

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Hodnocení rostlinných olejů pomocí abrazivní rozpouštěcí
voltametrie na uhlíkových pastových elektrodách

Anna Horská

Diplomová práce

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Anna Horská**
Osobní číslo: **C19480**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Hodnocení rostlinných olejů pomocí abrazivní rozpouštěcí voltametrie na uhlíkových pastových elektrodách**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. V teoretické části diplomové práce se zaměřte na analýzu jedlých olejů a stručně popište podstatu známých analytických metod k jejich hodnocení. Zjistěte zastoupení elektroaktivních látek v jedlých olejích a popište jejich elektrochemické chování. Uveďte možnosti využití těchto rostlinných olejů jako pojiv v elektrodách na bázi uhlíku.
2. Praktická část by měla obsahovat detailní charakterizaci uhlíkových pastových elektrod v závislosti na použitém druhu rostlinného oleje. V rámci optimalizace nalezněte takové podmínky, aby bylo možné zajistit selektivitu elektrochemicky aktivních látek. Poté porovnejte výsledky pro jednotlivé druhy rostlinných olejů.
3. Dosažené výsledky diskutujte a na závěr kriticky zhodnoťte.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Tomáš Mikysek, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Hodnocení rostlinných olejů pomocí abrazivní rozpouštěcí voltametrie na uhlíkových pastových elektrodách 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

Anna Horská

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Tomáši Mikyskovi, PhD. a mému konzultantovi Ing. Milanu Sýsovi, PhD. za cenné rady a vynaložený čas.

ANOTACE

Tato práce představuje abrazivní stripping voltametrii (AbrSV), určenou zejména pro kvalitativní a kvantitativní analýzu pevných materiálů, jako jednoduchou, levnou, efektivní a semikvantitativní screeningovou metodu pro hodnocení rostlinných olejů. Vyvinutá metoda AbrSV je založena na elektrochemické oxidaci elektroaktivních organických látek přirozeně se vyskytujících v analyzovaných vzorcích. Kdy vzorky rostlinných olejů slouží jako pastové kapaliny. Elektrochemická detekce byla uskutečněna v $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octanovém pufru o pH 4,2 s použitím square wave voltametrie. Výsledky ukazují, že lze AbrSV použít při kontrole autenticity potravin (elektrochemického otisku prstu) a jako indikátor čerstvosti.

KLÍČOVÁ SLOVA

Uhlíkové pastové elektrody, Abrasivní stripping voltametrie, rostlinné oleje, lipofilní vitamíny, fenolické látky

ANNOTATION

The present study represents an abrasive stripping voltammetry (AbrSV), designed mainly for the qualitative and quantitative analysis of solid materials, as a simple, low-cost, efficient and semi quantitative screening electroanalytical method to assess the quality of various vegetable oils. The developed AbrSV method was based on electrochemical oxidation of electroactive organic compounds naturally occurring in the investigated samples when samples vegetable oils served as pasting liquids for preparation of corresponding carbon paste electrodes. The electrochemical detection was performed in 0.1 mol L^{-1} acetate buffer of pH 4.2 using square wave voltammetry. Obtained results show that the proposed AbrSV could be applied in the food authenticity control (electrochemical fingerprinting) and also as freshness indicator.

KEY WORDS

Carbon paste electrode, Abrasive stripping voltammetry, Vegetable oils, Lipophilic vitamins, Phenolic compounds

Obsah

Seznam obrázků	9
Seznam zkratk	10
Úvod	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1. Rostlinné oleje	12
1.1. Příprava rostlinných olejů	12
1.1.1. Mechanické zpracování	12
1.1.2. Degumming	13
1.1.3. Rafinace	13
1.1.4. Chemická rafinace	14
1.1.5. Fyzikální rafinace	14
1.1.6. Bělení a dezodorace	14
1.2. Klasifikace rostlinných olejů	15
1.2.1. Palmový olej	15
1.2.2. Řepkový olej	17
1.2.3. Slunečnicový olej	18
1.2.4. Olivový olej	18
1.3. Biologicky aktivní látky v rostlinných olejích	20
1.3.1. Fenolové sloučeniny	20
1.3.1.1. Tokoferoly a tokotrienoly	21
1.3.1.2. Oleuropein a hydroxytyrosol	21
1.3.2. Steroly	21
1.3.3. Lipofilní vitamíny	22
1.4. Analýza rostlinných olejů	24
1.4.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti rostlinných olejů	24
1.4.2. Klasické metody používané v analýze rostlinných olejů	25
1.4.3. Instrumentální metody používané v analýze rostlinných olejů	25
1.4.3.1. Separační metody	25
1.4.3.2. Spektrální analytické metody	27

1.4.3.3. Elektroanalytické metody	27
1.4.3.3.1. Elektrochemické chování vybraných látek	28
1.4.3.3.2. Abrazivní stripping voltametrie	29
1.4.3.3.3. Elektronické jazyky, nosy a ultra-mikro senzory ...	30
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
2. Abrazivní stripping voltametrie jedlých rostlinných olejů	32
2.1. Chemikálie a reagenty	32
2.2. Vzorky rostlinných olejů a živočišných tuků	32
2.3. Přístrojové vybavení	33
2.4. Příprava uhlíkové pastové elektrody (CPE)	33
2.5. Příprava pracovních roztoků	34
2.6. Pracovní podmínky abrazivní stripping voltametrie	34
2.7. Statistická analýza	34
3. Výsledky a diskuse	35
3.1. Volba uhlíkového materiálu	35
3.2. Volba detekčního média	36
3.3. Optimalizace parametrů pro detekci fylochinonu	37
3.4. Optimalizace parametrů square wave voltametrie	39
3.5. Přesnost abrazivní stripping voltametrie	40
3.6. Abrazivní stripping voltametrie jednotlivých vitamínů	41
3.7. Semikvantitativní analýza α -tokoferolu	43
3.8. Kvalitativní analýza olivových olejů	44
3.9. Analýza rostlinných olejů	46
3.10. Analýza živočišných tuků	47
3.11. Kvalitativní analýza neznámých vzorků	48
3.12. Tepelná stabilita rostlinných olejů	49
4. Závěr	51
Reference	52

Seznam obrázků

Obr. 1. Obecné schéma přípravy rostlinných olejů	13
Obr. 2. Obecné schéma přípravy palmového oleje	16
Obr. 3. Schéma výroby olivového oleje	19
Obr. 4. Elektrochemické chování α -tokoferolu v CH_2Cl_2	29
Obr. 5. Elektrochemické chování α -tokoferolu v CH_3CN s přítomností vody	29
Obr. 6. Vliv uhlíkového materiálu na AbrSV modelové CPE	35
Obr. 7. Vliv detekčního média na AbrSV na modelové CPE	36
Obr. 8. Vliv detekčního média na AbrSV na modelové CPE	37
Obr. 9. Optimalizace elektrochemické depozice fylochinonu	38
Obr. 10. Vliv amplitudy na AbrSV modelové CPE	39
Obr. 11. Vliv frekvence na AbrSV pomocí CPE s cholekalciferolem	40
Obr. 12. Opakovaná AbrSV na CPE s olivovým olejem	41
Obr. 13. Cyklická voltametrie na CPE modifikovaných lipofilními vitamíny	42
Obr. 14. AbrSV na modelové CPE za optimálních podmínek	43
Obr. 15. Voltamogramy semikvantitativního stanovení α -tokoferolu	44
Obr. 16. AbrSV na CPE připravených z různých olivových olejů	45
Obr. 17. AbrSV na CPE připravených z různých rostlinných olejů	46
Obr. 18. AbrSV na CPE připravené z vepřového sádla	47
Obr. 19. AbrSV na CPE připravené z rybího oleje	48
Obr. 20. Kvalitativní analýza rostlinných olejů	49
Obr. 21. Tepelná degradace řepkového oleje	50

Seznam zkratek

BRB	Britton-Robinsonův pufr
CPE	uhlíkové pastové elektrody
CV	cyklická voltametrie
DP AdSV	diferenčně pulsní adsorptivní stripping voltametrie
DPV	diferenčně pulsní voltametrie
FFA	volné mastné kyseliny
FID	plamenový ionizační detektor
GAE	ekvivalent kyseliny gallové
GC	plynová chromatografie
GCE	elektroda se skleněným uhlíkem
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
MUFA	mononenasycená mastná kyselina
MFOA	monoaldehydická forma oleuropein aglykonu
MFLA	monoaldehydická forma ligstrosid aglykonu
MWCNTs	grafit z výcestěnných uhlíkových nanotrubiček
PUFA	polynenasycená mastná kyselina
RSD	relativní směrodatná odchylka
SWV	square wave voltametrie
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TGC	triacylglyceroly
UFA	nenasycené mastné kyseliny
VA	vitamín A
VA1	retinol
VD3	cholecalciferol
VE	vitamín E

Úvod

Cílem této diplomové práce bylo zjistit možnosti abrasivní stripping voltametrie (AbrSV) na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) pro kvalitativní a semikvantitativní analýzu rostlinných olejů, kdy se využívalo monitorování přítomných elektrochemicky aktivních organických látek, které sloužily jako biomarkery pravosti původu. Tato práce je rozdělena na dva hlavní celky, a to vědecké rešerši a popisu laboratorních experimentů.

V teoretické části jsou popsány obecné postupy výroby rostlinných olejů a jejich základní vlastnosti, kde je demonstrována souvislost mezi typem rostlinného oleje a koncentračními hladinami obsažených biomarkerů, mezi které patří fenolické látky, steroly, některé lipofilní vitamíny a jejich provitamíny. Dále jsou popsány analytické metody sloužící k hodnocení rostlinných olejů, které se používají v praxi, a jejich použití je dáno legislativou ve formě norem. V poslední řadě jsou zmíněny některé vědecké práce věnované elektrochemickému stanovení organických látek v rostlinných olejích, kdy je největší důraz kladen na vysvětlení podstaty abrazivní voltametrie.

Experimentální část se věnuje optimalizaci metody AbrSV na modelových CPE, kdy bylo nutné vybrat vhodný uhlíkový materiál a složení detekčního média. Spolu s tím bylo nezbytné optimalizovat pracovní podmínky square-wave voltametrie (SWV). Byly připravené CPE o modelovém složení elektroaktivních látek, aby bylo možné poté identifikovat tyto biomarkery ve vybraných vzorcích rostlinných olejů.

Z obdržných výsledků bylo zjištěno, že navržená AbrSV poskytuje podobné tvary voltamogramů pro stejný typ rostlinného oleje, a tudíž by mohla posloužit jako jednoduchá a levná screeningová elektroanalytická metoda pro hodnocení pravosti a kvality rostlinných olejů.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Rostlinné oleje

Rostlinné oleje lze definovat jako nepolární viskózní kapaliny. Slouží rostlinám jako rezervní látky. Skládají triacylglycerolů (TGC) a volných mastných kyselin [1]. Obecně platí, že čím více je dvojných vazeb v řetězci, tím je olej tekutější. Rostlinné tuky jsou získávány pouze z rostlin [2]. Rostlinné oleje jsou získávány ze semen, plodů nebo jader plodů olejnatých rostlin [3]. Rostlinné oleje našli své uplatnění v potravinářství, a proto jejich kvalita podléhá kontrole dané legislativou v normovaném tvaru. Příprava rostlinných olejů, jejich klasifikace dle původu, obsah biologicky aktivních látek a přehled standardních analytických metod je popsána níže.

1.1 Příprava rostlinných olejů

Výroba rostlinných olejů stoupá společně s růstem populace a lepšími ekonomickými podmínkami. V posledních dvou desetiletích je čím dál využívanější sójový a palmový olej, a to nejen v potravinářství. S rostoucí nabídkou vzniká i více kvalitních olejů [4].

Z rostlinných olejů jsou vyčleněny dvě skupiny, panenské oleje a za studena lisované oleje. U panenských olejů se dbá na zachování charakteru oleje, který může být získáván pouze zahříváním a mechanicky tedy lisováním. Tyto oleje mohou být čištěny pouze dekantací, promytím vodou, filtrací nebo odstředěním. U olejů lisovaných za studena se zachovává charakter oleje stejným způsobem, ale není možné ho tepelně upravovat [2].

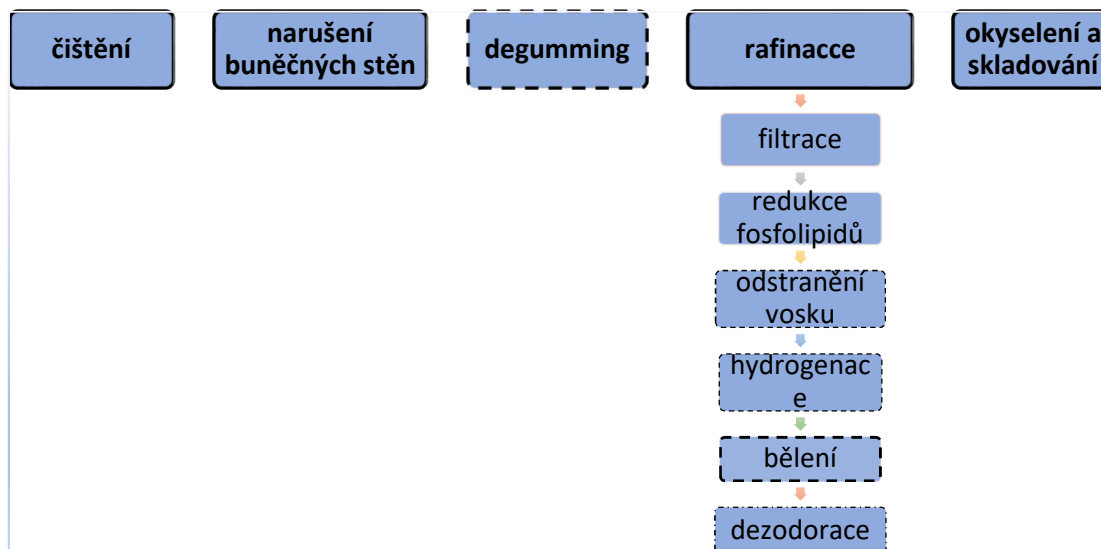
Výroba kvalitního oleje závisí nejen na šetrné rafinaci, v případě rafinovaných olejů, ale i mnoha jiných faktorech. Kvalitní vstupní suroviny, šetrný způsob přepravy a skladování, to vše má vliv kvalitu oleje [4]. Proces výroby olejů je zobrazen na Obr. 1.

Příprava začíná už před sklizní, kdy se provádí kontrola rostlin a přetřídí se zkažené plody či semena. Po sklizení a přepravě se surovina zvaží. Jsou z ní odebrány vzorky, u kterých se hodnotí vlhkost, obsah cizích částic, míra poškození, obsah proteinů a oleje [5]. Jednotlivé fáze přípravy olejů jsou detailně popsány v následujících podkapitolách.

1.1.1. Mechanické zpracování

V případě skladování je důležité surovinu uchovávat čistou. K čištění se používají síta, aspirátory nebo čističky. U semen s dřevnatými částmi se v tomto kroku může provádět odslupkování. Dalším už známějším krokem je narušení buněčných stěn výchozí suroviny. Tento krok se značně liší podle plodiny [4]. Cíl je společný, je třeba rozrušit a upravit buněčné

struktury, tak aby daly vzniknout surovému oleji. Jsou používány jak techniky mechanické, tak chemické. Patří sem lisování, drcení, extrakce, vaření a následné chlazení [5].



Obr. 1. Obecné schéma přípravy rostlinných olejů.

1.1.2. Degumming

Surový olej obsahuje značné množství nečistot. Některé z nich jsou v oleji žádoucí jako tokoferol a další antioxidanty. Fosfolipidy a fosfor jsou součástí buněčných stěn a jsou také rozpuštěné v surovém oleji. Fosfolipidy jsou pro finální produkt nežádoucí, protože ovlivňují barvu, chuť, hydrolytickou a oxidační stabilitu. Navíc snižují výtěžek při rafinaci. Proto je u některých výrobních procesů prováděn degumming nebo odsazení, hydratace [6].

Degumming je proces velmi důsledného odstranění fosfolipidů. Hydrofilní část fosfolipidů lze odstranit přidáním deionizované vody, která je hydratuje. Z hydratovaných fosfolipidů vznikne těžší fáze, která je odstředěna. Zatímco hydrofobní fosfolipidy musí být napřed okyseleny, aby bylo možné je oddělit [7]. Kyselina reaguje s kovovými komplexy fosfolipidu a přemění je na rozpustné ve vodě. Známý je též degumming pomocí enzymů, který je oblíbený kvůli větší výtěžnosti. Fosfolipidy jsou dále využívány pro výrobu lecitinu [8].

1.1.3. Rafinace

Obecně nejvíc zmiňovaným krokem výroby olejů je rafinace. Je to proces odstranění nežádoucích komplexů látek. Cílem je zvýšit trvanlivost a zlepšit organoleptické vlastnosti. Než je možné přistoupit k rafinaci je třeba olej filtrovat, tím ho zbavit kalu, vláken a nečistot [6]. Bohužel, je při rafinaci sníženo i množství člověku prospěšných lipolytických bioaktivních

látek [9]. „Také je potřeba odstranit volné mastné kyseliny konverzí na sodná mýdla. To je možné dvěma způsoby: alkalickou rafinací, nebo destilačně v procesu fyzikální rafinace“ [10].

1.1.4. Chemická rafinace

Alkalická rafinace je nejvíce rozšířená pro oleje s nízkým obsahem volným mastných kyselin (sójový a řepkový) [6] a převážně oleje vyráběné ze semen [7]. „Jedná se o neutralizaci pomocí vodného roztoku hydroxidu sodného za vzniku mýdel, která přecházejí do vodné fáze“ [10]. Od této metody je povolna upouštěno kvůli vysokým nárokům na ochranu životního prostředí. Jejím vedlejším produktem jsou takzvané „soapstock“, směs zmýdelněných mastných kyselin, solí, nečistot, případně fosfolipidů [5]. Výhoda je použití surového oleje s nižší kvalitou a produkce uspokojivého rafinovaného oleje. Také jsou při ní lépe odstraněny stopové prvky [8].

1.1.5. Fyzikální rafinace

Fyzikální rafinace je vhodná pro oleje s nízkým obsahem fosfolipidů a pro oleje s vysokým obsahem FFA. Proto je zejména používána pro výrobu palmového oleje. Fyzikální rafinace je nevhodná pro výrobu oleje ze semen. Ovšem v současnosti je zdokonalován proces degumming, takže je umožněno tímto způsobem rafinovat i oleje slunečnicové a řepkové [8]. „Hlavním úkolem fyzikální rafinace je získat komerčně přijatelné hodnoty FFA za současného zachování minoritních složek, jako jsou fytosteroly a tokoferoly [11].

1.1.6. Bělení a dezodorace

Bělení je prováděno pomocí okyselené bělicí hlinky, nebo aktivního uhlí za vakua [12]. Odstraní se tím barviva jako chlorofyly a karoteny, zbylé fosfolipidy a stopové prvky [8].

Dezodorace je proces destilace s vodní parou za vakua [5], respektive zvýšené teploty (pod 260 °C) a sníženého tlaku [6]. Slouží k odstranění volných mastných kyselin, monoglyceridů a produktů rozkladu oleje. Zároveň dezodorace zvyšuje množství trans mastných kyselin. Vzniklý olej je schlazen a je zabráněno oxidaci pomocí kyseliny citronové. Hotový olej je uskladněn. Podle potřeby jednotlivých výrobních kroků je možné do rafinace vložit frakcionaci, při které jsou odstraněny vosky [7]. Také je možné olej hydrogenovat. Hydrogenace slouží k prodloužení trvanlivosti a ke změně fyzikálních vlastností oleje. Rafinované oleje mají univerzální použití. Přínosem je jejich chuťová neutralita [8].

1.2. Klasifikace rostlinných olejů

Většinou se rostlinné oleje klasifikují podle přírodního zdroje, z kterého byly vyrobeny. Proto oleje rozeznáváme na palmové, řepkové, olivové, slunečnicové, dýňové, lněné atd. Dále se dají rostlinné oleje dělit dle jejich technologického zpracování na rafinované a nerafinované. V poslední řadě se rostlinné oleje dělí dle jejich obsažených látek či regionu jejich původu.

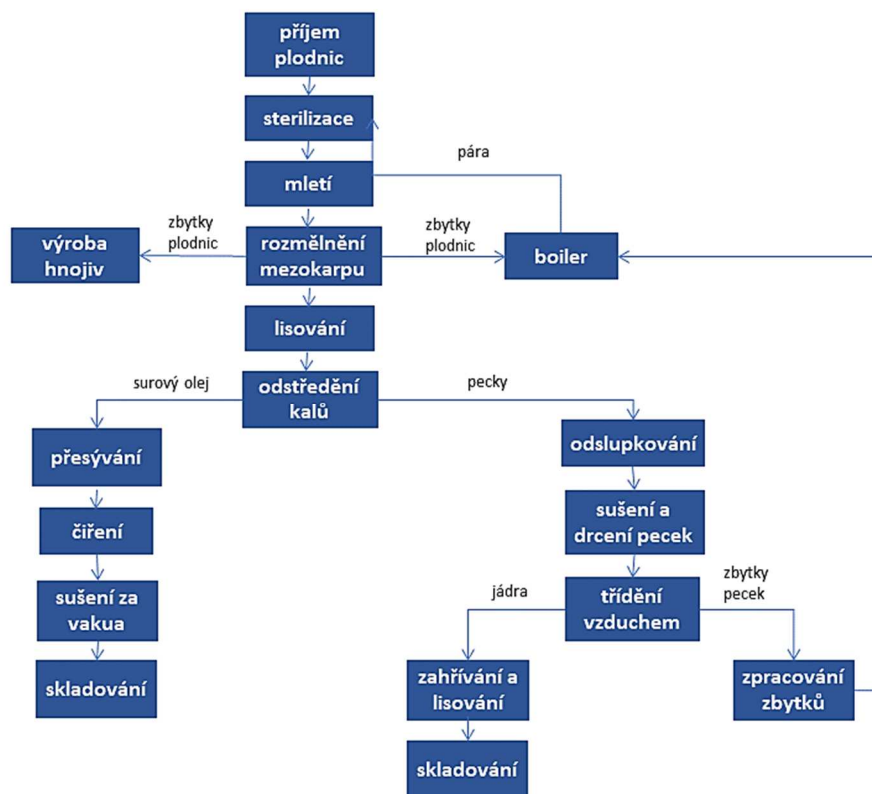
1.2.1. Palmový olej

Palma olejná (*Elais guineensis*) je rostlinou původem pocházející z východní Afriky. V současné době se její červené plody využívají k výrobě oleje. Hlavní světoví producenti tohoto oleje jsou Malajsie, Indonésie, Thajsko, Kolumbie a Nigérie [13]. Vyrábí se dva druhy oleje. Jeden je palmojádrový, vyrobený ze semena a druhý je palmový olej, který se vyrábí z dužniny (mezokarpu) plodu [14]. Tento olej má vysoký kouřový bod (okolo 230 °C), což ho řadí mezi nejvhodnější oleje na smažení. Frakcionací surového palmového oleje vzniká převážně tekutá frakce olein a pevná frakce stearin. Stearin funguje jako náhražka hydrolyzovaných tuků, výhodou je snížený obsah trans mastných kyselin [14]. První částí výroby palmového oleje je výroba surového oleje zobrazená na Obr. 2. Základní úkony výroby palmového oleje jsou sterilizace, loupání, rozmělnění, extrakce a číření oleje [15].

Po roztřídění podle zralosti a poškození jsou plodenství vařena nebo sterilizována horkou parou. Obě techniky mají za účel zastavit činnost enzymů způsobující autooxidaci a hydrolýzu. Pomáhají uvolňovat plody z lat (plodenství). Zároveň teplo způsobuje denaturaci bílkovin, která napomáhá vzniku malých trhlinek na buňkách obsahujících olej. Obsah volných mastných kyselin je snížen na hodnotu menší než 4 %. Pokud jsou plodenství sterilizována, teplo a zvýšený tlak působí i na pecky, ve kterých se oddělí jádro od tvrdého obalu pecky. Toto oddělení výrazně usnadňuje následné drcení jader [16]. Celá sterilizovaná či povařená plodenství jsou přepravena do mlátičky, ve které se uvolní plody. Vlákňité zbytky plodenství jsou využívána jako palivo pro boiler, který ohřívá vodu pro předchozí krok nebo slouží k výrobě hnojiva [17].

V dalším kroku dochází k rozmělnění palmových plodů. Palmové pecky jsou odděleny od dužniny. Tato část je opět prováděna v prostředí horké páry [15]. Pecky slouží pro zpracování palmojádrového oleje. Olej s příměsí dužniny a vody a je lisován například na šroubových lisech a přefiltrována na vibračních sítích. Tím se oddělí dužnina. Zbývající tekutina obsahující vodu a olej je z lisu převedena do sedimentačních nádrží, ve kterých probíhá

čiření. Vzniknou dvě fáze, kal a surový olej. Kal je odstředěn a obnovený surový olej, který vznikne odstředěním je opět převeden do sedimentační nádrže. Z vyčiřeného oleje jsou odstraněny nečistoty na hodnotu menší než 0,018 %. Nakonec je surový olej vysušen a připraven k přepravě [17].



Obr. 2. Obecné schéma přípravy palmového oleje.

Surový palmový olej je velmi bohatý na tokoferol a tokotrienol, fytoosteroly [14], volné mastné kyseliny, ubichinon (koenzym Q10) a karoteny. Proto je také znám jako červený palmový olej [13]. Palmový olej také obsahuje skvalen, který je prekurzorem fytoosterolů [11].

Palmový olej získaný rafinací (tekutá frakce) obsahuje téměř 50 % kyseliny olejové (a má relativně nízký obsah UFA. K tomu je poměrně bohatý na β -karoten a vitamin E. Tyto faktory mu zajišťují relativně vysokou oxidační stabilitu v porovnání s ostatními oleji [18]. Zároveň obsah FFA ve fyzikálně rafinovaném oleji závisí na vstupní surovině, která velmi ovlivňuje nastavení parametrů při rafinaci, aby byl splněn jejich komerčně přijatelný obsah. U obsahu tokoferolů, fytoosterolů a karotenoidů především závisí na použité teplotě procesu. Při více jak 212 °C jsou karotenoidy zcela zničeny [11]. Podle práce z roku 2021 se dají zbytky plodenství využívat jako zdroj červeného palmového oleje z pokrutin. Pokrutiny obsahují okolo 6 % oleje a jsou bohaté na biologicky aktivní látky. Olej je možné využít jako doplněk stravy i

k výrobě rozličných potravinářských produktů. Prozatím byl tento typ oleje využíván pouze jako palivo, popřípadě jako krmení pro zvířata [19].

1.2.2. Řepkový olej

Řepkový olej je vyráběn ze semen. Původní olej obsahuje 40–50 % kyseliny erukové, což znamená, že není vhodný ke konzumaci [10]. V současné době jsou vyvinuty kultivary řepky, rostliny *Brassica rapa* a *Brassica napus*, které obsahují nízké procento (jednotky procent) kyseliny erukové a zároveň mají velice nízký obsah glukosinolátů. To řepkový olej na přelomu tisíciletí vyneslo na pozici třetího nejčastějšího zdroje jedlého rostlinného oleje. Tento druh oleje je v anglickém jazyce nazýván „canola oil“. Podle původního kanadského druhu oleje [20].

„Řepkový olej obsahuje cca 60 % kyseliny olejové, okolo 10 % kyseliny linolenové a celkový obsah nasycených mastných kyselin je nejnižší z běžných olejů na trhu.“ [21]. Z mikroživin obsahuje kolem jednoho procenta sterolů, z nichž jsou převážně zastoupeny tokoferoly [22]. Pro degradaci sterolů a tokoferolů byla shledána dezodorace jako kritický krok výroby. Díky volným peroxidovým radikálům může snížit obsah tokoferolů v řepkovém oleji o 15–20 %. Zároveň při neutralizaci (tradiční chemická rafinace) dochází k největším ztrátám fenolických látek. Hydrofilní fenolické látky odchází zejména s vodnou částí odpadu [23].

Pro výrobu řepkového oleje je využíváno tradičních i nových metod. Lisování snižuje obsah oleje v pokrutinách přibližně na 20 % celkového obsahu [4]. Tradiční metoda výroby oleje pomocí extrakce rozpouštědlem a chemické rafinace byla popsána v předchozí kapitole. Protože tyto metody značně zatěžují životní prostředí a výrobci se snaží dosáhnout lepších vlastností oleje, jako větší oxidační stabilita, jsou vyvíjeny metody nové.

Mezi tyto metody patří extrakce nadkritickou tekutinou (SFE). Laboratorní studie z roku 2018 ukazují na lepší oxidační stabilitu řepkového oleje při extrakci nadkritickou tekutinou konkrétně oxidem uhličitým oproti konvenční extrakci rozpouštědlem (hexanem). To souvisí s větším množstvím oxidačních látek v oleji, jako jsou fytoosteroly a tokoferoly. Zároveň je zachováno obdobné složení mastných kyselin. Celková kvalita oleje je vysoká a srovnatelná s konvenčními metodami. Nevýhodou je, že SFE nedosahuje tak vysokých výtěžků [12].

Extrakce vodou za pomoci enzymů je metoda s malými výtěžky. V současné době není ekonomicky životaschopná, kvůli ceně enzymů. Dalším nevyřešeným problémem je

deemulgace a časová náročnost procesu. Pokud má být tato metoda komerčně využívána bude zapotřebí další výzkum [12].

Mikrovlnná extrakce je jedním z prvních kroků při získávání oleje. Mikrovlnné záření o frekvenci mezi 300 MHz a 300 GHz způsobí zahřátí suroviny pouze na několik minut. Tato metoda zrychluje celý výrobní proces, snižuje množství použitého rozpouštědla a při správném nastavení času působení, teploty a frekvence zvyšuje obsah antioxidantů ve výsledné oleji. Pro možnost komerčního využití je nutné provést další výzkum [12].

1.2.3. Slunečnicový olej

Optimální podnebí pro pěstování slunečnic je mírné až mírně teplé, tedy v teplotním rozmezí 20–28 °C. Pro výrobu oleje se zpracovává zralé semeno, které při skladování musí dosáhnout vlhkosti pod 9,5 %. Tím se zabrání nežádoucím enzymatickým reakcím [22]. Původní slunečnicový olej obsahuje velké množství kyseliny linolové okolo 60 %, dále kyselinu olejovou a 8–15 % nasycených mastných kyselin, převážně palmitovou a stearovou. V současné době jsou dostupné i oleje s vysokým obsahem kyseliny olejové. V nich je více než 80% kyseliny olejové a méně než 10% kyseliny linolové [24]. Nový kultivar slunečnic byl připraven kvůli výhodám, které kyselina olejová, jako MUFA (mononenasyčené mastné kyseliny), přináší. To jsou větší oxidační stabilita a dobrý vliv na hladinu HDL a LDL cholesterolu. Z výživového hlediska ovšem není toto složení optimální kvůli špatnému poměru ω -3 a ω -6 PUFA (polynenasycené mastné kyseliny) [22]. Tento olej je vhodný k fritování a je využíván v průmyslu [24].

Obsah fytoosterolů i tokoferolů se ve slunečnicovém oleji pohybuje kolem středních hodnot v porovnání s dalšími 14 oleji [25]. Při výrobě dochází k největší ztrátě fytoosterolů při bělení a dezodoraci [23].

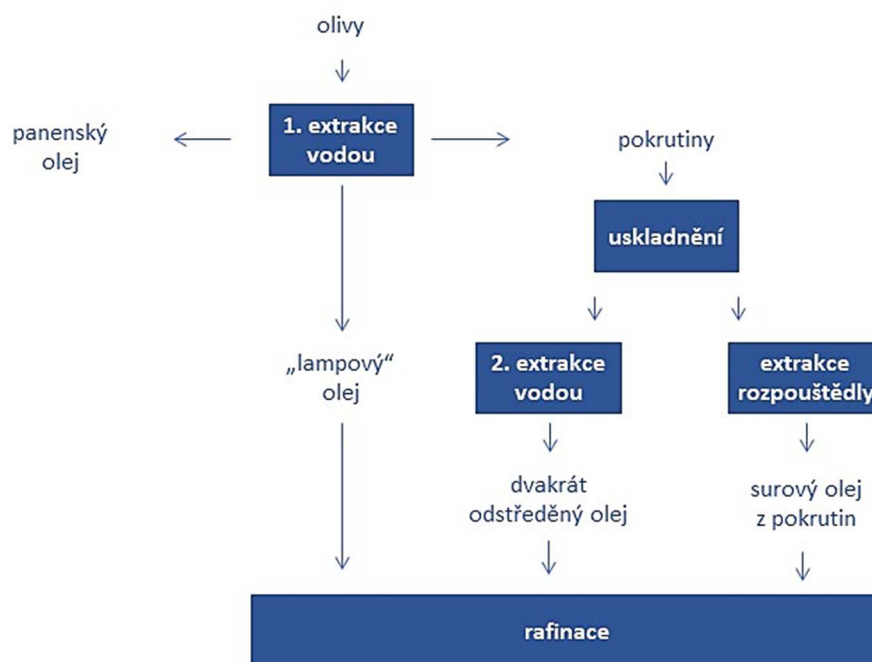
Výroba slunečnicového oleje je téměř totožná s výrobou jiných olejů získávaných ze semen. Také u něj dochází k lisování a následné extrakci rozpouštědlem [22]. Stejně tak se vyvíjí i nové metody výroby, které jsou zmíněny v podkapitole Řepkový olej.

1.2.4. Olivový olej

„Olivový olej, mononenasyčené mastné kyseliny a celkově středomořská kuchyně přináší snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění, obezity, diabetu druhého typu a zvýšeného krevního tlaku“ [26]. „Zastoupení nasycených a nenasycených tuků je v tomto oleji

15:85. Obsahuje 74 % kyseliny olejové, 11,5 % kyseliny palmitové, 9,5 % kyseliny linolové, 2,5 % kyseliny stearové“ [10].

Olivový olej se vyrábí z dužniny oliv [27]. Způsob získávání můžeme vidět v jednoduchém Obr. 3. Prvním krokem je extrakce vodou, při níž je získán panenský olivový olej, pokrutiny a „lampový“ olej. „Lampový“ olej je nevhodný pro lidskou spotřebu, proto je ho potřeba rafinovat. Po rafinaci bývá mísen ve vhodném poměru s panenským olivovým olejem a tato směs je vhodná ke konzumaci [28].



Obr. 3. Schéma výroby olivového oleje.

Pokrutiny jsou skladovány a v dalším kroku jsou extrahovány vodou nebo rozpouštědlem [28]. Běžně se jako rozpouštědlo používá hexan. Novější metoda extrakce je extrakce ultrazvukem. Těmito metodami je připravován surový olivový oleji z pokrutin. Ten je oproti olivovému oleji bohatší na steroly a polynenasycené mastné kyseliny jako je kyselina linolová [29]. Ovšem vyšší obsah této kyseliny snižuje oxidační stabilitu oleje [10]. Druhá možnost, jak naložit s pokrutinami je podruhé je extrahovat vodou. Tím vzniká také surový olej z pokrutin, který je ještě bohatší na bioaktivní látky, ale tento způsob má mnohem nižší výtěžnost. Po extrakci je olej rafinován [28].

Kontinuální extrakce vodou pro získání panenského olivového oleje zahrnuje několik kroků, ve kterých vznikají odpadní produkty a dochází ke ztrátám a přeměně bioaktivních látek.

Hlavní bioaktivní látky obsažené v olivách jsou fenolové sloučeniny [28]. Fenolové sloučeniny jsou podrobněji rozebrány v kapitole 1.2.

Podle vědecké práce z roku 2013 je jejich obsah v samotném panenském olivovém oleji omezený. Velmi záleží na druhu oliv, podnebí, počasí a ostatních vnějších faktorech. Následně je nezanedbatelný způsob výroby oleje. Při výrobě jsou aktivovány enzymatické procesy, které přeměňují bioaktivní látky z plodů na jejich deriváty. V olivovém oleji bylo stanovováno 9 biologicky významných sekundárních produkt pomocí HPLC-Orbitrap. Tyto sekundární produkty byly hydroxytyrosol, tyrosol, oleacein, oleokantal, oleuropein, ligstrosid, monoaldehydická forma oleuropein aglykonu (MFOA), monoaldehydická forma ligstrosid aglykonu (MFLA) a kyselina maslinová [30].

Během výroby panenského olivového oleje je důležitým krokem malaxace. Malaxace je způsob mělnění a mísení plodu ve vyhřívané nádobě, při kterém vzniká olivová pasta [31]. Dochází při ní k hydrolýze sekoiridoidů: oleuropeinu a ligstrosidu. Ty mohou být přeměněny na aglykony: MFOA a MFLA, nebo na fenoly a jejich deriváty: hydroxytyrosol a tyrosol, což bývá běžnější při zrání. Sekoiridoidy (oleacein a oleokantal), triterpeny (kyselina maslinová) i fenoly jsou ve finálním oleji obsaženy ve vyšší koncentraci, pokud se provádí malaxace i s peckami. Semena obsahují enzymy, které jsou důležité pro přeměnu těchto bioaktivních látek [30]. Bohužel většina těchto metabolitů odchází spolu s pokrutinami nebo odpadní vodou. Oba tyto odpadní produkty jsou v současnosti zkoumány jako potenciální zdroj bioaktivních látek, kterými by se dal finální olej opět obohatit [31].

1.3. Biologicky aktivní látky v rostlinných olejích

Některé mikroživiny v olejích přispívají k jeho protizánětlivým účinkům a jsou významnými antioxidanty [32]. V nezmýdelnitelné složce oleje jsou pro výživu významné tokoferoly, fytosteroly, polyfenoly a karotenoidy [33]. Na druhou stranu bývají přítomné i jiné látky, které mají nepříznivý vliv na jeho kvalitu. Jednou z nich je chlorofyl, který způsobuje fotooxidaci. Proto je třeba potravinu skladovat na tmavých místech a dbát na dobré odstranění chlorofylu při bělení [34]. I stopové prvky mohou způsobovat rychlejší oxidaci např.: Co, Ca, Fe, Ni a zároveň může olej obsahovat prvky potenciálně toxické např.: Cd, Hg, As [35]. Následující řádky budou věnovány především antioxidantů a bioaktivním látkám s pozitivním účinem na člověka.

1.3.1. Fenolové sloučeniny

Fenolové sloučeniny v olejích můžeme rozdělit na lipofilní a hydrofilní. Mezi lipofilní se řadí zejména tokoferoly a tokotrienoly [36]. Některé z nich jsou ve společnosti známé jako antioxidant vitamin E (VE) [37]. Mezi hydrofilní řadíme fenolové kyseliny (kyselinu kávovou a ferulovou), fenoly (hydroxytyrosol a oleuropein), fenolové alkoholy (tyrosol) [38], sekoiridoidy (oleuropein aglykon), lignany (pinoresinol) a flavonoidy (luteolin) [31]. Kromě výše zmíněných látek olivové oleje taky obsahují apigenin, kyselinu sinapovou, p-kumarovou, vanilovou a její derivát vanilin [39].

Mezi oleje s vysokým celkovým obsahem fenolických látek se řadí vysoko i nízko fenolický olivový, sezamový a řepkový olej. Kde se hodnota ekvivalentu kyseliny gallové ve 100 g oleje pohybuje mezi 5–33 mg [25]. Za nimi je dýňový olej s 2,5–5,1 mg/ 100 g oleje [42]. Naopak kokosový, sójový, palmový a slunečnicový se řadí mezi oleje s nízkým obsahem fenolických látek kolem 1 mg/GAE ve 100 g [25].

1.3.1.1. Tokoferoly a tokotrienoly

Mezi oleje s největším obsahem tokoferolů (69,4 až 213,3 mg/100 g) patří olej z pšeničných klíčků, kukuřičný, řepkový a slunečnicový. Oproti tomu mají kokosový a palmový jeho obsah nízký (2,9 až 21,3 mg/100 g). Olivové oleje jsou na tom podobně 14,1-20,3 mg/100g oleje. Ovšem všechny tyto oleje obsahují α -tokoferol. Ten má největší antioxidační kapacitu [25]. Zároveň jsou tokoferoly velmi citlivé a snadno se oxidují na tokochinony, které nemají antioxidační vlastnosti [28]. Tokotrienoly obsahují o tři dvojné vazby víc než tokoferoly, což může být důvodem pro jejich lepší schopnost bránit autooxidaci [40].

1.3.1.2. Oleuropein a hydroxytyrosol

Obsahy těchto dvou významných antioxidantů se liší dle typu rostlinného oleje, kde například průměrný obsah oleuropeinu v olivových olejích se pohybuje od 0,4 do 0,48 mg na 100 g [41]. Druhý zmíněný hydroxytyrosol se vyskytuje ve větším množství např. v dýňových olejích (5-20 mg na 100 g) [42].

1.3.2. Steroly

Steroly jsou triterpeny, které najdeme v lipidových membránách rostlin [28]. Jsou jednou z hlavních sloučenin v nezmýdlené složce surového oleje. Vyskytují se volné

nebo v podobě esterů [33]. Nejčastější z nich jsou kampasterol, sitosterol a stigmasterol [23]. Stanovení sterolů se využívá při kontrolách pravosti olejů a tuků [43]. Jejich prekurzorem je polynenasycený triterpen skvalen [44].

Olej s nejvyšším obsahem sterolů je olej z pšeničných klíčků (1765,0 mg/100 g) a hned za ním olej z rýžových otrub. Olej řepkový má střední obsah sterolů a je následován olejem olivovým. Úplně nejnižší obsah z testovaných olejů má olej palmový (58,7 mg/100 g). Ze třech výše zmiňovaných sterolů byl vždy β -sitosterol v nejvyšší koncentraci u všech testovaných olejů [25].

1.3.3. Lipofilní vitamíny

Kromě výše uvedených tokoferolů a tokotrienolů, označovaných jako vitamin E, mohou rostlinné oleje také obsahovat další lipofilní vitamíny jako vitaminy K, D, a A. Vitamin K je koenzym podílející se na syntéze řady proteinů účastnících se srážení krve a kostního metabolismu, hraje roli jako kofaktor a má další známe funkce v organismu [45]. Vitamin K existuje ve dvou základních podobách. Jedna je fylochinon (VK1) a druhá menachinon (VK2). Obě tyto formy jsou chinony a liší se pouze v postranní izoprenové jednotce [46]. V rostlinách vyskytující se fylochinon je v olejích zastoupen ve dvou izomerních formách Z a E. Znalost zastoupení jednotlivých izomerů je důležitá z hlediska výživového a zdravotního, protože pouze E izomer je bioaktivní. Z dostupných informací ovšem nebyl obsah izomerů v olejích stanoven [47].

Nejvyšší obsah celkového fylochinonu je v sójovém a řepkovém oleji v rozmezí 80-350 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ nebo 100 ml v závislosti na odrůdě, zpracování vzorku, metodě a dalších okolnostech. V ostatních olejích (slunečnicovém, olivovém, sezamovém) je obsah nižší než 100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ nebo 100 ml. Konkrétně v panenském olivovém oleji se obsah pohybuje v rozmezí 50–85 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ oleje. Jako nejvhodnější metoda pro stanovení fylochinonu byla shledána kapalinová chromatografie s post kolonovou derivatizací a fluorescenční detekcí [47].

Vitamin D má dvě hlavní formy. Jednou je ergokalciferol (VD2), který je běžný v rostlinách a druhou je cholekalciferol (VD3), který je zastoupen v živočišných produktech [48]. Ergokalciferol vzniká v rostlinách působením UV záření na provitamin ergosterol. Nejčastěji se vyskytuje například v houbách, ale také v semenech rostlin [46].

Vitamin A (VA) je označení pro skupinu látek odvozených od retinolu. Látky vykazující aktivitu VA jsou obecně nazývány retinoidy. Vzhledem k jejich různorodosti je stanovení VA složité [49]. Nejdůležitější formy jsou retinal, retinol, kyselina retinová a

karotenoidy [46]. „Retinal může být enzymatickým procesem reverzibilně přeměněn na retinol a zároveň je ireverzibilně oxidován na kyselinu retinovou“ [46].

Podle vědecké práce z roku 2020 se podařilo najít metodu rafinace, při které je zachováno 67 % karotenoidů a 70 % vitamínu E. Fakticky je během konvenční rafinace zničeno více než 98 % karotenoidů [50]. V řecké extra panenském olivovém oleji byl stanoven lutein v koncentraci 0,35 mg/100 g a β -karoten v koncentraci 0,23 mg/100 g. Tyto látky nebyly nalezeny v australském extra light olivovém oleji. Také byla vyvrácena přítomnost lykopenu a kryptoxantinu [51]. Díky výživovým problémům souvisejícím s nedostatkem mikroživin a podvýživou jsou v Indii oleje povinně fortifikovány vitamínem A (retinyl acetátem, retinyl palmitátem a retinyl propionátem) a oběma formami vitamínu D [52]. Oproti retinolu jsou retinyl palmitát i retinyl acetát více stabilní za zvýšených teplot. Zejména retinyl palmitát, který při zahřívání na 180 °C po dobu 25 min. zůstane v oleji obsažen z 80 % na rozdíl od acetátu, jehož obsah poklesne na 56 % [53].

1.4. Analýza rostlinných olejů

Pro analytické hodnocení rostlinných olejů je využíváno jak klasických, tak i instrumentálních metod. Kromě toho se hodnotí i fyzikální a senzorické vlastnosti olejů. Následující kapitoly obsahují základní klasifikaci metod používaných v hodnocení kvality rostlinných olejů, kdy je zahrnuta i podstata těchto analytických postupů.

1.4.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti rostlinných olejů

Stejně jako je důležitá informace o rozpustnosti jsou i další fyzikální a chemické veličiny důležité pro správné rozlišení, ohodnocení kvality a analýzu olejů. První z nich je hustota, která měla prozatím větší vliv na obchodování s oleji, protože přímo souvisí s objemem a hmotností. Hustota je závislá na obsahu a složení masných kyselin i teplotě. Na stejných veličinách je závislá dynamická i kinetická viskozita. Také se k základní charakterizaci rostlinných olejů využívá měření indexu lomu světla [54].

Bod tání olejů ale i samotných masných kyselin patří mezi hlavní oblasti analýzy olejů [2]. Bod tání takzvaný „slip point“ je ovlivněn délkou řetězce a druhem krystalizace. Oleje bohaté na nasycené kyseliny mohou obsahovat vyšší množství triacylglycerolů s vysokým bodem tání. Proto u nich může docházet k vykryštalizování v průběhu skladování [54]. Bod tání se stanovuje pomocí ISO normy 6321:2002 v otevřené kapiláře [2]. U olejů jsou stanovovány i fyzikální parametry jako kouřový bod, teplota vzplanutí a hoření. Také se stanovuje těkavost při 105 °C. Dilatometrické měření podílu pevné a kapalné fáze při různých teplotách se používá pro určení vhodnosti tuku pro další zpracování, například do margarínů [40].

Kromě výše uvedených stanovovaných charakteristik olejů lze použít jednoduché testy, které jsou založeny na změně zbarvení u rafinovaných a bělených olejů, jmenovitě Lovibond test a test na chlorofylové pigmenty. Jako další test je možno uvést Halphen test, jenž se využívá na zjištění přítomnosti bavlníkového oleje. Pomocí specifických chemických reakcí se určuje přítomnost stopových prvků a obsah některých nerozpustných látek [5]. V poslední řadě je třeba ještě zmínit metodu označovanou jako ČSN EN ISO 6884, kdy norma specifikuje metodu stanovení popela použitelnou pro všechny živočišné a rostlinné tuky a oleje včetně kyselých olejů [55].

1.4.2. Klasické metody používané v analýze rostlinných olejů

Mezi základní stanovení se řadí obsah volných masných kyselin vyjádřený v procentech kyseliny laurové či olejové. Stanovení jodového čísla udává míru nenasyčenosti

olejů. Metoda daná normou ČSN EN ISO 3961 nemůže být použita pro rybí oleje. Rovněž za studena lisované, surové nebo nerafinované rostlinné oleje stejně jako (částečně) hydrogenované oleje mohou poskytovat různé výsledky [56]. Dále se stanovuje číslo kyselosti, kdy se přepočítává množství hydroxidu draselného potřebného k neutralizaci volných kyselin [57]. Obdobně se udává číslo zmydlnění, které určuje množství KOH potřebného na hydrolýzu triglyceridů [58]. Peroxidové číslo představuje míru oxidace nenasycených mastných kyselin [59]. Obsah aldehydů (zejména α a β nenasycených aldehydů), které jsou produkty sekundární oxidace lipidů je udáván para anisidinovým číslem, který se stanovuje spektrofotometricky při 350 nm [60]. Měření obsahu konjugovaných dienu pomáhá k pochopení počátku autooxidace. Mezi další stanovení stupně oxidace patří metoda aktivního kyslíku (AOM), která slouží pro určení primární oxidační stability oleje. Je vhodná pro oleje, které neslouží k úpravě vysokou teplotou, například pro oleje určené do salátů. Další z těchto metod je index oxidační stability (OSI), kterým je určování terciální oxidace oleje za vysoké teploty pomocí měření vodivosti [61].

1.4.3. Instrumentální metody používané v analýze rostlinných olejů

Níže jsou popsány normované metody a postupy přípravy rostlinných olejů k analýze. V tomto případě jsou uvedeny jen ty, které se rutinně využívají. Kromě toho jsou zmíněny i některé instrumentální metody prezentované ve vědeckých publikacích.

1.4.3.1. Separační metody

Mezi základní separační metody v analýze rostlinných olejů lze zařadit i tenkovrstvou chromatografii (TLC). Za zmínku stojí uvést normu označovanou jako ČSN EN ISO 6800, která slouží k určení složení mastných kyselin v triacylglycerolech vázaných v poloze β [62].

Celkový obsah polárních látek lze stanovit pomocí kolonové chromatografie, která slouží především k určení míry oxidace při smažení. Stanovení *trans*-mastných kyselin v hydrogenovaných tucích nabývá na významu zvláště u produkce rostlinných olejů [63].

Při tepelném zpracování rostlinného oleje, rafinaci vznikají uhlovodíky nejvíce zastoupené 3,5-stigmastadienem. Díky obsahu 3,5-stigmastadienu se dají nejen rozlišit oleje panenský a rafinovaný, ale i malá příměs oleje rafinovaného do oleje panenského. K tomu slouží normy ČSN EN ISO 15788-1 a ČSN EN ISO 15788-2, ve kterých jsou stanovovány stigmastadieny v rostlinných olejích pomocí kapilární plynové chromatografie (GC) [64; 65]. Podle normy ČSN EN ISO 12966-1 jsou stanovovány volné i vázané mastné kyseliny v olejích

pomocí plynové chromatografie s kapalnou stacionární fází po jejich převedení na methyl estery. Pro detekci se využívá plamenově ionizační detektor (FID), popřípadě hmotnostní detektor [66]. Podle normy ČSN EN ISO 12228 -1 se stanovují jednotlivé a celkové steroly v olejích, kdy se využívá GC s vnitřním standardem. Nejprve je vzorek saponifikován varem pod zpětným chladičem. Nesaponifikovaná hmota je rozdělena na koloně s oxidem litným. Zachytí se anionty mastných kyseliny a steroly projdou kolonou. Sterolový podíl je oddělen pomocí TLC. Produkt je silylován a detekován pomocí FID [67].

Výše popsaná GC je upřednostňována pro hodnocení kvality tuků v rostlinných olejích, kdy lze stanovit i izomery mastných kyselin. Na rozdíl vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) dominuje při stanovení organických látek rozpuštěných v rostlinných olejích. Většina těchto látek podléhá oxidaci během hydrolýzy tuků. Proto se hydrolýza provádí s přítomností antioxidantu jako je kyselina askorbová či hydrochinon. Po hydrolýze se látky většinou vytřepávají extrakcí *kapalina-kapalina* do organického rozpouštědla, nejčastěji hexanu v několika krocích, a po odpaření hexanu se analyty rozpouštějí v mobilní fázi (acetonitril nebo metanol) pro HPLC.

Podle normy ČSN EN ISO 9936 jsou stanovovány volné alfa-, beta-, gama- a delta-tokoferoly a tokotrienoly (označovány souhrnně jako tokoly), kdy se využívá standardní spektrofotometrická analýza [67]. Podle normy ČSN EN 12823-1 je stanovován vitamín A v potravinách pomocí HPLC s fluorimetrickou nebo UV detekcí [69]. Podle normy ČSN EN 12823-2 je stanovován β -karoten v potravinách pomocí HPLC se spektrofotometrickou detekcí metodou vnějšího standardu [70]. Dále podle normy ČSN EN 12821 jsou stanovovány vitamíny D2 a D3 v potravinách. Nejprve je vzorek zmýdelněn metanolickým roztokem hydroxidu draselného a extrahován vhodným rozpouštědlem. Je provedena semipreparativní HPLC na normální fázi a následně analytickou HPLC na reverzní fázi se spektrofotometrickou detekcí. Při detekci vitamínu D2 se jako vnitřní standard používá vitamín D3 [71].

Podle normy ČSN EN 14148 je stanovován obsah vitamínu K₁ v potravinách. Je měřen redukovaný fylochinon, ze kterého je nejprve enzymaticky odstraněn tuk a pomocí HPLC s postkolonovou redukcí a fluorimetrickou detekcí analyzován. Metoda je validována pro mléko a mléčné výrobky, ale existující laboratorní zkušenosti ukazují, že je použitelná i pro další typy potravin jako jsou rostlinné oleje [72]. Kromě výše uvedených lipofilních vitamínů se pomocí HPLC stanovují fenolické látky či některé kontaminanty. Podle normy ČSN EN ISO 15753 je možné monitorovat obsah až 15 druhů polyaromatických uhlovodíků (PAH), kdy se používá fluorescenční detekce [73].

1.4.3.2. Spektrální analytické metody

Přestože v analýze rostlinných olejů převažují kolonové separační metody, některé látky nelze stanovit jinak nežli spektrofotometricky, popřípadě elektrochemicky. Mezi tyto látky řadíme minerály a těžké kovy. Podle předběžné normy ČSN P ISO/TS 21033+Amd. 1 je stanovována přítomnost rozpustných stopových prvků v olejích pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES). Touto metodou je možné, v závislosti na použitém ředícím rozpouštědle, analyzovat většinu typů rostlinných olejů (surový, degumovaný, rafinovaný, bělený, deodorizovaný a ztužený) a téměř všechny typy lecitinů a fosfatidů. Některé minerální látky jako je měď, nikl a železo je možné stanovovat pomocí atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickým atomizátorem [74].

Dále je možné spektrofotometricky stanovit některé skupiny chemicky podobných organických látek. Kupříkladu norma ČSN EN ISO 11702 slouží k stanovení obsahu volných i vázaných sterolů v olejích pomocí enzymatické kolorimetrické zkoušky. Při oxidaci enzymem vzniká peroxid vodíku, který v přítomnosti katalázy oxiduje metanol na formaldehyd a v přítomnosti amonných iontů se tvoří žlutý lutidin při 405 nm [75].

1.4.3.3. Elektroanalytické metody

Jak bylo patrné z předchozích kapitol, je elektrochemické stanovení potravin spíše okrajovým oborem. V současnosti se, ale dostává do popředí například v senzorické analýze, kde jsou využívány elektronické nosy a jazyky. Elektroanalytické metody jsou založeny na změně potenciálu elektrodové dvojvrstvy (metody bez průtoku elektrického proudu), elektrochemických reakcí přítomných elektroaktivních látek nebo interakcích s povrchem elektrody (metody za průchodu elektrického proudu).

Stanovení čísla kyselosti a peroxidového čísla rostlinných a živočišných tuků a olejů lze provádět potenciometricky [57; 76]. Dále se u rostlinných olejů stanovuje obsah vody podle normy ČSN EN ISO 8534 pomocí metody Karla-Fischera. Tato metoda má dvě varianty. První z nich je možnost provádět měření volumetricky, titrací vzorku. Druhá z nich je coulometrická, kdy se z roztoku jodidu draselného generuje jód. Tato varianta se používá pro vzorky s nízkým obsahem vody [77].

Elektroaktivní organické látky přítomné v jedlých olejích se převážně stanovují voltametricky na různých pracovních elektrodách a v organických rozpouštědlech, ve směsích voda-organika nebo ve vodných roztocích s vysokým obsahem surfaktantu. Níže jsou vypsány jednotlivé voltametrické přístupy používané v analýze rostlinných olejů [78; 79; 80; 81; 82].

1.4.3.3.1. Elektrochemické chování vybraných látek

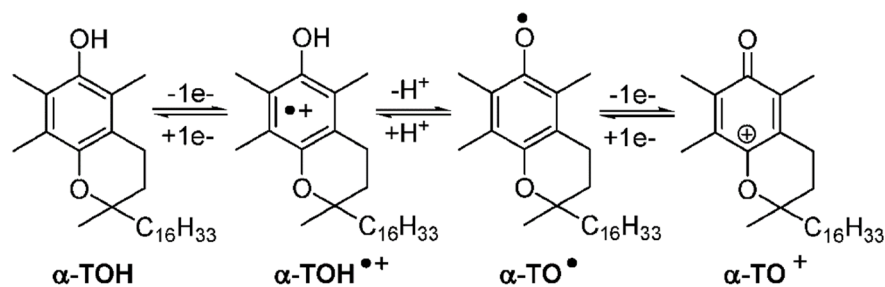
Mezi tyto techniky patří cyklická voltametrie (CV), jež má svoje nenahraditelné místo při studiu elektrochemického chování organických sloučenin obsažených v rostlinných olejích. Pomocí CV je tedy možné zjistit mechanismy elektrodových reakcí a určit jejich kinetiku. Při CV *all-trans*-retinolu (vitamín A1; VA1) odhalila, že VA1 poskytuje oxidační pík při 0,708 V. Jedná se o přechod dvou elektronů stejně jako v případě β -karotenu. Tento oxidační proces je zcela ireverzibilní, neboť dochází k hydroxylaci dvojných vazeb v konjugovaném systému. Ostatní karotenoidy většinou prochází dvěma jednoelektronovými oxidačními procesy, kdy jsou píky mezi 0,5 a 1,0 V. Dochází u nich i k redukčním procesům, které nemají tak velký význam v elektroanalýze [46].

Elektronové přechody retinyl acetátu a retinyl palmitátu (syntetické analogy VA1) jsou si strukturně velmi podobné. Na redukci se podílí necelými dvěma elektrony, v případě oxidace se jedná o přechod jednoho elektronu. Viditelným rozdílem je, že retinyl acetát má vždy větší intenzitu píku, tudíž dosahuje vyšších proudů. Tento rozdíl je dán jinými difuzními koeficienty [83].

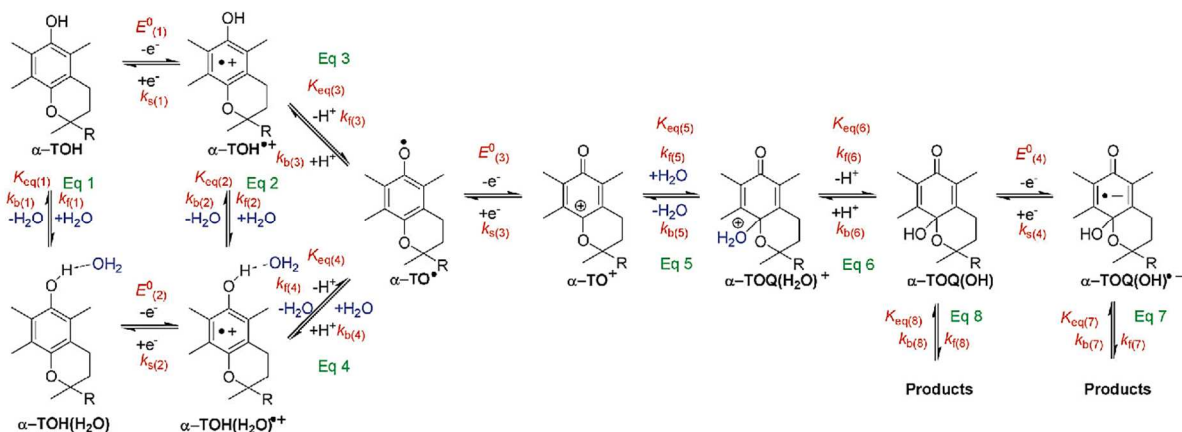
Cholekalciferol se přirozeně v rostlinných olejích nevyskytuje, ale může být přidán uměle (fortifikace). Kvůli jeho velmi nízkému obsahu je prakticky nemožné jej voltametriky monitorovat. VD3 podléhá anodické oxidaci na uhlíkových elektrodách při potenciálech od 1 do 1,2 V v závislosti na použitém organickém rozpouštědle a obsahu vody [84].

Při CV tokoferolů dochází k přechodu dvou elektronů a jednoho protonu v cyklu, jak je vidět na Obr. 4. Reakce je reversibilní pouze v organických rozpouštědlech bez přítomnosti vody. Při přítomnosti i stopového množství vody dochází k její nukleofilní adici a odtržení protonu za vzniku příslušného tokochinonu, jež je reverzibilně elektroaktivní, jak je zřejmé z Obr. 5 [85].

Elektrochemické chování fylochinonu (vitamín K₁) je stejné s chováním redoxního páru chinon/hydrochinon. Fylochinon tedy nemůže být oxidován, protože se již vyskytuje v oxidované formě. Je nutné ho nejprve redukovat za účasti dvou protonů a jednoho elektronu. Adsorbovaný fylochinon na elektrodě ze skleného uhlíku (GCE) poskytuje dva reversibilní píky (při -0,325 V a -0,006 V) v octanovém pufru o pH 4,5 při rychlosti skenování 50 mV·s⁻¹ [86].



Obr. 4. Elektrochemické chování α -tokoferolu v CH_2Cl_2 [85].



Obr. 5. Elektrochemické chování α -tokoferolu v CH_3CN s přítomností vody [85].

Oleuropein, fenolická látka typická pro olivový olej, poskytuje v 0,1 M H_2SO_4 na GCE pokryté vrstvou vícesměnných nanotrubic (MWCNTs) anodický i katodický pík. Anodický pík se pohybuje v rozmezí 5,3-6,3 mV a katodický pík v rozmezí 4,5-5,3 V v závislosti na rychlosti skenování [86]. Hydroxytyrosol se oxiduje při potenciálech kolem 0 V ve 0,1 mol \cdot l $^{-1}$ fosfátovém pufru o pH 7 na uhlíkové tištěné elektrodě na rozdíl od tyrosolu, který se oxiduje při 0,6 V [42].

1.4.3.3.2. Abrázivní stripping voltametrie

Tato diplomová práce je zcela věnována možnostem abrazivní voltametrie v hodnocení kvality různých rostlinných olejů. Z tohoto důvodu nejsou jiné voltametrické metody, ať už přímé či stripping, zahrnuty. Obecně platí, že abrazivní stripovací voltametrie (AbrSV) představuje jedinečnou elektroanalytickou techniku určenou především pro kvalitativní a částečně kvantitativní analýzu pevných materiálů, kdy se pevný analyt vyskytuje na povrchu nebo uvnitř elektrodového materiálu [88]. AbrSV využívající pulzní voltametrické techniky byla mnohokrát použita jako elektrochemická metoda otisku prstu [89]. Z výše uvedené definice vyplývá, že voltametrická měření na uhlíkové pastové elektrodě (CPE)

modifikované vzorkem lze považovat za speciální typ AbrSV. Proto existuje příležitost použití AbrSV na CPE připravených z různých druhů rostlinných olejů, jakožto vhodný analytický nástroj k identifikaci jejich původu.

Za běžných teplot lze rostlinné oleje považovat za kapalné lipidy, jejíž hlavní složkou jsou obvykle TGC bohaté na kyselinu linolovou. Tyto oleje obvykle obsahují rozpuštěné elektroaktivní látky, jako je směs tokoferolů a tokotrienolů [90], karotenoidy [91], fenolové sloučeniny (oleuropein, hydroxytyrosol a tyrosol) a fylochinon [80]. Kromě toho je lze obohatit syntetickými analogy vitamínu A, konkrétně *all-trans*-retinyl acetátem a *all-trans*-retinyl palmitátem. Lze předpokládat, že tyto látky by mohly sloužit jako biologické markery při analytickém hodnocení rostlinných olejů.

V roce 2005 byla zveřejněna vědecká práce zaměřená na stanovení rostlinných olejů pomocí CPE. Španělsí elektrochemici se však nepokusili identifikovat elektrochemické látky přítomné v těchto vzorcích, které jsou zodpovědné za typické široké voltametrické signály. Bohužel objevili pouze společné rysy pro různé typy panenských olivových olejů [78].

V této diplomové práci byly jako pastové kapaliny náhodně vybrány různé typy komerčně dostupných rostlinných olejů, jako jsou olivové, řepkové, lněné, dýňové, chia a slunečnicové oleje. Kromě toho byly analyzovány CPE připravené z minerálního oleje a lipofilních vitamínů přirozeně se vyskytujících v rostlinných olejích. Kriticky hodnoceny a diskutovány jsou možnosti použití AbrSV při identifikaci druhů rostlinných olejů a semikvantitativní stanovení přítomných lipofilních vitamínů.

1.4.3.3.3. Elektronické jazyky, nosy a ultra-mikro senzory

Výroba elektronických nosů a jazyků zaznamenala v poslední době velký rozvoj, a to zejména pro zintenzivnění požadavků po kvalitních potravinách [92]. „Elektronické nosy a jazyky jsou ve své podstatě souborem elektrických a chemických senzorů, které individuálně měří různé vlastnosti (vodivost, proud, odpor, apod.) těkavých sloučenin a výsledky poté společně zpracuje matematickými a statistickými metodami“ [78].

Elektronické nosy slouží především k určení zeměpisného původu oleje, odhalení falšování a zhoršování kvality způsobené vnějšími podmínkami. Elektronické nosy i jazyky mají základ v běžných analytických metodách jako je plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Také jsou používány polovodičové snímače, piezoelektrické snímače [92] a elektrochemické snímače, konkrétně CPE, voltametrická měření, konduktometrická měření atp [92]. Příkladem může být potenciometrická analýza, při které se pomocí systému

dvanácti membránových senzorů v pevné fázi vyrobených z polykrystalického a chalkogenidového skla detekuje druh oleje nebo jednotlivé oleje ve směsi [94].

Pro odhalení syntetických antioxidantů v olejích či pro stanovení izomerů tokoferolu v oleji byly vyvinuty metody spočívající v měření pomocí ultra-mikro senzorů. Jedná se o mikro-disk z uhlíkového vlákna v roztoku benzen/ethanol s 0,1 M H_2SO_4 [95; 96]

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2. Abrazivní stripping voltametrie jedlých rostlinných olejů

Experimentální část obsahuje seznam použitých chemikálií, popis přístrojového vybavení, přehled parametrů elektrochemických technik, laboratorní přípravu CPE a pracovních elektrolytů, seznam použitých vzorků rostlinných olejů a použitou statistickou analýzu. Zde je důležité zmínit, že experimentální část obsahuje pouze optimální podmínky získané v rámci optimalizace. Kromě rostlinných olejů byla vyzkoušena AbrSV i při analýze rybího tuku a vepřového sádla.

2.1. Chemikálie a reagenty

V této práci byly porovnávány čtyři druhy uhlíkových prášků: prášek ze skelného uhlíku Sigradur G s rozměry uhlíkových částic 5-20 μm od společnosti HTW Hochtemperatur-Werkstoffe GmbH (Thierhaupten, Německo), MWCNTs o šířce 10–30 nm a délce 5-15 μm se specifickým povrchem 40-300 m^2g^{-1} z Shenzhen Nanotech Port Co., Ltd., (Shenzen, Čína), spektroskopický grafitový prášek RW-B z SGL Carbon (Wiesbaden, Německo) a krystalický grafit CR-2 o velikosti částic kolem 2 μm z Maziva Týn, spol. s.r.o., (Týn nad Vltavou, Česko).

Pro měření byly použity tyto pufrů a roztoky: Britton-Robinson pufr připravený z 99% kyseliny borité z Chemapol (Praha Česko), 84% kyseliny fosforečné a 99,8% kyseliny octové z Penty (Praha, Česko). Na přípravu amonného pufru byl použit chlorid amonný a vodný roztok amoniaku z Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česko). Na přípravu pracovních roztoků byly použity dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný dihydrát, 65% kyselina dusičná, 99,8% octan sodný, 35% kyselina chlorovodíková, 96% kyselina sírová, hydroxid sodný rovněž od společnosti Lach-Ner, s.r.o. Parafínový olej byl zakoupen od společnosti Merck KGaA (Darmstadt, Německo). Všechny tyto roztoky byly připraveny z deionizované vody s minimálním elektrickým odporem 18,2 Ω připravené pomocí systému Milli-Q® z Merck Millipore (Burlington, USA). Jako standardní látky byly využity cholekaciferol, (\pm)- α -tokoferol; β -karoten; all-*trans*-retinyl palmitát, all-*trans*-retinyl acetát a fylochinon, vše od společnosti Merck KGaA.

2.2. Vzorky rostlinných olejů a živočišných tuků

Různé druhy olejů od různých výrobců byly použity jako vzorky pro stanovení bioaktivních látek. Všechny oleje pocházely z běžných českých obchodů, kdy byly náhodně

vybrány extra panenský olivový olej Terra di Bari D.O.P. od Olearia Sweet s.r.l. (Andria, Itálie), extra panenský olivový olej distribuován společností Access Business Group (Venlo, Nizozemí), extra panenský olivový olej odrůdy Picual od Lozano Červenka (Středokluky, Česko), portugalský extra panenský olivový olej Gourmet od Oliveira da Serra (Ferreira do Alentejo, Portugalsko), směs rafinovaného olivového oleje (80%) a panenského olivového oleje La Española Classic od výrobce Aceites del Sur.Coosur SA. (Jaén, Španělsko).

Jako ostatní jedlé jednodruhové rostlinné oleje a živočišné tuky byly vybrány pro analýzu následující: řepkový olej Lukana od Glencore Agriculture Czech s.r.o. (Ústí nad Labem, Česká republika), řepkový olej Manka na vaření, za studena lisovaný slunečnicový olej Slunka, za studena lisovaný dýňový olej Dynka od výrobce Fabio product, spol. s.r.o., (Jičín, Česko), dýňový olej Kürbiskernöl od Manfred Prattes (Pöfing-Brunn, Rakousko), Chia olej od distributora ACE Trade CZ, spol. s.r.o., (Ústí nad Orlicí Česko), za studena lisovaný, nefiltrovaný lněný olej od Romana Blaško (Vamberk, Česko), rybí olej Jecoris aselli oleum od Fagron a.s., (Olomouc, Česká republika), selské škvařené vepřové sádlo od Otto Schachinger Ges.m.b.H. (Enzersdorf, Rakousko).

2.3. Přístrojové vybavení

Veškerá voltametrická měření byla prováděna v běžném tříelektrodové uspořádání skládající se z CPE (pracovní), Ag/AgCl/3,0 mol·l⁻¹ KCl (referenční) a platinový drát (pomocné elektrody). Elektrodové Teflonové pouzdro o průměru 3 mm pocházelo z pracoviště Katedry analytické chemie, Univerzity Pardubice. Referenční elektroda pocházela od firmy Metrohm Česká republika, s.r.o. (Praha, Česko), pomocná elektroda od firmy ED s.r.o. (Turnov, Česko). Tyto elektrody byly připojeny k potenciostatu/galvanostatu Autolab PGSTAT 128N od výše uvedené firmy Metrohm, který byl ovládán prostřednictvím softwaru NOVA 1.11. Elektrický odpor elektrody byl měřen na multimetru HC-3500T od Hung Chang Co. Ltd. (Soul, Jižní Korea). Pro měření pH byl použit pH-metr od společnosti InoLab, s.r.o. (Kladno, Česko).

2.4. Příprava uhlíkové pastové elektrody (CPE)

Pro přípravu byl vybrán krystalický grafit CR-2 o průměru částic 2 μm, který byl mísen s olejem, tak aby výsledný obsah oleje byl 20 % (w/w). Tento poměr nebyl optimalizován, protože se použil doporučený poměr z odpovídající literatury [97; 98]. Pasta byla homogenizována v třecí misce po dobu 15–20 min a vzniklá uhlíková pasta se naplnila do

dutiny elektrodového pouzdra o průměru 3 mm. Měření probíhala nejdéle tři dny po přípravě elektrody, aby CPE poskytovala reprodukovatelné výsledky měření. Přestože většina biologicky aktivních látek jsou uvnitř uhlíkové pasty chráněny před vzdušným kyslíkem, stejně byly raději skladovány v chladničce při 8 °C. Během měření se CPE musely vytemperovat na laboratorní teplotu a povrch byl vždy renovován o vlhčený filtrační papír.

2.5. Příprava pracovních roztoků

Na přípravu zásobního roztoku Britton-Robinsonova pufru bylo použito 2,472 g kyseliny borité, 2,2 ml kyseliny octové a 3 ml kyseliny fosforečné do 1000ml odměrné baňky. K zásobnímu roztoku byl přidáván $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydroxid sodný až do požadovaného pH 2. Na přípravu amonného pufru o pH 9,9 byla použita 250 ml odměrná baňka. Naváženo bylo 34 g chloridu amonného a 42 ml vodný roztok amoniaku o koncentraci $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Na přípravu fosfátového pufru byly použity 100ml odměrná baňka, do které bylo pipetováno 50 ml $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dihydrogenfosforečnanu sodného a doplněno vodou. Následně byl přidáván roztok $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydrogenfosforečnanu sodného do požadovaného pH 7. Na přípravu octanového pufru bylo naváženo 10 g octanu sodného a doplněno 300 ml vody následně byl přidán $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydroxid sodný do požadovaného pH 4,2. Dále byly použity vodné roztoky silných anorganických kyselin, jmenovitě $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HNO₃, a $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ H₂SO₄.

2.6. Pracovní podmínky abrazivní stripping voltametrie

Stanovení probíhalo pomocí square wave voltametrie (SWV) v 10 ml octanového pufru o pH 4,2. Optimální podmínky pro potenciálovou rampu SWV jsou potenciálové rozpětí -0,4 V až 1,6 V, potenciál depozice (E_{dep}) při -0,4 V, krokovém přírůstku (E_{step}) 5 mV, amplitudě (E_{ampl}) 25 mV, frekvenci (f) 40 Hz a času depozice (t_{dep}) 30 s. Bylo nastaveno 5 s pro ustálení podmínek tzv. equilibration time (t_{eq}). Všechna měření probíhala za laboratorní teploty. Vzorky rostlinných olejů byly skladovány v chladničce při 8 °C.

2.7. Statistická analýza

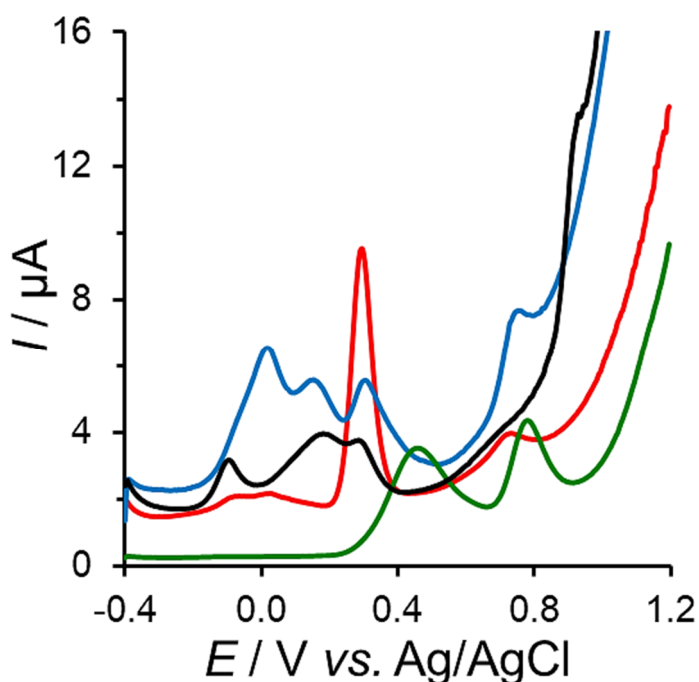
Měření vzorků bylo provedeno minimálně v pěti opakováních ($N = 5$) pro ověření opakovatelnosti výsledku. Přesnost těchto opakovaných měření byla prezentována jako relativní směrodatná odchylka (RSD). Jelikož se neprováděla kvantitativní analýza, žádná složitější statistické výpočty nebyly nutné.

3. Výsledky a diskuse

Kvalitativní analýza náhodně vybraných rostlinných olejů pomocí AbrSV nemohla být provedena bez nutnosti složité optimalizace, kdy byl důraz kladen na počet a tvar anodických píků, tak aby se dali jednotlivé vzorky od sebe rozpoznat. Optimalizace spočívala v nalezení vhodného typu uhlíkového materiálu, složení detekčního média a parametry SWV. Veškeré změny v experimentech lze nalézt v legendě u příslušných obrázků

3.1. Volba uhlíkového materiálu

První krok pro výrobu CPE je správný výběr uhlíkového materiálu. Pro tento účel byly vybrány čtyři druhy uhlíku od nejobyčejnějšího grafitového prášku CR-2, přes prášek ze skelného uhlíku (Sigradur G), MWNTs, až k spektroskopickému grafitovému prášku RW-B. Z každého typu uhlíkového materiálu byla připravena odpovídající CPE s obsahem 20 % extra panenského olivového oleje, tudíž se CPE lišily pouze typem uhlíku. Jak již bylo zmíněno v úvodu, pro dobré rozlišení druhu oleje (tzv. otisku palce oleje) je potřeba mít co nejvyšší počet píků, které se výrazně nepřekrývají. V Obr. 6 jsou znázorněny příslušné voltamogramy CPE.

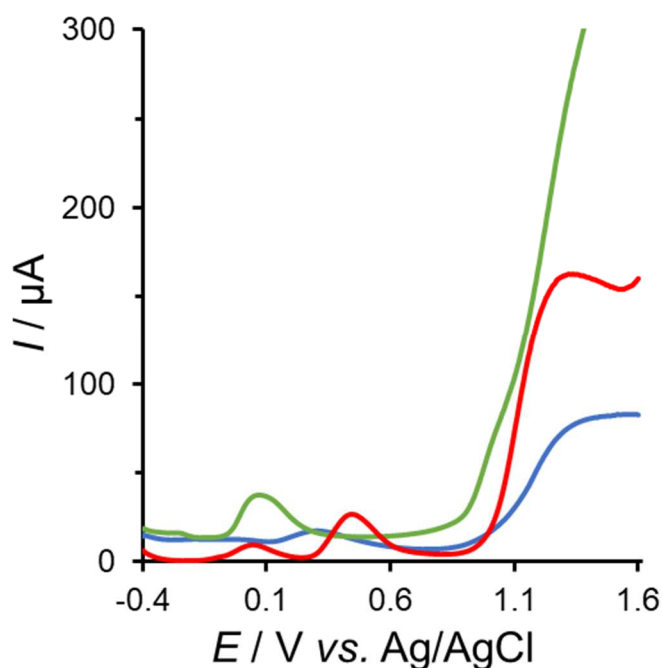


Obr. 6. AbrSV olivového oleje od distributora Acess Bussines Goup CPE s různým typem uhlíkového prášku, Signatur G (červený), MWNTs (modrý), krystalický CR-2 (černý) a RW-B (zelený voltamogram), při $E_{\text{dep}} = -0,4$ V, $E_{\text{step}} = 5$ mV, $E_{\text{ampl}} = 25$ mV, $f = 40$ Hz a $t_{\text{dep}} = 30$ s v octanovém pufru o pH 4,2.

U prášku typu Sigradur G (19 Ω) je vysoký a ostrý pouze jediný pík a ostatní jsou špatně rozlišitelné, což není žádoucí, pokud chceme stanovovat více látek najednou. Elektroda se spektroskopickým grafitovým práškem RW-B (10,2 Ω) poskytovala signály pouze dvou rozlišených píků. Voltamogram náležící elektrodě s MWNTs (5,1 Ω) sice zobrazuje čtyři píky, ale tři z nich jsou slabě rozlišitelné. Na voltametričtém záznamu CPE z krystalického grafitu CR-2 (5,3 Ω) je sice poslední pík na konci potenciálového okna, ale ostatní píky jsou lépe rozlišeny než u MWCNTs. Vzhledem ke spotřebě materiálu je grafit CR-2 ekonomicky výhodná varianta. Z těchto důvodů byl zvolen za optimální právě krystalický grafit CR-2.

3.2. Volba detekčního média

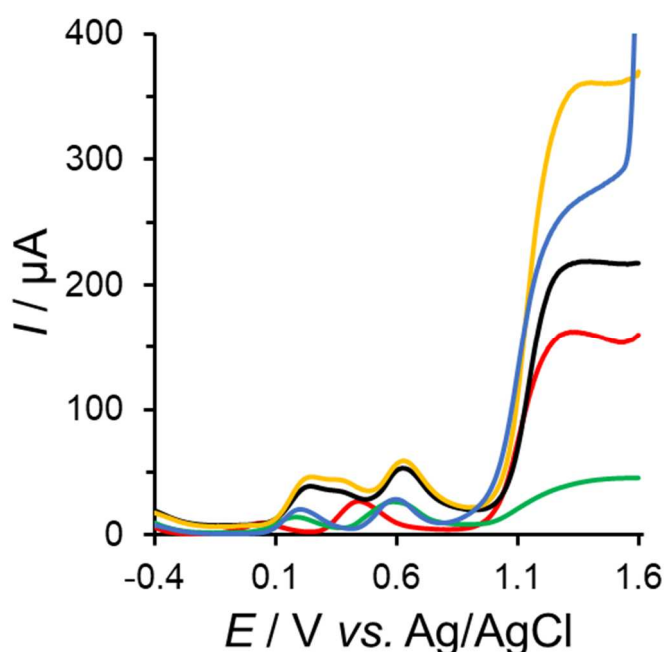
Intenzita a tvar píku závisí na povaze elektrolytu, ve kterém je elektroda ponořena. Jednou z důležitých vlastností je pH. Pro volbu vhodného detekčního média byly nejprve vybrány tři roztoky o různých pH: octanový pufr o pH 4,2, fosfátový pufr o pH 7 a amonný pufr o pH 9,9. Následně proběhla analýza v 10 ml každého z pufrů pomocí CPE (7,2 Ω), která obsahovala modelové složení 1 % (w/w) fylochinonu, 1 % (w/w) α -tokoferolu, 1 % (w/w) cholekalciferolu a 17 % (w/w) parafínového oleje (viz. Obr. 7).



Obr. 7. AbrSV na modelové CPE s 1 % (w/w) fylochinonu, 1 % (w/w) α -tokoferolu a 1 % (w/w) cholekalciferolu v octanovém pufru o pH 4,2 (červený), amonném pufru o pH 9,9 (zelený) a fosfátovém pufru o pH 7 (modrý voltamogram) při $E_{\text{dep}} = -0,4$ V, $E_{\text{step}} = 5$ mV, $E_{\text{ampl}} = 25$ mV, $f = 10$ Hz a $t_{\text{dep}} = 30$ s.

Získané anodické píky byly nejlépe rozlišitelné v octanovém pufru. Tuto skutečnost potvrzují údaje v literatuře, ve které byly signály optimální při nižším pH [78]. Proto bylo přistoupeno k dalšímu měření v roztocích kyselin a pufrům s nižším pH. Těmito roztoky byly $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Britton-Robinsonův pufr o pH 2, $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2SO_4 , $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HNO_3 a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl , vše o pH cca. 1.

Z Obr. 8. je patrné zvýšení základní linie a překryv píků při použití roztoků kyseliny sírové a kyseliny chlorovodíkové. Britton-Robinsonův pufr (BRB) poskytuje sice oddělené píky i nižší základní linii než kyseliny, ale nebyl zde patrný pík v oblasti 1,3 V. Vyhovující se zdá být octanový pufr, nebo kyselina dusičná. Při dalších měřeních bylo zjištěno, že modelová CPE poskytuje v kyselině dusičné dostatečně reprodukovatelné výsledky. Kvůli oxidativním vlastnostem kyseliny dusičné byl detekční médium upřednostněn octanový pufr o pH 4,2.



Obr. 8. AbrSV na CPE s příměsí 1 % (w/w) fylochinonu, 1 % (w/w) α -tokoferolu a 1 % (w/w) cholekalciferolu. Voltamogramy byly pořízeny v octanovém pufru o pH 4,2 (červený), $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BRB o pH 2 (zelený), $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2SO_4 (černý), $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl (žlutý) a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HNO_3 (modrý voltamogram). Za podmínek $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$, $f = 10 \text{ Hz}$ a $t_{\text{dep}} = 30 \text{ s}$.

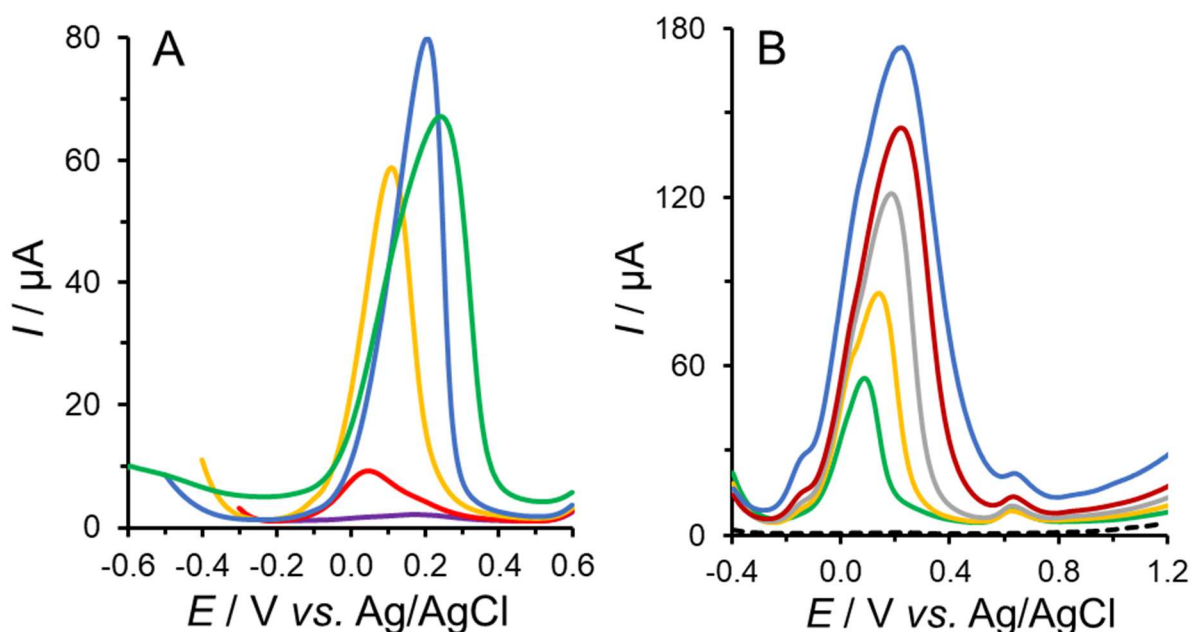
3.3. Optimalizace parametrů pro detekci fylochinonu

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.4.3.3.1. *Elektrochemické chování vybraných látek*, fylochinon se běžně vyskytuje ve své oxidované formě. Pro jeho detekci spolu s ostatními

látkami je třeba ho nejprve redukovat. K tomu se využívá záporný depoziční potenciál po určitou dobu. Bylo předpokládáno, že tento potenciál nebude mít vliv na ostatní látky, které už se v redukované formě vyskytují.

Pro toto měření byla připravena CPE ($4,3 \Omega$) s obsahem 2 % (w/w) fylochinonu, 18 % (w/w) parafinového oleje. Obr. 9A. ukazuje, jak byl postupně aplikován depoziční potenciál $-0,2$, $-0,3$, $-0,4$, $-0,5$ a $-0,6$ V. Před každým měřením byl obnoven povrch elektrody. Na stejné elektrodě byl optimalizován čas depozice, a to v intervalech 30, 60, 120, 240 a 300 s, jak je vidět v Obr. 9B.

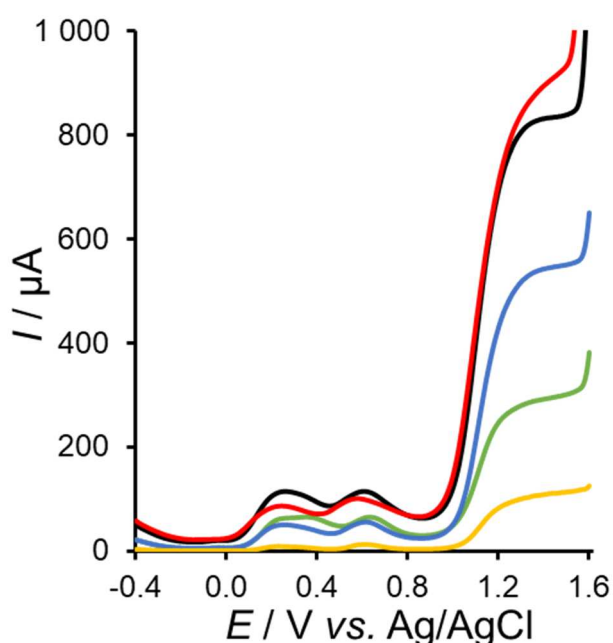
Se snižujícím se potenciálem se píky zvyšují, rozšiřují a stávají se lehce asymetrickými. Naopak hodnoty bližší nule ($-0,2$ a $-0,3$ V) tvoří malý špatně pozorovatelný pík. Se zvyšujícím se časem píky rostou, ale také se rozšiřují. Z těchto důvodů byl vybrán depoziční potenciál $-0,4$ V a depoziční čas 30 s.



Obr. 9. AbrSV na CPE s 2 % (w/w) fylochinonu v octanovém pufru o pH 4,2 za podmínek: $E_{\text{dep}} = -0,2$ V (fialový), $-0,3$ V (červený), $-0,4$ V (žlutý), $-0,5$ V (modrý) a $-0,6$ V (zelený voltamogram), $E_{\text{step}} = 5$ mV, $E_{\text{ampl}} = 25$ mV, $f = 10$ Hz a $t_{\text{dep}} = 60$ s (A). AbrSV na CPE s 2 % (w/w) fylochinonu v octanovém pufru o pH 4,2 za podmínek $t_{\text{dep}} = 30$ s (zelený); $t_{\text{dep}} = 60$ s (žlutý); $t_{\text{dep}} = 120$ s (šedý); $t_{\text{dep}} = 240$ s (červený) a $t_{\text{dep}} = 300$ s (modrý voltamogram), kde blank značí přerušovaná čára (holá CPE) při $E_{\text{dep}} = -0,4$ V, $E_{\text{step}} = 5$ mV, $E_{\text{ampl}} = 25$ mV a $f = 10$ Hz (B).

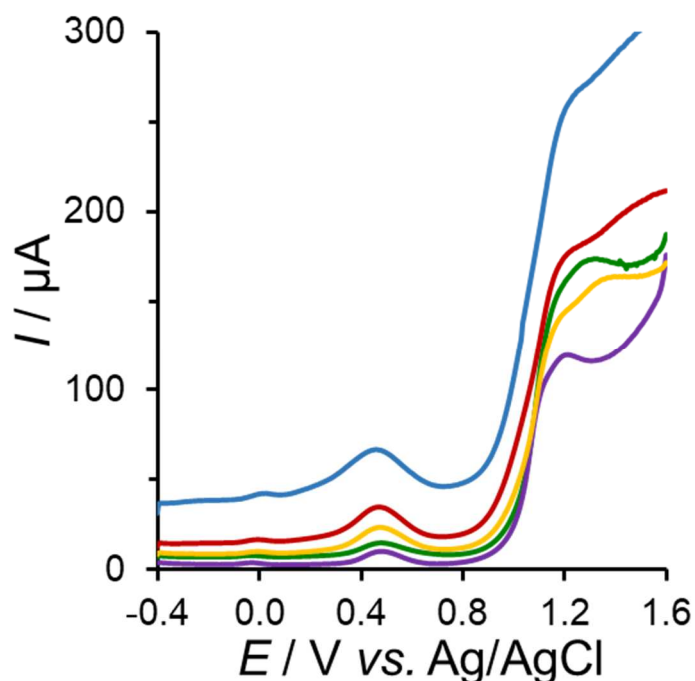
3.4. Optimalizace parametrů square-wave voltametrie

Aby získané anodické píky obsažených látek v rostlinných olejích byly co nejvíce rozlišitelné, je zapotřebí nalézt optimální nastavení parametrů zvolené elektrochemické techniky, v našem případě SWV. Za konstantního potenciálového kroku 5 mV byly optimalizována amplituda a frekvence. Pro určení vhodné amplitudy byla použita již připravená elektroda ($7,2 \Omega$) s obsahem 1 % (w/w) fylochinonu, 1 % (w/w) α -tokoferolu, 1 % (w/w) cholekalciferolu a 17 % (w/w) parafínového oleje. Jak je vidět na Obr. 10, se zvyšující se amplitudou se zvyšuje i signál pro cholekalciferol (anodický pík při 1,2 V). Z tohoto důvodu byla zvolena amplituda 25 mV.



Obr. 10. Voltamogramy získané během optimalizace amplitudy na CPE o složení 1 % (w/w) fylochinonu, 1 % (w/w) α -tokoferolu, 1 % (w/w) cholekalciferolu a 17 % (w/w) parafínového oleje v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HNO}_3$ při $E_{\text{ampl}} = 10$ (žlutý), 30 (zelený), 50 (modrý), 700 (černý) a 100 mV (červený záznam), $t_{\text{dep}} = 30 \text{ s}$, $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ and $f = 10 \text{ Hz}$.

Při hledání vyhovující frekvence byla použita CPE ($12,1 \Omega$) s 2 % cholekalciferolu (w/w) a 18 % (w/w) parafínového oleje. Signál byl měřen při 2, 4, 6, 8, 10, 15, 18, 25, 40, 60, 80 a 100 Hz. Záznam je zobrazen na Obr. 11. Při vyšší frekvenci mají píky vyšší proudovou odezvu, a tím jsou lépe rozlišitelné. Frekvence 10 Hz se zdála dostačující, ale pro měření reálných vzorků se později osvědčila frekvence 40 Hz. Z tohoto důvodu byly některé elektrody měřeny při frekvenci 10 Hz a některé při 40 Hz.



Obr. 11. Voltamogramy příslušící CPE o složení 2 % (w/w) cholekalciferolu a 18 % (w/w) parafínového oleje v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HNO}_3$ při $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$, $t_{\text{dep}} = 30 \text{ s}$, $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $f = 2$ (fialový), 6 (zelený), 10 (žlutý), 25 (červený) a 60 Hz (modrý záznam).

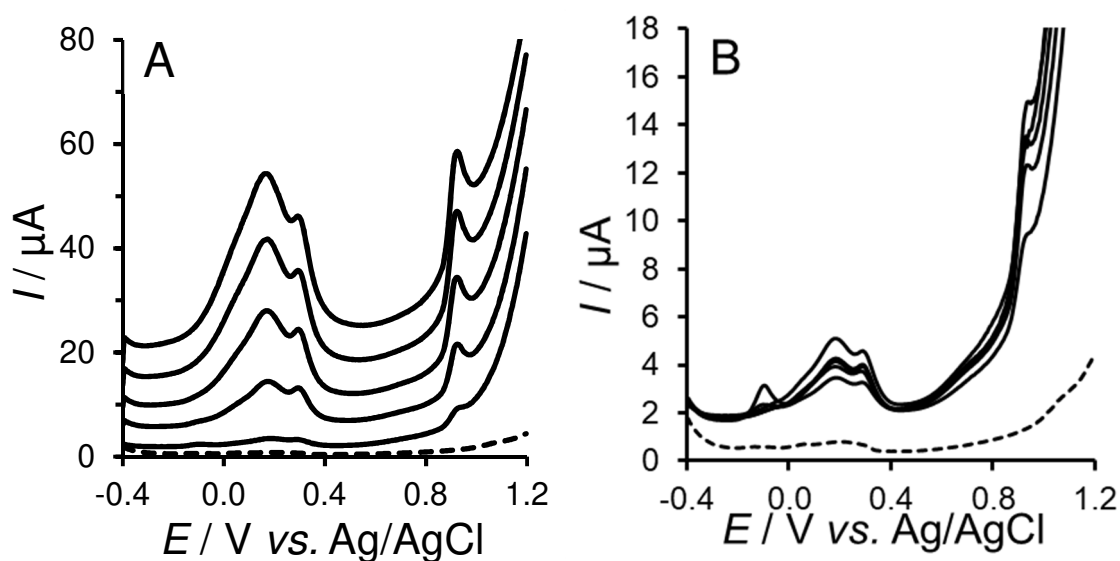
3.5. Přesnost abrazivní stripping voltametrie

Přesnost lze definovat jako shodu opakovaných měření při stejných pracovních podmínkách a obecně se vyjadřuje jako RSD (%). Opakovatelnost obvykle závisí na mnoha faktorech, kde tím nejdůležitějším je homogenita uhlíkové pasty a rovnoměrné rozložení přítomných analytů. Předpokládá se, že homogenita závisí na tvaru uhlíkových částic a na samotné přípravě.

V rámci těchto měření bylo důležité zjistit, zda je možné provádět opakované analýzy na jednom povrchu CPE, nebo se bude muset po každém měření povrch CPE obnovovat. Pro ověření reprodukovatelnosti byla připravena elektroda s 20 % (w/w) extra panenského olivového oleje homogenizovaného s krystalickým grafitem CR-2 ($5,3 \text{ } \Omega$). Porovnání příslušných voltamogramů je zobrazeno na Obr. 12.

Jak je vidět na Obr. 12A základní linie společně s anodickými píky se s každou další analýzou zvyšovala. Důvodem bude pravděpodobně nahromadění analytu na povrchu elektrody během opakovaných analýz. Na základě tohoto zjištění je zřejmé, že každá analýza se bude muset provádět vždy na novém povrchu, kdy byla zjištěna mnohem větší shoda při opakovaném

měření (viz. Obr. 12B). Pro výpočet přesnosti byly použity výšky píku při 0,18 V, kdy byla spočtena 12,4% RSD, z čehož vyplývá, že AbrSV není příliš vhodná pro kvantitativní analýzu.



Obr. 12. Pět opakovaných voltamogramů pořízených na stejném (A) a obnovovaném povrchu CPE (B) připravené z 20% (w/w) extra panenského olivového oleje v octanovém pufru o pH 4,2 při $E_{\text{dep}} = -0,4$ V, $E_{\text{step}} = 5$ mV, $E_{\text{ampl}} = 25$ mV, $f = 40$ Hz a $t_{\text{dep}} = 30$ s.

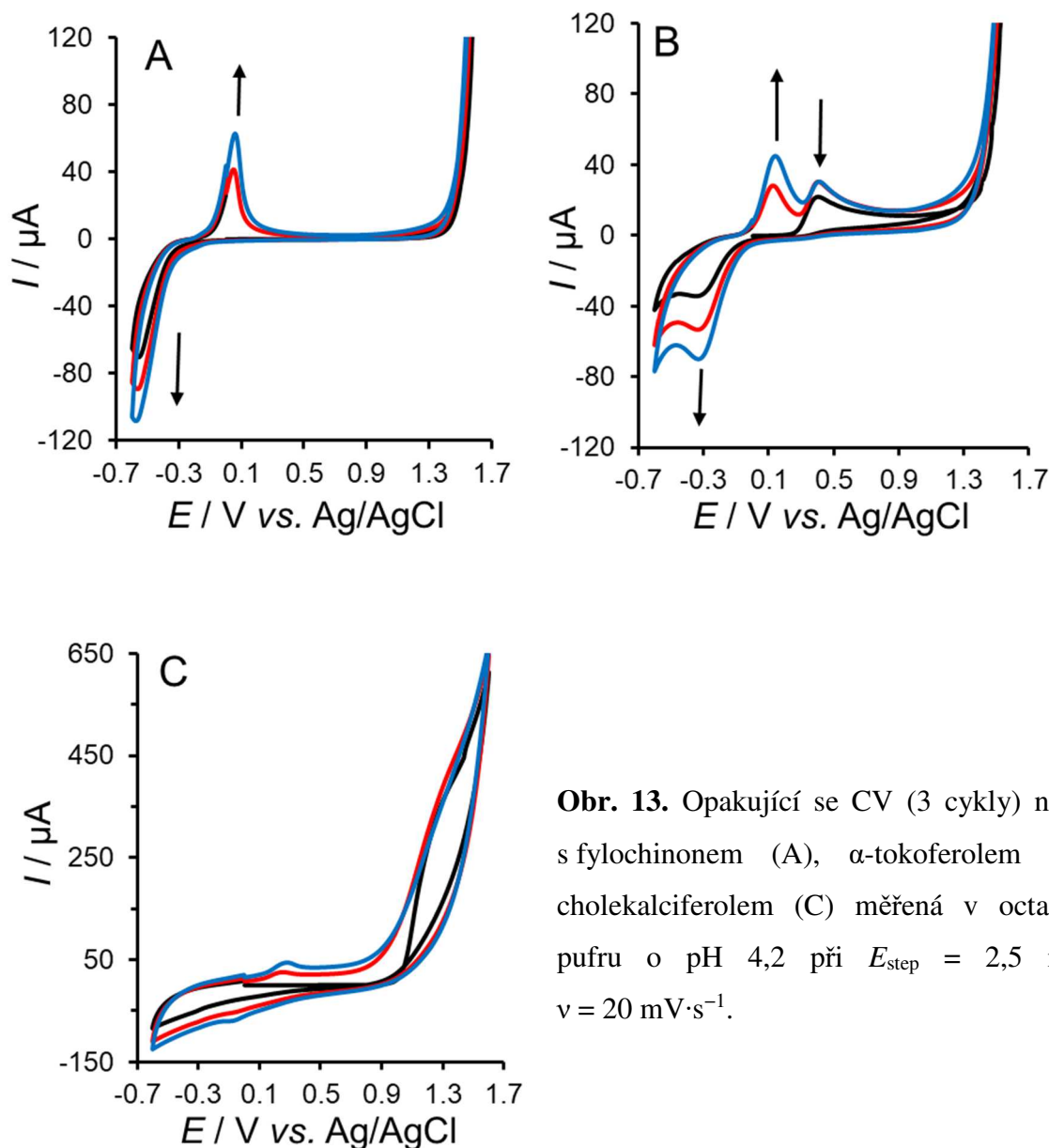
3.6. Abrazivní stripping voltametrie jednotlivých vitamínů

Jedním z cílů této diplomové práce bylo odhalit složení rostlinných olejů, tedy identifikovat přítomné elektroaktivní látky. Z tohoto důvodu byla připravena série CPE obsahující vždy 2 % (w/w) β -karoten, α -tokoferol, cholekalciferol nebo fylochinon a 18 % (w/w) parafínového oleje. Bohužel je nutné konstatovat, že další eventuální elektroaktivní látky (biomarkery autenticity olejů) nebyly bohužel studovány. Mezi tyto látky patří oleuropein a hydroxytyrosol, tyrosol, β -stigmasterol, skvalen, atd.

Modelové CPE s obsaženými vitamíny byly postupně proměřovány v režimu CV, jak je vidět na Obr. 13. Byly určeny hodnoty potenciálů píků (E_p) studovaných vitamínů, jmenovitě oxidační pík při 0,05 V a redukční pík při $-0,5$ V fylochinonu, oxidační pík při 0,40 V (v 2. cyklu oxidační pík při 0,13 V) a jeden redukční pík při $-0,3$ V α -tokoferolu a oxidační pík cholekalciferolu při 1,3V.

Pro úplnost byly připraveny i elektrody s retinyl palmitátem (7,0 Ω), retinyl acetátem (6,0 Ω) a β -karotenem (13,6 Ω) všechny o obsahu 2 % (w/w) stanovované látky a 18 % (w/w) parafínového oleje, jelikož jejich výskyt v olejích nebyl předpokládán, protože zakoupené oleje

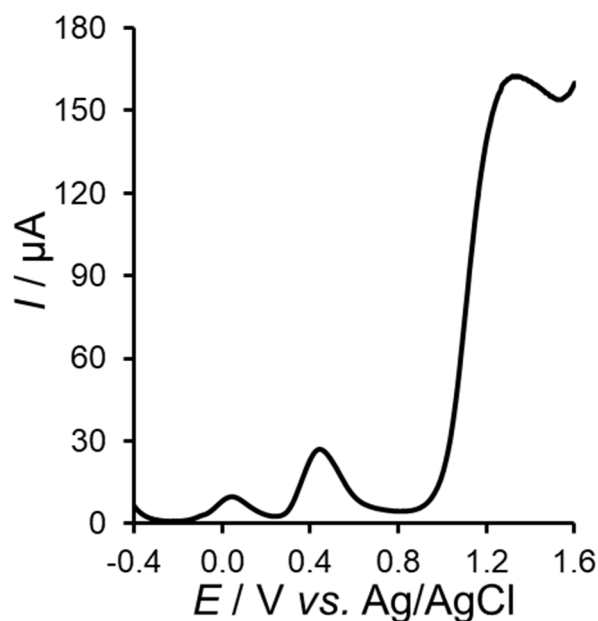
nebyly fortifikovány těmito látkami. Retinyl acetát poskytoval oxidační pík při 0,95 V a retinyl palmitát při 1,18 V. V případě β -karotenu pro potenciálový rozsah od -0,4 do 1,6 V nebyl pozorován žádný významný anodický pík.



Obr. 13. Opakující se CV (3 cykly) na CPE s fylochinonem (A), α -tokoferolem (B) a cholekalciferolem (C) měřená v octanovém pufru o pH 4,2 při $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$ a $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Následně byla připravena CPE o ohmickém odporu $7,2 \Omega$ s obsahem 1 % (w/w) fylochinonu, 1 % (w/w) α -tokoferolu, 1 % (w/w) cholekalciferolu a 17 % (w/w) parafínového oleje, která byla změřena při optimálních podmínkách. Příslušný voltamogram za optimálních podmínek SWV je zobrazen na Obr. 14, kdy je vidět, že fylochinon poskytuje signál při 0,16 V, α -tokoferol při 0,48 V a cholekalciferol při 1,19 V. Píky se vzájemně nepřekrývají, a proto je možné tyto vitamíny stanovit vedle sebe, což platí pouze u modelových systémů. Rostlinné

oleje většinou obsahují všechny formy vitamínu E a další fenolické látky, jejichž píky budou zcela jistě překrývat píky výše uvedených látek.



Obr. 14. Voltamogram náležící CPE s obsahem 1 % (w/w) fylochinonu, 1 % (w/w) α -tokoferolu, 1 % (w/w) cholekalciferolu a 17 % (w/w) parafínového oleje v octanovém pufru o pH 4,2 během AbrSV při $E_{\text{dep}} = -0,4$ V, $E_{\text{step}} = 5$ mV, $E_{\text{ampl}} = 25$ mV, $f = 40$ Hz a $t_{\text{dep}} = 30$ s.

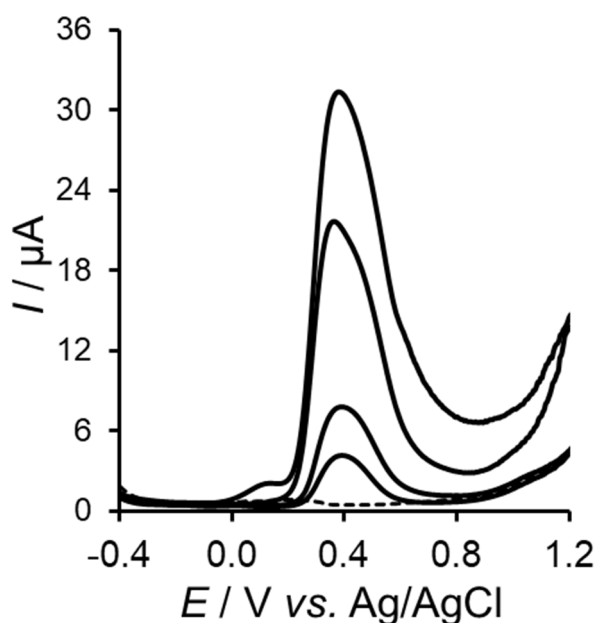
3.7. Semikvantitativní analýza α -tokoferolu

Z literatury je známo, že vitamin E, zejména α -tokoferol a γ -tokoferol představují hlavní elektroaktivní složku, která je v oleji vysoce obsažena. Například plně rafinované řepkové oleje obsahují pořád až 80 mg na 100 g oleje, přestože rafinace může způsobit ztráty až 70 % VE [99]. Lze tedy předpokládat minimální obsah 0,1 % (w/w) VE dokonce i u rafinovaného oleje.

V této části studie byly připraveny čtyři CPE s různými koncentracemi α -tokoferolu: 0,5, 1,0, 2,5 a 5 % (w/w) jenž měly ohmické odpory 14,7, 14,2, 10,4 a 13,5 Ω . Obr. 15 ukazuje anodické voltamogramy zaznamenané na modelových CPE, které se liší obsahem α -tokoferolu (w/w).

Výška anodického píku rostla (I_p^a) se zvyšujícím se obsahem α -tokoferolu (w/w), kdy byla dosažena lineární závislost popsaná rovnicí lineární regrese $I_p^a = -0,6691 + 8,8263$ (w/w) s $R^2 = 0,9978$ pro koncentrační rozsah od 0,5 do 2,5 % (w/w) α -tokoferolu.

Kvůli relativně vysoké RSD kolem 10 % lze předpovědět limit kvantifikace (LOQ) a limit detekce (LOD) 0,45 % a 0,15 % (w/w) α -tokoferolu.



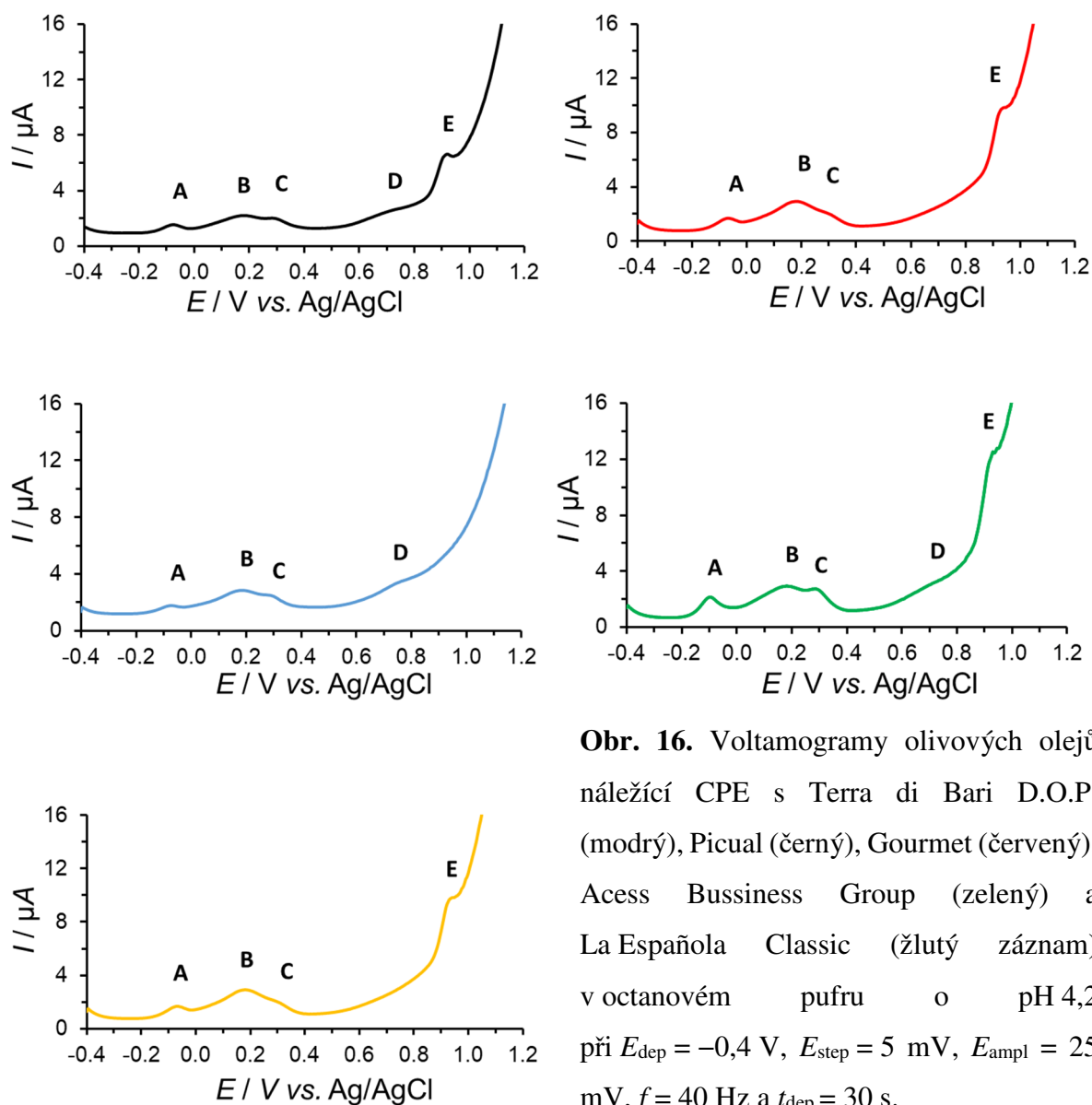
Obr. 15. Voltamogramy semikvantitativního stanovení α -tokoferolu náležící CPE s obsahem 0,5 %, 1 %, 2,5 % a 5 % (w/w) α -tokoferolu a 19,5 %, 19 %, 17,5 % a 15 % (w/w) parafínového oleje, 80 % grafitového prášku CR-2 analyzovaném v octanovém pufru o pH 4,2 během AbrSV při $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$, $f = 2 \text{ Hz}$ a $t_{\text{dep}} = 30 \text{ s}$.

Pokud se nahradí výška píku za plochu (A_p^a) lze získat lineární rozsah až k 5 % (w/w) α -tokoferolu, který lze charakterizovat rovnicí regrese $A_p^a = 0,2873 + 1,5967 (w/w)$ s $R^2 = 0,9578$. Z velikostí hodnot LOD a LOQ je možné usoudit, že AbrS by mohla posloužit i jako semikvantitativní elektroanalytická metoda pro sledování celkového obsahu vitamínu E vyjádřeného jako hmotnostní ekvivalent α -tokoferolu ve vzorcích rostlinných olejů, které neprošly rafinací. Nicméně je nutné připomenout, že kvantitativní analýza pomocí AbrSV nebyla ústředním tématem této diplomové práce.

3.8. Kvalitativní analýza olivových olejů

Tak aby se ověřila spolehlivost vyvinuté metody AbrSV bylo proměřeno pět různých vzorků olivových olejů, kdy se předpokládal stejný tvar voltamogramů (otisk prstu). CPE vždy obsahovaly stejný podíl vybraného oleje (20 % w/w), kdy všechny vykazovaly ohmický odpor

maximálně do 8 Ω . Na Obr. 16. jsou ukázány tyto voltamogramy, kde je vidět, že všechny olivové oleje si jsou podobné množstvím, velikostí i rozložením oxidačních píků.

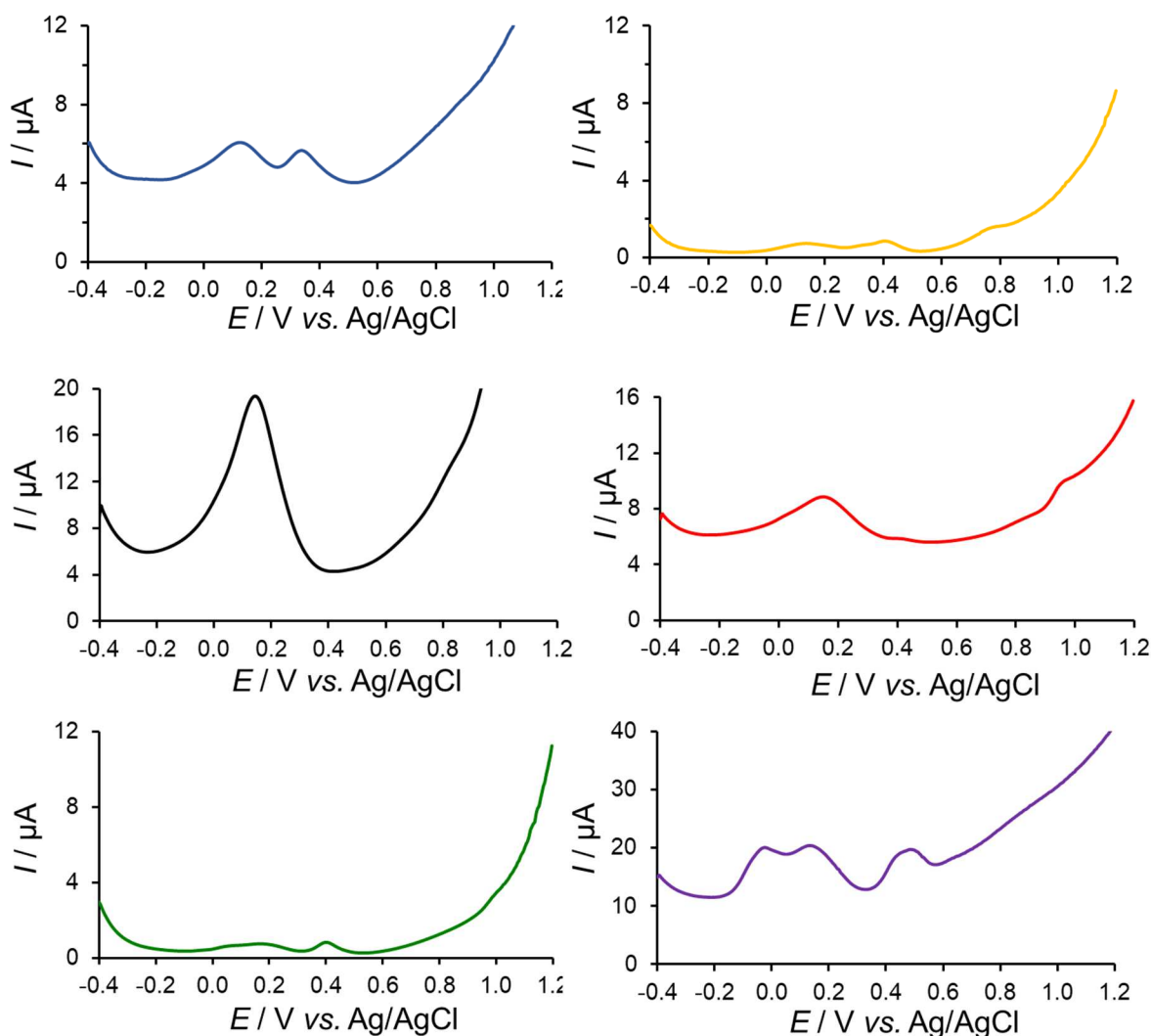


Obr. 16. Voltamogramy olivových olejů náležící CPE s Terra di Bari D.O.P. (modrý), Picual (černý), Gourmet (červený), Acess Bussiness Group (zelený) a La Española Classic (žlutý záznam) v octanovém pufru o pH 4,2 při $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$, $f = 40 \text{ Hz}$ a $t_{\text{dep}} = 30 \text{ s}$.

Na základě hodnot potenciálů jednotlivých píků (E_p), které je možné porovnat s připravenými standardy a s hodnotami uvedenými v předchozí kapitole. Vzorke olivových olejů poskytovaly maximálně pět rozlišitelných píků s relativně nízkými proudy. Lze tedy předpokládat, že olivové oleje jsou bohaté na množství elektroaktivních látek o nízké koncentraci. Dle průměrného obsahu biologicky aktivní látek v olivových olejích je možné předpokládat a pravděpodobně i přiřadit jednotlivé anodické píky k příslušným oxidačním reakcím, a to pík A pro hydroxytyrosol, píky B a C pro tokoferoly, pík D pro karotenoidy a pík E pro tyrosol.

3.9. Analýza rostlinných olejů

Jak je zjevné z předchozí kapitoly oleje stejného rostlinného původu mají podobné voltamogramy. Kromě olivových olejů byly analyzovány i dva oleje dýňové Dynka a Kürbiskernöl, slunečnicový Slunka, řepkový Manka, lněný olej a chia olej. Všechny elektrody byly namíchány ve stejném poměru jako v případě olivových olejů a neměly ohmický odpor vyšší než 16 Ω .



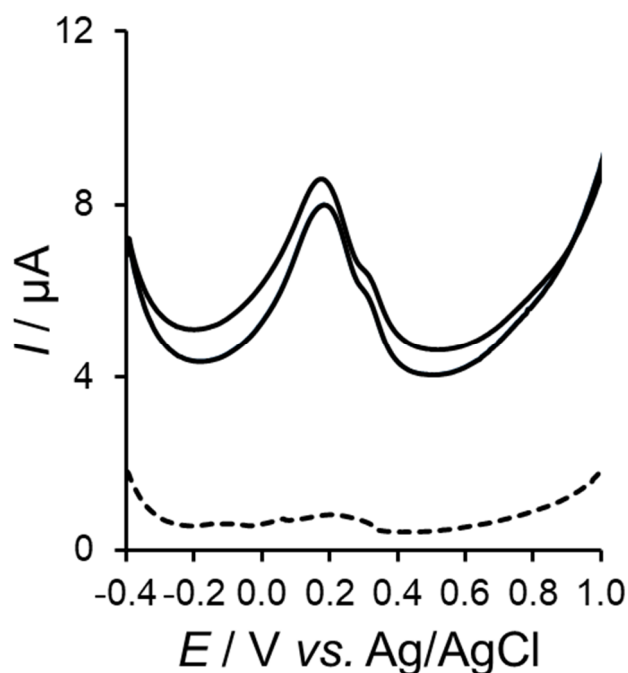
Obr. 17. Voltamogramy rostlinných olejů příslušící CPE připravených ze slunečnicového (modrý), řepkového (žlutý), lněného (černý), dýňového Kürbiskernöl (červený) a Dynka (zelený) a chia oleje (fialový záznam) v octanovém pufru o pH 4,2 při $E_{\text{dep}} = -0,4$ V,

$$E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}, E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}, f = 40 \text{ Hz a } t_{\text{dep}} = 30 \text{ s.}$$

Anodické píky u dýňových olejů (zelené a červené voltamogramy na Obr. 17) se dají přiřadit oxidacím fenolickým látek ($E_p = 0,17$ a $0,4$ V). U oleje Kürbiskernöl lze předpokládat vyšší obsah tyrosolu ($E_p = 0,96$ V). U lněného oleje (černý) a chia oleje (fialový voltamogram) je vidět vyšší podíl tokoferolů a tokotrienolů, u kterých se dá předpokládat stejné elektrochemické chování. Naopak u řepkového oleje (žlutý voltamogram) je více různých píků patřících zřejmě taktéž tokoferolům a tokotrienolům, ale o nižší koncentraci.

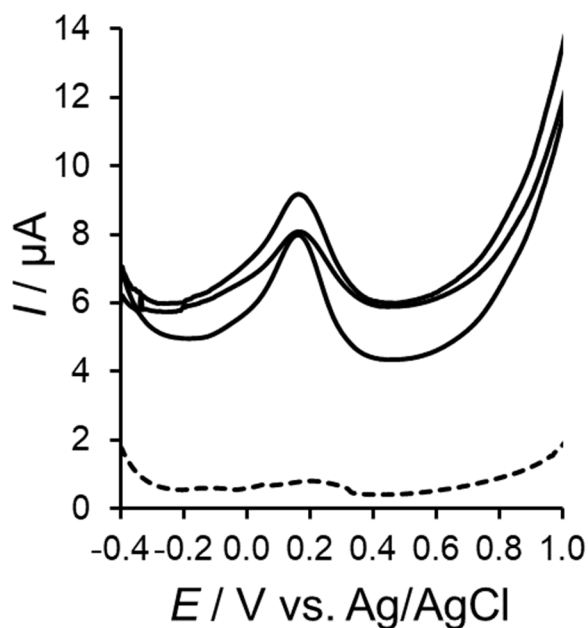
3.10. Analýza živočišných tuků

Jako doplněk k rostlinným olejům byly analyzovány dva živočišné tuky v očekávání vyššího zastoupení vitamínu D3. Byla připravena elektroda s 20 % (w/w) vepřového sádla o $R = 6,8 \Omega$. Bylo provedeno patnáct měření, z nichž výsledky nebyly reprodukovatelné zřejmě z důvodu obsahu vody, kdy obsah nesmí přesahovat 0,5 % (w/w). Na Obr. 18 jsou uvedeny záznamy AbrSV vepřového sádla (12 a 14 opakování).



Obr. 18. Voltamogramy vepřového sádla příslušící CPE v octanovém pufru o pH 4,2 při $E_{\text{dep}} = -0,4$ V, $E_{\text{step}} = 5$ mV, $E_{\text{ampl}} = 25$ mV, $f = 40$ Hz a $t_{\text{dep}} = 30$ s.

Stejným způsobem byla připravena elektroda s 20 % (w/w) rybího oleje o $R = 5,3 \Omega$ (viz. Obr. 19). Pro oba vzorky nebyly nalezeny další oxidační píky nad hodnotou potenciálu 1,2 V. Tudíž obsah cholekalciferolu nebyl potvrzen a spíše se ukazuje, že tyto živočišné tuky jsou bohaté na vitamin E.

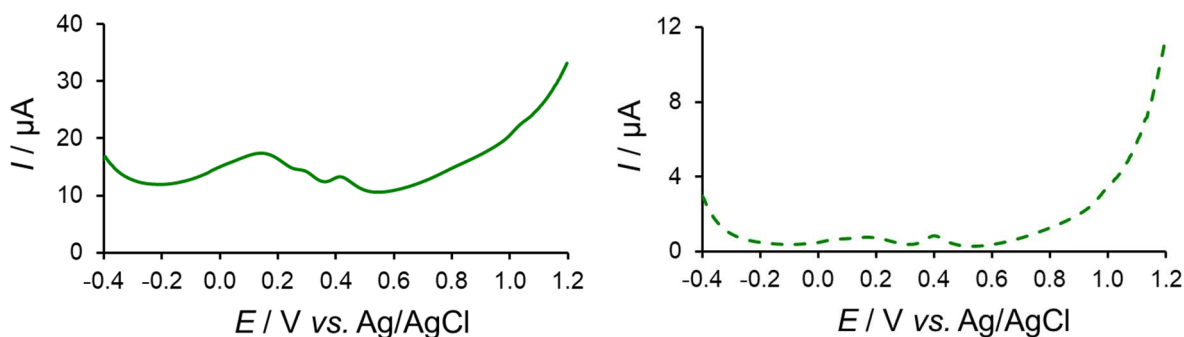


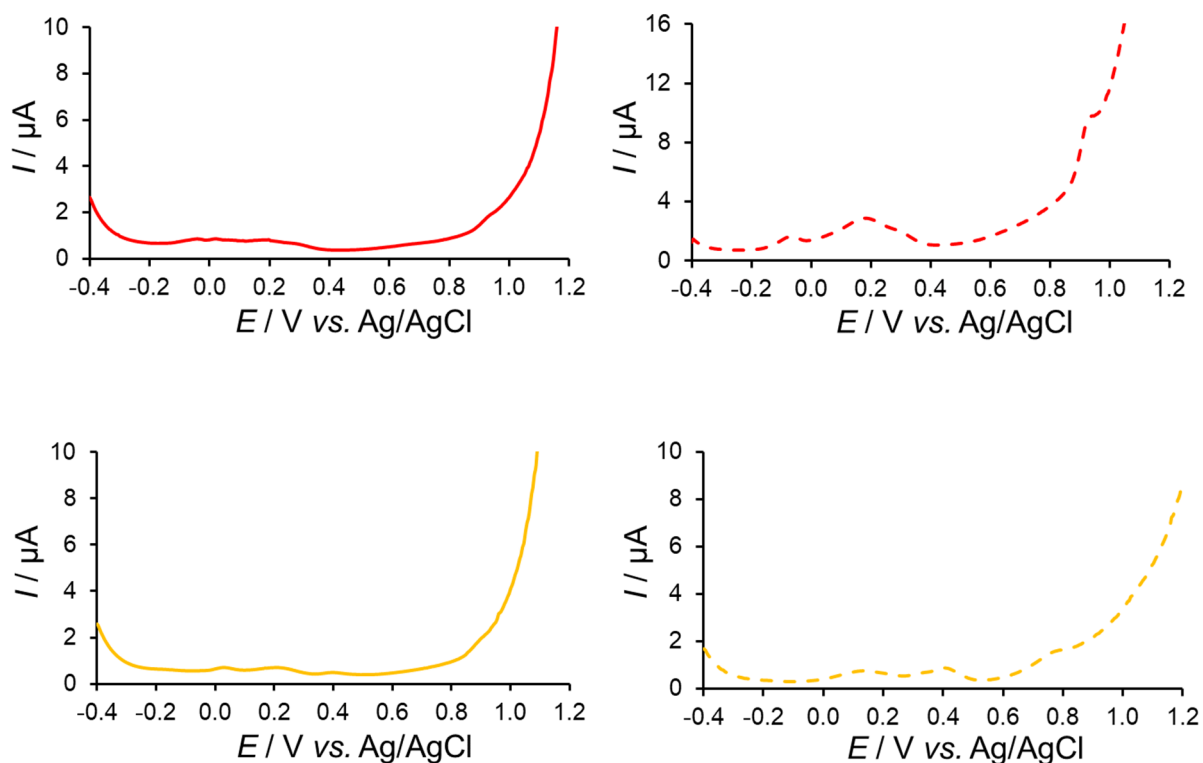
Obr. 19. Voltamogramy rybího oleje náležící CPE v octanovém pufru o pH 4,2 při $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$, $f = 40 \text{ Hz}$ a $t_{\text{dep}} = 30 \text{ s}$.

3.11. Kvalitativní analýza neznámých vzorků

Pro ověření správnosti kvalitativní analýzy pomoci vyvinuté metody AbrSV, byly náhodně vybráni tři zástupci již analyzovaných rostlinných olejů. CPE poskytovaly ohmický odpor $7,0 \Omega$ pro vzorek 1, $7,2 \Omega$ pro vzorek 2 a $5,0 \Omega$ pro vzorek 3. Příslušné voltamogramy jsou zobrazeny na Obr. 20, kde vlevo jsou vzorky a vpravo standardy.

Po porovnání těchto záznamů se dalo usoudit, že vzorek jedna patří dýňovému oleji Dynka, vzorek 2 řepkovému oleji Manka a vzorek 3 olivovému oleji od distributora Acess Bussiness Group.





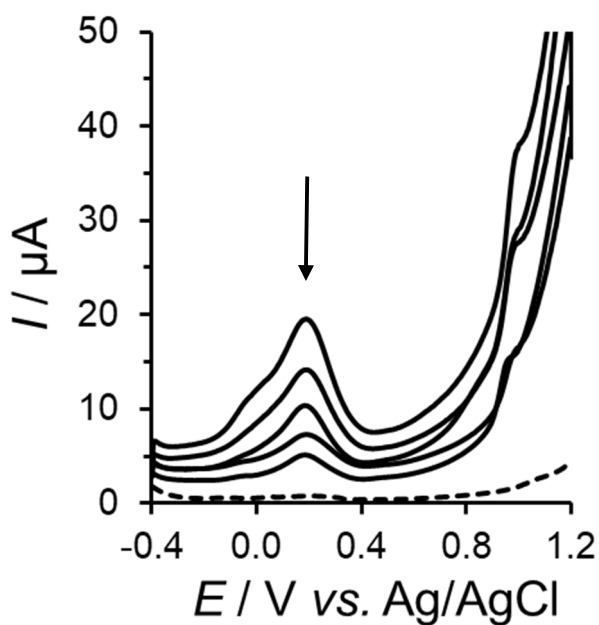
Obr. 20. Voltamogramy již analyzovaných rostlinných olejů příslušící CPE připravených z dýňového (zelený), olivového (červený) a řepkového (žlutý), v octanovém pufru o pH 4,2 při $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$, $f = 40 \text{ Hz}$ a $t_{\text{dep}} = 30 \text{ s}$. Voltamogramy standardů jsou zobrazeny přerušovanou čarou.

3.12. Tepelná stabilita rostlinných olejů

V zásadě je možné předpokládat, že vyvinutý postup pro analýzu pomocí AbrSV by mohl sloužit k jednoduché a levné kontrole kvality olejů pomocí sledování koncentrace elektroaktivních organických látek (biomarkerů) po stanovenou dobu. Tato teorie byla ověřena jednoduchým experimentem, ve kterém byl řepkový olej Lukana zahříván na $150 \text{ }^\circ\text{C}$ a vždy po pěti minutách byl odebrán vzorek. Ten byl schlazen a z něj se vyrobila odpovídající CPE. Jednalo se o elektrody s nezahříváním olejem a s olejem zahříváním na 5, 10, 15 a 20 min. Odporů těchto CPE se pohybovaly v rozmezí ohmických odporů $4,2\text{-}10 \text{ } \Omega$.

Na Obr. 21 byl pozorován typický pokles anodického proudu při $0,215 \text{ V}$. Tento jev pravděpodobně odpovídá degradaci tokoferolů a doprovodných fenolických sloučenin, které jsou způsobeny hlavně oxidací atmosférickým kyslíkem [100] a jejich reakcí s volnými radikály [101;102]. Pro srovnání literatura uvádí, že asi 7 % γ -tokoferolu a 12 % α -tokoferolu ubylo (degradovalo), když byl rafinovaný řepkový olej zahříván na $180 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut.

Po 8 hodinách při stejné teplotě poklesl obsah obou izomerů tokoferolů o 29 %, respektive o 30 % [103]. Z toho se dá vyvodit závěr, že se dá AbrSV použít při studiu degradace bioaktivních látek a jako vhodná screeningová elektrochemická metoda pro hodnocení kvality rostlinných olejů během skladování.



Obr. 21. Voltamogramy řepkového oleje získané na CPE po zahřívání oleje na 150 °C po dobu 0, 5, 10, 15 a 20 min. v octanovém pufru o pH 4,2 při $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$, $f = 40 \text{ Hz}$ a $t_{\text{dep}} = 30 \text{ s}$.

4. Závěr

Získané výsledky naznačují, že by bylo možné vyvinout jednoduchou, levnou, účinnou a semikvantitativní screeningovou elektroanalytickou metodu pro hodnocení kvality rostlinných olejů pomocí abrasivní stripping voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě, která byla připravena z levného grafitového prášku a analyzovaného vzorku rostlinného oleje.

Byly zkoumány všechny základní experimentální podmínky včetně výběru uhlíkového materiálu nebo parametrů square wave voltametrie. K voltametrické detekci elektroaktivních organických látek obsažených v oleji dochází při rozdílných potenciálech. Každý rostlinný olej poskytuje charakteristický tvar voltametrického záznamu s různým počtem píků o různé velikosti, tzv. „elektrochemický otisk palce“. Získané laboratorní výsledky naznačují, že by abrazivní square wave voltametrie mohla sloužit k rutinním laboratorním kontrolám pravosti a také jako indikátor čerstvosti.

Reference

- [1] CXS 19-198: Standard for Edible Fats and Oils not Covered by Individual Standards, Amended in 2009, *Codex Alimentarius*, 1981.
- [2] CXS 210-1999: Standard for Named Vegetable Oils, Amended in 2019, *Codex Alimentarius*, 1999.
- [3] Vyhláška 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje (§26). *Sbírka zákonů České republiky 2016*, částka 162.
- [4] Hamm W., Hamilton R. J., Calliauw G.: *Edible Oil Processing*, kap. 3., 2nd Edition, John Wiley & Sons, 2013.
- [5] Tauferová A., Ošťádalová M., Javůrková Z., Petrášová M., Čáslavková P.: Technologie hygieny potravin rostlinného původu I., II.. *Ústav hygieny a technologie vegetabilních potravin*, 2014.
- [6] Hamm W., Hamilton R. J., Calliauw G.: *Edible Oil Processing*, kap. 5., 2nd Edition, John Wiley & Sons, 2013.
- [7] Gupta M. K.: *Practical Guide to Vegetable Oil Processing*, kap.4., 2nd Edition, AOCS Press, 2017.
- [8] Gupta M. K.: *Practical Guide to Vegetable Oil Processing*, kap.5., 2nd Edition, AOCS Press, 2017.
- [9] Seçmeler Ö., Üstündağ Ö. G.: Behavior of lipophilic bioactives during olive oil processing. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 199, 9 (2017).
- [10] Kadlec P., Melzoch K., Voldřich M.: *Co byste měli vědět o výrobě potravin?*, kap. 5, Key Publishing s.r.o., 2009.
- [11] Sampaio K. A., Ayala J. V., Hoed V., Monteiro S., Ceriani R., Verhé R., Meirelles A.: Impact of crude oil quality on the refining conditions and composition of nutraceuticals in refined palm oil. *J. Food Sci.* 82, 1842 (2017).
- [12] Gaber M., Tujillo F., Mansour M., Juliano P.: Improving oil extraction from canola seeds by conventional and advanced methods. *Food Eng. Rev.* 10, 198 (2018).
- [13] Mancini A., Imperilini E., Nigro E., Montagnese C., Daniele A., Orrú S., Buono P.: Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: effects on health. *Molecules* 20, 26 (2015).
- [14] Mba O., Dumont M., Ngadi M.: Palm oil: processing, characterization and utilization in the food industry. *Food Biosci.* 10, 26 (2015).

- [15] Owolarafe O. K., Faborode M. O., Ajibola O.: Comparative evaluation of the digester-screw press and a hand-operated hydraulic press for palm fruit processing. *J. Food Eng.* 52, 249 (2002).
- [16] Poku K.: *Small-Scale Palm Oil Processing in Africa*, kap. 3, Agric. Serv. Bull. (F. A. O.), 2002.
- [17] Man E. L. Y., Buharum A.: A Qualitative approach of identifying major cost influencing factors in palm oil mills and the relations towards production post of crude palm oil. *Am. J. Appl. Sci.* 8, 441 (2010).
- [18] Shahidi F.: *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, kap. 15, Elsevier, 2015.
- [19] Teh S. S., Lau H. L. N.: Quality assessment of refined red palm-pressed mesocarp olein. *Food Chem.* 340, (2021).
- [20] Gunstone F. D.: *Vegetable oils in food technology; composition, properties and uses*, kap. 4, 2nd Edition, 2011.
- [21] Brát J.: *Jak poznáme kvalitu? Tuky a oleje*. Česká technologická platforma pro potraviny, 2018.
- [22] Shahidi F.: *Bailey's industrial oil and fat products*, 6th edition, vol. 2, John Wiley & Sons, 2005.
- [23] Fine F., Brochet C., Gaud M., Carre P., Simon N., Ramli F., Joffre F.: Micronutrients in vegetable oils: the impact of crushing and refining processes on vitamins and antioxidants in sunflower, rapeseed, and soybean oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118, 680 (2016).
- [24] Rass M., Schein C., Matthäus B.: Virgin sunflower oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 618 (2008).
- [25] Liu R., Lu M., Zhang T., Zhang Z., Jin Q., Chang M., Wang X.: Evaluation of the antioxidant properties of micronutrients in different vegetable oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 122, 1 (2020).

- [26] López-Miranda J., Pérez-Jiménez F., Ros E.: Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases* 20, 284 (2010).
- [27] *CXS 33-1981*: Standard for olive oils and olive pomace oils, Amended in 2013, codex Alimentarius, 1981.
- [28] Galanakis C.: *Innovations in Traditional Foods*, kap. 8, Elsevier, 2019.
- [29] Chanioti S., Tzia C.: Evaluation of ultrasound assisted and conventional methods for production of olive pomace oil enriched in sterols and squalene. *ACS Food Sci. Technol.* 99, 209 (2019).
- [30] Kanakis P., Termentzi A., Michel T., Gikas E., Halabalaki M., Skaltsounis A.: From olive drupes to olive oil. An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. *Planta Med.* 79, 1576 (2013).
- [31] Frankel E.J., Lozano-Sanchez A., Segura-Carretero, Fernandez-Gutierrez A.: Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds: potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 61, 5179 (2013).
- [32] Icerale S., Lcas L., Keast R.: Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr. Opin. Biotechnol.* 32, 129 (2012).
- [33] Ghazani S., Marangoni A.: Minor components in canola oil and effects of refining on these constituents: a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 90, 923 (2013).
- [34] Yang L. X. R., Lv C.: Effect of chlorophyll on lipid oxidation of rapeseed Oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 121, 1 (2019).
- [35] Kucukkolbasi S., Temur O., Kara H., Khaskheli A.: Monitoring of Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II) during refining of some vegetable oils using differential pulse anodic Stripping voltammetry. *Food Anal. Methods* 7, 872 (2014).
- [36] Servili M., Sordini B., Esposto S. Urbani S., Veneziani G., Maio I., Selvaggini R., Taticchi A.: Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants* 3, 1 (2014).
- [37] Vitamin E, dostupné z: www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92153.aspx, staženo 22. 4. 2021.
- [38] Fernández E., Vidal L., Canals A.: Rapid determination of hydrophilic phenols in olive oil by vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and screen-printed carbon electrodes. *Talanta* 181, 44 (2018).

- [39] Caruso C.: Phenolic compounds in extra virgin olive oil stimulate human osteoblastic cell proliferation. *PLOS One* 11, (2016).
- [40] Gupta M. K.: *Practical Guide to Vegetable Oil Processing*, kap.2., 2nd Edition, AOCS Press, 2017.
- [41] Caponio F., Alloggio V., Gomes T.: Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chem.* 64, 203 (1999).
- [42] Andjelkovic M., Van Camp J., Trawka A., Verhé, R.: Phenolic compounds and some quality parameters of pumpkin seed oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 208 (2010).
- [43] Nestola M, Schmidt T.: Fully automated determination of the sterol composition and total content in edible oils and fats by online liquid chromatography-gas chromatography-flame ionization detection. *J. Chromatogr. A* 146, 136 (2016).
- [44] Yang R., Zhang P. L., Yu L., Mao J., Wang X., Zhang Q.: A review of chemical composition and nutritional properties of minor vegetable oils in China. *Trends Food Sci. Technol.* 74, 26 (2018).
- [45] Otles S., Cagindi O.: Determination of vitamin K1 content in olive oil, chard and human plasma by RP-HPLC method with UV–Vis detection. *Food Chem.* 100, 1220 (2007).
- [46] Webster R. D.: Voltammetry of the liposoluble vitamins (A, D, E and K) in organic solvents. *Chem. Rec.* 12, 188 (2012).
- [47] Rébufa C., Artaud J.: Analytical Determination of Phylloquinone (Vitamin K1) in olive oils: comparison with other vegetable oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 120, 1 (2018).
- [48] Vitamin D, www.britannica.com/science/vitamin-D, staženo 22. 4. 2021.
- [49] Žabčíková S.: *Disertační práce*. Univerzita Pardubice, Pardubice, 2018.
- [50] Nabilah K. M.: Production of refined red palm-pressed fibre oil from physical refining pilot plant. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering* 2, 100035 (2020).
- [51] Su Q., Rowley K.G., Itsiopoulos C., O’Dea K.: Identification and quantitation of major carotenoids in selected components of the mediterranean diet: green leafy vegetables, figs and olive oil. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, 1149 (2002).
- [52] Sirohi A., Pundhir A., Chosh S.: Food fortification: a nutritional management strategy in India. *Inn. J. Food Sci.* 6, (2018).
- [53] Biesalski H., Drewnowski A., Dwyer J., Strain J., Weber P., Eggersdorfer M.: *Sustainable Nutrition in a Changing World*, s. 295, Springer, Cham., 2017.
- [54] Hamm W., Hamilton R. J., Calliauw G.: *Edible Oil Processing*, kap. 1., 2nd Edition, John Wiley & Sons, 2013.
- [55] ČSN EN ISO 6884: Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení popela.

- [56] ČSN EN ISO 3961 (588761): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení jodového čísla.
- [57] ČSN EN ISO 660 (588756): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení čísla kyselosti a kyselosti.
- [58] ČSN EN ISO 3657 (580132): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení čísla zmýdelnění.
- [59] ČSN EN ISO 3960 (588765): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení peroxidového čísla - Jodometrické (vizuální) stanovení koncového bodu.
- [60] ČSN EN ISO 6885 (588777): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení anidisinového čísla.
- [61] ČSN EN ISO 6886 (588774): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení oxidační stability (zrychlený oxidační test).
- [62] ČSN EN ISO 6800 (588799): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení složení mastných kyselin v triacylglycerolech vázaných v poloze 2.
- [63] ČSN EN ISO 8420 (588809): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení obsahu polárních látek.
- [64] ČSN EN ISO 15788-1 (588722): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení stigmastadienů v rostlinných tucích - Část 1: Metoda kapilární plynové chromatografie.
- [65] ČSN EN ISO 15788-2 (588722): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení stigmastadienů v rostlinných tucích - Část 2: Metoda HPLC.
- [66] ČSN EN ISO 12966-1 (588767): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin - Část 1: Směrnice pro moderní plynovou chromatografii methylesterů mastných kyselin.
- [67] ČSN EN ISO 12228-1 (588800): Stanovení obsahu jednotlivých a celkových sterolů - Metoda plynové chromatografie - Část 1: Živočišné a rostlinné tuky a oleje.
- [68] ČSN EN ISO 9936 (588723): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení obsahu tokoferolu a tokotrienolu metodou HPLC.
- [69] ČSN EN 12823-1 (560048): Potraviny - Stanovení vitamínu A metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie - Část 1: Stanovení all-E-retinolu a 13-Z-retinolu.
- [70] ČSN EN 12823-2 (560048): Potraviny - Stanovení vitamínu A metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie - Část 2: Stanovení beta-karotenu.
- [71] ČSN EN 12821 (560047): Potraviny - Stanovení vitamínu D metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie - Stanovení cholekalciferolu (D3) nebo ergokalciferolu (D2).
- [72] ČSN EN 14148 (560053): Potraviny - Stanovení vitamínu K1 metodou HPLC.

- [73] ČSN EN ISO 15753 (588724): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků.
- [74] ČSN P ISO/TS 21033+Amd. 1 (580130): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení stopových prvků optickou emisní spektroskopií (ICP-OES) s indukčně vázaným plazmatem.
- [75] ČSN EN ISO 11702 (588730): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Enzymatické stanovení celkového obsahu sterolů.
- [76] ČSN EN ISO 27107 (588778): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení peroxidového čísla - Potenciometrické stanovení koncového bodu.
- [77] ČSN EN ISO 8534 (588727): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení obsahu vody - Metoda Karl Fischera (za nepřítomnosti pyridinu).
- [78] Apetrei C., Rodríguez-Médez M. L., Saja J. A.: Modified carbon paste electrodes for discrimination of vegetable oils. *Sens. Actuators, B 111-112*, 403 (2005).
- [79] Vasilescu I., Eremia S. A. V., Albu C., Radoi A., Litescu S. C.: Determination of the antiradical properties of olive oils using an electrochemical method based on DPPH radical. *Food Chem. 166*, 324 (2015).
- [80] Sýs M., Jashari G., Švecová B., Arbneshi T., Metelka R.: Determination of vitamin K1 using square wave adsorptive stripping voltammetry at solid glassy carbon electrode. *J. Electroanal. Chem. 821*, 10 (2018).
- [81] Gulaboski R.: Mirčeski V., Mitrev S.: Development of a rapid and simple voltammetric method to determine total antioxidative capacity of edible oils. *Food Chem. 138*, 116 (2013).
- [82] Lv X., Zhao J., Dong X., Tian H., Qi S., Jiang Y., Ping Y.: Electrochemical determination of vitamin A based on a novel nanoalloy modified carbon paste electrode. *Int. J. Electrochem. Sci. 12*, 8457 (2017).
- [83] Tan S. Y., Urbančok D., Webster R. D.: Contrasting voltammetric behavior of different forms of vitamin A in aprotic organic solvents. *J. Phys. Chem. B 118*, 8591 (2014).
- [84] Đurović A., Stojanović Z., Kravić S., Kos J., Richtera L.: Electrochemical determination of vitamin D3 in pharmaceutical products by using boron doped diamond electrode. *Electroanalysis 32*, 741 (2020).
- [85] Tan Y. S., Chen S., Hong W. M., Kan J. M., Kwek E. S. H., Lim S. Y., Lim Z. H., Tessensohn M. E., Zhang Y., Webster R. D.: The role of low levels of water in the electrochemical oxidation of α -tocopherol (vitamin E) and other phenols in acetonitrile. *Phys. Chem. Chem. Phys. 28*, 12745 (2011).

- [86] Sýs M., Žabčíková S., Červenka L, Vytrás K.: Adsorptive stripping voltametry in lipophilic vitamins determination. *Potravinářstvo 10*, 260 (2016).
- [87] Cittan M., Kocak S., Celik A., Dost K.: Determination of oleuropein using multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode by adsorptive stripping square wave voltammetry. *Talanta 159*, 148 (2016).
- [88] Scholz F., Lange B.: Abrasive stripping voltammetry - an electrochemical solid state spectroscopy of wide applicability. *TrAC, Trends Anal. Chem. 11*, 359 (1992).
- [89] Chatterjee A., Wiltshire R., Holt K. B., Compton R.G., Foord J.S., Marken F.: Abrasive stripping voltammetry of silver and tin at boron doped diamond electrodes. *Diamond Relat. Mater. 11*, 646 (2002).
- [90] Shahidi F., de Camargo A. C.: Tocopherols and tocotrienols in common and emerging dietary sources: occurrence, applications, and health benefits. *Int. J. Mol. Sci. 10*, 1745 (2016).
- [91] Gebregziabher B. S., Zhang S., Qi J., Azam M., Ghosh S, Feng Y., Huai Y., Li J., Li B., Sun J.: Simultaneous determination of carotenoids and chlorophylls by the HPLC-UV-VIS method in soybean seeds. *Agronomy 11*, 758 (2021).
- [92] Majchrzak T., Wojnowski W., Dymerski T., Gebicki J.: Electronic noses in classification and quality control of edible oils: a review. *Food Chem. 246*, 192 (2018).
- [93] Apetrei L. M., Apetrei C.: Detection of virgin olive oil adulteration using a voltammetric e-tongue. *Comput. Electron. Agric. 108*, 148 (2014).
- [94] Semenov V., Volkov S., Khaydukova M., Fredorov A., Lisitsyna I., Kirsanov D., Legin A.: Determination of three quality parameters in vegetable oils using potentiometric e-tongue. *J. Food Compos. Anal. 75*, 75 (2019).
- [95] Robledo S. N.: Tesio A. Y., Ceballos C. D., Zon M. A., Fernandez H.: Electrochemical ultra-micro sensors for the determination of synthetic and natural antioxidants in edible vegetable oils. *Sens. Actuators, B 192*, 467 (2014).
- [96] Robledo S. N., Zchetti V. G. L., Zon M. A., Fernandez H.: Quantitative determination of tocopherols in edible vegetable oils using electrochemical ultra-microsensors combined with chemometric tools. *Talanta 116*, 964 (2013).
- [97] Sýs M., Farag A. S., Švancara I.: Extractive stripping voltammetry at carbon paste electrodes for determination of biologically active organic compounds. *Monatsh. Chem. 150*, 373 (2019).

- [98] Mikysek T., Švancara I., Kalcher K., Bartoš M., Vytřas K., Ludvik J.: New approaches to the characterization of carbon paste electrodes using the ohmic resistance effect and qualitative carbon paste indexes. *Anal. Chem.* *81*, 6327 (2009).
- [99] Ergönül P. G., Köseoğlu O.: Changes in α -, β -, γ - and δ -tocopherol contents of mostly consumed vegetable oils during refining process. *CyTA--J. Food* *12*,199 (2004).
- [100] Sabliov C. M., Fronczek C., Astete C. E., Khachatryan M., Khachatryan L., Leonardi C.: Effects of temperature and UV light on degradation of α -tocopherol in free and dissolved form. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *86*, 895 (2009).
- [101] Delgado Adámez J., Baltasar M. N. F., Yuste M. C. A., Martín Vertedor D.: Oxidative stability, phenolic compounds and antioxidant potential of a virgin olive oil enriched with natural bioactive compounds. *J. Oleo Sci.* *63*, 55 (2014).
- [102] Kreps, F., Burčová Z., Schmidt Š.: Degradation of fatty acids and tocopherols to form tocopheryl quinone as risk factor during microwave heating, pan frying and deep fat frying. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *119*, (2017).
- [103] Kasprzak M., Rudzińska M., Przybylski R., Kmiecik D., Siger A., Olejnik A. Q.: The degradation of bioactive compounds and formation of their oxidation derivatives in refined rapeseed oil during heating in model system. *LWT-Food Sci. Technol.* *123*, 109078 (2020).