsah [%]	RSD [%]	obsah [%]	RSD [%]	obsah [%]	RSD [%]
1	53,49	0,13	13,86	1,91	13,79	0,35	4,48	4,33	2,86	2,60	1,58	0,79
2	63,89	1,30	13,47	0,85	7,79	7,00	3,19	2,93	0,95	5,40	1,13	6,87
3	54,41	0,44	17,06	0,66	14,15	0,01	2,47	3,87	2,15	3,81	1,17	2,55
4	62,78	1,41	15,40	2,53	6,44	3,07	3,38	4,77	1,61	6,23	1,11	6,58
5	54,49	0,89	18,10	0,65	12,79	0,54	2,93	3,99	2,00	4,70	1,11	4,77
6	62,08	0,31	14,80	1,12	8,34	1,83	3,03	4,04	1,17	2,08	1,21	2,43
7	61,08	0,63	15,63	1,67	7,72	0,93	3,79	1,36	1,50	3,66	1,09	1,47
8	65,81	0,14	15,06	1,99	9,91	1,57	5,04	2,82	1,76	3,82	1,44	3,30
9	52,74	0,92	15,71	1,94	17,63	0,67	2,80	4,54	1,30	8,61	1,24	4,29
10	59,71	0,15	15,07	1,46	7,53	0,87	4,41	1,77	1,73	0,20	1,50	2,28
11	63,03	0,28	13,36	1,69	9,79	0,18	2,32	1,22	0,73	0,37	1,23	0,27
12	57,06	1,39	13,45	0,51	16,07	3,96	2,28	2,69	1,17	4,59	1,11	1,74
13	47,38	2,13	16,90	2,46	16,89	3,04	4,64	1,10	3,80	2,80	1,65	2,30
14	46,50	0,27	19,53	0,01	20,09	0,05	2,22	1,93	3,21	1,19	1,11	2,05
15	61,72	0,54	13,25	1,39	12,12	0,02	2,26	4,68	0,81	2,54	0,92	2,52
16	58,66	1,61	16,84	2,79	10,44	3,63	2,40	3,02	1,75	4,76	1,08	4,77
17	64,13	0,11	12,80	0,07	6,84	0,56	3,07	2,45	2,55	2,00	1,04	0,99
18	59,98	1,16	13,78	2,30	10,18	2,93	3,26	1,53	2,00	3,08	1,26	3,28
19	54,32	1,24	16,07	1,36	14,25	1,13	3,01	3,65	2,55	7,34	1,21	4,31
20	58,36	0,75	13,22	2,13	11,88	1,97	3,63	0,52	1,41	0,47	1,22	0,73

Zastoupení mastných kyselin v olivovém oleji se mění v závislosti na zralosti oliv, zeměpisné šířce a klimatických podmínkách, z toho lze usuzovat na původ olivového oleje. Olivové oleje z Itálie, Španělska a Řecka měly vyšší obsah kyseliny olejové a nižší obsah palmitové a linolové kyseliny. U olivových olejů z Tuniska tomu bylo naopak, obsahovaly méně kyseliny olejové a více kyseliny palmitové a stearové než oleje z výše uvedených zemí, což odpovídá poznatkům z literatury [77]. Ve vzorku č. 20 byla stanovena kyselina elaidová, což je trans mastná kyselina, která má negativní zdravotní účinky. Jak uvádí výrobce, jedná se o olivový olej z pokrutin, který je směsí rafinovaného oleje z pokrutin a panenského olivového oleje. Trans mastné kyseliny se v olejích přirozeně nevyskytují, vznikají až při jejich

rafinaci. Stanovený obsah kyseliny elaidové byl 0,43 %, což o 0,03 % překračuje limit stanovený legislativou pro tento druh olivového oleje. V dalších vzorcích nebyla kyselina elaidová identifikována, což je pravděpodobně zapříčiněno tím, že se většinou jednalo o extra panenské oleje. Tento druh olivového oleje je získán z prvního lisování oliv za studena, tudíž se nerafinuje [76].

Pro zajímavost byla také provedena **diskriminační analýza** dvaceti vzorků olivových olejů pomocí softwaru STATISTICA 12. Diskriminační analýza je jednou z klasifikačních metod vícerozměrné statistické analýzy. Klasifikační metody jsou postupy, pomocí kterých se jeden objekt zařadí do jedné existující třídy. Postup klasifikace je založen na určitých předpokladech o vlastnostech klasifikovaných objektů. Diskriminační analýza zkoumá závislosti mezi skupinou nezávisle proměnných na jedné straně a jednou závisle proměnnou na straně druhé. Tato klasifikační metoda byla v této práci využita jako nástroj pro ověření hypotézy, že zeměpisný původ má vliv na složení mastných kyselin. Vzorky byly rozděleny do pěti tříd: Španělsko, Řecko, Itálie + Chorvatsko, Tunisko a země EU. Jako nezávisle proměnná byl vybrán procentuální obsah osmi mastných kyselin: olejové, palmitové, linolové, stearové, palmitolejové,  $\alpha$ -linolenové, arachové a gadolejové. Grafické znázornění diskriminační analýzy je zobrazeno na Obr. 17.



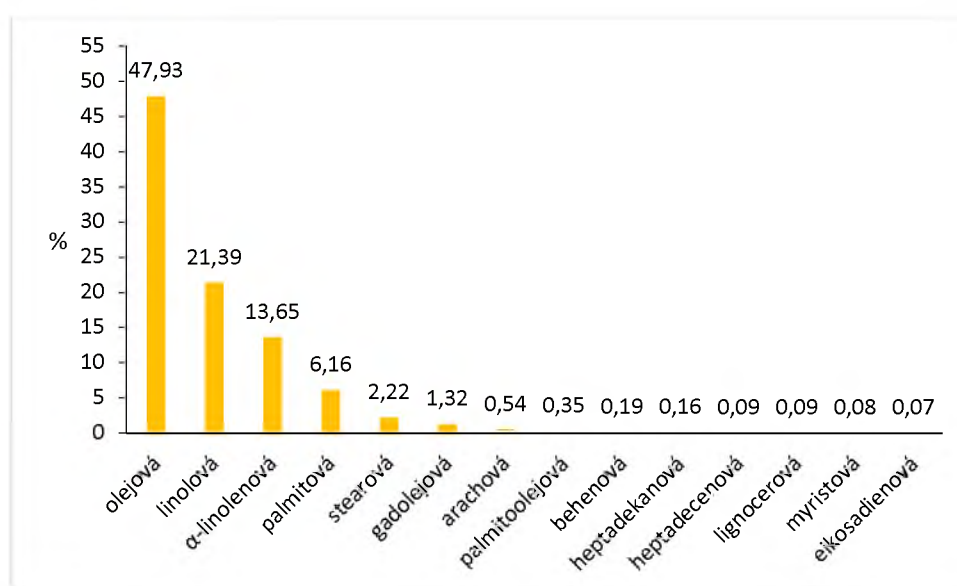
Obr. 17: Diskriminační analýza olivových olejů

Zeměpisný původ olivových olejů: 1 – Španělsko, 2 – Španělsko, 3 – Španělsko, 4 – Španělsko, 5 – Španělsko, 6 – Španělsko, 7 – Španělsko, 8 – Řecko, 9 – Řecko, 10 – Řecko, 11 – Itálie, 12 – Chorvatsko, 13 – Tunisko, 14 – Tunisko, 15 – Řecko + Španělsko, 16 – země EU, 17 – země EU, 18 – země EU, 19 – země EU i mimo EU, 20 – Španělsko (baleno)

Jak je patrné z výše uvedeného obrázku, jednotlivé vzorky vytvořily shluky na základě zeměpisného původu. Olivové oleje ze Španělska a ze zemí EU jsou členové jedné skupiny, na základě toho lze usuzovat, že majoritní část směsných olejů tvoří španělské oleje. Vzorek č. 19 je dle údajů na obale tvořen směsí olejů ze zemí EU i mimo EU, což potvrzuje i diskriminační analýza, pravděpodobně se jedná o směs olivového oleje ze Španělska a olivového oleje z Tuniska, Itálie nebo Chorvatska. Na obalu vzorku č. 20 je uvedena informace, že olivový olej je balen ve Španělsku, země původu však nebyla uvedena. Na základě diskriminační analýzy lze však předpokládat, že se jedná o španělský olivový olej. Olivové oleje třídy Řecko rovněž vytvořily shluk. Bod reprezentující vzorek č. 15 je však odlehlejší od ostatních tříd, dle výrobce se jedná o směs řeckého a španělského oleje, což opět potvrzují výsledky diskriminační analýzy. Olivový olej původem z Chorvatska (vzorek č. 12) byl složením mastných kyselin nejvíce podobný olivovému oleji z Itálie (vzorek č. 11). Velmi významně se odlišovaly olivové oleje z Tuniska, což může být zapříčiněno poměrně nízkým obsahem kyseliny olejové oproti ostatním vzorkům. Aplikací diskriminační analýzy na získaná data bylo prokázáno, že vybrané nezávisle proměnné, tj. procentuální obsah mastných kyselin, mají vliv na rozdělení olivových olejů do tříd dle zeměpisného původu.

V práci bylo také analyzováno pět olejů různého druhu, které se běžně využívají v české kuchyni. Konkrétně se jednalo o dva řepkové oleje, jeden běžné kvality a druhý v BIO kvalitě, jeden slunečnicový, jeden lněný a jeden kokosový olej. Účelem analýzy bylo porovnání profilů mastných kyselin.

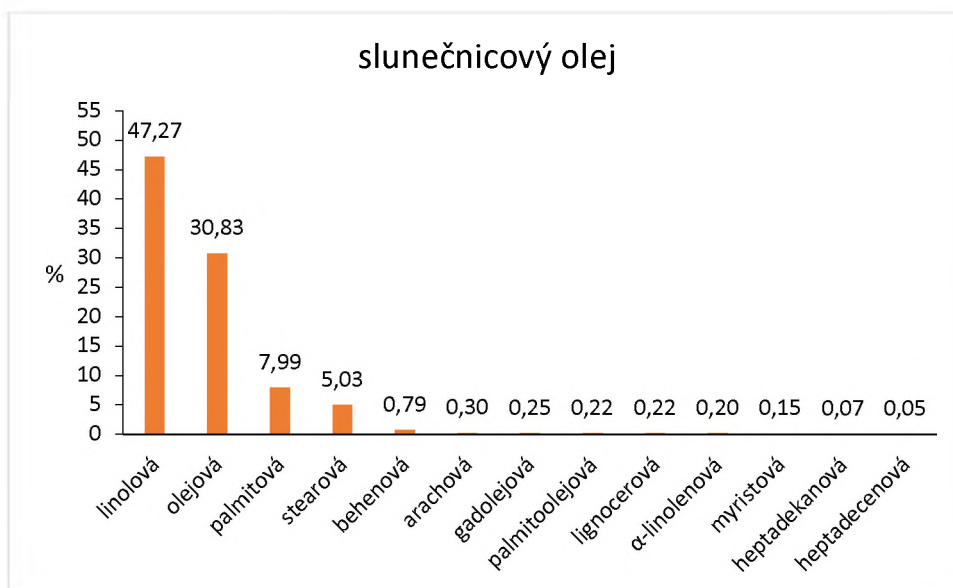
Zastoupení mastných kyselin v řepkovém oleji (vzorek č. 21) je zobrazeno na Obr. 18.



Obr. 18: Profil mastných kyselin v řepkovém oleji

Oba vzorky **řepkového oleje** obsahovaly, stejně jako olivový olej, nejvíce kyseliny olejové (47,93 a 49,27 %) a kyseliny linolové (21,39 a 20,64 %). Třetí nejzastoupenější však byla kyselina  $\alpha$ -linolenová, známá také jako  $\omega$ -3 esenciální mastná kyselina, s obsahem 13,65 a 12,13 %. Za kyseliny s významným zastoupením lze také považovat kyselinu palmitovou (6,16 a 6,15 %), stearovou (2,22 a 2,26 %) a gadolejovou (1,32 a 1,44 %). Řepkový olej je výhodný z nutričního hlediska pro svůj nízký obsah nasycených mastných kyselin (pod 10 %). Nadměrný příjem nasycených mastných kyselin totiž přispívá k riziku srdečního onemocnění. Olej, který se získává ze semen řepky olejné, je také upřednostňován kvůli vyváženému poměru  $\omega$ -6 a  $\omega$ -3 mastných kyselin (2:1) [77]. Řepkový olej jako jediný z analyzovaných vzorků obsahoval kyselinu erukovou, která má stejně jako trans mastné kyseliny nepříznivý vliv na zdraví člověka. Norma Codex Alimentarius stanovuje, že nízkoerukový řepkový olej nesmí obsahovat více než 2 % kyseliny erukové z veškerého množství obsažených mastných kyselin [79]. U vzorku č. 22 byla její hodnota stanovena na 0,09 %, u vzorku č. 21 bylo množství kyseliny erukové pod mezí stanovitelnosti.

Obr. 19 ukazuje celkové zastoupení mastných kyselin ve vzorku slunečnicového oleje.

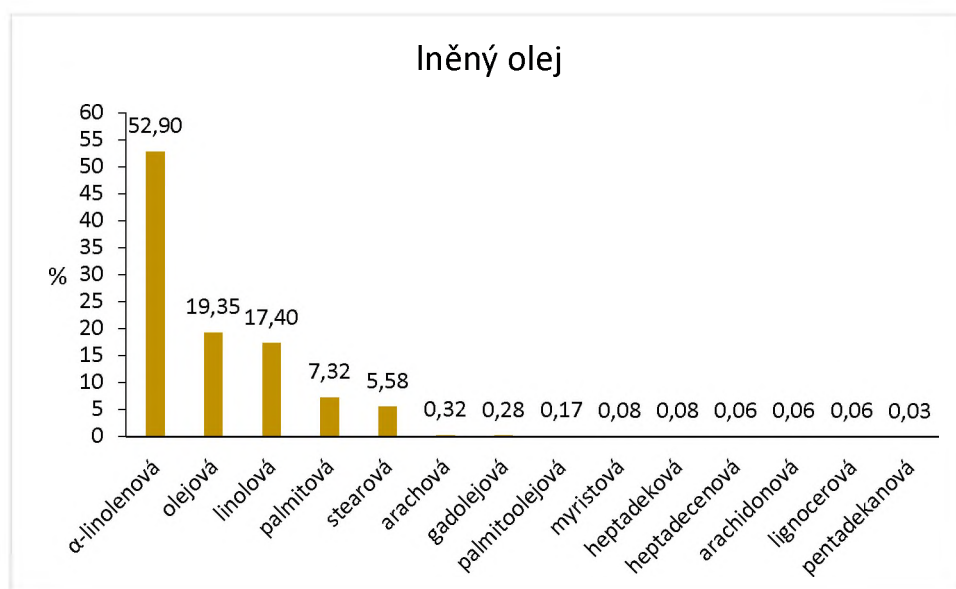


Obr. 19: Profil mastných kyselin ve slunečnicovém oleji

Ve **slunečnicovém oleji** byla přednostně zastoupena kyselina linolová (47,27 %). Kyselina olejová, která u olivového a řepkového oleje dominuje, byla až druhou majoritní mastnou kyselinou (s obsahem 30,83 %). V praxi se vyrábí několik typů slunečnicového oleje, s vysokým obsahem kyseliny linolové a s vysokým nebo středním obsahem kyseliny olejové. Prostudováním odborné literatury bylo zjištěno, že tento vzorek splňuje parametry

slunečnicového oleje se středním obsahem kyseliny olejové. Ve větším množství byly v tomto oleji přítomny také nasycené mastné kyseliny, konkrétně kyselina palmitová (7,99 %) a stearová (5,03 %).

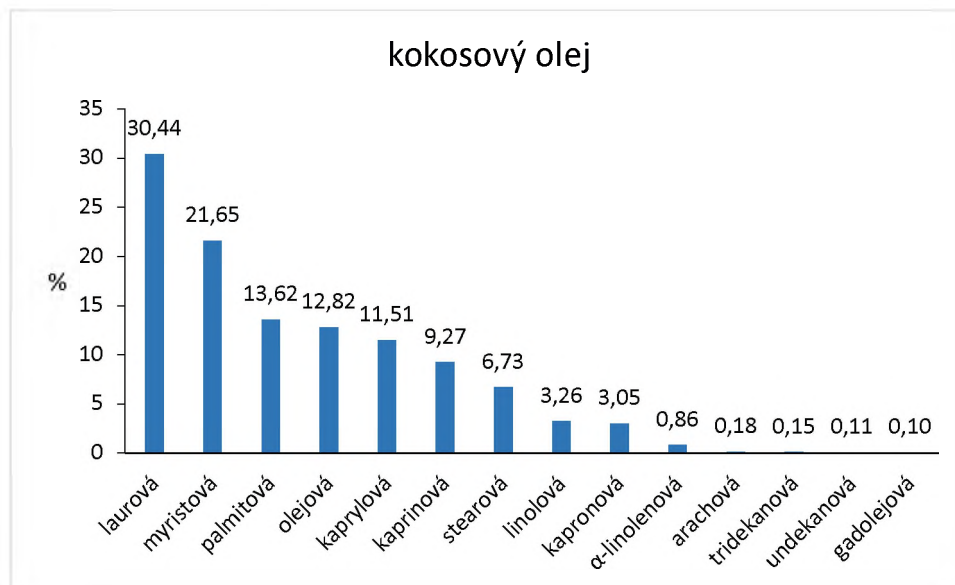
Profil mastných kyselin lněného oleje je znázorněn na Obr. 20.



Obr. 20: Profil mastných kyselin ve lněném oleji

**Lněný olej** vyrobený lisováním za studena se vyznačoval vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin (70,35 %), a to zejména kyseliny α-linolenové, která tvořila více než polovinu všech mastných kyselin (52,90 %). Nicméně vysoký obsah této zdraví prospěšné kyseliny způsobuje sníženou oxidační stabilitu oleje. Olej by proto měl být skladován v chladu, temnu a nejlépe bez přístupu kyslíku. Další obsaženou polynenasycenou mastnou kyselinou je kyselina linolová (17,40 %). Lněný olej obsahoval také mononenasycenou kyselinu olejovou (19,35 %) a nasycené mastné kyseliny, kyselinu palmitovou (7,32 %) a stearovou (5,58 %).

Obsah mastných kyselin v kokosovém oleji je graficky zobrazen na Obr. 21.



Obr. 21: Profil mastných kyselin v kokosovém oleji

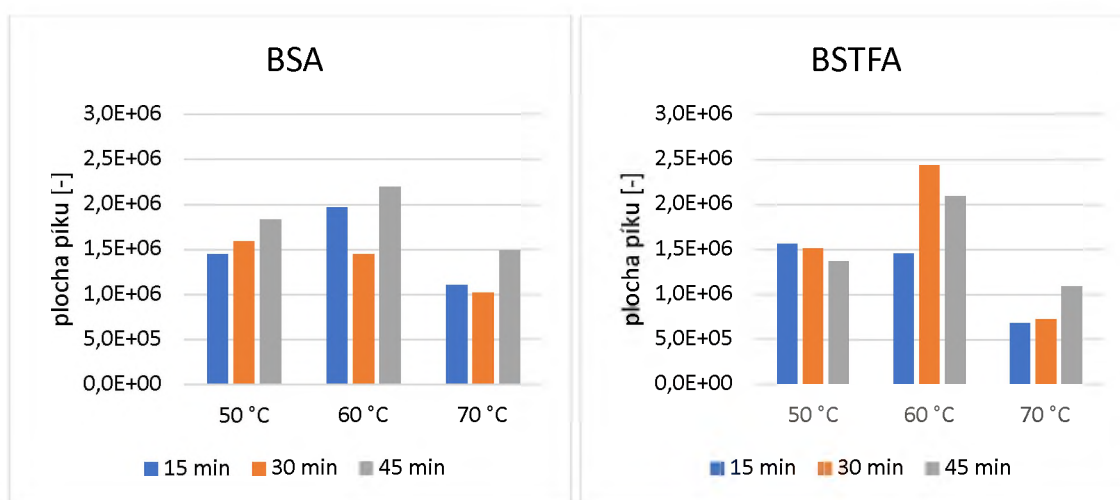
Panenský **kokosový olej** se vyznačoval vysokým obsahem nasycených mastných kyselin s kratším řetězcem (C6:0 až C16:0), čímž se odlišuje od všech ostatních analyzovaných vzorků. Vzorek obsahoval 30,44 % kyseliny laurové, což je méně, než uvádí literatura [55, 77, 79]. Dále byla hojně zastoupena kyselina myristová (21,65 %) a palmitová (13,62 %), což jsou naopak vyšší obsahy, než je uvedeno v literatuře [55, 79]. Díky vysokému obsahu nasycených mastných kyselin je kokosový olej oxidativně velmi stabilní. Nicméně nelze ho doporučit ke každodenní konzumaci právě z důvodu vysokého obsahu nasycených mastných kyselin, jejichž negativní účinky byly zmíněny u řepkového oleje [77]. Kromě nasycených mastných kyselin vzorek obsahoval mononenasycenou kyselinu olejovou (12,82 %). Tento olej byl vyroben lisováním za studena na Srí Lance, nicméně hlavními producenty kokosového oleje jsou Filipíny, Indonésie a Indie. V těchto zemích se kokosový olej využívá nejen pro kulinární úpravu, ale také ve velké míře v oleochemickém průmyslu.

### 3.2 Chromatografická analýza tokoferolů

Tokoferoly lze stanovit kromě kapalinové chromatografie také plynovou chromatografií, čímž se zabývá právě tato práce. Před separací pomocí GC je však nutné tokoferoly převést na trimethylsilyl deriváty. Pro detekci TMS derivátů tokoferolů je výhodnější využít hmotnostního spektrometru nežli plamenově-ionizačního detektoru, protože kromě retenčních časů se získají také hmotnostní spektra, která vypovídají o chemické struktuře. Stanovení tokoferolů v olejích pomocí GC-MS je cílem této práce. Nejprve byl optimalizován výtěžek derivatizační reakce a následně byly optimální podmínky použity pro derivatizaci tokoferolů ve vzorcích. Tokoferoly byly z časových důvodů stanoveny pouze v deseti vzorcích.

#### 3.2.1 Optimalizace derivatizace

Výtěžek derivatizační reakce lze ovlivnit správným výběrem derivatizačního činidla a podmínek derivatizace. Proto byla pro přípravu derivátů vyzkoušena dvě silylační činidla, která byla dostupná na pracovišti, konkrétně činidla BSA a BSTFA. Pro obě použítá činidla byla sledována výtěžnost reakce při různých teplotách (50, 60 a 70 °C) a dobách reakce (15, 30 a 45 minut). Množství derivatizačního činidla a pyridinu zůstávalo stejné. Výtěžnost reakce byla objektivně vyhodnocena pomocí ploch píků jednotlivých tokoferolů. Ze získaných ploch bylo zjištěno, že pro  $\delta$ -tokoferol byl nejvyšší výtěžek derivatizační reakce při použití derivatizačního činidla BSTFA, při teplotě 60 °C a při době derivatizace trvající 30 min, jak je ilustrováno na Obr. 22. Ostatní tokoferoly na tom byly podobně, proto byly tyto podmínky použity pro derivatizaci standardů a vzorků.

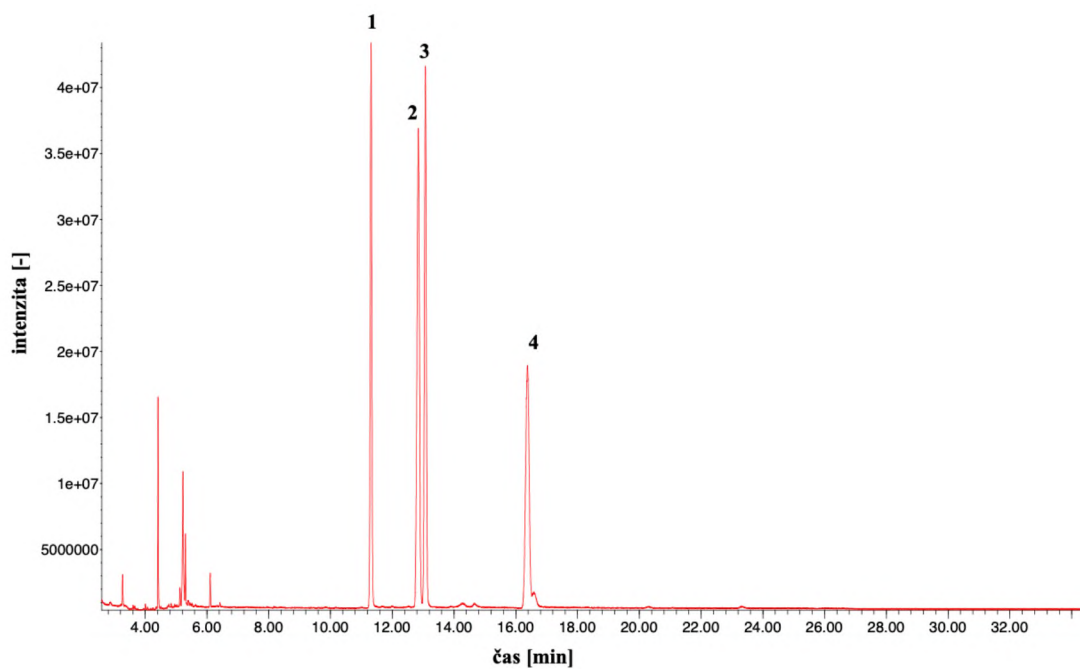


Obr. 22: Srovnání derivatizačních činidel a podmínek derivatizace pro  $\delta$ -tokoferol



### 3.2.2 Chromatografické podmínky pro analýzu tokoferolů

Nejlépe se trimethylsilyl deriváty separovaly při následujících podmínkách. Separace probíhala na koloně SLB<sup>®</sup>-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm), mobilní fází bylo helium s průtokem 1 ml/min. Teplota nástřiku byla nastavena na 250 °C, dávkován byl 1 μl ve splitovacím poměru 1:1. Teplotní program začínal na teplotě 200 °C s nárůstem 20 °C/min na konečnou teplotu 290 °C, která byla držena 30 minut. Celková doba analýzy byla 34,5 min. Nastavené teploty hmotnostního detektoru byly nastaveny pro EI zdroj na 300 °C, pro převodník GC-MS na 300 °C a pro kvadrupól na 150 °C. Byly sledovány píky v rozsahu  $m/z$  50 – 550. Při použití těchto podmínek dochází k separaci trimethylsilyl derivátů tokoferolů tak, jak je uvedeno na Obr. 23, kdy první eluovanou látkou byl δ-tokoferol (1), následuje β-tokoferol (2), γ-tokoferol (3) a α-tokoferol (4). Stejně jako u separace methylesterů mastných kyselin byla využita funkce solvent delay (2,5 min).



Obr. 23: Separace trimethylsilyl derivátů tokoferolů

*Chromatografické podmínky: kolona SLB<sup>®</sup>-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1 ml/min, nástřik: 1 μl, splitovací poměr: 1:1, teplota nástřiku: 250 °C, teplotní program: 200 – 290 °C, teplota EI zdroje: 300 °C, teplota převodníku GC-MS: 300 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C.*

*Píky: δ-tokoferol (1), β-tokoferol (2), γ-tokoferol (3), α-tokoferol (4).*

#### Kalibrační závislosti, meze detekce a stanovitelnosti

Jednotlivé kalibrační roztoky byly po derivatizaci proměřeny dle výše uvedených podmínek. Pro jednotlivé tokoferoly byly připraveny šestibodové kalibrační závislosti

v rozsahu 5 – 100 µg/ml. Kalibrační závislost  $\alpha$ -tokoferolu byla vytvořena z pěti kalibračních bodů, resp. v rozsahu 15 – 100 µg/ml, jelikož kalibrační bod o koncentraci 5 µg/ml byl pod mezí stanovitelnosti. Z kalibračních závislostí byly získány rovnice regrese. Kalibrační závislosti jednotlivých tokoferolů jsou uvedeny v příloze. Dále byly stanoveny meze detekce a stanovitelnosti stejně jako meze mastných kyselin, a to jako koncentrace odpovídající trojnásobku, resp. desetinásobku šumu základní linie. Rovnice regrese pro jednotlivé tokoferoly společně s koeficientem determinace ( $R^2$ ), mezemi detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10: Rovnice regrese s koeficientem determinace, meze detekce a stanovitelnosti tokoferolů

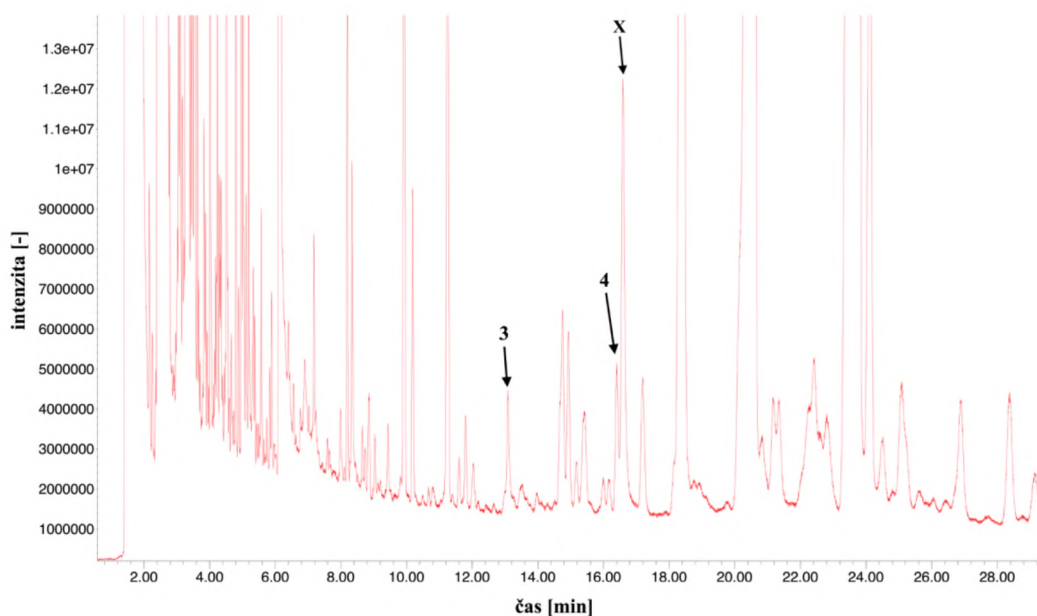
<b>látk</b>	<b>rovnice regrese</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b>LOD [µg/ml]</b>	<b>LOQ [µg/ml]</b>
<b><math>\alpha</math>-tokoferol</b>	$y = 1,64 \cdot 10^7 x - 8,60 \cdot 10^7$	0,9823	2,28	7,61
<b><math>\beta</math>-tokoferol</b>	$y = 2,20 \cdot 10^7 x - 7,73 \cdot 10^7$	0,9938	1,50	5,00
<b><math>\gamma</math>-tokoferol</b>	$y = 1,88 \cdot 10^7 x - 6,50 \cdot 10^7$	0,9941	1,27	4,23
<b><math>\delta</math>-tokoferol</b>	$y = 1,65 \cdot 10^7 x - 5,14 \cdot 10^7$	0,9916	1,17	3,90

Nejvyšší mez detekce měl  $\alpha$ -tokoferol (2,28 µg/ml), což odpovídá výše uvedenému chromatogramu, jelikož tento izomer měl nejvyšší pík. Naopak nejnižší mez detekce měl  $\delta$ -tokoferol, a to 1,17 µg/ml.

### 3.2.3 Obsah tokoferolů ve vzorcích

Před vlastním stanovením bylo třeba extrahovat tokoferoly z matrice vzorku. Postup extrakce byl inspirován diplomovou prací Z. Forstové [80], která se zabývala analýzou lipofilních vitamínů pomocí HPLC. Pro optimalizaci extrakce byl vybrán vzorek řepkového oleje (vzorek č. 21), který při prvotní analýze obsahoval  $\alpha$ -tokoferol i  $\gamma$ -tokoferol. Extrakci předcházelo zmýdlnění pomocí ethanického roztoku hydroxidu draselného. Byl optimalizován vliv počtu kroků na účinnost reakce. Ta byla sledována při jednonásobné, dvojnásobné, trojnásobné, čtyřnásobné a pětinasobné extrakci do hexanu. Porovnáním ploch píků analytů v extraktech bylo zjištěno, že při čtyřnásobné extrakci se již prakticky neztvětšuje plocha píků, proto byla pro analýzu vzorků zvolena trojnásobná extrakce. Tokoferoly v extraktu byly převedeny na trimethylsilyl deriváty a analyzovány za stejných podmínek jako směs standardů. Postup zmýdlnění, extrakce a derivatizace vzorků je popsán v kapitole 2.4.2.

Pro stanovení tokoferolů ve vzorcích bylo z časových důvodů vybráno celkem deset vzorků olejů. Konkrétně se jednalo o pět olivových olejů, dva řepkové, jeden slunečnicový, jeden lněný a jeden kokosový olej. Olivové oleje byly vybrány tak, aby se lišily zemí původu. Všechny olivové oleje kromě oleje z Chorvatska byly extra panenské. Trimethylsilyl deriváty tokoferolů byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů a dále také porovnáním hmotnostních spekter s knihovnou spekter NIST. Na ukázkovém chromatogramu řepkového oleje (vzorek č. 21), který je zobrazen na Obr. 24, je označen TMS derivát  $\gamma$ -tokoferolu (3) a TMS derivát  $\alpha$ -tokoferolu (4). Jistou nesrovnalostí bylo, že pík X byl dle knihovny identifikován jako vitamín E s 33% pravděpodobností. Nejednalo se však o TMS derivát, proto nelze tuto látku kvantifikovat, to může mít za následek zkreslení výsledného obsahu.



Obr. 24: Chromatogram řepkového oleje – analýza tokoferolů

*Chromatografické podmínky: kolona SLB®-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1 ml/min, nástřik: 1 μl, splitovací poměr: 1:1, teplota nástřiku: 250 °C, teplotní program: 200 – 290 °C, teplota EI zdroje: 300 °C, teplota převodníku GC-MS: 300 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C.*

*Píky:  $\gamma$ -tokoferol (3),  $\alpha$ -tokoferol (4), vitamín E (X).*

Analyzované oleje obsahovaly pouze  $\alpha$ -tokoferol a  $\gamma$ -tokoferol, jejich obsah byl vypočítán z příslušných rovnic regrese. Získané hodnoty byly v  $\mu\text{g/ml}$ , tyto koncentrace byly za účelem porovnání výsledků s odbornou literaturou přepočítány na hodnoty v  $\mu\text{g/g}$ . Získané koncentrace jsou uvedeny v Tab. 11 spolu se směrodatnou odchylkou (RSD), která byla vypočtena ze 4 analýz.

Tab. 11: Obsah tokoferolů ve vzorcích olejů

vzorek č.	druh oleje	země původu	$\alpha$ -tokoferol		$\gamma$ -tokoferol	
			c [ $\mu\text{g/g}$ ]	RSD [%]	c [ $\mu\text{g/g}$ ]	RSD [%]
7	olivový	Španělsko	18,20	3,13	–	–
8	olivový	Řecko	14,18	5,38	–	–
11	olivový	Itálie	17,97	3,81	–	–
12	olivový	Chorvatsko	6,87	9,99	–	–
13	olivový	Tunisko	38,50	4,79	–	–
21	řepkový (BIO)	–	11,58	1,94	6,01	10,14
22	řepkový	–	–	–	13,29	5,01
23	slunečnicový	–	25,42	7,12	–	–
24	lněný	–	–	–	6,89	7,50
25	kokosový	–	–	–	–	–

Ve vzorcích **olivového oleje** analyzovaných v této práci se vyskytoval pouze  $\alpha$ -tokoferol, který dle odborné literatury představuje 95 % celkového obsahu tokoferolů [77]. Zbylých 5 % tvoří  $\beta$ -tokoferol a  $\gamma$ -tokoferol, nicméně ani jeden z nich nebyl ve vzorcích identifikován. Nejvíce  $\alpha$ -tokoferolu ze všech olejů obsahoval olivový olej z Tuniska (38,50  $\mu\text{g/g}$ ). Naproti tomu nejméně  $\alpha$ -tokoferolu obsahoval olivový olej z Chorvatska. U tohoto vzorku není specifikován jeho druh, jelikož byl zakoupen v obalu bez etikety u místních obyvatel. Nízký obsah  $\alpha$ -tokoferolu (6,87  $\mu\text{g/g}$ ) u tohoto vzorku může naznačovat, že se jedná o rafinovaný olivový olej. Rafinací totiž olej přichází o část vitamínů a další cenné látky. Při porovnání s literaturou [73] se analyzované vzorky olivového oleje se svým obsahem  $\alpha$ -tokoferolu blíží spíše panenským olivovým olejům. Extra panenské olivové oleje by měly obsahovat stovky mikrogramů  $\alpha$ -tokoferolu na gram oleje. Nicméně další literatura [77] také uvádí, že obsah tokoferolů v olivovém oleji je velmi variabilní, obsah se může pohybovat od 5 do 300  $\mu\text{g/g}$ , což koresponduje s výsledky této práce.

V **řepkovém oleji** BIO (vzorek č. 21) byl stanoven  $\alpha$ -tokoferol i  $\gamma$ -tokoferol. Obsah  $\alpha$ -tokoferolu (11,58  $\mu\text{g/g}$ ) a  $\gamma$ -tokoferolu (6,01  $\mu\text{g/g}$ ) je ale mnohem menší, než uvádí literatura [79]. Zajímavostí je, že v řepkovém oleji běžné kvality (vzorek č. 22) byl stanoven pouze obsah  $\gamma$ -tokoferolu, a to 13,29  $\mu\text{g/g}$ , což je více než v řepkovém oleji v BIO kvalitě. Vzorek **slunečnicového oleje** obsahoval 25,42  $\mu\text{g/g}$   $\alpha$ -tokoferolu, což je také méně, než je uvedeno v odborné literatuře [79]. Slunečnicový olej by měl obsahovat velké množství  $\alpha$ -tokoferolu, což zajišťuje jeho odolnost vůči fotooxidaci, a menší množství  $\gamma$ -tokoferolu, který však

v analyzovaném vzorku nebyl stanoven. **Lněný olej** obsahoval pouze  $\gamma$ -tokoferol (6,89  $\mu\text{g/g}$ ), který dle literatury [81] tvoří 96–98 % celkového obsahu tokoferolu. Obsah tokoferolů ve lněném oleji je ovlivněn klimatickými podmínkami. Lněné semínko, celé nebo drcené, se využívá v pekařství pro zvýšení nutriční hodnoty výrobku. V **kokosovém oleji** nebyl identifikován žádný tokoferol. Tento výsledek je v souladu s literaturou [77], která uvádí, že kokosový olej obsahuje stopová množství tokolů, resp. tokoferolů. Zároveň však připouští, že jejich přítomnost a množství se mohou velmi lišit. Podle jiné literatury však kokosový tuk může obsahovat až 17  $\mu\text{g/g}$   $\alpha$ -tokoferolu, 11  $\mu\text{g/g}$   $\beta$ -tokoferolu a 14  $\mu\text{g/g}$   $\gamma$ -tokoferolu [79].

## 4 Závěr

Cílem této práce bylo stanovit mastné kyseliny a tokoferoly v rostlinných olejích pomocí metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Celkem bylo analyzováno 25 vzorků. Práce se zaměřuje především na analýzu olivových olejů, ale byly analyzovány i oleje jiného druhu.

Při stanovení mastných kyselin byly nejprve optimalizovány chromatografické podmínky, konkrétně byl optimalizován teplotní program, průtok mobilní fáze a splitovací poměr. Mastné kyseliny bylo nutné převést na methylestery, které byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů a dále také porovnáním získaných spekter s knihovnou. Mastné kyseliny byly kvantifikovány pomocí odezvových faktorů. Olivový olej byl bohatý na obsah mononenasycených mastných kyselin, konkrétně na kyselinu olejovou (46,5 – 65,8 %). V řepkovém oleji byla rovněž nejzastoupenější kyselina olejová (v průměru 48,6 %), od olivového oleje se však odlišoval poměrně vysokým obsahem kyseliny  $\alpha$ -linolenové (12,1 – 13,7 %). Slunečnicový a lněný olej se vyznačovaly vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin, ve slunečnicovém oleji byla dominantní  $\omega$ -6 mastná kyselina, kyselina linolová (47,3 %), zatímco ve lněném oleji to byla  $\omega$ -3 mastná kyselina, kyselina  $\alpha$ -linolenová (52,9 %). Kokosový olej se od ostatních vzorků odlišoval vysokým obsahem nasycených mastných kyselin, a to konkrétně kyselinou laurovou (30,4 %), myristovou (21,7 %) a palmitovou (13,6 %). Na vzorky olivových olejů byla aplikována diskriminační analýza, která potvrdila hypotézu, že dle poměrného zastoupení mastných kyselin lze usuzovat na zeměpisný původ olivového oleje. Například pomocí diskriminační analýzy bylo zjištěno, že olivový olej z pokrutin je původem ze Španělska.

Při stanovení tokoferolů byly nejprve optimalizovány podmínky derivatizace na trimethylsilyl deriváty. Dále byla optimalizována metoda extrakce tokoferolů z matrice. V deseti vzorcích olejů byly stanoveny pouze  $\alpha$ -tokoferol a  $\gamma$ -tokoferol. V olivovém oleji byl stanoven pouze  $\alpha$ -tokoferol, nejvíce ho obsahoval olivový olej z Tuniska (38,50  $\mu\text{g/g}$ ), nejméně olivový olej z Chorvatska (6,87  $\mu\text{g/g}$ ). Řepkový olej v BIO kvalitě obsahoval  $\alpha$ -tokoferol (11,58  $\mu\text{g/g}$ ) a  $\gamma$ -tokoferol (6,01  $\mu\text{g/g}$ ), zatímco řepkový olej běžné kvality obsahoval pouze  $\gamma$ -tokoferol (13,29  $\mu\text{g/g}$ ). Slunečnicový olej obsahoval  $\alpha$ -tokoferol (25,42  $\mu\text{g/g}$ ), naopak lněný olej  $\gamma$ -tokoferol (6,89  $\mu\text{g/g}$ ). V kokosovém oleji nebyl stanoven žádný tokoferol.

Výsledky obsahu mastných kyselin se shodují s literaturou, avšak stanovený obsah tokoferolů je v této práci mnohem menší, než uvádí literatura.

## Seznam použité literatury

- [1] VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I*. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [2] GURR, M. I., J. L. HARWOOD, K. N. FRAYN, D. J. MURPHY a R. H. MICHELL. *Lipids: Biochemistry, Biotechnology and Health*. Chichester: Wiley-Blackwell, 2016. ISBN 978-1-118-50110-8.
- [3] O'BRIEN, R. D. *Fats and oils: formulating and processing for applications*. Boca Raton: CRC Press, 2004. ISBN 978-0-8493-1599-2.
- [4] WU, Z., Q. ZHANG, N. LI, Y. PU, B. WANG a T. ZHANG. Comparison of critical methods developed for fatty acid analysis: A review. *Journal of Separation Science*. 2017, 40(1), 288–298.
- [5] ROUBÍK, L. *Moderní výživa ve fitness a silových sportech*. Praha: Erasport, s.r.o., 2018. ISBN 978-80-905685-5-6.
- [6] CHOW, C. K., *Fatty acids in foods and their health implications*. Boca Raton: CRC Press, 2008. ISBN 978-0-8493-7261-2.
- [7] KOMPRDA, T., A. ANSORGOVÁ, V. ROZÍKOVÁ a B. NĚMCOVÁ. Chromatografické stanovení polynenasycených mastných kyselin ve vybraných živočišných tkáních. *Chemické listy*. 2015, 109(2), 140–146.
- [8] SALIMON, J., T. A. OMAR a N. SALIH. An accurate and reliable method for identification and quantification of fatty acids and trans fatty acids in food fats samples using gas chromatography. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017, 10, S1875–S1882.
- [9] LEDOUX, M., P. JUANÉDA a J.-L. SÉBÉDIO. Trans fatty acids: Definition and occurrence in foods. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2007, 109(9), 891–900.
- [10] DOSTÁLOVÁ, J. Tuk v potravinách a jejich výživové hodnocení. *Svět potravin a kouzlo biotechnologií*. Ostrava: Key Publishing, 2010. ISBN 978-80-7418-069-9.
- [11] BIELAWSKA, K., I. DZIAKOWSKA a W. ROSZKOWSKA-JAKIMIEC. Chromatographic determination of fatty acids in biological material. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2010, 20(9), 526–537.
- [12] FRIEDRICH, W. *Vitamins*. Berlín: Walter de Gruyter, 1988. ISBN 3-11-010244-7.

- [13] BRAUNSTEIN, M. H. *Focus on vitamin E research*. New York: Nova Science Publishers, 2006. ISBN 978-1-59454-971-7.
- [14] BARTOSÍŇSKA, E., M. BUSZEWSKA-FORAJTA a D. SILUK. GC–MS and LC–MS approaches for determination of tocopherols and tocotrienols in biological and food matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, 127, 156–169.
- [15] GROPPER, S. A. S., J. L. SMITH a J. L. GROFF. *Advanced nutrition and human metabolism*. Belmont: Wadsworth Cengage Learning, 2009. ISBN 978-0-495-11657-8.
- [16] CHURÁČEK, J. *Analytická separace látek*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
- [17] SMOLKOVÁ, E. a L. FELTL. *Analyza látek v plynném stavu*. Praha: SNTL, 1991. ISBN 978-80-03-00604-5.
- [18] *Schéma plynového chromatografu* [online]. [cit. 6. 2. 2020]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-the-main-components-of-a-gas-chromatography-system-Philadelphia\\_fig3\\_273134301](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-the-main-components-of-a-gas-chromatography-system-Philadelphia_fig3_273134301)
- [19] MIKEŠ, O. a M. HEJTMÁNEK, *Laboratory handbook of chromatographic and allied methods*. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1979. ISBN 0-470-26399-7.
- [20] HÜBSCHMANN, H.-J. *Handbook of GC-MS: fundamentals and applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2015. ISBN 978-3-527-33474-2.
- [21] SPARKMAN, O. D., Z. E. PENTON a F. G. KITSON. *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. Burlington: Academic Press, 2011. ISBN 978-0-12-373628-4.
- [22] *Typy kapilárních kolon* [online]. [cit. 13. 6. 2020]. Dostupné z: <http://delloyd.50megs.com/MOBILE/GC.html>
- [23] GROB, R. L. a E. F. BARRY, ed. *Modern practice of gas chromatography*. Hoboken, N.J: John Wiley & Sons, 2004. ISBN 978-0-471-22983-4.
- [24] WANNER, K. T. a G. HÖFNER, ed. *Mass spectrometry in medicinal chemistry: applications in drug discovery*. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. ISBN 978-3-527-31456-0.
- [25] GROSS, J. H. *Mass spectrometry: a textbook*. Berlin: Springer, 2011. ISBN 978-3-642-10711-5.
- [26] DE HOFFMANN, E. a V. STROOBANT. *Mass spectrometry: principles and applications*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.



- [27] JANDERA, P. *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2011. ISBN 978-80-7395-392-8.
- [28] *Schéma hmotnostního spektrometru* [online]. [cit. 8. 2. 2020]. Dostupné z: <https://dgms.eu/en/about-dgms/this-is-mass-spectrometry/mass-spectrometers/>
- [29] HOLČAPEK, M. Hmotnostní analyzátoři [online]. [cit. 13. 6. 2020]. Dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/03\\_MS\\_analyzatory.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf)
- [30] RIFAI, N., A. R. HORVATH, C. T. WITWER a A. N. HOOFNAGLE. *Principles and applications of clinical mass spectrometry: small molecules, peptides, and pathogens*. Amsterdam: Elsevier, 2018. ISBN 978-0-12-816063-3.
- [31] MAKAROV, A. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Analytical Chemistry*. 2000, 72(6), 1156–1162.
- [32] JOUSTEN, K., *Handbook of vacuum technology*. Weinheim: Wiley-VCH, 2016. ISBN 978-3-527-68824-1.
- [33] HOLČAPEK, M. a P. JANDERA. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy*. 1998, 92(4), 278–286.
- [34] KITSON, F. G., B. S. LARSEN a C. N. MCEWEN. *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. San Diego: Academic Press, 1996. ISBN 978-0-12-483385-2.
- [35] SCHÄFER, K. Accelerated solvent extraction of lipids for determining the fatty acid composition of biological material. *Analytica Chimica Acta*. 1998, 358(1), 69–77.
- [36] TAMMEKIVI, E., S. VAHUR, O. KEKIŠEV, I. D. VAN DER WERF, L. TOOM, K. HERODES a I. LEITO. Comparison of derivatization methods for the quantitative gas chromatographic analysis of oils. *Analytical Methods*. 2019, 11(28), 3514–3522.
- [37] LI, Y., F. GHASEMI NAGHDI, S. GARG, T. ADARME-VEGA, K. J. THURECHT, W. GHAFOR, S. TANNOCK a P. M. SCHENK. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microbial Cell Factories*. 2014, 13(1), 14.
- [38] REDDY, M., R. MOODLEY a S. B. JONNALAGADDA. Fatty acid profile and elemental content of avocado (*Persea americana Mill.*) oil –effect of extraction methods. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 2012, 47(6), 529–537.

- [39] KURT, C., H. ARIOGLU, T. ERDEM, M.R. AKKAYA, A. E. SABAGH a M.S. ISLAM. A comparative study of fatty acid extraction methods of sesame (*Sesamum indicum* L.) varieties grown under mediterranean environment. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. 2016, 4(5S), 588–593.
- [40] XIAO, L., S. A. MJØS a B. O. HAUGSGJERD. Efficiencies of three common lipid extraction methods evaluated by calculating mass balances of the fatty acids. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2012, 25(2), 198–207.
- [41] CEQUIER-SÁNCHEZ, E., C. RODRÍGUEZ, Á. G. RAVELO a R. ZÁRATE. Dichloromethane as a Solvent for Lipid Extraction and Assessment of Lipid Classes and Fatty Acids from Samples of Different Natures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56(12), 4297–4303.
- [42] ALUYOR, E. O., C. E. OZIGAGU, O. I. OBOH a P. ALUYOR. Chromatographic analysis of vegetable oils: A review. *Scientific Research and Essay*. 2009, 4(4), 191–197.
- [43] RAJAEI, A., M. BARZEGAR a Y. YAMINI. Supercritical fluid extraction of tea seed oil and its comparison with solvent extraction. *European Food Research and Technology*. 2005, 220(3–4), 401–405.
- [44] ROSENFELD, J. Application of analytical derivatizations to the quantitative and qualitative determination of fatty acids. *Analytica Chimica Acta*. 2002, 465(1–2), 93–100.
- [45] SHANTHA, N. C. a G. E. NAPOLITANO. Gas chromatography of fatty acids. *Journal of Chromatography A*. 1992, 624(1–2), 37–51.
- [46] HAUFF, S. a W. VETTER. Quantitation of *cis*- and *trans*-Monounsaturated Fatty Acids in Dairy Products and Cod Liver Oil by Mass Spectrometry in the Selected Ion Monitoring Mode. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, 57(9), 3423–3430.
- [47] ARMENTA, R. E., S. D. SCOTT, A. M. BURJA, H. RADIANTINGTYAS a C. J. BARROW. Optimization of Fatty Acid Determination in Selected Fish and Microalgal Oils. *Chromatographia*. 2009, 70(3–4), 629–636.
- [48] DIMITRIJEVIC, M. V., V. D. MITIC, O. P. JOVANOVIC, V. P. STANKOV JOVANOVIC, J. S. NIKOLIC, G. M. PETROVIC a G. S. STOJANOVIC. Comparative Study of Fatty Acids Profile in Eleven Wild Mushrooms of Boletacea and Russulaceae Families. *Chemistry & Biodiversity*. 2018, 15(1), e1700434.

- [49] DE MELLO, B. T. F., V. A. DOS SANTOS GARCIA a C. DA SILVA. Ultrasound-Assisted Extraction of Oil from Chia (*Salvia hispánica* L.) Seeds: Optimization Extraction and Fatty Acid Profile: Ultrasound-Assisted Extraction of Oil from Chia. *Journal of Food Process Engineering*. 2017, 40(1), e12298.
- [50] ASLAN, M., I. ORHAN a B. SENNER. Comparison of the seed oils of *Pistacia vera* L. of different origins with respect to fatty acids. *International Journal of Food Science and Technology*. 2002, 37(3), 333–335.
- [51] THI, H. T., B. A. LE, H. N. T. LE, K. OKITSU, K. IMAMURA, N. TAKENAKA, B. V. LUU a Y. MAEDA. Screening of fatty acids, saccharides, and phytochemicals in *Jatropha curcas* seed kernel as their trimethylsilyl derivatives using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2018, 1102–1103, 66–73.
- [52] BENITEZ-SÁNCHEZ, P. L., M. LEÓN-CAMACHO a R. APARACIO. A comprehensive study of hazelnut oil composition with comparisons to other vegetable oils, particularly olive oil. *European Food Research and Technology*. 2003, 218(1), 13–19.
- [53] ALDAI, N., B. E. MURRAY, A. I. NÁJERA, D. J. TROY a K. OSORO. Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids: Derivatization of fatty acids-its application for CLA. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005., 85(7), 1073–1083.
- [54] ESONYE, C., O. D. ONUKWULI a A. U. OFOEFULE. Characterization and oxidation modeling of oils from *Prunus amygdalus*, *Dyacrodes edulis* and *Chrysophyllum albidium*. *Industrial Crops and Products*. 2019, 128, 298–307.
- [55] ALVES, A. Q., V. A. DA SILVA, A. J. S. GÓES, M. S. SILVA, Gibson Gomes DE OLIVEIRA, I. V. G. A. BASTOS, A. G. DE CASTRO NETO a A. J. ALVES. The Fatty Acid Composition of Vegetable Oils and Their Potential Use in Wound Care. *Advances in Skin & Wound Care*. 2019, 32(8), 1–8.
- [56] YAMAMOTO, K., A. KINOSHITA a A. SHIBAHARA. Ricinoleic Acid in Common Vegetable Oils and Oil Seeds. *Lipids*. 2008, 43(5), 457–460.
- [57] RUEDA, A., I. SEIQUER, M. OLALLA, R. GIMÉNEZ, L. LARA a C. CABRERA-VIQUE. Characterization of Fatty Acid Profile of Argan Oil and Other Edible Vegetable Oils by Gas Chromatography and Discriminant Analysis. *Journal of Chemistry*. 2014, 2014, 1–8.

- [58] DULF, F. V. Fatty acids in berry lipids of six sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L., subspecies *carpatica*) cultivars grown in Romania. *Chemistry Central Journal*. 2012, 6(1), 106.
- [59] CALIGIANI, A., A. MARSEGLIA a G. PALLA. An Overview on the Presence of Cyclopropane Fatty Acids in Milk and Dairy Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, 62(31), 7828–7832.
- [60] CALIGIANI, A., M. NOCETTI, V. LOLLI, A. MARSEGLIA a G. PALLA. Development of a Quantitative GC–MS Method for the Detection of Cyclopropane Fatty Acids in Cheese as New Molecular Markers for Parmigiano Reggiano Authentication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, 64(20), 4158–4164.
- [61] LIM, H., S. WOO, H. S. KIM, S.-K. JONG a J. LEE. Comparison of extraction methods for determining tocopherols in soybeans. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2007, 109(11), 1124–1127.
- [62] HUSSAIN, ., Z. JABEEN, Y. LI, M. CHEN, Z.-I. LI, W. GUO, I. H. SHAMSI, X. CHEN a L. JIANG. Detection of Tocopherol in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Using Gas Chromatography with Flame Ionization Detector. *Journal of Integrative Agriculture*. 2013, 12(5), 803–814.
- [63] RAO, M. K. G. a E. G. PERKINS. Identification and estimation of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1971, 20(2), 240–245.
- [64] RUPÉREZ, F. J., D. MARTÍN, E. HERRERA a C. BARBAS. Chromatographic analysis of  $\alpha$ -tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatography A*. 2001, 935(1–2), 45–69.
- [65] BHATIA, A., S. K. BHARTI, S. K. TEWARI, O. P. SIDHU a R. ROY. Metabolic profiling for studying chemotype variations in *Withania somnifera* (L.) Dunal fruits using GC–MS and NMR spectroscopy. *Phytochemistry*. 2013, 93, 105–115.
- [66] KIM, J. K., S.-H. HA, S.-Y. PARK, S. M. LEE, H. J. KIM, S. H. LIM, S.-C. SUH, D. H. KIM a H. S. CHO. Determination of lipophilic compounds in genetically modified rice using gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2012, 25(1), 31–38.

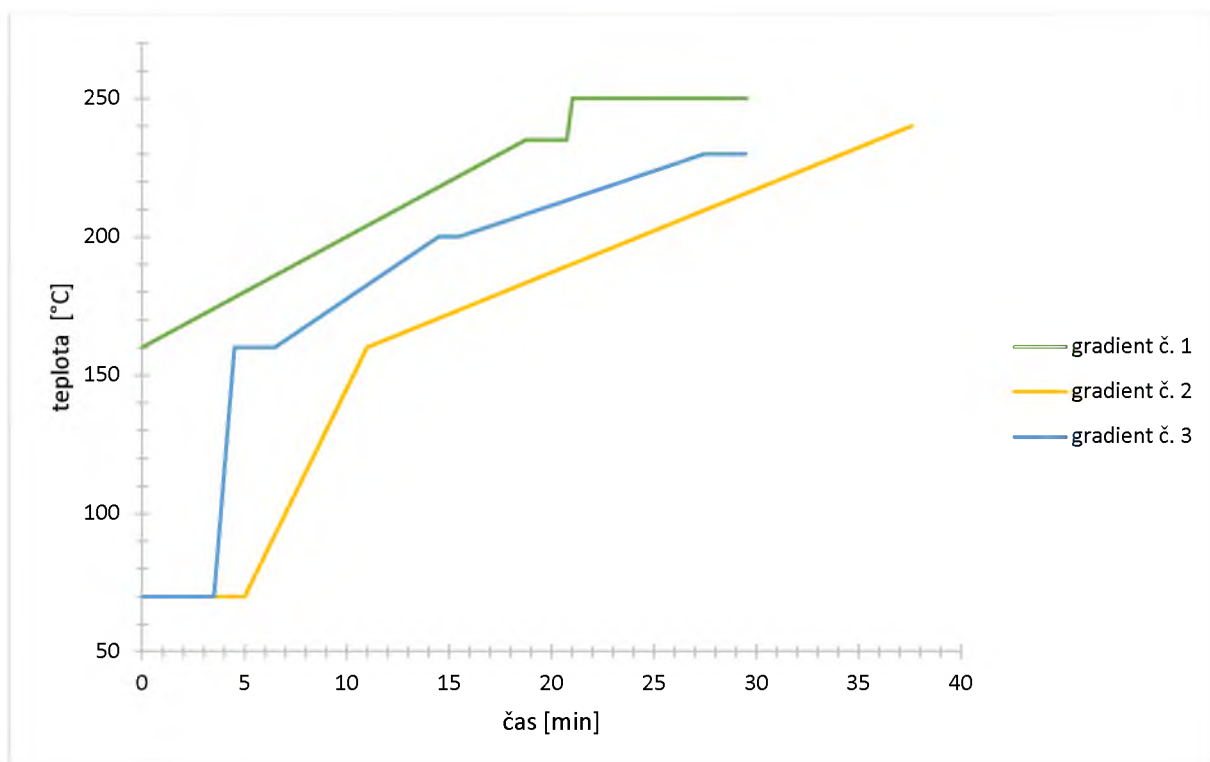
- [67] GIACOMETTI, J. Determination of aliphatic alcohols, squalene,  $\alpha$ -tocopherol and sterols in olive oils: direct method involving gas chromatography of the unsaponifiable fraction following silylation. *Analyst*. 2001, 126(4), 472–475.
- [68] BUTINAR, B., M. BUČAR-MIKLAVČIČ, C. MARIANI a P. RASPOR. New vitamin E isomers (gamma-tocomonolenol and alpha-tocomonolenol) in seeds, roasted seeds and roasted seed oil from the Slovenian pumpkin variety ‘*Slovenska golica*’. *Food Chemistry*. 2011, 128(2), 505–512.
- [69] ZHANG, R., W. SHEN, X. WEI, F. ZHANG, C. SHEN, B. WU, Z. ZHAO, H. LIU a X. DENG. Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils by GC-MS. *Analytical Methods*. 2016, 8(40), 7341–7346.
- [70] OLMO-GARCÍA, L., J. J. POLARI, X. LI, A. BAJOUB, A. FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, S. C. WANG a A. CARRASCO-PANCORBO. Study of the minor fraction of virgin olive oil by a multi-class GC–MS approach: Comprehensive quantitative characterization and varietal discrimination potential. *Food Research International*. 2019, 125, 108649.
- [71] KOŠTÁL, V., T. URBAN, L. ŘIMNÁČOVÁ, P. BERKOVÁ a P. ŠIMEK. Seasonal changes in minor membrane phospholipid classes, sterols and tocopherols in overwintering insect, *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Insect Physiology*. 2013, 59(9), 934–941.
- [72] CHEIKHYOUSSEF, N., M. KANDAWA-SCHULZ, R. BÖCK, C. DE KONING, A. CHEIKHYOUSSEF a A. A. HUSSEIN. Characterization of *Schinziophyton rautanenii* (Manketti) nut oil from Namibia rich in conjugated fatty acids and tocopherol. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018, 66, 152–159.
- [73] ARESTA, A. a C. ZAMBONIN. Determination of  $\alpha$ -Tocopherol in Olive Oil by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Letters*. 2017, 50(10), 1580–1592.
- [74] HODES, M. *GC/MS stanovení methylesterů mastných kyselin v biologických vzorcích*. Pardubice, 2014. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [75] POHANKA, M. Základy statistiky laboratorních experimentů. *Vojenské zdravotnické listy*. 2010, 79(2), 60–63.
- [76] POKORNÁ, I. a V. FILIP. Olivový olej. *Výživa a potraviny*. 2007, 6.

- [77] FOSTER, R., C. S. WILLIAMSON a J. LUNN. Culinary oils and their health effects. *Nutrition Bulletin*. 2009, 34, 4–47.
- [78] TRENTACOSTE, E. R., A. P. BANCO, P. N. PICCOLI a R. P. MONASTERIO. Olive oil characterization of cv. ‘Arauco’ harvested at different times in areas with early frost in Mendoza, Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2020, 100(3), 953–960.
- [79] *Codex Standard for Named Vegetable Oils* [online]. [cit. 22. 6. 2020]. Dostupné z: <http://www.fao.org/3/y2774e/y2774e04.htm>
- [80] FORSTOVÁ, Z. *Analýza lipofilních vitamínů pomocí HPLC*. Pardubice, 2015. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [81] OOMAH, B. D., E. O. KENASCHUK a G. MAZZA. Tocopherols in Flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, 45(6), 2076–2080.

## **Přílohy**

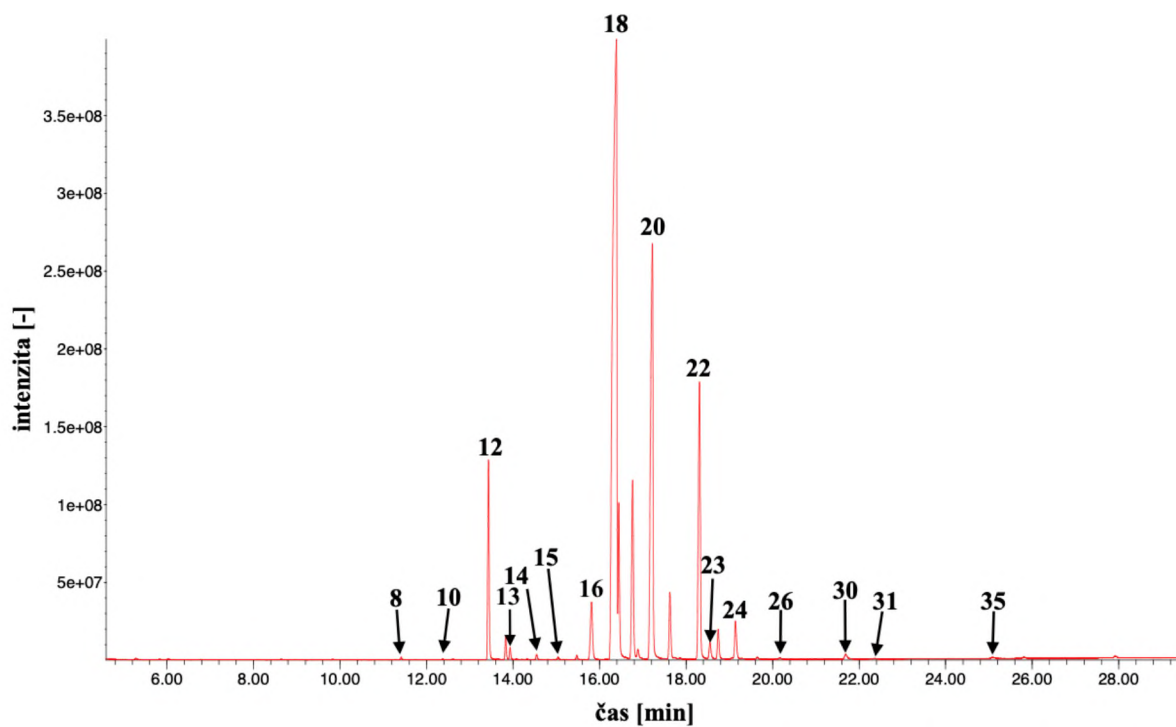
Příloha I: Nárůst teploty při jednotlivých teplotních gradientech.....	72
Příloha II: Chromatogram řepkového oleje .....	73
Příloha III: Chromatogram slunečnicového oleje.....	74
Příloha IV: Chromatogram lněného oleje.....	75
Příloha V: Chromatogram kokosového oleje.....	76
Příloha VI: Kalibrační závislost $\alpha$ -tokoferolu.....	77
Příloha VII: Kalibrační závislost $\beta$ -tokoferolu .....	77
Příloha VIII: Kalibrační závislost $\gamma$ -tokoferolu .....	78
Příloha IX: Kalibrační závislost $\delta$ -tokoferolu.....	78

# Příloha I: Nárůst teploty při jednotlivých teplotních gradientech





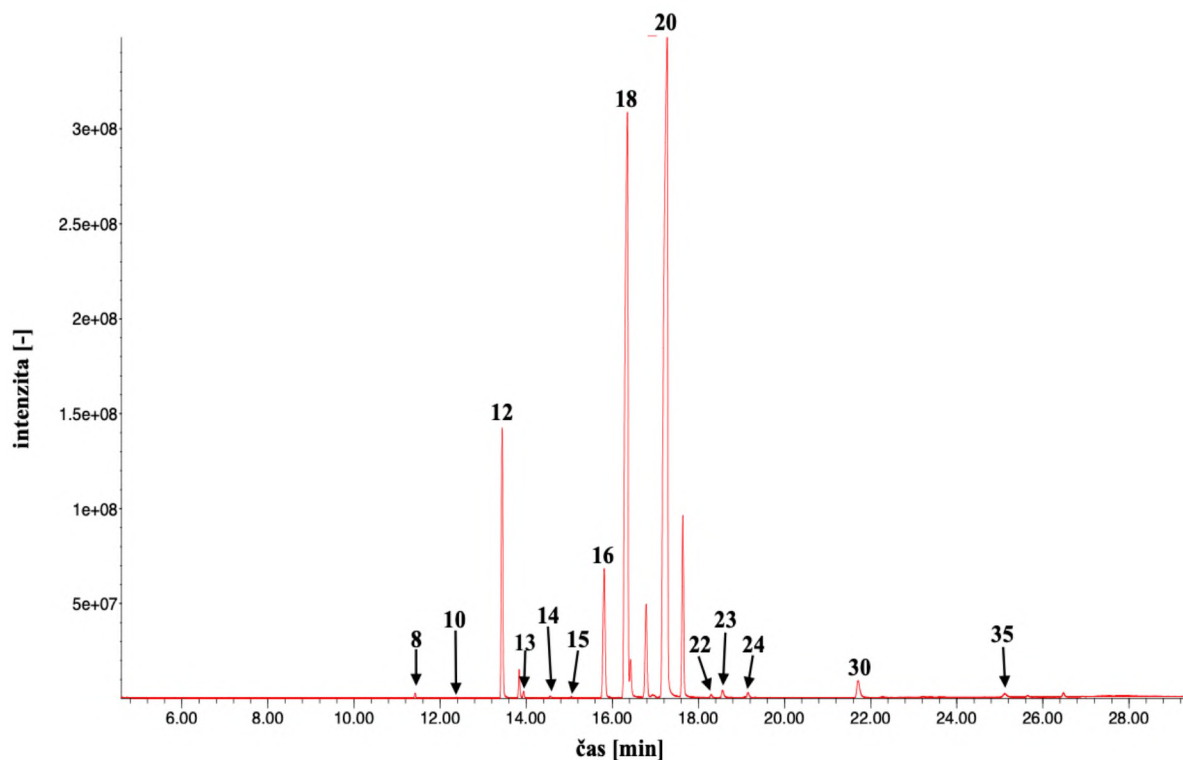
## Příloha II: Chromatogram řepkového oleje



*Chromatografické podmínky: kolona TR-FAME (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1,2 ml/min, nástřik: 1 μl, splitovací poměr: 10:1, teplota nástřiku: 250 °C, teplotní program: 70 – 230 °C, teplota EI zdroje: 230 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C.*

*Kyseliny: myristová (8), pentadekanová (10), palmitová (12), palmitoolejová (13), heptadekanová (14), heptadecenová (15), stearová (16), olejová (18), linolová (20), α-linolenová (22), arachová (23), gadolejová (24), eikosadienová (26), behenová (30), eruková (31), lignocerová (35).*

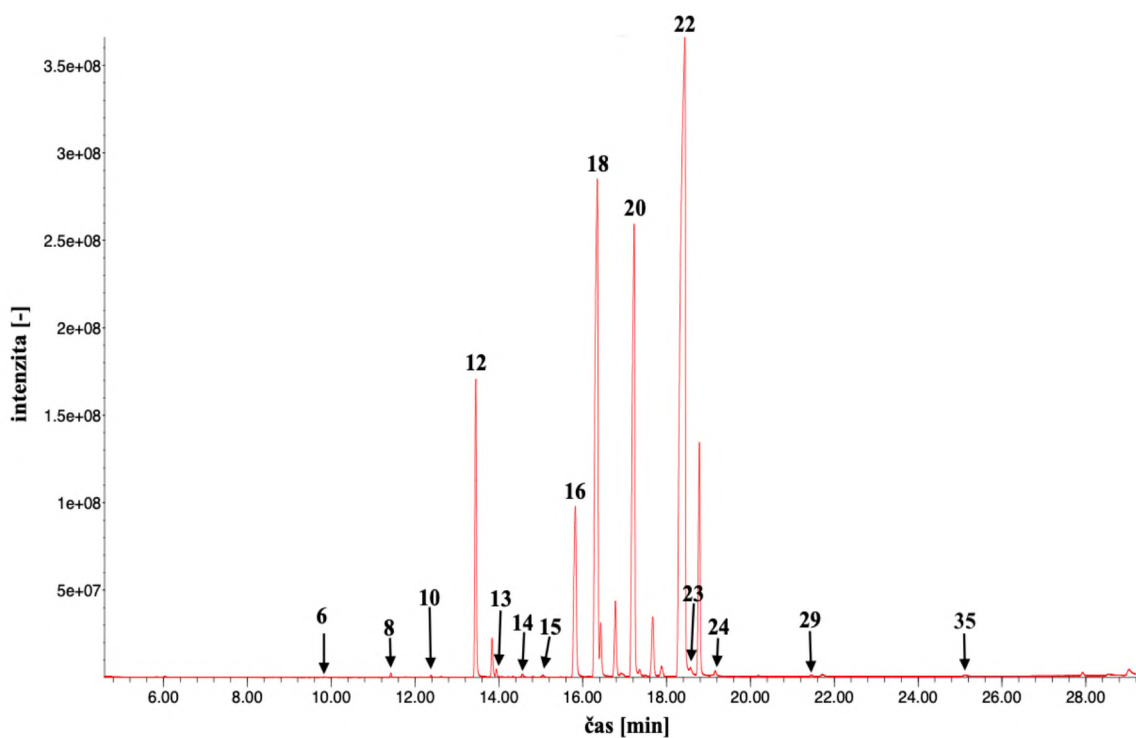
### Příloha III: Chromatogram slunečnicového oleje



*Chromatografické podmínky: kolona TR-FAME (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1,2 ml/min, nástřik: 1 μl, splitovací poměr: 10:1, teplota nástřiku: 250 °C, teplotní program: 70 – 230 °C, teplota EI zdroje: 230 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C.*

*Kyseliny: myristová (8), pentadekanová (10), palmitová (12), palmitoolejová (13), heptadekanová (14), heptadecenová (15), stearová (16), olejová (18), linolová (20), α-linolenová (22), arachová (23), gadolejová (24), behenová (30), lignocerová (35).*

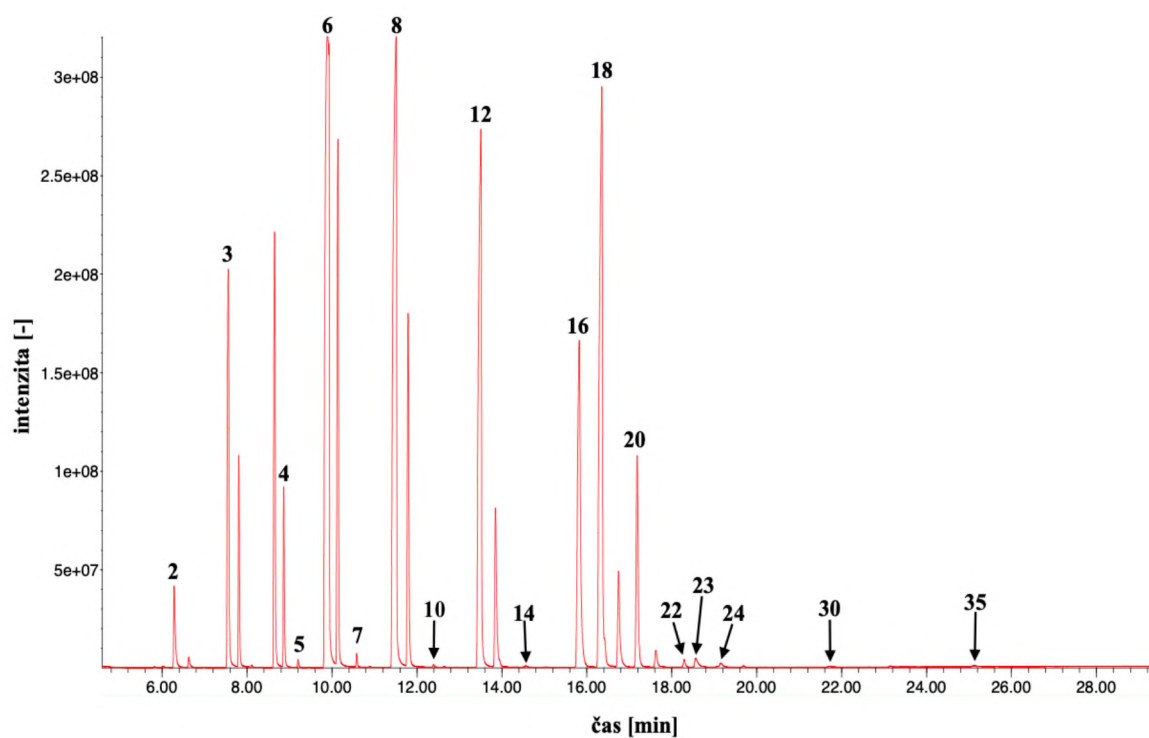
#### Příloha IV: Chromatogram lněného oleje



*Chromatografické podmínky: kolona TR-FAME (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1,2 ml/min, nástřik: 1 μl, splitovací poměr: 10:1, teplota nástřiku: 250 °C, teplotní program: 70 – 230 °C, teplota EI zdroje: 230 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C.*

*Kyseliny: laurová (6), myristová (8), pentadekanová (10), palmitová (12), palmitolejová (13), heptadekanová (14), heptadecenová (15), stearová (16), olejová (18), linolová (20), α-linolenová (22), arachová (23), gadolejová (24), arachidonová (29), lignocerová (35).*

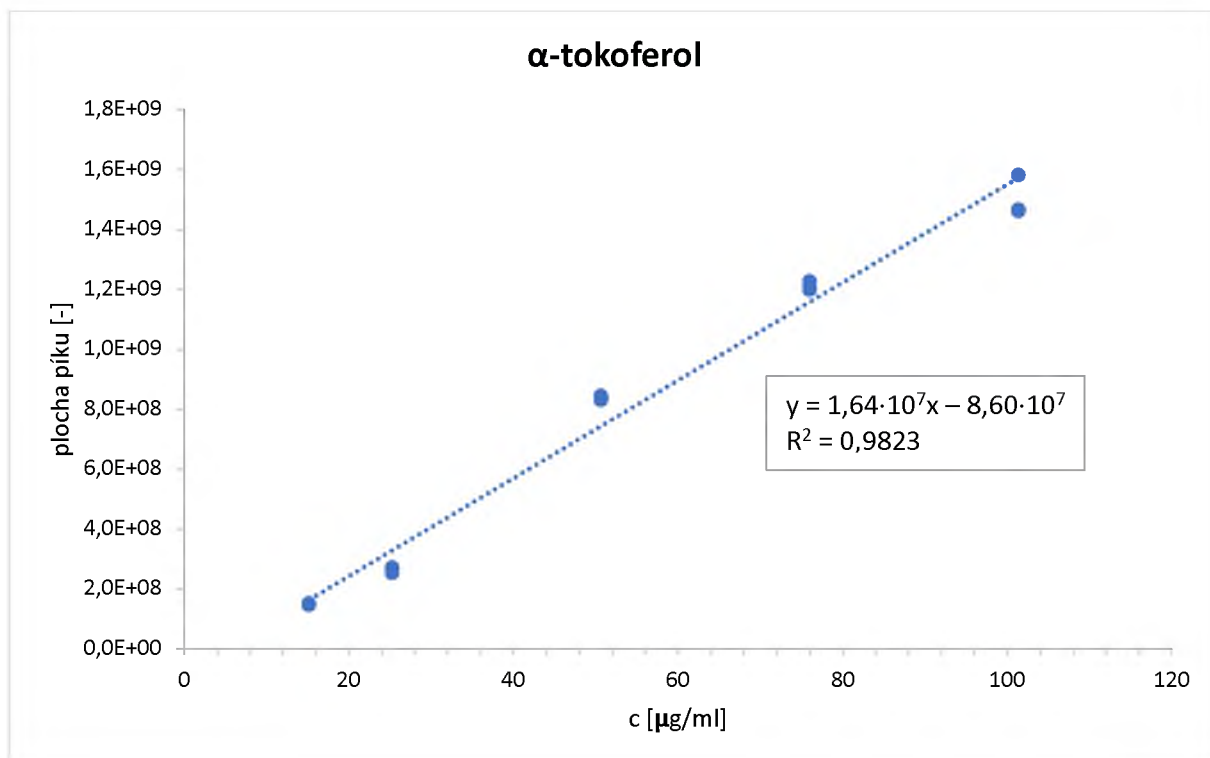
## Příloha V: Chromatogram kokosového oleje



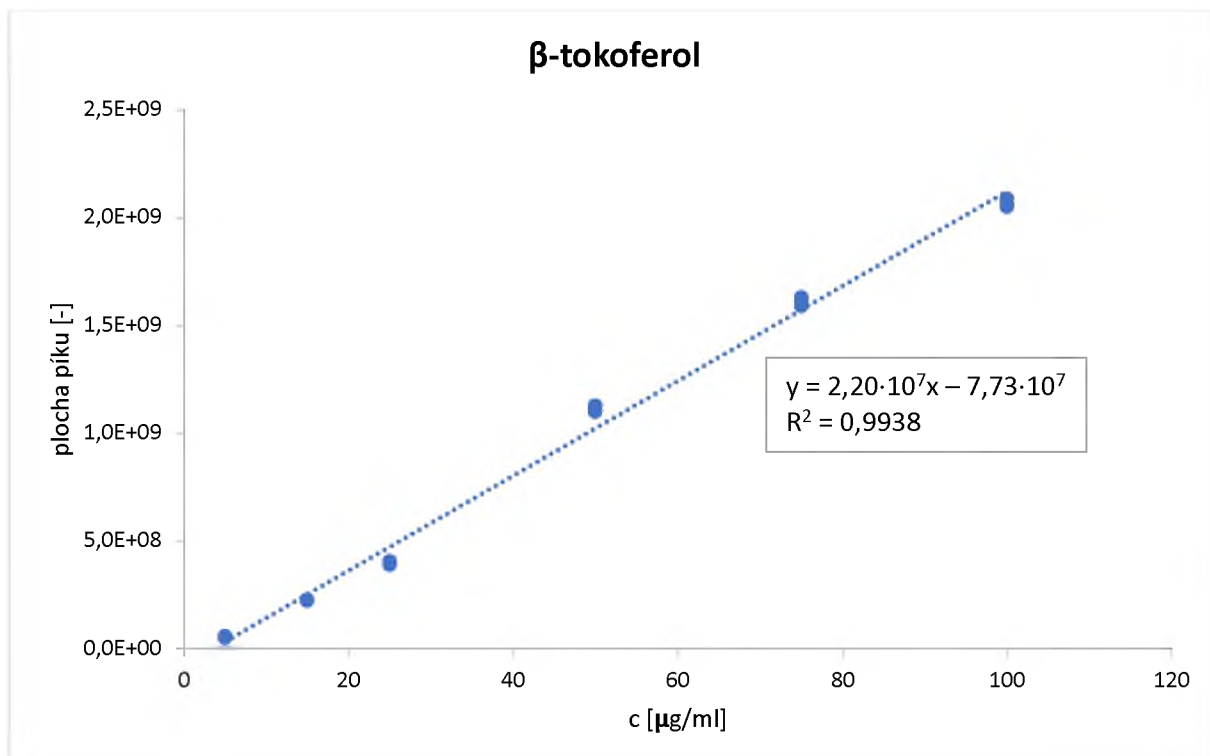
*Chromatografické podmínky: kolona TR-FAME (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), mobilní fáze: helium, průtok: 1,2 ml/min, nástřik: 1 μl, splitovací poměr: 10:1, teplota nástřiku: 250 °C, teplotní program: 70 – 230 °C, teplota EI zdroje: 230 °C, teplota převodníku GC-MS: 235 °C, teplota kvadrupólu: 150 °C.*

*Kyseliny: kapronová (2), kaprylová (3), kaprinová (4), undekanová (5), laurová (6), tridekanová (7), myristová (8), pentadekanová (10), palmitová (12), heptadekanová (14), stearová (16), olejová (18), linolová (20), α-linolenová (22), arachová (23), gadolejová (24), behenová (30), lignocerová (35).*

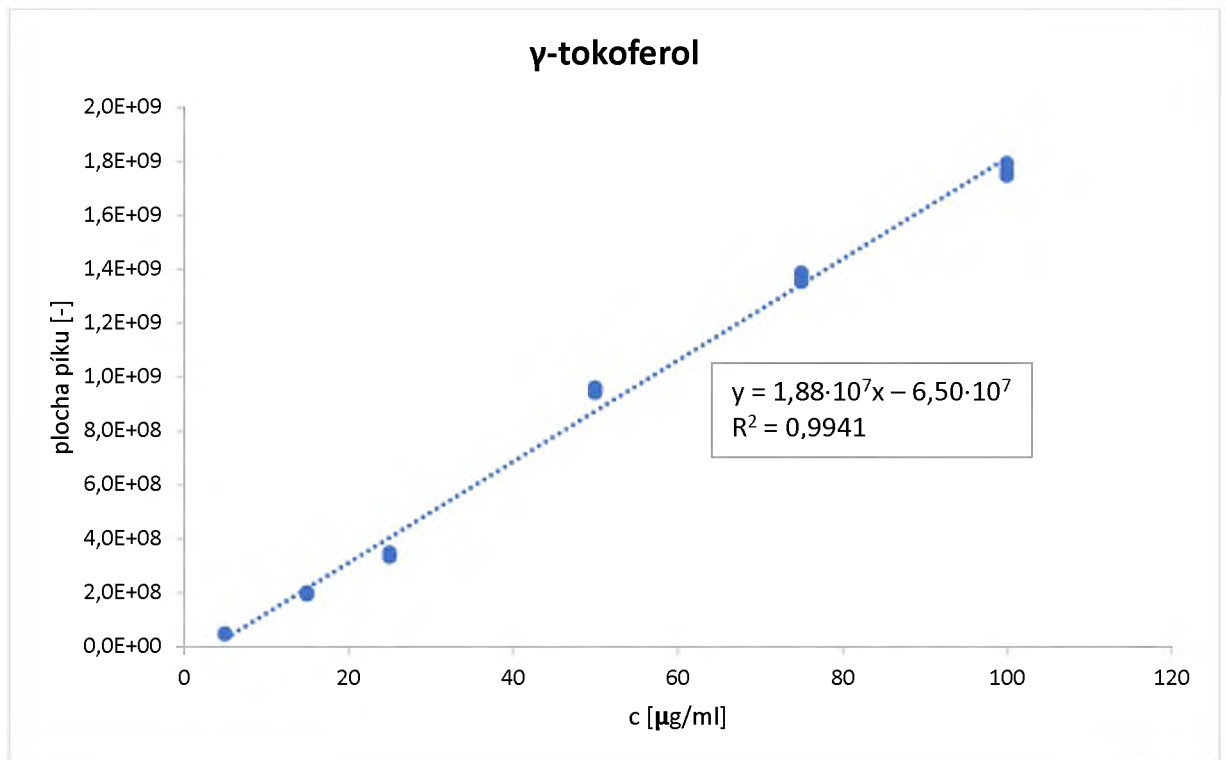
Příloha VI: Kalibrační závislost  $\alpha$ -tokoferolu



Příloha VII: Kalibrační závislost  $\beta$ -tokoferolu



Příloha VIII: Kalibrační závislost  $\gamma$ -tokoferolu



Příloha IX: Kalibrační závislost  $\delta$ -tokoferolu

